



24ème Colloque Français des Jeunes Chercheurs en mucoviscidose

7 FEVRIER 2023

INSTITUT IMAGINE
24 boulevard du Montparnasse 75015 PARIS

**Avec le soutien de notre
partenaire :**



 **#CFJC2023**



Programme

Colloque Français des Jeunes Chercheurs

Mardi 7 février 2023

Institut Imagine, Paris

- 8:45 - 9:00 **Accueil et mot de bienvenue** : Pierre Foucaud, vice-président de Vaincre la Mucoviscidose
- 9:00 - 9:30 **Conférence d'ouverture** par Stéphane Devoret, vice-président de Vaincre la Mucoviscidose et le Dr Antoine Roux, médecin au CRCM et centre de transplantation pulmonaire de l'hôpital Foch :
« *La recherche en transplantation pulmonaire dans la mucoviscidose : état des lieux et perspectives* »

- 9:30 - 10:30 **Session 1 : *Pseudomonas aeruginosa* dans tous ses états**
modérée par : Estelle RUFFIER et Romé VOULHOUX

Présentation orale 10 min + 5 min de questions/réponses

1. *KOWALEWSKI Julien* : *Vaincre la résistance de Pseudomonas aeruginosa aux aminoglycosides par la conception d'inhibiteurs d'aminoglycoside phosphotransférases.*
2. *BOSC Lola* : *Caractérisation de la voie Pseudopaline de Pseudomonas aeruginosa et importance dans l'infection.*
3. *DUBOIS Eline* : *Effet de combinaisons huiles essentielles/antibiotiques sur Pseudomonas aeruginosa dans le contexte de la mucoviscidose.*

Ma thèse en 180 secondes + 2 min de questions/réponses

4. *DUPUIS Gabrielle* : *Étude du rôle du facteur de virulence ExoY de Pseudomonas aeruginosa dans la réponse des cellules pulmonaires des patients atteints de mucoviscidose*
5. *DUPUIS Lucas* : *Systèmes de résistance au cuivre de Pseudomonas aeruginosa : rôle dans la défense contre la phagocytose*

Pause (15 min)

- 10:40 - 12:10 **Session 2 : "pot-pourri" (ne vous y trompez pas ça sent super bon!)**
modérée par : Marjolaine GOSSET et Pascale FANEN

Présentation orale 10 min + 5 min de questions/réponses

6. *BARRERO Anna* : *Niveaux d'activité physique chez les patients atteints de mucoviscidose avant et après le traitement par triple modulateur (Kaftrio) : une étude de cohorte rétrospective monocentrique.*
7. *BLOTAS Clara* : *Etude tissu spécifique d'éléments cis-régulateurs du gène CFTR.*
8. *LADUNE Raphaëlle* : *Promotion de l'activité physique adaptée chez les patients atteints de mucoviscidose : développement d'un outil numérique de mesure de la balance décisionnelle.*
9. *PASCAREL Khilian* : *Création d'un modèle de culture cellulaire bronchique mucoviscidosique hypoxique : impact sur les canaux ioniques.*
10. *SANTINELLI Raphaël* : *Restauration du transport du p.phe508del-CFTR par le PF-429242.*

Ma thèse en 180 secondes + 2 min de questions/réponses

11. DUMORTIER Claire : *L'adiposité médullaire est-elle altérée lors de la maladie osseuse liée à la mucoviscidose ?*
12. SERGHERAERT Johan : *Pathologie osseuse relative à la mucoviscidose : Impact des mutations de classe II de CFTR sur les précurseurs ostéoclastiques et leur différenciation.*

12:10 - 13:30 : Pause déjeuner et photo

13 :30 - 14:15 **Session posters 1 (nombre impair)**

14:15 - 15:00 **Session posters 2 (nombre pair)**

15:00 - 16:15 **Session 3 : Myco and co**

modérée par : Nathalie DESIRE et Jean-Luc MAINARDI

Présentation orale 10 min + 5 min de questions/réponses

13. CHESNAY Adélaïde : *L'avènement du Kaftrio dans le traitement de la mucoviscidose : quel impact sur les atteintes aspergillaires ?*
14. GERGES Elias : *Caractérisation du rôle de la protéine Lsr2 dans la virulence des morphotypes lisses et rugueux de Mycobacterium abscessus.*
15. ILLOUZ Morgane : *Rôle des tréhaloses polyphléates dans les interactions entre le phage thérapeutique BPs et Mycobacterium abscessus.*
16. SY Khadeeja Adam : *Impact des médiateurs lipidiques de la résolution de l'inflammation sur la colonisation des cellules épithéliales respiratoires par Aspergillus fumigatus.*

Ma thèse en 180 secondes + 2 min de questions/réponses

17. KHAU Sandra : *Etude de la régulation de l'inflammasome durant la surinfection bactérienne et fongique dans la mucoviscidose.*
18. SARRAZIN Morgane : *Les Cyclipostins/Cyclophostines de nouvelles perspectives dans le traitement des infections à Mycobacterium abscessus*

Pause (15 min)

16:30 - 16:50 **Prix Michel Chignard 2023 : intervention de la lauréate et remise du prix**

16:50 - 17:00 **Annnonce des lauréats des prix du Colloque 2023**

17:00 - 17:15 **Mot de clôture**



Nous remercions la Filière Muco-CFTR pour son soutien à cette journée !

Présentations orales :

N°	NOM Prénom	Thématique de recherche	TITRE	Page
1	KOWALEWSKI Julien	Infection	Vaincre la résistance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux aminoglycosides par la conception d'inhibiteurs d'aminoglycoside phosphotransférases	1
2	BOSC Lola	Infection	Caractérisation de la voie Pseudopaline de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et importance dans l'infection	3
3	DUBOIS Eline	Infection	Effet de combinaisons huiles essentielles/antibiotiques sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dans le contexte de la mucoviscidose	5
4	DUPUIS Gabrielle	Infection	Étude du rôle du facteur de virulence ExoY de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dans la réponse des cellules pulmonaires des patients atteints de mucoviscidose	7
5	DUPUIS Lucas	Infection	Systèmes de résistance au cuivre de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : rôle dans la défense contre la phagocytose	9
6	BARRERO Anna	STAPS	Niveaux d'activité physique chez les patients atteints de mucoviscidose avant et après le traitement par triple modulateur (Kaftrio) : une étude de cohorte rétrospective monocentrique	11
7	BLOTAS Clara	Génétique	Etude tissu spécifique d'éléments cis-régulateurs du gène CFTR	13
8	LADUNE Raphaëlle	STAPS	Promotion de l'activité physique adaptée chez les patients atteints de mucoviscidose : développement d'un outil numérique de mesure de la balance décisionnelle.	14
9	PASCAREL Khilian	Fonction CFTR	Création d'un modèle de culture cellulaire bronchique mucoviscidosique hypoxique : impact sur les canaux ioniques.	16
10	SANTINELLI Raphaël	Fonction CFTR	Restauration du transport du p.phe508del-CFTR par le PF-429242	17
11	DUMORTIER Claire	Pathologies Associées	L'adiposité médullaire est-elle altérée lors de la maladie osseuse liée à la mucoviscidose ?	20
12	SERGHERAERT Johan	Pathologies Associées	Pathologie osseuse relative à la mucoviscidose : Impact des mutations de classe II de CFTR sur les précurseurs ostéoclastiques et leur différenciation.	22
13	CHESNAY Adélaïde	Infection	L'avènement du Kaftrio dans le traitement de la mucoviscidose : quel impact sur les atteintes aspergillaires ?	23
14	GERGES Elias	Infection	Caractérisation du rôle de la protéine Lsr2 dans la virulence des morphotypes lisses et rugueux de <i>Mycobacterium abscessus</i> .	25
15	ILLOUZ Morgane	Infection	Rôle des tréhaloses polyphléates dans les interactions entre le phage thérapeutique BPs et <i>Mycobacterium abscessus</i>	26
16	SY Khadeeja Adam	Infection	Impact des médiateurs lipidiques de la résolution de l'inflammation sur la colonisation des cellules épithéliales respiratoires par <i>Aspergillus fumigatus</i> .	28
17	KHAU Sandra	Infection	Etude de la régulation de l'inflammasome durant la surinfection bactérienne et fongique dans la mucoviscidose.	29
18	SARRAZIN Morgane	Infection	Les Cyclipostins/Cyclophostines de nouvelles perspectives dans le traitement des infections à <i>Mycobacterium abscessus</i> .	31

KOWALEWSKI Julien

VAINCRE LA RESISTANCE DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA AUX AMINOGLYCOSIDES PAR LA CONCEPTION D'INHIBITEURS D'AMINOGLYCOSIDE PHOSPHOTRANSFERASES

Julien Kowalewski, Mathilde Tomaszczyk

Jean-François Guichou

Muriel Gelin

Gilles Labesse

Gerard D. Wright

Corinne Lionne

1. Centre de Biologie Structurale, Université de Montpellier, Montpellier

2. David Braley Centre for Antibiotic Discovery, M.G. DeGrootte Institute for Infectious Disease Research, McMaster University, Hamilton, ON, Canada

Objectifs

La multirésistance est un problème majeur de santé publique nécessitant le développement urgent de nouveaux antibiotiques. Les patients atteints de mucoviscidose sont prédisposés aux infections pulmonaires par des pathogènes opportunistes tels que *P. aeruginosa*. L'inflammation pulmonaire associée à l'infection pyocyanique conduit à des lésions graves pouvant nécessiter une transplantation et, dans les cas les plus graves, conduire au décès.

Les aminoglycosides sont utilisés pour le traitement des infections pyocyanique, mais le développement de résistance à ces antibiotiques augmente la difficulté thérapeutique. L'Aminoglycoside 3'-Phosphotransférase IIb de *P. aeruginosa* est directement impliquée dans cette résistance. La caractérisation structurale et biochimique de cette APH est cruciale pour mieux comprendre son mécanisme et développer des inhibiteurs efficaces pour rétablir la sensibilité des bactéries aux aminoglycosides.

Matériels et méthodes

Expression et purification d'APH(3')-IIb recombinante.

Cristallographie aux rayons X.

Activité enzymatique et affinité (ITC) in vitro.

Mesure de CMI en milieu liquide.

Résultats

La spécificité de substrat de l'APH(3')-IIb de *P. aeruginosa* a été déterminée par enzymologie et mesures d'affinité. Nous avons ainsi identifié les substrats préférentiels de l'APH(3')-IIb comme étant la néomycine (accepteur de phosphate) et le MgATP (donneur de phosphate).

La structure cristallographique de l'APH(3')-IIb en complexe avec le MgADP et la kanamycine A phosphorylée a été résolue à 2.01 Å. L'analyse des interactions entre la protéine et ses ligands naturels a permis de développer un inhibiteur compétitif de l'ATP ayant une affinité sub-micromolaire pour l'APH(3')-IIb.

Cet inhibiteur est capable de réduire les CMI en aminoglycoside mesurées sur des souches de laboratoire et cliniques.

Discussion et conclusions

Actuellement, nous avons identifié un composé, L44, inhibant in vitro l'activité enzymatique de l'APH(3')-IIb et ayant une affinité sous-micromolaire. Les données d'enzymologie et de biologie structurale ont guidé la synthèse chimique de nouvelles molécules dérivées (Pr. F. Hausch, contrat bilatéral ANR/BMBF). Ces composés devraient être encore plus affins (nanomolaires) et spécifiques de l'APH(3')-IIb.

Nos travaux ont un impact sur le concept de réutilisation des antibiotiques conventionnels en contournant la résistance. Cette stratégie pourrait permettre la réutilisation des antibiotiques pour traiter les patients atteints de mucoviscidose infectés par *P. aeruginosa*.

Références

Doi O, Kondo S, Tanaka N, Umezawa H. 1969. Purification and properties of kanamycin-phosphorylating enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antibiot (Tokyo)* 22(6): 273-82.

Ramirez MS, Tolmasky ME. 2010. Aminoglycosides modifying enzymes. *Drug Resistance Updates* 13(6): 151-171.

Stogios PJ, Spanogiannopoulos P, Evdokimova E, Egorova O, Shakya T, Todorovic N, Capretta A, Wright GD, Savchenko A. 2013. Structure-guided optimization of protein kinase inhibitors reverses aminoglycoside antibiotic resistance. *Biochem J* 454(2): 191-200.

Wright GD, Thompson PR. 1999. Aminoglycoside phosphotransferases: proteins, structure, and mechanism. *Front Biosci* 4: D9-21.

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose & Association Grégory Lemarchal

BOSC Lola

CARACTERISATION DE LA VOIE PSEUDOPALINE DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA ET IMPORTANCE DANS L'INFECTION

L. Bosc 1, N. O. Gomez 1&2, G. Ball 1, C. Laffont 3, M. Tribout 1, L. Ouerdane 4, T. Secher 5, N. Heuzé-Vourc'h 5, P. Plésiat 6, P. Arnoux 3, R. Voulhoux 1.

1. CNRS/Aix-Marseille Université LCB UMR7283, Marseille, France
2. Helmholtz Centre for Infection Research GmbH, Braunschweig, Allemagne
3. CEA/CNRS/Aix-Marseille Université, BIAM UMR 7265, CEA Cadarache, Saint-Paul-lez Durance, France
4. Université de Pau et des Pays de l'Adour/CNRS – UMR5254, Pau, France
5. INSERM/Université de Tours, Centre d'Étude des Pathologies Respiratoires, U1100, Tours, France
6. CNRS/Université de Bourgogne Franche-Comté, Lab. de Microbiologie, UMR 6249, Besançon, France

Objectifs

Pseudomonas aeruginosa (Pa) est une bactérie pathogène opportuniste infectant jusqu'à 70% des patients atteints de mucoviscidose et causant de graves infections pulmonaires. Afin de contrer la carence en métaux imposée par l'hôte, Pa synthétise, sécrète et récupère de petites molécules à très forte affinité pour ces métaux, les métallophores. Ainsi, Pa répond à la carence en zinc en sécrétant la pseudopaline (Pp) (1). La voie d'import de zinc par ce zincophore (voie Cnt) est induite lors d'infections (2,3) et nécessaire à la croissance de Pa dans le mucus pulmonaire (4) et le biofilm (5). L'objectif de cette étude est de caractériser les différentes étapes de la voie Cnt et de mieux comprendre son rôle essentiel dans l'infection.

Matériels et méthodes

Les souches de Pa PA14 sauvage (PA14WT) et délétée des gènes cntL (PA14ΔcntL) ou cntT (PA14ΔcntT) sont cultivées en milieu minimum succinate (MS) supplémenté en EDTA (milieu MCM) afin d'induire la carence métallique nécessaire à l'activation de la voie Cnt. L'induction de la voie est vérifiée par western-blot avec un anticorps dirigé contre le récepteur de membrane externe CntO. Les macrophages utilisés sont de lignée RAW 264.7. Les expériences de double hybride bactérien (BACTH) sont réalisées dans *E. coli* BTH101 possédant les plasmides pKNT25 et pUT18C exprimant les fusions T25 et T18 avec les protéines d'intérêt.

Résultats

Une analyse génomique sur une centaine d'isolats cliniques de Pa montre la très forte conservation des gènes cnt. Le rôle important de la Pp lors de l'infection est également confirmé par l'induction de la voie lors d'infection pulmonaire chez la souris. Des expériences supplémentaires d'infection dans le macrophage révèlent qu'une souche de Pa ne produisant plus de Pp (PA14ΔcntL) présente, par rapport à la souche sauvage, un défaut de cytotoxicité et de phagocytose ainsi qu'une plus faible survie intracellulaire et une moindre réponse inflammatoire. Ces phénotypes révèlent un rôle important de la voie Cnt à différents stades de l'infection.

Nous avons par ailleurs identifié un nouvel élément de la voie Cnt, la méthyltransférase CntT (PA14_39660). Nos travaux montrent que CntT, qui est induite en carence en zinc (6), interagit in vivo avec l'enzyme de synthèse de la Pp CntM et méthyle la Pp in vitro. Sachant que PA14ΔcntT présente, par rapport à la souche sauvage, un défaut de formation biofilm accompagné d'une augmentation de la production de CntO, nous proposons que PaCntT produise une forme méthylée de la Pp, importante en condition de biofilm.

Discussion et conclusions

Nos résultats démontrent l'importance de la voie Cnt lors de l'infection aiguë avec des effets multiples et indépendants sur quatre aspects de l'interaction avec le macrophage : cytotoxicité, phagocytose, survie intracellulaire et réponse inflammatoire. Le défaut de formation de biofilm d'un mutant PA14ΔcntL suggère également l'importance de la Pp lors de l'infection chronique, avec un potentiel rôle d'une forme méthylée.

Références

1. Lhospice S, Gomez NO, Ouerdane L, Brutesco C, Ghssein G, Hajjar C, et al. Pseudomonas aeruginosa zinc uptake in chelating environment is primarily mediated by the metallophore pseudopaline. Sci Rep. déc 2017;7(1):17132.
2. Palmer KL, Mashburn LM, Singh PK, Whiteley M. Cystic Fibrosis Sputum Supports Growth and Cues Key Aspects of Pseudomonas aeruginosa Physiology. J Bacteriol. août 2005;187(15):5267-77.
3. Bielecki P, Puchałka J, Wos-Oxley ML, Loessner H, Glik J, Kawecki M, et al. In-Vivo Expression Profiling of Pseudomonas aeruginosa Infections Reveals Niche-Specific and Strain-Independent Transcriptional Programs. Brown SP, éditeur. PLoS ONE. 12 sept 2011;6(9):e24235.
4. Gi M, Lee KM, Kim SC, Yoon JH, Yoon SS, Choi JY. A novel siderophore system is essential for the growth of Pseudomonas aeruginosa in airway mucus. Sci Rep. déc 2015;5(1):14644.
5. Gomez NO, Tetard A, Ouerdane L, Laffont C, Brutesco C, Ball G, et al. Involvement of the Pseudomonas aeruginosa MexAB–OprM efflux pump in the secretion of the metallophore pseudopaline. Mol Microbiol. janv 2021;115(1):84-98.
6. Pederick VG, Eijkelkamp BA, Begg SL, Ween MP, McAllister LJ, Paton JC, et al. ZnuA and zinc homeostasis in Pseudomonas aeruginosa. Sci Rep. oct 2015;5(1):13139.

Ce projet est financé par : Autre : ANR

DUBOIS Eline

EFFET DE COMBINAISONS HUILES ESSENTIELLES/ANTIBIOTIQUES SUR PSEUDOMONAS AERUGINOSA DANS LE CONTEXTE DE LA MUCOVISCIDOSE

Eline Dubois 1, Anne Doléans-Jordheim 2, Karen Moreau 2, Hélène Marchandin 3, Patrick Plésiat 1, Catherine Llanes 1

1. Agents Pathogènes Exposition Résistance et Génomique, UMR CNRS 6249, Université Bourgogne Franche-Comté, Besançon.

2. CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Université de Lyon, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS de Lyon, Lyon.

3. HydroSciences Montpellier, CNRS, IRD, Univ Montpellier, Service de Microbiologie et Hygiène Hospitalière, CHU Nîmes, Nîmes.

Objectifs

L'utilisation d'huiles essentielles (HEs) à visée anti-infectieuse est une pratique répandue chez les patients atteints de mucoviscidose (CF, cystic fibrosis). Cependant, notre équipe a montré que certaines HEs (cannelle et citronnelle) ont une action antagoniste à celle des antibiotiques, soit parce qu'elles induisent la surproduction de mécanismes de résistance, soit parce qu'elles modifient la structure des antibiotiques (Tetard et al., 2019 ; 2021). Les premiers éléments d'enquêtes menées en France (2019-2021) ont montré que les HEs préférentiellement utilisées par les patients CF sont celles de tea tree, eucalyptus, ravintsara, clou de girofle, inule, cannelle et thym. L'objectif de ce travail est donc de : (i) tester l'effet des composés majoritaires de ces HEs, seuls ou en association avec les antibiotiques, vis-à-vis de souches CF de *Pseudomonas aeruginosa* isolées à différents stades de la colonisation et (ii) étudier l'impact des associations HE-antibiotique sur le devenir de souches de *P. aeruginosa* lorsqu'elles sont co-isolées avec *Staphylococcus aureus*.

Matériels et méthodes

Les souches de *P. aeruginosa* ont été isolées lors d'un protocole de surveillance longitudinale sur plusieurs années de patients CF des CHU de Besançon, Lyon et Montpellier à différents stades de la maladie ; les souches de *S. aureus* ont été co-isolées à partir des mêmes échantillons. La réalisation d'antibiogrammes et la détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices ont permis de comparer la sensibilité des souches aux antibiotiques avec et sans extraits d'HEs (eucalyptol, terpinèn-4-ol, thymol, γ -terpinène, eugéno, carvacrol). Des co-cultures calibrées *P. aeruginosa* / *S. aureus* ont été exposées à des combinaisons HE-antibiotique et suivies au cours du temps par le dénombrement des deux espèces sur milieux sélectifs (*Pseudomonas* Isolation Agar et Chapman).

Résultats

Certains composés naturels extraits d'HEs (eugéno, citral, terpinen-4-ol, et carvacrol) modifient la résistance des souches de *P. aeruginosa* aux antibiotiques (antagonisme ou synergie), alors que d'autres (γ -terpinène) n'ont que très peu d'effet. De plus, les HEs perturbent les équilibres microbiens entre *P. aeruginosa* et *S. aureus* en faveur de *P. aeruginosa*. En effet, *S. aureus* est beaucoup plus sensible à de nombreux composés naturels tels que l'eucalyptol, le terpinèn-4-ol, le carvacrol. Nous travaillons actuellement pour déterminer si les souches co-isolées en début de colonisation ont des comportements différents de celles co-isolées plus tardivement au cours de la maladie chez un même patient. Des résultats préliminaires suggèrent en effet que les interactions négatives HEs/antibiotiques seraient plus fréquemment observées pour des souches de colonisation persistante par rapport à celles isolées en début de colonisation.

Discussion et conclusions

Les résultats de ce travail permettront de renforcer les informations à diffuser auprès des patients sur l'utilisation des HEs en traitement alternatif.

Références

Tetard, A., Zedet, A., Girard, C., Plésiat, P., & Llanes, C. (2019). Cinnamaldehyde Induces Expression of Efflux Pumps and Multidrug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63(10), e01081-19.

Tetard, A., Foley, S., Mislin, G.L.A., Brunel, J-M., Oliva, E., Torrealba Anzola, F., Zedet, A., Cardey, B., Pellequer, Y., Ramseyer, C., Plésiat, P., & Llanes, C. (2021). Negative Impact of Citral on Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to Antibiotics. *Frontiers Microbiology*, 12:709838.

Ce projet est financé par : La région Bourgogne-Franche-Comté

DUPUIS Gabrielle

ÉTUDE DU RÔLE DU FACTEUR DE VIRULENCE EXOY DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA DANS LA REPONSE DES CELLULES PULMONAIRES DES PATIENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE

Dupuis G.1,2, Deruelle V.2 ; Touqui L.1,3 ; Corvol H.1 ; Mechold U.2 ; Tabary O.1

1. Mucoviscidose : Physiopathologie et Phénomégenomique, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), Sorbonne Université, Inserm, Paris, FR
2. Unité de Biochimie des Interactions Macromoléculaires, Département de Biologie Structurale et Chimie, CNRS UMR 3528, Institut Pasteur, Paris, FR
3. Mucoviscidose et Bronchopathies Chroniques, Département Santé Globale, Institut Pasteur, Paris, FR

Objectifs

P. aeruginosa est une bactérie Gram négatif, ubiquitaire et opportuniste chez l'Homme et ainsi fortement pathogène pour les patients immunodéprimés ou fragilisés, comme les patients atteints de mucoviscidose (patients CF). *P. aeruginosa* est ainsi responsable d'infections respiratoires chroniques chez ces patients. Elle est retrouvée chez près de 50% des patients CF adultes, et cette présence de façon chronique est corrélée à leur survie.

P. aeruginosa est capable d'infecter l'hôte via de nombreux facteurs de virulence, l'un des plus importants étant le système de sécrétion de type III (T3SS). Il permet à la bactérie d'injecter des exotoxines directement dans le cytoplasme des cellules cibles. Quatre toxines ont été identifiées : ExoS, ExoT, ExoU et ExoY.

ExoY est exprimée par 90% des souches de *P. aeruginosa* issues de patients CF et non-CF[1]. Son activité enzymatique nucléotidyl cyclase est activée par sa liaison à la F-actine eucaryote[2], et induit l'accumulation de nucléotides monophosphates cycliques (cNMP), avec une préférence pour le cGMP, perturbant ainsi de nombreuses voies de signalisation.

À ce jour, et contrairement aux autres toxines du T3SS qui sont connues pour contribuer directement à la mort cellulaire, le rôle d'ExoY dans la virulence de *P. aeruginosa* n'a pas encore été clairement élucidé. De plus, il n'existe aucune donnée sur son rôle dans la pathogénèse de la mucoviscidose.

Ce projet a pour but d'étudier le rôle d'ExoY et son implication dans la virulence de *P. aeruginosa* au niveau pulmonaire dans un contexte non-CF et CF.

Matériels et méthodes

Des lignées de cellules épithéliales bronchiques non-CF (16HBE14o-) et CF (16HBE41o-F508del) ont été infectées avec des souches de laboratoire de *P. aeruginosa* PAO1 sauvage (PAO1-WT) ou mutées : délétée pour ExoY (PAO1ΔY), sécrétant uniquement ExoY (PAO1ΔST) ou sécrétant ExoY catalytiquement inactif (PAO1ExoYK81M/K88I). La toxicité et l'apoptose ont été étudiées par microscopie, dosage de la lactate déshydrogénase (LDH) et Western-Blot (clivage de la caspase-3) respectivement. L'inflammation a été étudiée par RT-qPCR (expression de la cytokine pro-inflammatoire interleukine-8 (IL-8)).

Résultats

La souche PAO1ΔY est 3 et 4 fois plus toxique (19% vs 6% ; 22% vs 5%), induit une apoptose 5 et 6 fois plus importante (0,3 vs 1,5 ua ; 0,1 vs 0,6 ua) et une expression 1,7 et 3 fois plus importante de l'IL-8 (8 vs. 14 ua ; 6 vs. 18 ua) que les souches PAO1-WT, PAO1ΔST et PAO1ExoYK81M/K88I dans les cellules non-CF et CF respectivement.

Discussion et conclusions

Conclusion

Ces premiers résultats mettent en évidence que la toxine ExoY diminue la pathogénicité globale de *P. aeruginosa* sur les cellules respiratoires CF et non-CF, et que cet effet ne passe pas uniquement par son activité catalytique. Ses résultats préliminaires sont en train d'être validés sur des modèles de cellules primaires cultivées à l'interface

air-liquide, modèle qui sera utilisé pour réaliser une analyse transcriptomique afin d'identifier l'ensemble des voies moléculaires modulées par ExoY.

Références

[1] Silistre et al., Front Microbiol. 2021;12:666097

[2] Belyy et al., Nat Commun. 2016;7:13582

Ce projet est financé par : Ecole Doctorale ED394 & Fondation Air Liquide

DUPUIS Lucas

SYSTEMES DE RESISTANCE AU CUIVRE DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA : ROLE DANS LA DEFENSE CONTRE LA PHAGOCYTOSE

Lucas Dupuis(1), Maxime Rémi Gimenez(1), Sophie Bleves(1), Marianne Ilbert(2), Bérengère Ize(1)

1. LISM (Laboratoire d'ingénierie des systèmes macromoléculaires), IMM - Marseille

2. BIP (Bioénergétique et Ingénierie des Protéines), IMM - Marseille

Objectifs

Le pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa* peut causer des infections aiguës ou chroniques des voies respiratoires et c'est un pathogène majeur chez les patients atteints de mucoviscidose. Devant l'émergence des souches bactériennes multi-résistantes aux antibiotiques, une des pistes de recherche pourrait être de cibler les systèmes de virulence de ces bactéries pour « désarmer » les bactéries pathogènes. Parmi les systèmes de virulence de *P. aeruginosa*, les systèmes de sécrétion jouent un rôle prépondérant.

Le système Tat, qui permet l'export de protéines substrats du cytoplasme vers le périplasma, est essentiel pour la virulence de *Pseudomonas aeruginosa*¹. De précédentes études ont montré que ce système permet une meilleure tolérance de *P. aeruginosa* au cuivre. Dans le contexte infectieux, le cuivre est utilisé par le système immunitaire comme agent antibactérien². En effet, ce métal est essentiel pour la bactérie mais il est toxique dans de trop grandes concentrations. Sa toxicité est due à sa capacité à entrer en compétition avec le fer des centres fer-soufre et à induire du stress oxydatif.

L'objectif de ma thèse est de mieux comprendre le rôle du système Tat et de ses substrats dans la tolérance au cuivre chez *P. aeruginosa*.

Matériels et méthodes

Des approches de bio-informatiques et de biologie moléculaire ont permis la mise en évidence de 34 substrats du système Tat dont 3 pourraient être de bons candidats pour expliquer le rôle de Tat dans la tolérance au cuivre. Je propose donc d'étudier les conditions de régulation des 3 gènes codant ces protéines candidates via un gène rapporteur et par des approches de qRT-PCR. Je m'intéresse également au rôle de ces différentes protéines par des études de physiologie bactérienne et de fractionnement des différents compartiments cellulaires. Je réaliserai aussi des expériences d'interaction protéines-protéines ou protéines-cuivre (RMN, Co-Immuno-précipitation). Enfin, dans la dernière année de ma thèse, une étude de la survie bactérienne dans les macrophages par une expérience de « Gentamycin protection assay » permettra de tester le rôle des 3 candidats lors de l'infection.

Résultats

A ce jour, 34 protéines ont été identifiées par notre équipe comme étant des substrats du système Tat³, et nous en avons identifié 3 qui pourraient être de bons candidats pour expliquer la sensibilité au cuivre du mutant tat. En effet, une approche ciblée nous a permis de mettre en évidence une homologie de séquence entre deux de nos substrats et des protéines de résistance au cuivre d'*Escherichia coli* de la famille des Multi-Copper Oxidases. En parallèle, le screening d'une banque de mutants, chacun délété d'un des gènes codant un substrat Tat, a révélé un troisième candidat : une enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse d'un sidérophore.

Mes travaux ont permis de mettre en évidence des conditions de régulation différentes de chacun des gènes candidats. J'ai pu observer également que la sensibilité au cuivre du mutant Tat était principalement à un défaut de sécrétion de pyoverdine mais également à une mauvaise localisation d'une des deux Multi-copper oxidases.

Discussion et conclusions

Je propose maintenant de mieux caractériser les mécanismes d'action de chacun des systèmes mis en évidence. Une prochaine étape de mon projet sera également d'étudier le rôle de ces systèmes dans la survie des bactéries à l'intérieur du macrophage.

Références

1. Ochsner et al., 2002, <https://doi.org/10.1073/pnas.082238299>
2. White et al., 2009, <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.070201>
3. Gimenez et al., 2018, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30393-x>

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose & Association Grégory Lemarchal

BARRERO Anna

NIVEAUX D'ACTIVITE PHYSIQUE CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE AVANT ET APRES LE TRAITEMENT PAR TRIPLE MODULATEUR (KAFTRIO) : UNE ETUDE DE COHORTE RETROSPECTIVE MONOCENTRIQUE

Anna Barrero (1), Masson-Rouchaud (2)

Chaparro D (2)

Dupuy-Grasset M (2)

Languepin J (2)

Borel B (1)

1 Univ. Limoges, HAVAE, UR 20217, F-87000 Limoges, France

2 CRCM mixte, CHU Limoges, F-87000 Limoges, France

Objectifs

La pratique régulière d'une activité physique (AP) et l'adoption d'un mode de vie actif (défini par 30 minutes d'AP modérée à vigoureuse (MVPA) par jour) sont associés à des bienfaits pour la santé et à une plus grande espérance de vie chez les patients atteints de mucoviscidose (CF). Cependant, la littérature (Cox & Holland, 2019) montre que les patients atteints de mucoviscidose ont tendance à avoir un niveau d'AP réduit, par rapport aux directives internationales. Cette étude de cohorte rétrospective à Limoges (France) visait à déterminer si la mise en place de l'Elxacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor (kaftrio), un modulateur du régulateur de la conductance transmembranaire de la mucoviscidose (CFTR), avait un impact sur le niveau quotidien d'AP chez les patients atteints de CF.

Matériels et méthodes

18 patients (4 enfants, 18 adultes) du CHU de Limoges, suivis au CRCM mixte, ont participé à l'étude. Les données sur l'AP et la fonction pulmonaire ont été mesurées objectivement, respectivement par accélérométrie (pendant 7 jours consécutifs) et par spirométrie. Plusieurs moments d'évaluation ont été proposés : des évaluations cliniques de routine au départ (T0), un mois après avoir reçu Kaftrio (T1), trois mois après avoir reçu Kaftrio (T3) et six mois après avoir reçu Kaftrio (T6). Un test de comparaison pour échantillons appariés a été utilisé pour montrer les différences, dans les données de la fonction pulmonaire et de l'AP, entre T0 et les différentes mesures (T1, T3 et T6).

Résultats

Le pourcentage moyen de VEMS prédit (VEMS%pred) a augmenté de manière significative dans toutes les mesures par rapport à T0. De T0 (68,4±18,1) à T1 (78,2±21,2, p<0,001), de T0 (68,4±18,1) à T3 (81,8±20,7, p<0,001) et de T0 (72,5±13,5) à T6 (83,3±20,5, p=0,01). Le pourcentage moyen de CVF prédit (CVF%pred) a significativement augmenté de T0 (88,2±15,0) à T1 (94,0±13,9, p = 0,02) et de T0 (88,2±15,0) à T3 (95,6±14,6, p = 0,003). Les paramètres d'AP à T0 étaient : 6 460,2±2 068,8 pas/jour et 46,8 ± 35,0 min/jour pour le temps MVPA. Aucun des paramètres d'AP n'a présenté de différences statistiques sur l'ensemble des mesures par rapport à T0. Le nombre de pas/jour moyen était de 6253,8±2253,5 au T1, 7170,90±3511,90 au T3 et 7979,7±3729,2 au T6. Le temps moyen MVPA (min/jour) était 36,2±15,6 au T1, 44,7±31,5 au T3 et 61,4±15,0 au T6.

Discussion et conclusions

Les principaux résultats de ce travail rétrospectif mettent en avant un temps moyen MVPA supérieur à la recommandation de 30min/jour. Ce résultat intéressant, pouvant être expliqué par la présence d'un enseignant en activité physique adaptée au sein du CRCM de Limoges, est à relativiser par des différences inter-individuelles. Toutefois, malgré une amélioration des capacités pulmonaires (Causer et al., 2022; Hillen et al., 2022; Krivec et al., 2022; McGrath et al., 2022), ce temps d'AP moyen n'est pas modifié significativement après la mise en place du Kaftrio. Ainsi, nos résultats soulignent l'importance de maintenir l'accompagnement et le soutien des patients

vers l'adoption ou le maintien d'un mode de vie physiquement actif au sein des CRCM par des professionnels de l'AP.

Références

- Causser, A. J., Shute, J. K., Cummings, M. H., Shepherd, A. I., Wallbanks, S. R., Pulsford, R. M., Bright, V., Connett, G., & Saynor, Z. L. (2022). Elexacaftor–Tezacaftor–Ivacaftor improves exercise capacity in adolescents with cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology*, 57(11), 2652–2658. <https://doi.org/10.1002/ppul.26078>
- Cox, N. S., & Holland, A. E. (2019). Current perspectives of physical activity in cystic fibrosis. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 13(1), 13–22. <https://doi.org/10.1080/17476348.2019.1552833>
- Hillen, B., Legat, L., Knoll, R. L., Süß, V., Nitsche, O., Simon, P., & Poplawska, K. (2022). P034 Long-term elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor CFTR modulation significantly increases lung function and peak power output in people with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 21, S70. [https://doi.org/10.1016/S1569-1993\(22\)00367-8](https://doi.org/10.1016/S1569-1993(22)00367-8)
- Krivec, U., Praprotnik, M., Aldeco, M., Lepej, D., Zver, A., Šmid, S. Š., Dolenc, Š., & Rodman, J. (2022). P037 Improved aerobic fitness in children on CFTRm triple combination therapy. *Journal of Cystic Fibrosis*, 21, S71. [https://doi.org/10.1016/S1569-1993\(22\)00370-8](https://doi.org/10.1016/S1569-1993(22)00370-8)
- McGrath, A., Dowle, H., Marwick, J., Tennant, E., & Urquhart, D. S. (2022). P039 Changes to clinical well-being following initiation of elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor in children with cystic fibrosis – single-centre experience. *Journal of Cystic Fibrosis*, 21, S71. [https://doi.org/10.1016/S1569-1993\(22\)00372-1](https://doi.org/10.1016/S1569-1993(22)00372-1)

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose

BLOTAS Clara

ETUDE TISSU SPECIFIQUE D'ELEMENTS CIS-REGULATEURS DU GENE CFTR

Clara Blotas 1, Mégane Collobert 1, Anaïs Le Nabec 1, Claude Férec 1 et Stéphanie Moisan 1,2

1. Univ Brest, Inserm, EFS, UMR 1078, GGB, F-29200 Brest, France

2. Laboratoire de génétique moléculaire et d'histocompatibilité, CHRU Brest, Bretagne, France

Objectifs

L'identification du gène CFTR en 1989 a déclenché de nombreuses avancées dans le diagnostic de patients atteints de mucoviscidose mais également d'autres pathologies que l'on nomme formes frontières de la mucoviscidose, comme l'agénésie bilatérale des canaux déférents (ABCD) ou la pancréatite. En effet, plus de 2000 mutations ont été retrouvées dans le gène CFTR permettant, parfois, d'établir une corrélation entre phénotype et génotype.

Malgré ces avancées, des progrès sur la compréhension de la pathogenèse sont encore nécessaires. D'une part, afin de comprendre la distinction entre mucoviscidose, notamment les phénotypes extrêmes, et les formes frontières et d'autre part, pour définir des génotypes incomplets (1% des patients).

Afin d'expliquer ces cas complexes, ce projet a pour but d'identifier des potentiels dérégulations de l'expression du gène CFTR dûs à des altérations d'éléments cis-régulateurs (CREs).

Matériels et méthodes

Dans le but d'explorer la régulation du gène CFTR de façon cellule-spécifique, des techniques d'étude de la conformation de la chromatine sont mises en place dans trois modèles cellulaires, des cellules intestinales, pancréatiques et épидидymaires. Ce sont les principaux organes impliqués dans les maladies impliquant le gène CFTR, après les poumons mais qui ont déjà été bien documentés.

La technique de 4C (circular chromosome conformation capture) est utilisée pour obtenir des profils d'interaction et définir des candidats CREs qui sont ensuite validés par des tests de gènes rapporteurs. Pour confirmer ces données, la méthode de CUT & RUN (Cleavage Under Targets And Release Using Nuclease) permet de définir les marques épigénétiques H3K27ac (enhancer) et H3K27me3 (silencer) ainsi que les marques CTCF (CCCTC-binding factor).

Une seconde partie est consacrée à la détection de variants au sein des CREs par séquençage NGS (Next Generation Sequencing) du locus CFTR chez des patients atteints de formes frontières.

Résultats

Les analyses de 4C fournissent des profils d'interactions chromatiniennes spécifiques des tissus et montrent ainsi de nombreuses similarités entre les cellules mais aussi des pics spécifiques aux types cellulaires. En plus de l'identification de multiples régions interagissant avec le promoteur CFTR, nous avons réalisé des tests gènes rapporteurs qui ont permis d'identifier des enhanceurs mais aussi un potentiel silencer.

Par le séquençage des patients ABCD, huit variants régulateurs potentiels ont été mis en évidence par rapport à la fréquence de la population européenne. Afin de valider leur impact sur la régulation tridimensionnelle du locus CFTR, des tests fonctionnels sont réalisés.

Discussion et conclusions

Pour aller plus loin, nous voulons définir les facteurs de transcription impliqués dans la régulation du gène CFTR. De plus, nous devons utiliser la technologie CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) pour disposer d'un outil endogène qui pourra nous conduire à décrire la régulation au sein de ces trois modèles.

Ainsi, ce travail permet de mieux comprendre l'organisation tridimensionnelle du locus CFTR afin d'améliorer la prise en charge des patients.

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose

LADUNE Raphaëlle

PROMOTION DE L'ACTIVITE PHYSIQUE ADAPTEE CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE : DEVELOPPEMENT D'UN OUTIL NUMERIQUE DE MESURE DE LA BALANCE DECISIONNELLE.

Raphaëlle Ladune, Doctorante, Anne Vuillemin, professeur des universités

Meggy Hayotte, maitre de conférence

Laurent Mely, médecin chef de service

Sophie Ramel, médecin chef de service

Fabienne d'Arripe-Longueville, professeur des universités

Raphaëlle Ladune, Université Côte-d'Azur, Portail Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives, Laboratoire LAMHESS, Nice, France

Anne Vuillemin, Université Côte-d'Azur, Portail Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives, Laboratoire LAMHESS, Nice, France

Meggy Hayotte, Université Côte-d'Azur, Portail Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives, Laboratoire LAMHESS, Nice, France

Laurent Mely, Hôpital Renée Sabran Hospices Civils de Lyon, Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose de Giens, France

Sophie Ramel, Responsable CRCM-mixte et site Constitutif, Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose de Roscoff, France

Fabienne d'Arripe-Longueville, Université Côte-d'Azur, Portail Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives, Laboratoire LAMHESS, Nice, France

Objectifs

L'activité physique (AP) est une thérapie efficace pour améliorer la qualité et l'espérance de vie des personnes atteintes de mucoviscidose (MV). Elle est associée à des bienfaits physiques et psychologiques (e.g., amélioration de la tolérance à l'exercice et de l'élimination des sécrétions pulmonaires, diminution de la consommation de médicaments et du nombre d'hospitalisations, etc.). Malgré ses nombreux bénéfices, le niveau d'AP des personnes atteintes de MV est inférieur aux recommandations actuelles et aux niveaux d'AP de leurs pairs en bonne santé en termes d'intensité et de durée (Burnett et al., 2020).

La balance décisionnelle (BD) est un bilan des pour et des contres dans le choix d'apporter ou non un changement. Elle permet de déterminer si une personne se sent prête à démarrer un changement de comportement dans un futur proche. Les travaux de notre équipe ont permis de développer un questionnaire de mesure de la BD dans le contexte spécifique de l'AP chez les patients MV (Filleul et al., 2021). Cet outil permet de mesurer les barrières et facilitateurs selon trois sous-catégories « physiques » ; « psychologiques » et « environnementales ». Cette échelle facilite l'évaluation du stade de changement du patient à l'égard de l'AP et permet la personnalisation et l'individualisation de sa prise en charge en activités physiques adaptées (APA).

Néanmoins, plusieurs limites sont à relever pour cet outil, notamment son mode de passation actuel (« papier-crayon ») chronophage incompatible avec les contraintes des professionnels de santé. Dans une ère où la téléconsultation se démocratise, la création d'une application mobile permettrait de palier ces limites en optimisant la passation et le traitement des résultats dans des conditions d'hygiène maximisées, tout en proposant des recommandations personnalisées en AP et un suivi des résultats du patient.

L'objectif principal de cette étude est de développer une version numérique de l'échelle de mesure de la balance décisionnelle pour l'AP chez les patients MV.

Matériels et méthodes

Tout d'abord, des entretiens semi-directifs individuels et des ateliers collectifs de co-construction avec des patients (n=8) et des professionnels de santé spécialistes de la mucoviscidose (n=14) se sont déroulés pour définir le contenu et les fonctionnalités de l'application mobile. Les participants ont été recrutés sur la base du volontariat au sein de deux Centres de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose, et étaient âgés de plus de 18 ans. Une fois l'ensemble de ces entretiens réalisés et analysés, les besoins relatifs à l'application ont

été synthétisés puis transmis à une entreprise spécialisée dans la création d'applications mobiles. Une version test de l'outil a été soumise au comité de pilotage de l'étude ce qui a engendré des premiers ajustements. L'acceptabilité de l'outil a ensuite été testée auprès de la population cible (20 professionnels de santé spécialisés dans la MV et 20 personnes atteintes de MV). Pour cela une vidéo a été développée. L'acceptabilité a été mesurée à partir du questionnaire de l'UTAUT2 (Hayotte et al., 2020) accompagné de 4 items sur l'anxiété technologique et d'un entretien semi-directif.

Résultats

L'application se décline en trois versions : (1) pour les professionnels de santé, (2) pour les patients, et (3) pour les chercheurs. Les professionnels de santé ont la possibilité de créer les comptes pour leurs patients ainsi que pour d'autres professionnels de santé. Ils peuvent transmettre un questionnaire à remplir à leurs patients, accéder aux résultats et les télécharger. Les patients ont la possibilité de répondre au questionnaire, d'avoir les résultats immédiats de leur balance décisionnelle pour chaque dimension ainsi que des recommandations personnalisées. Ils peuvent avoir accès à ces données en illimité et les télécharger. Les chercheurs ont la possibilité d'avoir également leur accès, avec uniquement les résultats aux questionnaires. L'ensemble des données personnelles est rendu anonyme. Les mesures de son acceptabilité sont en cours et seront présentées lors du Colloque.

Discussion et conclusions

Le développement de l'application tend à répondre aux besoins d'assurer la promotion de l'APA à des fins de promotions de la santé en proposant une utilisation optimale du questionnaire par les professionnels de santé. Ce nouvel outil numérique permettrait d'obtenir rapidement un profil individualisé du patient et offrirait la possibilité de fournir des recommandations personnalisées en fonction de ces résultats. L'application mobile pourrait également permettre un suivi des patients à distance. La création de notre application mobile pallierait plusieurs des barrières rencontrées par les CRCM et leurs équipes soignantes pour assurer la promotion de l'activité physique adaptée chez les patients MV, à savoir le manque de temps des soignants, le manque de personnels, le manque ou l'absence d'installations et d'équipements. Grâce au développement de l'application mobile, les soignants pourront rapidement obtenir des réponses vis-à-vis des freins et des leviers à l'activité physique de leurs patients et ainsi proposer des offres et des conseils adaptés à chacun. Les barrières pourront être cernées plus rapidement et ainsi discutées afin de les contourner. Les aspects chronophages du traitement des résultats seraient évités et un temps considérable serait gagné, permettant aux soignants de consacrer davantage de leurs temps à leurs patients. L'application mobile offrira l'avantage également de ne requérir que de peu de matériel, puisqu'elle pourra être installée sur les smartphones des patients.

Références

Ladune et al., 2021

Filleul et al., 2021

Hayotte et al. 2020

Golden et al., 2015

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose & Filière Muco-CFTR

PASCAREL Khilian

CREATION D'UN MODELE DE CULTURE CELLULAIRE BRONCHIQUE MUCOVISCIDOSIQUE HYPOXIQUE : IMPACT SUR LES CANAUX IONIQUES

Khilian PASCAREL, Jenny COLAS & Clarisse VANDEBROUCK
1.Laboratoire PRÉTI, Université de Poitiers, Poitiers, France

Objectifs

La raison d'être de notre système respiratoire est de fournir à l'organisme l'oxygène (O₂) dont il a besoin pour assurer le métabolisme aérobie de tous les organes du corps, et d'évacuer le dioxyde de carbone (CO₂) généré par ce même métabolisme au niveau des tissus. L'insuffisance respiratoire peut donc être définie comme l'incapacité du poumon à fournir l'O₂ nécessaire au métabolisme aérobie des tissus (hypoxie). Dans la grande majorité des maladies respiratoires chroniques à un stade avancé, une insuffisance respiratoire est observée. C'est en particulier le cas dans la mucoviscidose.

Cette dernière est provoquée par une mutation sur le gène CFTR codant pour un canal chlorure. La mutation prépondérante F508del, entraîne l'absence à la surface des cellules épithéliales de la protéine CFTR et par la suite une accumulation du mucus visqueux au niveau des voies aériennes causant une hypoxie cellulaire. Notre projet vise à caractériser l'impact de l'hypoxie sur les canaux ioniques ainsi que les voies de signalisation sous-jacentes impliquées mais aussi de tester l'efficacité des traitements actuels de la mucoviscidose dans de telles conditions.

Matériels et méthodes

Des cellules épithéliales bronchiques CFBE-wt (WT) et CFBE-F508del (DF) sont cultivées dans une atmosphère hypoxique (1% O₂) contrôlée pour une durée de 0 à 24h. Les cellules CFBE-F508del seront corrigées avec une combinaison de Vx (Vx661; Vx445; Vx770) aussi appelée Trikafta® pendant 24h. L'expression des canaux ioniques et leur quantification seront réalisées en utilisant la technique du western-blotting. L'activité du canal CFTR sera mesurée par la technique du patch-clamp automatique à l'aide d'un Patchliner (Nanion©). Le courant CFTR est activé par 10µM Forskoline/30µM Génistéine et inhibé par 30µM de CFTRinh-172. L'activité des canaux TRPs, sensibles à l'O₂ comme le TRPA1, est mesurée en incubant les cellules avec la sonde fluorescente Fluo4-AM et en les stimulant avec 100µM d'AITC (activateur spécifique de TRPA1). La localisation de TRPA1 est quant à elle observée par immunomarquage.

Résultats

Un régulateur central de l'hypoxie est le facteur HIF1α (hypoxia inducible factor 1 subunit alpha). En suivant cet indicateur spécifique, nous avons validé notre modèle de culture cellulaire hypoxique. Il apparaît que HIF1α est détectée dès 2h d'hypoxie et avec un pic entre 4h et 6h sur nos cellules. Les quantités de protéines CFTR (WT ou F508del) et TRPA1 ne semblent pas varier en condition hypoxie.

Les résultats préliminaires, après 24h d'hypoxie montrent : i) que les courants CFTR ne sont pas altérés dans les cellules WT mais semblent l'être dans les cellules DF corrigées et ii) que l'activité calcique liée au TRPA1 est diminuée quel que soit le type cellulaire ou la correction apportée.

Discussion et conclusions

L'hypoxie ne modifie pas les quantités de protéines CFTR et TRPA1. Cependant, après 24h d'hypoxie, l'activité calcique est modulée dans tous les types cellulaires. Afin de comprendre cette différence, nous allons étudier l'impact de la présence et de la fonctionnalité de CFTR sur le courant calcique TRPA1 dépendant. De plus, l'utilisation d'une pharmacopée ciblant directement TRPA1 (inhibition spécifique) nous permettra de mieux caractériser l'activité calcique dont il est responsable.

Références

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose

SANTINELLI Raphaël

RESTAURATION DU TRANSPORT DU P.PHE508DEL-CFTR PAR LE PF-429242

R. Santinelli1, J. Guellec1, N. Benz1, C. Coraux2, P. Trouvé1
1: Inserm, Univ Brest, EFS, UMR 1078, GGB, F-29200 Brest, France
2: Inserm, Univ Reims, UMR 1250, SFR Cap-Santé, Reims, France

Objectifs

La mucoviscidose est la maladie autosomale récessive létale la plus fréquente dans la population européenne. Elle est due à des mutations dans le gène codant pour le canal CFTR (CF Transmembrane conductance Regulator) perméable notamment aux ions chlorure (Cl⁻; 1,2). La mutation la plus courante est p.phe508del-CFTR (3,4). Elle conduit à un défaut de repliement de la protéine qui est alors maintenue dans le Reticulum Endoplasmique (RE) et qui est rapidement dégradée, limitant le nombre de canaux dans la membrane plasmique des cellules épithéliales (5–8). Ceci conduit à des déséquilibres ioniques responsables de l'épaississement du mucus des voies aériennes qui devient propice aux infections et à l'inflammation (9,10). Ces mécanismes sont responsables de la mise en place d'un stress du RE (11,12) qui est régulé par à trois voies de signalisation constituant la réponse aux protéines mal formées (UPR) : IRE1 α , PERK et ATF6 (13–15). Des études ont montré qu'ATF6 inhibait l'expression du gène cftr et nous avons précédemment montré que l'utilisation de siRNA anti-ATF6 permettait la restauration de la fonction du canal CFTR muté (16–19). Nous avons observé les mêmes effets en utilisant une molécule, le PF-429242 (PF), une anti-sérine protéase inhibant spécifiquement S1P, enzyme essentielle au clivage et à l'activation d'ATF6 (20,21).

Le but de notre étude est de décrypter le mécanisme d'action du PF, dans un modèle plus proche de la pathologie.

Matériels et méthodes

Nous avons utilisé les cellules CFBE41o- qui sont des cellules bronchiques humaines issues d'un patient CF. Des tests MTT ont été réalisés afin d'évaluer la toxicité du PF. La localisation cellulaire d'ATF6 étant modifiée en fonction de son état d'activation, nous avons voulu observer les effets du PF sur cette localisation par immunofluorescence. L'expression de diverses cibles liées à l'UPR a été étudiée par Western blot (GRP78 et SREBP2) et par RT-qPCR (CHOP, IRE1, PERK et XBP1). Des RT-qPCR arrays ont été effectués ciblant 84 gènes spécifiques de l'UPR afin de connaître l'effet du PF sur la régulation de ce mécanisme. Des immunoprécipitations nous ont permis d'appréhender le taux de CFTR total. Des expériences de patch-clamp ont permis d'évaluer la fonctionnalité du CFTR sur notre modèle cellulaire, en plus d'expériences de chambre Ussing réalisées sur des bronches humaines prélevées chez des patients.

Résultats

Nous avons montré l'absence de toxicité due au PF. La spécificité du PF vis-à-vis de S1P a été démontrée par l'absence de clivage de SREBP2. L'inhibition du clivage/activation d'ATF6 a été mise en évidence en montrant sa séquestration dans la lumière du RE, après traitement. L'expression des principaux acteurs de l'UPR (CHOP, IRE1, PERK et XBP1) n'est pas modifiée mais le clivage de XBP1 a été observé. Le point fort de nos résultats est d'avoir montré que le PF augmente la synthèse du CFTR (ARNm et protéine), après traitement. Nous avons identifié 7 gènes liés à l'UPR modulés suite au traitement au PF (HSPA1B, CEBPB, VIMP, DNAJB9, INSIG1, HSPA5 et CALR) dont certains sont directement impliqués dans la synthèse du canal pouvant expliquer nos résultats. Enfin, nous avons montré que le PF restaure les flux d'ion chlorure liés au transport du p.phe508del-CFTR jusqu'à la membrane.

Discussion et conclusions

En conclusion, nous proposons le PF comme molécule thérapeutique potentielle puisqu'elle augmente la synthèse du CFTR et en conséquence les efflux d'ions Cl⁻, dans des cellules CF.

Références

1. Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic analysis. *Science*. 1989;245(4922):1073-80.
2. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 8 sept 1989;245(4922):1066-73.
3. Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Souza DW, White GA, et al. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell*. 16 nov 1990;63(4):827-34.
4. Du K, Sharma M, Lukacs GL. The $\Delta F508$ cystic fibrosis mutation impairs domain-domain interactions and arrests post-translational folding of CFTR. *Nat Struct Mol Biol*. janv 2005;12(1):17-25.
5. Lukacs G L., Mohamed A, Kartner N, Chang X b., Riordan J r., Grinstein S. Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart ($\Delta F508$) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP. *The EMBO Journal*. 1 déc 1994;13(24):6076-86.
6. Kartner N, Augustinas O, Jensen TJ, Naismith AL, Riordan JR. Mislocalization of $\Delta F508$ CFTR in cystic fibrosis sweat gland. *Nat Genet*. août 1992;1(5):321-7.
7. Ward CL, Kopito RR. Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins. *J Biol Chem*. 14 oct 1994;269(41):25710-8.
8. Denning GM, Ostedgaard LS, Welsh MJ. Abnormal localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in primary cultures of cystic fibrosis airway epithelia. *J Cell Biol*. 1 août 1992;118(3):551-9.
9. Pier GB, Grout M, Zaidi TS, Olsen JC, Johnson LG, Yankaskas JR, et al. Role of Mutant CFTR in Hypersusceptibility of Cystic Fibrosis Patients to Lung Infections. *Science*. 5 janv 1996;271(5245):64-7.
10. Armstrong DS, Grimwood K, Carzino R, Carlin JB, Olinsky A, Phelan PD. Lower respiratory infection and inflammation in infants with newly diagnosed cystic fibrosis. *BMJ*. 17 juin 1995;310(6994):1571-2.
11. Ribeiro CMP, Boucher RC. Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Cystic Fibrosis–Related Airway Inflammatory Responses. *Proc Am Thorac Soc*. 1 nov 2010;7(6):387-94.
12. van 't Wout EFA, van Schadewijk A, van Boxel R, Dalton LE, Clarke HJ, Tommassen J, et al. Virulence Factors of *Pseudomonas aeruginosa* Induce Both the Unfolded Protein and Integrated Stress Responses in Airway Epithelial Cells. *PLoS Pathog*. 17 juin 2015;11(6):e1004946.
13. Ali MMU, Bagratuni T, Davenport EL, Nowak PR, Silva-Santisteban MC, Hardcastle A, et al. Structure of the Ire1 autophosphorylation complex and implications for the unfolded protein response. *EMBO J*. 2 mars 2011;30(5):894-905.
14. McQuiston A, Diehl JA. Recent insights into PERK-dependent signaling from the stressed endoplasmic reticulum. *F1000Res*. 2017;6:1897.
15. Chen X, Shen J, Prywes R. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem*. 12 avr 2002;277(15):13045-52.
16. Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*. 28 avr 2000;101(3):249-58.
17. Kerbirou M, Le Drévo MA, Férec C, Trouvé P. Coupling cystic fibrosis to endoplasmic reticulum stress: Differential role of Grp78 and ATF6. *Biochim Biophys Acta*. déc 2007;1772(11-12):1236-49.
18. Rab A, Bartoszewski R, Jurkuvenaite A, Wakefield J, Collawn JF, Bebek Z. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response regulate genomic cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression. *Am J Physiol Cell Physiol*. févr 2007;292(2):C756-766.

19. Bartoszewski R, Rab A, Jurkuvenaite A, Mazur M, Wakefield J, Collawn JF, et al. Activation of the Unfolded Protein Response by Δ F508 CFTR. *Am J Respir Cell Mol Biol.* oct 2008;39(4):448-57.
20. Huguet F, Guellec J, Kerbiriou M, Gandy M, Thomas J, Férec C, et al. Evaluation of aminopyrrolidine amide to improve chloride transport in CFTR-defective cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 15 sept 2022;72:128866.
21. Hay BA, Abrams B, Zumbunn AY, Valentine JJ, Warren LC, Petras SF, et al. Aminopyrrolidineamide inhibitors of site-1 protease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 15 août 2007;17(16):4411-4.

Ce projet est financé par : Brest métropole & Association Gaétan Saleün

DUMORTIER Claire

L'ADIPOSITE MEDULLAIRE EST-ELLE ALTEREE LORS DE LA MALADIE OSSEUSE LIEE A LA MUCOVISCIDOSE ?

DUMORTIER Claire 1,2, FRAUENPREIS Andrew 2, SERGHERAERT Johan 1, DANOPOULOS Soula 2, GANGLOFF Sophie 1, AL ALAM Denise 2, VELARD Frédéric 1

1. Université de Reims Champagne-Ardenne, EA 4691 BIOS « Biomatériaux et Inflammation en site Osseux », Reims, France
2. Harbor-UCLA Medical Center, The Lundquist Institute, Torrance, USA

Objectifs

La maladie osseuse liée à la mucoviscidose (CFBD) concerne 50% des adultes atteints de mucoviscidose (patients CF) et se traduit notamment par une faible densité osseuse (Paccou, 2010). La différenciation de cellules souches mésenchymateuses (CSM) dérivées de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) de donneurs sains et de patients CF (F508del homozygotes) en ostéoblastes nous a permis de retrouver les phénotypes précédemment identifiés sur cellules primaires matures (Velard, 2014 ; Delion, 2016), à savoir une différenciation ostéoblastique retardée et un ratio RANKL/OPG (cytokines sécrétées par les ostéoblastes) modifié pour la lignée CF ; mais a également mis en évidence un taux de PPARG, facteur de transcription adipocytaire, plus élevé que dans la lignée contrôle. Puisqu'une relation entre faible densité osseuse et adiposité médullaire augmentée a été montrée dans plusieurs pathologies telles que l'obésité, le diabète, l'ostéoporose post-ménopause mais aussi l'anorexie (Verma, 2002; Piccinin, 2014, Schafer, 2015; Bredella, 2009), nous émettons l'hypothèse que la différenciation adipocytaire soit facilitée pour les CSM présentant un défaut d'activité CFTR au dépens de l'ostéoblastogenèse. A ce jour, la question de l'adiposité médullaire dans la CFBD n'a jamais été investiguée.

Matériels et méthodes

Dans un premier temps, des CSM de moelle osseuse de 6 patients non-CF ont été utilisées. Elles ont été différenciées pendant 21 jours en présence ou non d'Inh172, un inhibiteur pharmacologique de CFTR.

Résultats

Les immunomarquages de la périlipine, de FABP4 (protéines exprimées spécifiquement par les adipocytes) et de PPARG ont permis de mesurer la taille des vésicules lipidiques des adipocytes générés, 50% plus importante lors de l'ajout de l'inhibiteur dans le milieu (n=6 donneurs, p<0.05). Ces données permettent ainsi d'asseoir la preuve de concept d'un effet de l'inhibition de la fonction canal chlorure de CFTR sur la taille et le contenu des vésicules lipidiques des adipocytes différenciés. Cependant, l'expression des gènes associés PLIN1, FABP4 et PPARG n'est pas modifiée par la présence de l'inhibiteur, de même que la sécrétion protéique d'adiponectine et de leptine. Enfin, nous avons montré un engagement adipocytaire des CSM facilité en présence d'Inh172 et en absence de facteurs pro-différenciants, par l'apparition de gouttelettes lipidiques avec la coloration à l'Oil Red O et par l'expression de PREF1 qui traduit un engagement des cellules en pré-adipocytes.

Discussion et conclusions

Ces données nous encouragent désormais à reproduire ces expérimentations à partir des CSM CF et non-CF dérivées d'iPSC, afin d'attester de ces effets sur des cellules porteuses de la mutation F508del CFTR. La nature des lipides stockés dans les vésicules adipocytaires des deux conditions sera, de plus, évalué grâce à la spectroscopie RAMAN. Cet aspect nous semble d'autant plus intéressant que de récents travaux ont mis en évidence un rôle majeur des dérégulations lipidiques dans la fonction de CFTR (Aureli et al., 2016 ; Loberto et al., 2020) L'hypothèse d'une adiposité médullaire augmentée chez les patients CF est un axe prometteur à approfondir pour comprendre et mieux lutter contre la CFBD.

Références

Aureli M, Schiumarini D, Loberto N, Bassi R, Tamanini A, Mancini G, Tironi M, Munari S, Cabrini G, Dehecchi MC, Sonnino S. Unravelling the role of sphingolipids in cystic fibrosis lung disease. Chem Phys Lipids. 2016 Oct;200:94-103.

Bredella MA, Fazeli PK, Miller KK, Misra M, Torriani M, Thomas BJ, Ghomi RH, Rosen CJ, Klibanski A. Increased bone marrow fat in anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Jun;94(6):2129-36.

Delion M. et al. "Overexpression of RANKL in osteoblasts: a possible mechanism of susceptibility to bone disease in cystic fibrosis." *The Journal of pathology* vol. 240,1 (2016): 50-60.

Loberto N, Mancini G, Bassi R, Carsana EV, Tamanini A, Pedemonte N, Dehecchi MC, Sonnino S, Aureli M. Sphingolipids and plasma membrane hydrolases in human primary bronchial cells during differentiation and their altered patterns in cystic fibrosis. *Glycoconj J.* 2020 Oct;37(5):623-633.

Paccou J, Zeboulon N, Combescure C, Gossec L, Cortet B. The prevalence of osteoporosis, osteopenia, and fractures among adults with cystic fibrosis: a systematic literature review with meta-analysis. *Calcif Tissue Int.* 2010 Jan;86(1):1-7.

Piccinin MA, Khan ZA. Pathophysiological role of enhanced bone marrow adipogenesis in diabetic complications. *Adipocyte.* 2014 Dec 10;3(4):263-72.

Schafer AL, Li X, Schwartz AV, Tufts LS, Wheeler AL, Grunfeld C, Stewart L, Rogers SJ, Carter JT, Posselt AM, Black DM, Shoback DM. Changes in vertebral bone marrow fat and bone mass after gastric bypass surgery: A pilot study. *Bone.* 2015 May;74:140-5.

Velard F. et al. "Cystic fibrosis and bone disease: defective osteoblast maturation with the F508del mutation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator." *American journal of respiratory and critical care medicine* vol. 189,6 (2014): 746-8.

Verma S, Rajaratnam JH, Denton J, Hoyland JA, Byers RJ. Adipocytic proportion of bone marrow is inversely related to bone formation in osteoporosis. *J Clin Pathol.* 2002 Sep;55(9):693-8.

Ce projet est financé par : Région Grand Est & The Lundquist Institute and The Children's Hospital of Los Angeles

SERGHERAERT Johan

PATHOLOGIE OSSEUSE RELATIVE A LA MUCOVISCIDOSE : IMPACT DES MUTATIONS DE CLASSE II DE CFTR SUR LES PRECURSEURS OSTEOCLASTIQUES ET LEUR DIFFERENCIATION

Johan Sergheraert¹, Claire Dumortier¹, Marie-Laure Jourdain¹, Christine Guillaume¹, Julien Braux¹, Cédric Mauprivez¹, Bruno Ravoninjatovo², Muriel Griffon², Pierre-Régis Burgel³, Sophie C Gangloff¹, Jacky Jacquot¹, Frédéric Velard¹
¹URCA, EA 4691 « Biomatériaux et inflammation en site osseux », Reims, France
²Service de pneumologie, CRCM, Hôpital Cochin, Paris, France
³Service de pneumologie, CRCM, Hôpital Cochin, Paris, France

Objectifs

La pathologie osseuse liée à la mucoviscidose (CFBD) est une des nombreuses comorbidités dont souffrent les patients atteints par la mucoviscidose (CF). La CFBD est associée à une augmentation du risque fracturaire et une diminution de la densité minérale osseuse dès le plus jeune âge (Sermet-Gaudelus et al., 2011). Une augmentation des précurseurs ostéoclastiques circulants RANK+MCSFR+ chez des patients porteurs de la mutation CFTR-G551D (mutation de classe III) a été mise en évidence (Velard et al., 2018). Plus récemment, dans des cultures d'ostéoclastes issus de patients CFTR-F508del (mutation de classe II), des altérations du phénotype et de la fonction ostéoclastiques ont également été identifiées (Jourdain et al., 2020). Le but de notre étude est de caractériser les précurseurs ostéoclastiques circulants et leur capacité de différenciation ostéoclastique chez les patients CF.

Matériels et méthodes

Des monocytes circulants précurseurs d'ostéoclastes ont été isolés à partir de sang total de 18 patients atteints de mutations de CFTR de classe II (NCT04877223) et de 16 sujets contrôles (ALC/PIL/DIR/AJR/FO/606), puis marqués pour les récepteurs membranaires RANK et MCSFR et analysés par cytométrie en flux. Ces cellules ont également été cultivées 21 jours afin d'obtenir une différenciation ostéoclastique, puis un marquage en fluorescence (Vinculine-AlexaFluor[®]568, Phalloïdine-AlexaFluor[®]488, DAPI) a permis de déterminer le nombre d'ostéoclastes, leur taille, leur morphologie et d'évaluer la formation de podosomes. Un test statistique de Wilcoxon-Mann-Whitney a été réalisé et le risque alpha a été fixé à 5%.

Résultats

Nous avons mis en évidence une augmentation significative du nombre de monocytes circulants RANK+/MCSFR+ chez les patients F508del comparativement aux sujets sains (58% vs 28%; p<0.05). Les ostéoclastes CF étaient moins nombreux (-33%; p<0.05) et présentaient une surface plus importante (+104%; p<0.05) comparativement aux ostéoclastes contrôles. Aucune variation morphologique n'a été mise en évidence entre les deux cultures. Cependant, le marquage de la vinculine était moins colocalisé à l'anneau d'actine dans les cultures d'ostéoclastes CF, indiquant un défaut de formation des podosomes.

Discussion et conclusions

Nous avons mis en évidence une augmentation du nombre de monocytes circulants RANK+MCSFR+ marquant un potentiel accru de différenciation ostéoclastique chez les patients porteurs d'une mutation de CFTR de classe II. Pour autant, in vitro, une altération de la différenciation ostéoclastique a été observée dans les échantillons de patients CF, marquée par une diminution du nombre d'ostéoclastes associée à une augmentation de leur taille sans variation de leur morphologie. Les mutations de CFTR de classe II (dont F508del) sembleraient donc induire des modifications du cytosquelette. Or il a été démontré par ailleurs que de telles variations pourraient être responsables d'une perturbation de la zone de scellement et donc de la fonction des ostéoclastes (Blangy et al., 2020). Les mutations de classe II de CFTR semblent être responsables d'une altération de l'ostéoclastogénèse notamment par l'augmentation du nombre de précurseurs ostéoclastiques circulants RANK+MCSFR+ et la perturbation de la différenciation et de la fonction ostéoclastique.

Références

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose

CHESNAY Adélaïde

L'AVENEMENT DU KAFTRIO DANS LE TRAITEMENT DE LA MUCOVISCIDOSE : QUEL IMPACT SUR LES ATTEINTES ASPERGILLAIRES ?

Adélaïde Chesnay 1,2, Eric Bailly1, Laure Cosson3, Thomas Flament4, Guillaume Desoubieux1,2

1. Parasitologie-Mycologie-Médecine Tropicale, CHRU de Tours
2. Unité INSERM U1100 - Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires
3. Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose Pédiatrique, CHRU de Tours
4. Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose Adultes, CHRU de Tours

Objectifs

L'avènement de la trithérapie associant l'elixacaftor, le tezacaftor et l'ivacaftor, appelée association ETI, a profondément élargi l'arsenal thérapeutique de la mucoviscidose. Plusieurs essais en double aveugle randomisés de phase 3 ont démontré la bonne tolérance et l'efficacité sur la fonction CFTR de l'association ETI chez les patients atteints de mucoviscidose. Ces études ont également rapporté un taux annualisé plus faible d'exacerbations pulmonaires et une réduction rapide des infections bactériennes et de l'utilisation d'antibiotiques. En revanche, peu de données sont disponibles sur l'impact de cette association thérapeutique sur la colonisation, la sensibilisation ou encore les infections fongiques au cours de la mucoviscidose. Nous avons donc voulu évaluer l'effet du traitement par l'association ETI sur ces atteintes fongiques chez les patients malades de mucoviscidose

Matériels et méthodes

Une étude pilote observationnelle rétrospective et monocentrique a été menée sur 88 patients ayant reçu un traitement par ETI afin d'évaluer son effet sur les colonisation/sensibilisation/infections fongiques au CHRU de Tours. Les données biologiques recueillies, avant et après le début du traitement par ETI, ont compilé les résultats des cultures mycologiques des expectorations, les titres d'anticorps IgG anti-Aspergillus mesurés par ELISA, les anticorps précipitants anti-Aspergillus par immuno-électrophorèse, les titres d'IgE totales et d'IgE anti-Aspergillus fumigatus.

Résultats

La proportion de cultures d'expectorations positives à Aspergillus spp. a rapidement diminué de manière significative pour les patients atteints de mucoviscidose inclus dans cette étude. Les anticorps précipitants anti-Aspergillus mesurés par immuno-électrophorèse et les IgE totales ont également diminué de manière significative après l'initiation du traitement par l'association ETI.

Discussion et conclusions

Notre étude pilote soutient l'hypothèse selon laquelle l'initiation d'un traitement par l'association elixacaftor-tezacaftor-ivacaftor améliore rapidement la clairance pulmonaire à Aspergillus chez les patients atteints de mucoviscidose. Si ces résultats prometteurs sont confirmés par des études de plus grande envergure, le suivi des patients atteints de mucoviscidose et les habitudes de traitement pourraient être profondément transformés.

Références

[1] Maturu VN, Agarwal R. Prevalence of Aspergillus sensitization and allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: systematic review and metaanalysis. Clin Exp Allergy 2015;45:1765–78. doi:10.1111/cea.12595.

[2] Middleton PG, Mall MA, Drevínek P, Lands LC, McKone EF, Polineni D, et al.

Elexacaftor–tezacaftor–ivacaftor for cystic fibrosis with a single Phe508del allele. N Engl J Med 2019;381:1809–19. doi:10.1056/NEJMoa1908639.

[3] Heltshe SL, Mayer-Hamblett N, Burns JL, Khan U, Baines A, Ramsey BW, et al.

Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis patients with G551D-CFTR treated

with ivacaftor. Clin Infect Dis 2015;60:703–12. doi:10.1093/cid/ciu944.

[4] Frost FJ, Nazareth DS, Charman SC, Winstanley C, Walshaw MJ. Ivacaftor is associated with reduced lung infection by key cystic fibrosis pathogens. A cohort study using national registry data. Ann ATS 2019;16:1375–82. doi:10.1513/

AnnalsATS.201902-122OC.

[5] Currie AJ, Main ET, Wilson HM, Armstrong-James D, Warris A. CFTR modulators

dampen aspergillus-induced reactive oxygen species production by cystic fibrosis

Ce projet n'a pas de financement

GERGES Elias

CARACTERISATION DU ROLE DE LA PROTEINE LSR2 DANS LA VIRULENCE DES MORPHOTYPES LISSES ET RUGUEUX DE MYCOBACTERIUM ABSCESSUS

Elias Gerges¹, María del Pilar Rodríguez-Ordoñez², Norman Partouche¹, Jean-Louis Herrmann^{1,3}, Frédéric Crémazzy¹

1. Université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm, Infection et inflammation, Montigny-Le-Bretonneux, France

2. Université Paris-Saclay, Université d'Evry, Laboratoire Européen de Recherche pour la Polyarthrite rhumatoïde-Genhotel, Evry, France

3. APHP, GHU Paris-Saclay, Hôpital Raymond Poincaré, Service de Microbiologie, Garches, France

Objectifs

Mycobacterium abscessus (Mabs) est une mycobactérie non tuberculeuse à croissance rapide, responsable d'infections pulmonaires graves chez les patients atteints de mucoviscidose. Au cours de l'infection, cette bactérie évolue entre un morphotype lisse (Mabs-S) et un morphotype rugueux (Mabs-R) qui est hyper-virulent et hyper-inflammatoire. De plus, Mabs présente une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques et le taux d'échec des traitements atteint près de 60%. Nous avons précédemment isolé la protéine Lsr2, comme étant différemment exprimée durant la transition entre les morphotypes Mabs-S et Mabs-R. Lsr2 code un facteur de transcription pleiotropique appartenant à la superfamille des protéines associées au nucléoïde (NAP), connues pour leur rôle essentiel dans l'organisation hiérarchique des chromosomes bactériens. Nous avons pu montrer que Lsr2 est aussi un déterminant physiologique important qui favorise la résistance aux espèces oxydatives et joue un rôle dans la croissance intracellulaire et la virulence de Mabs.

Le présent projet vise à mieux comprendre le rôle moléculaire de Lsr2 dans la conformation spatiale du chromosome, la régulation de l'expression des gènes et la patho-biologie de Mabs.

Matériels et méthodes

Nous utilisons pour cela une approche intégrative basée sur trois méthodes de génomique fonctionnelle (RNA-Seq, ChIP-Seq, Hi-C) associée à des expériences de microscopie super-résolution. Nous étudions également le rôle de Lsr2 dans la résistance aux antibiotiques en réalisant des expériences d'infections de macrophages à l'aide de souches mutantes pour Lsr2 en conditions de traitements antibiotiques.

Résultats

L'analyse transcriptomique montre que Lsr2 régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans plusieurs processus cellulaires clés de la croissance de Mabs, dont seulement une partie est commune entre Mabs-S et R. Lsr2 est notamment impliquée dans la régulation des gènes modifiant l'activité des macrolides et aminoglycosides, couramment utilisées dans le traitement clinique de Mabs, résultats que nous avons confirmés par RT-qPCR ainsi que, par des tests de concentration minimale inhibitrice (CMI) après infection des macrophages en présence de ces antibiotiques.

L'analyse par ChIP-Seq a révélé que Lsr2 lie abondamment le génome de Mabs au niveau de séquences riches en AT et semble former de long domaines. De manière surprenante, cette distribution est identique entre Mabs-S et R. En parallèle, la microscopie super-résolution a révélé une localisation de Lsr2 dans une région contrainte de Mabs correspondant à une fraction importante du nucléoïde.

Discussion et conclusions

L'absence de Lsr2 a un effet dramatique sur l'expression de nombreux gènes mais l'existence d'un répertoire limité de gènes communs entre Mabs-S et Mabs-R suggère son implication dans des mécanismes physiologiques distincts suivant la souche considérée. Cependant, la distribution identique de Lsr2 sur le chromosome de Mabs-S et Mabs-R suggère que d'autres mécanismes sont à l'origine de ces disparités, telle que l'existence de partenaires exprimés spécifiquement dans chacun de ces morphotypes ou des conditions physiologiques venant moduler son rôle dans la conformation du chromosome.

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose & Association Grégory Lemarchal

ILLOUZ Morgane

ROLE DES TREHALOSES POLYPHLEATES DANS LES INTERACTIONS ENTRE LE PHAGE THERAPEUTIQUE BPS ET MYCOBACTERIUM ABSCESSUS

Morgane Illouz¹, Katherine Wetzel², Graham Hatfull², Laurent Kremer¹

1. Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier, CNRS UMR 9004
2. Department of Biological Sciences, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15260, USA

Objectifs

Les patients atteints de mucoviscidose sont particulièrement sujets aux infections à *M. abscessus* (Mab), souches souvent multirésistantes aux antibiotiques et aboutissant à des échecs thérapeutiques. Ces dernières années, la phagothérapie combinée à l'antibiothérapie contre Mab a largement fait ses preuves comme alternative thérapeutique dans le traitement de Mab chez certains patients¹⁻³. Cependant, le mécanisme d'action et l'interaction de ces phages avec Mab demeurent inconnus. Dès lors, une meilleure compréhension des étapes précoces de l'infection est primordiale pour optimiser les cocktails phagiques et contrecarrer l'émergence de souches résistantes aux phages. Notre étude a pour but de déterminer l'implication de glycolipides de surface mycobactériens dans la reconnaissance et la spécificité d'action du phage thérapeutique BPs vis-à-vis de souches cliniques de Mab.

Matériels et méthodes

Analyse lipidique

Les lipides totaux sont extraits de culots bactériens avec un mélange CHCl₃/CH₃OH (1 :2) et (2 :1), lavés et séchés. Les échantillons resuspendus après évaporation sont séparés sur des plaques de silice dans un solvant de migration CHCl₃/CH₃OH et révélés avec un mélange anthrone/H₂SO₄.

Efficacité des phages

Des plages de lyse sur bactéries en top agar ont été réalisées par dépôt de solutions phagiques diluées. Après 2 à 3 jours d'infection à 37°C, les plages de lyse sont imagées. Les bactéries en milieu liquide sont incubées avec (MOI 1 :10) ou sans phage durant 7 jours et la DO à 600nm est mesurée toutes les 6 heures.

Microscopie

En milieu liquide, les bactéries et le fluorophage (MOI 1 :10) sont incubés durant 4 heures à 37°C. Après fixation, les échantillons sont déposés entre lame et lamelle puis observés au microscope droit.

Complémentation fonctionnelle

Les mutants ont été transformés avec des plasmides intégratifs portant les gènes MAB_0939 ou MAB_0937c clonés sous le contrôle du promoteur endogène ou pBlacF*, respectivement.

Résultats

Suite à l'exposition prolongée à BPs in vitro, des souches cliniques de Mab isolées de patients atteints de mucoviscidose et traités par phagothérapie sont devenues résistantes à ce phage. Le séquençage du génome de ces mutants a identifié des mutations dans les gènes MAB_0939 ou MAB_0937c codant, respectivement, une polyketide synthase de type I (Pks) et le transporteur MmpL10, tous deux impliqués dans la synthèse et le transport de tréhalose polyphléates (TPP) à la surface de Mab. La complémentation fonctionnelle des mutants pks et mmpL10 restaure la production des TPP et la sensibilité des souches à BPs en milieu solide et liquide, démontrant l'importance des TPP pour l'activité lytique du phage sur ces isolats cliniques. Par ailleurs, l'usage du fluorophage BPs a permis d'imager le processus infectieux de BPs au cours de l'infection de Mab et de valider le rôle des TPP dans l'étape d'adhérence du phage à Mab.

Discussion et conclusions

Nos travaux décrivent, pour la première fois, un récepteur utilisé par un mycobactériophage et permettent d'expliquer le mécanisme de reconnaissance spécifique entre BPs et Mab. Ces résultats confirment donc un

mécanisme déjà connu chez les bactériophages mais n'ayant jamais été décrit pour les phages mycobactériens. Ils permettent également d'associer un premier rôle biologique aux TPP, interagissant entre BPs et certaines souches de Mab.

Références

1. Dedrick, R. M. et al. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat Med* 25, 730–733 (2019).
2. Nick, J. A. et al. Host and pathogen response to bacteriophage engineered against *Mycobacterium abscessus* lung infection. *Cell* 185, 1860-1874.e12 (2022).
3. Dedrick, R. M. et al. Phage Therapy of *Mycobacterium* Infections: Compassionate Use of Phages in 20 Patients With Drug-Resistant Mycobacterial Disease. *Clinical Infectious Diseases* ciac453 (2022) doi:10.1093/cid/ciac453.

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose & Association Grégory Lemarchal

SY Khadeeja Adam

IMPACT DES MEDIATEURS LIPIDIQUES DE LA RESOLUTION DE L'INFLAMMATION SUR LA COLONISATION DES CELLULES EPITHELIALES RESPIRATOIRES PAR ASPERGILLUS FUMIGATUS

Khadeeja Adam SY 1,2, Maëlle Briottet 1, Isabel Valsecchi 2, Sephora John 1, Françoise Botterel 2 et Valérie Urbach 1

1. IMRB, INSERM U955, UPEC, Créteil

2. UPEC, EnvA, USC ANSES, Créteil

Objectifs

La mucoviscidose (CF) se caractérise par des infections respiratoires chroniques associées à une inflammation excessive et inefficace dans l'élimination des pathogènes. Parmi eux, le champignon *Aspergillus fumigatus* est prédominant, mais comme dans d'autres pathologies, ses interactions avec son hôte sont mal comprises.

Dans la mucoviscidose, les médiateurs lipidiques qui orchestrent la résolution de l'inflammation (SPM pour Specialized Proresolving Mediators), comme les lipoxines (LX), les résolvines (Rv) et les protectines (PD) sont produits en quantité réduite par les cellules épithéliales respiratoires. Les conséquences de cette anomalie sur l'infection des voies respiratoires des patients CF ont été peu étudiées.

Notre objectif est d'explorer les interactions entre *A. fumigatus* et son hôte dans un modèle rendant compte d'altérations de la réponse immunitaire caractérisant la mucoviscidose. Ainsi, nous avons testé l'impact des SPMs sur la colonisation de l'épithélium des voies aériennes par *A. fumigatus*.

Matériels et méthodes

Des cellules épithéliales nasales issues de patients (HNEC) et la lignée épithéliale bronchique CFBE sont cultivées sur plastique ou filtres perméables en interface air-liquide. Des conidies d'*A. fumigatus* exprimant la protéine Dsred sont inoculées (MOI 1 à 6, 24h) sur les cellules épithéliales exposées ou non aux SPMs, LXA4, LXB4, RvE1, RvD5, PD1 (10nM). L'intégrité épithéliale est évaluée par la mesure de sa résistance électrique (TEER) et par la visualisation de la protéine ZO-1 en microscopie confocale. La colonisation épithéliale par *A. fumigatus* est étudiée en microscopie confocale et qPCR. La croissance d'*A. fumigatus* sans cellules est mesurée grâce un lecteur de microplaque. Le rôle des récepteurs aux SPMs a été évalué grâce à des outils pharmacologiques.

Résultats

Les cellules HNEC les plus différenciées (TEER > 1000 Ω .cm², présence de cils et de mucus) inhibent la croissance d'*A. fumigatus* et son invasion au sein de l'épithélium. *A. fumigatus* (24h) n'altère pas l'intégrité de ces épithéliums intacts et très différenciés. Or, les SPMs stimulent la formation des jonctions serrées au cours de sa différenciation. Les cellules HNEC moins différenciées ou la lignée cellulaire CFBE410- (TEER <400 Ohm.cm²) inhibent de façon moindre la croissance d'*A. fumigatus* qui en 24h dégrade les jonctions serrées épithéliales.

Le traitement des cellules épithéliales avec LXA4, LXB4, RvE1, RvD5 et PD1 protège significativement l'épithélium de l'altération de ses jonctions serrées par *A. fumigatus*. Ces effets sont abolis par le WRW4 et la Chemerin utilisés pour inhiber la liaison des SPMs aux récepteurs FPR2 et ChemR23, respectivement. Les SPMs LXA4, LXB4, RvE1, RvE2, RvD1, RvD5, et PD1 n'affectent pas la croissance d'*A. fumigatus* en absence de cellules épithéliales. En revanche, le traitement des cellules épithéliales à LXA4 et PD1 inhibe la croissance d'*A. fumigatus* et stimule la transcription des défensines HBD-2 et HD-5.

Discussion et conclusions

Ainsi, les SPMs stimulent la capacité des cellules épithéliales à réduire la croissance d'*A. fumigatus* et protègent la barrière épithéliale. Ces données suggèrent que les anomalies de biosynthèse des SPM dans la mucoviscidose contribuent à la capacité réduite de l'épithélium des voies respiratoires à combattre la colonisation par *A. fumigatus* et ouvrent des pistes thérapeutiques nouvelles

Références

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose & Association Grégory Lemarchal

KHAU SANDRA

ETUDE DE LA REGULATION DE L'INFLAMMASOME DURANT LA SURINFECTION BACTERIENNE ET FONGIQUE DANS LA MUCOVISCIDOSE

1. 2. Sandra KHAU, 1. 2. Benoît BRIARD

1. Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires, UMR1100, Tours

2. Faculté de Médecine, Université de Tours, Tours

Objectifs

La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* et le champignon filamentueux *Aspergillus fumigatus* sont les microorganismes les plus souvent isolés chez les patients mucoviscidosiques. La surinfection par *A. fumigatus* des patients déjà colonisés par *P. aeruginosa* engendre une hypersécrétion de la cytokine IL-1 β , dépendante de l'inflammasome. IL-1 β est connue pour être responsable de l'aggravation de la dégradation des fonctions pulmonaires. L'objectif de recherche est donc d'étudier la régulation de l'inflammasome lors de la surinfection de macrophages par *P. aeruginosa* et *A. fumigatus*.

Matériels et méthodes

La régulation de l'inflammasome est étudiée *in vitro* lors de la surinfection par *A. fumigatus* de macrophages dérivés de la moelle osseuse et alvéolaires infectés par la bactérie *P. aeruginosa*. L'activation de l'inflammasome est évaluée grâce à l'analyse du clivage de la protéine caspase-1, la sécrétion de la cytokine IL-1 β , et l'induction de la mort cellulaire (pyroptose) des macrophages infectés et contrôles.

La régulation et l'activation de l'inflammasome en réponse aux infections sont liées à la reconnaissance des pathogènes. L'activation des différentes voies de signalisation suite à cette reconnaissance sont étudiées par western blot en réponse à nos conditions de surinfection.

Afin de décrypter les mécanismes moléculaires permettant la suractivation de l'inflammasome lors d'une surinfection bactérie-champignon, des macrophages sauvages et transgéniques délétés dans les voies de signalisation de la réponse immunitaire et de l'inflammasome ainsi que des inhibiteurs ont été utilisés. Des souches mutantes bactériennes et aspergillaires sont également utilisées afin de caractériser les motifs bactériens et fongiques impliqués dans cette suractivation de l'inflammasome.

Résultats

La surinfection fongique de ces cellules infectées par la bactérie mène à l'activation de l'inflammasome NLRP3, des caspases -1 et -8 et une sécrétion d'IL-1 β plus importantes. Lors de la surinfection les voies de signalisation sont modulées pour entraîner une plus forte activation de l'inflammasome. Différents motifs moléculaires (PAMPs) de *P. aeruginosa* et d'*A. fumigatus* sont impliqués dans ce mécanisme tels que le pili du type IV, la flagelline, les systèmes de sécrétion de type II et III, et du côté d'*A. fumigatus*, le galactosaminogalactane.

Discussion et conclusions

Une primo infection avec *P. aeruginosa* entraîne une potentialisation des macrophages permettant la suractivation de l'inflammasome et une sursécrétion d'IL-1 β en réponse à une seconde infection par *A. fumigatus*. Ceci pourrait expliquer l'aggravation des fonctions pulmonaires des patients coinfectés. Par conséquent, il est important d'étudier ce phénomène d'un point de vue thérapeutique. Par exemple, il serait envisageable d'inhiber l'inflammasome en plus du traitement antifongiques et antibactériens, afin de diminuer l'inflammation pulmonaire et la destruction progressive de l'architecture pulmonaires des patients.

Références

J. B. Lyczak, C. L. Cannon, G. B. Pier, Lung infections associated with cystic fibrosis. Clin. Microbiol. Rev. 15, 194–222 (2002).

J. Palomo, T. Marchiol, J. Piotet, L. Fauconnier, M. Robinet, F. Reverchon, M. L. Bert, D. Togbe, R. Buijs-Offerman, M. Stolarczyk, V. F. J. Quesniaux, B. J. Scholte, B. Ryffel, Role of IL-1 β in Experimental Cystic Fibrosis upon *P. aeruginosa* Infection. PLOS ONE. 9, e114884 (2014).

B. Briard, G. L. A. Mislin, J.-P. Latgé, A. Beauvais, Interactions between *Aspergillus fumigatus* and Pulmonary Bacteria: Current State of the Field, New Data, and Future Perspective. *Journal of Fungi*. 5, 48 (2019).

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose & Association Grégory Lemarchal

SARRAZIN Morgane

LES CYCLIPOSTINS/CYCLOPHOSTINES DE NOUVELLES PERSPECTIVES DANS LE TRAITEMENT DES INFECTIONS A MYCOBACTERIUM ABSCESSUS

M. Sarrazin¹, C. D. Spilling², J-L. Herrmann³, L. Kremer⁴, J-F. Cavalier¹, S. Canaan¹

1. Aix-Marseille Univ, CNRS, LISM, Marseille

2. University of Missouri–St. Louis, USA.

3. UVSQ, INSERM UMR1173, Versailles

4. IRIM, INSERM, Montpellier

Objectifs

M. abscessus est un pathogène émergent responsable d'infections pulmonaires sévères, chroniques et persistantes chez les patients atteints de mucoviscidose. Chez ces derniers, *M. abscessus* colonise les poumons et affecte la fonction pulmonaire entraînant une forte détresse respiratoire. Entre traitement lourd, avec de nombreux effets secondaires, apparition de souches résistantes et échec thérapeutique, le traitement des infections à *M. abscessus* représente aujourd'hui un réel déficit. De plus, l'apparition au cours du traitement d'une résistance aux macrolides, antibiotiques centraux dans la thérapie, provoquée par la production de la protéine Erm(41) peut être très problématique. Il est donc primordial de rechercher de nouvelles molécules pour traiter ces infections bactériennes et détecter leur présence pour déterminer rapidement une voie thérapeutique adaptée. Dans ce contexte, nous avons découvert une famille de composés, les analogues de Cyclophostines et Cyclipostins (CyC), qui représentent des outils utiles pour aborder la question des nouveaux traitements et diagnostics.

Matériels et méthodes

Après avoir identifié les cibles impactées par nos composés, nous avons caractérisé le potentiel thérapeutique des CyC les plus actifs *in vitro* et *ex vivo* et évalué leur potentiel pour contrecarrer la résistance induite aux macrolides par de nombreuses techniques multidisciplinaires (antibiogramme, synergie, microscopie, biochimique,...).

Résultats

Nous avons montré que ces composés, non toxiques pour l'animal, possèdent une activité antibactérienne sur plusieurs mycobactéries pathogènes incluant *M. abscessus* dont l'efficacité est similaire aux meilleurs antibiotiques de référence utilisés en clinique. Les CyC se sont révélés très efficaces envers plusieurs souches cliniques isolées de patients infectés qui présentaient différents profils de sensibilité aux antibiotiques. L'utilisation des CyC en synergie avec des antibiotiques déjà utilisés pour soigner ces infections permettrait *in vitro* une meilleure clairance de ce pathogène. De façon très intéressante, la bactérie est incapable de déclencher des mécanismes de résistance vis-à-vis de ces nouvelles molécules. Cette dernière caractéristique particulièrement encourageante pourrait éviter l'apparition de bactéries résistantes et donc l'échec thérapeutique. En parallèle, nous avons montré que les CyC interagissaient avec la protéine Erm(41) purifiée confirmant qu'Erm(41) est bien une cible des CyC. Enfin nous avons également montré que tous les CyC actifs ou non sont capables, dans un mélange bactérien complexe, de cibler spécifiquement les mycobactéries et en particulier *M. abscessus*. Ce dernier point ouvre alors la voie de leur utilisation comme de puissants outils de diagnostic pour détecter des infections à ce pathogène.

Discussion et conclusions

Les résultats obtenus sont très encourageants et nous confortent dans l'idée que l'association CyC-macrolide sera efficace contre les souches résistantes. En outre, le marquage spécifique des mycobactéries par les CyC, nous permet d'envisager également leur utilisation pour le diagnostic des infections à *M. abscessus*. L'ensemble de toutes ces données nous permettrons de proposer un nouveau schéma thérapeutique pour lutter contre *M. abscessus*.

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose & Association Grégory Lemarchal

Posters :

N°	NOM Prénom	Type de recherche	Thématique	Titre	Page
1	ALCARAZ Matthéo	Fondamentale	Infection	Efficacité et mode d'action d'un inhibiteur direct de la protéine InhA de <i>Mycobacterium abscessus</i>	34
2	BERNAL Alice	Fondamentale	Fonction CFTR	CFTR régule négativement la prolifération des cellules β du pancréas endocrine chez la souris.	35
3	BITAR Maria	Fondamentale	Infection	Optimisation de la prise en charge des infections dues à <i>Mycobacterium abscessus</i> basée sur la synergie entre l'imipénème, l'amoxicilline et les inhibiteurs de β -lactamases de seconde génération.	36
4	BONNET Pierre	Fondamentale	Infection	<i>Pneumocystis jirovecii</i> in Patients With Cystic Fibrosis: A Review	37
5	BORN-BONY Maëlys	Fondamentale	Infection	L'infection pulmonaire à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> augmente le potentiel inhibiteur des cellules myéloïdes suppressives sur l'immunité adaptative	38
6	BRAX Sylvain	Fondamentale	Infection	Implication de la septine 7 dans l'interaction de l'épithélium bronchique avec <i>P. aeruginosa</i>	40
7	CARVALHO Clarisse	Fondamentale	Infection	Rôle des thiorédoxine réductases TrxR1 et TrxR2 dans la pathogénèse des infections à <i>Scenedesporium apiospermum</i>	41
8	CASTANIER Solène	Fondamentale	Fonction CFTR	Etude de l'interactome de CFTR	43
9	CHOTTIN Claire	Fondamentale	Infection	Modulation de la sensibilité néonatale au Virus Respiratoire Syncytial par des bactéries primo-colonisatrices du poumon	44
10	DREANO Elise	Clinique	Fonction CFTR	Traitement par Kaftrio® de cellules primaires nasales et organoïdes rectaux de patients atteints de mucoviscidose et porteurs de mutations rares non éligibles à cette trithérapie en vue d'une médecine personnalisée	46
11	FRATACCI Alison	Fondamentale	Infection	La protéine chaperon Hsp90 est impliquée de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	47
12	JOUAULT Albane	Fondamentale	Infection	Étude du potentiel thérapeutique du peptide antimicrobien Cg-BigDef1 pour traiter les infections SARM	48
13	LEFEBVRE Delphine	Fondamentale	Infection	Caractérisation d'une nouvelle phospholipase antibactérienne de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	49
14	LUSSAC-SORTON Florian	Clinique	Infection	Évolution des microbiotes et mycobiotés pulmonaire et digestif chez les patients mucoviscidosiques sous Lumacaftor/Ivacaftor	51
15	MITRI Christie	Fondamentale	Thérapie Cellulaire	Développement d'une approche pour traiter tous les patients atteints de mucoviscidose avec des oligonucléotides antisens	52
16	NILLY Flore	Clinique	Infection	Persistance d'isolats cliniques de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et efficacité des traitements antibiotiques et/ou anti-biofilm chez le poisson zèbre.	53
17	PONT Stéphane	Fondamentale	Infection	Pathogénicité de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et réponse immunitaire innée associée au cours d'une infection persistante dans un modèle d'embryon de poisson zèbre	54
18	POUCET Eloi	Fondamentale	Atteinte pulmonaire	Identification des récepteurs cellulaires et des ligands fongiques impliqués dans la synthèse d'IL-8 par les cellules épithéliales bronchiques infectées par <i>Aspergillus fumigatus</i> .	55
19	ROCHARD Camille	Fondamentale	Infection	Etude de l'effet antifongique d'un peptide antimicrobien sur <i>Aspergillus fumigatus</i>	57
20	TIDJANI Abdoul-Razak	Fondamentale	Infection	Rôle des polyamines dans la virulence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> au cours de l'infection pulmonaire chronique chez les patients atteints de mucoviscidose	58

21	TRIBOUT Mathilde	Fondamentale	Infection	Étude du récepteur impliqué dans l'import du métalophore pseudopaline chez la bactérie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59
22	VALDÉS Loréna	Clinique	Génétique	Variations de méthylation de l'ADN dans des gènes impliqués dans l'inflammation chez les patients atteints de mucoviscidose	61

ALCARAZ Matthéo

EFFICACITE ET MODE D'ACTION D'UN INHIBITEUR DIRECT DE LA PROTEINE INHA DE MYCOBACTERIUM ABSCESSUS

Matthéo ALCARAZ.¹, Françoise Roquet-Banères.¹, Stephen Adonai Leon-Icaza.³, Jan Abendroth.^{4,5}, Yves-Marie Boudehen.¹, Céline Cougoule.³, Thomas E. Edwards.^{4,5}, and Laurent Kremer.^{1,2}
1. Centre National de la Recherche Scientifique UMR 9004, Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier (IRIM), Université de Montpellier, 1919 route de Mende, 34293, Montpellier, France.
2. INSERM, IRIM, Montpellier, France.
3. Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), Université de Toulouse, CNRS, Toulouse, France.
4. UCB BioSciences, Bainbridge Island, WA 98109 USA
5. Seattle Structural Genomics Center for Infectious Disease (SSGICD), Seattle, WA 98109 USA

Objectifs

Mycobacterium abscessus est un pathogène opportuniste émergent causant des infections pulmonaires sévères, notamment chez les patients atteints de mucoviscidose. De par sa résistance intrinsèque à la plupart des antibiotiques, il apparaît urgent de développer des traitements plus efficaces. L'isoniazide, un antituberculeux de première intention, cible la protéine InhA impliquée dans la synthèse des acides mycoliques. Cette molécule est inopérante chez *M. abscessus*, vraisemblablement de par l'incapacité de KatG à convertir l'isoniazide en un métabolite actif chez cette bactérie. Ainsi, nous évaluons une nouvelle approche thérapeutique basée sur l'utilisation du NITD-916, un inhibiteur direct d'InhA [1] chez *M. abscessus*.

Matériels et méthodes

L'activité de NITD-916 est déterminée in vitro par la mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI) vis-à-vis d'un panel d'isolats cliniques de *M. abscessus*. L'efficacité du composé a également été étudiée dans des macrophages infectés par *M. abscessus* ainsi que dans des organoïdes pulmonaires dérivés de patients atteints de mucoviscidose. L'analyse lipidique par chromatographie en couche mince a été réalisée pour démontrer l'altération de la synthèse des acides mycoliques en présence de NITD-916. Le séquençage du gène inhAMAB de mutants résistants spontanés à NITD-916 a été réalisé pour tenter de décrire son mode d'action. Une étude structurale par cristallographie du complexe InhAMAB liée au NITD-916 et au NAD a été réalisée pour démontrer la liaison directe de l'inhibiteur à sa cible.

Résultats

L'ensemble des souches cliniques testées a montré une haute sensibilité au composé (CMI = 1,56 µg/ml). L'exposition au NITD-916 entraîne une réduction importante des bactéries intramacrophagiques ainsi que du nombre et de la taille des cordes mycobactériennes. La microinjection du composé dans des organoïdes infectés par *M. abscessus* s'accompagne d'une baisse significative de la charge bactérienne. D'un point de vue mécanistique, NITD-916 inhibe la synthèse de novo des acides mycoliques. Des mutants hautement résistants au composé présentent des mutations ponctuelles dans inhAMAB (G96S ou G96V). La structure cristallographique confirme la liaison directe de l'inhibiteur à InhAMAB et qu'une mutation du résidu Gly96 empêcherait sa fixation, induisant la résistance.

Discussion et conclusions

Ces données indiquent que NITD-916 présente une forte activité contre les formes intra- et extracellulaires de *M. abscessus* en agissant comme un inhibiteur direct de la protéine InhAMAB, et valide InhAMAB comme cible attractive à exploiter. La synthèse d'analogues du NITD-916, en vue d'optimiser ses propriétés, est actuellement en cours. Ces études seront poursuivies par une évaluation pré-clinique dans le modèle murin.

Références

[1] Manjunatha UH et al. Direct inhibitors of InhA are active against *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Transl Med*. 2015;7(269):269ra3-269ra3.

BERNAL Alice

CFTR REGULE NEGATIVEMENT LA PROLIFERATION DES CELLULES B DU PANCREAS ENDOCRINE CHEZ LA SOURIS.

Alice BERNAL, Léa GOBLET, Gaëlle POMMIER, Stefania TOLU, Jamileh MOVASSAT et Kamel Maouche

1. Unité Biologie Fonctionnelle et Adaptative, équipe Biologie et Pathologie du Pancréas Endocrine, UMR 8251, Université Paris Cité, CNRS.

Objectifs

Le diabète lié à la mucoviscidose (CFRD) est la comorbidité la plus courante chez les sujets atteints de mucoviscidose (CF). La survie est significativement affectée chez les patients atteints de CFRD, avec moins de 25 % d'entre eux survivant jusqu'à l'âge de 30 ans. Chez l'homme, le diabète résulte d'une altération de la sécrétion d'insuline qui peut être due à un nombre réduit de cellules sécrétrices d'insuline (masse des cellules β) et/ou à une sécrétion anormale d'insuline par les cellules β (fonction des cellules β). L'inflammation du pancréas exocrine a été proposée pour être la cause de l'altération de la masse fonctionnelle des cellules β des patients CF. Cependant, un remodelage et un dysfonctionnement des îlots de Langerhans ont été retrouvés chez des enfants CF de moins de 4 ans et à la naissance chez un modèle de furet CF. Ce qui indique que l'absence ou l'inactivation de CFTR pourrait impacter le développement du pancréas endocrine fœtal. A ce jour, les effets du dysfonctionnement de CFTR sur le développement du pancréas fœtal et l'homéostasie de la masse des cellules β n'ont pas été étudiés. En raison du caractère unique et de l'importante croissance du CFRD, il est nécessaire de comprendre comment les dysfonctionnements de CFTR modifient directement la masse et la fonction des cellules β , entraînant l'apparition du CFRD. Notre projet vise donc à déterminer si CFTR joue un rôle essentiel dans la croissance de la masse des cellules β .

Matériels et méthodes

Pour cela, nous avons utilisé des souris CFTR^{-/-}, mâles et femelles, âgées de 7 jours. Cette fenêtre de développement du pancréas correspond à un stade de prolifération des cellules β différenciées. A partir de coupes histologiques, nous avons quantifié la surface des cellules β (immunohistomarquage de l'insuline) pour déterminer la masse des cellules β des pancréas des souriceaux Wild-Type (WT) et CFTR^{-/-}. Pour quantifier la prolifération des cellules β , ces sections histologiques des pancréas des souris WT et CFTR^{-/-} ont été doublement immunomarquées pour l'insuline et le BrdU, un marqueur de prolifération. Pour conforter les données sur la masse des cellules β , nous avons quantifié le contenu en insuline de leur pancréas ainsi que leur insulinémie.

Résultats

Le dosage du taux d'insuline plasmatique a indiqué que les souriceaux CFTR^{-/-} de 7 jours, indépendamment du sexe, affichent une hyper-insulinémie par rapport aux souriceaux WT de même âge. Ces résultats, surprenant, ont été corroborés avec une masse de cellules β significativement plus élevée chez les souriceaux CFTR^{-/-}, suggérant que ces souris ont un plus grand nombre de cellules β et par conséquent une quantité d'insuline sécrétée dans le sang plus importante. De plus, le contenu en insuline du pancréas des souriceaux CFTR^{-/-} est significativement augmenté, confirmant ainsi l'augmentation de la masse β CFTR^{-/-}. Cet accroissement s'explique par une hyper-prolifération des cellules β CFTR^{-/-}.

Discussion et conclusions

Nos résultats révèlent que CFTR est un régulateur négatif de la prolifération des cellules β endocrines. L'ensemble de ces observations soulève l'idée très intéressante que les très jeunes patients CF seraient défini par des cellules β ayant une capacité proliférative plus élevée. En conséquence, cette masse β importante pourrait retarder la survenue du CFRD chez les patients CF.

Références

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose

BITAR Maria

OPTIMISATION DE LA PRISE EN CHARGE DES INFECTIONS DUES A MYCOBACTERIUM ABSCESSUS BASEE SUR LA SYNERGIE ENTRE L'IMIPENEME, L'AMOXICILLINE ET LES INHIBITEURS DE β -LACTAMASES DE SECONDE GENERATION.

- M. Bitar 1.2.3, V. Le Moigne 4, D. Dorchène 1.2.3, JL. Herrmann 4.5, M. Arthur 1.2.3 JL. Mainardi 1.2.3.6
1. INSERM, UMRS1138, Équipe 12 du Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, F-75006, France
 2. Sorbonne Université, UMRS 1138, Paris, France
 3. Université Paris Cité, UMRS 1138, Paris, France
 4. Université Paris-Saclay, UVSQ, INSERM U1173, Montigny-Le-Bretonneux, France.
 5. APHP, GHU Paris-Saclay, Hôpital Raymond Poincaré, Service de Microbiologie, Garches, France.
 6. APHP, GHU Paris Centre Service de Microbiologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

Objectifs

Mycobacterium abscessus est une bactérie responsable d'infections pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose. Malgré un traitement long comprenant une quadrithérapie, ces infections sont difficiles à traiter puisque *M. abscessus* est résistant à une majorité d'antibiotiques y compris les β -lactamines. La résistance aux β -lactamines est principalement due à la production naturelle d'une β -lactamase (BlaMab).

Les β -lactamines ont pour cible principale les D,D-Transpeptidases (DDT) qui interviennent dans la synthèse du peptidoglycane. Cependant, chez *M. abscessus*, la synthèse du peptidoglycane est surtout médiée par les L,D-Transpeptidases (LDT) qui sont uniquement inhibées par les carbapénèmes comme l'imipénème. L'association de l'imipénème à d'autres β -lactamines comme l'amoxicilline permettrait l'inhibition de deux voies distinctes de synthèse en présence d'inhibiteurs de β -lactamases de seconde génération appartenant à la famille des diazabicyclooctanes (DBO).

Le but du travail sera d'évaluer les combinaisons d'imipénème, d'amoxicilline et d'avibactam sur *M. abscessus* et de déterminer le mécanisme responsable de cette synergie.

Matériels et méthodes

L'efficacité des combinaisons d'amoxicilline, d'imipénème et de DBO, est évaluée sur *M. abscessus* CIP104536 et sur un panel de souches cliniques. L'étude inclut la détermination des CMI, des indices FIC et de l'activité bactéricide in vitro. La triple combinaison est aussi évaluée dans un modèle de macrophage infecté ainsi que dans un modèle murin C3HeB/FeJ. Les mécanismes de la synergie seront déterminés grâce à l'analyse du génome des mutants résistants à l'association ainsi qu'aux analyses du peptidoglycane en présence de concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques et des tests de compétition en utilisant un carbapénème fluorescent.

Résultats

La CMI de l'imipénème en présence d'avibactam et de relebactam (4 μ g/ml) et d'amoxicilline (4 μ g/ml) était de 0,5 μ g/ml contre 2 μ g/ml et 4 μ g/ml en présence d'avibactam et de relebactam. L'association imipénème-amoxicilline est synergique en présence d'avibactam avec un indice FIC de 0.458. La triple combinaison imipénème 32 μ g/mL - relebactam 4 μ g/mL - amoxicilline 4 et 64 μ g/L est bactéricide in vitro.

Les premiers résultats dans le modèle murin C3HeB/FeJ montrent que la triple association améliore la survie des souris ainsi que leur poids. L'évaluation de la triple combinaison dans le modèle macrophage est en cours.

Discussion et conclusions

Les triples combinaisons d'amoxicilline, d'imipénème et de DBO pourraient donc être utiles dans le traitement des infections pulmonaires à *M. abscessus* chez les patients atteints de mucoviscidose. Il est important de comprendre le mécanisme de cette synergie et d'identifier les cibles de ces antibiotiques.

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose & Association Grégory Lemarchal

BONNET Pierre

PNEUMOCYSTIS JIROVECII IN PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS: A REVIEW

Pierre Bonnet (1), Solène Le Gal (1,2) ; Enrique Calderon (3) ; Laurence Delhaes (4) ; Dorothée Quinio (1) ; Florence Robert-Gangneux (5) ; Sophie Ramel (6) au nom du Réseau Muco Ouest et Gilles Nevez (1,2).

1. Laboratoire de Parasitologie et Mycologie, Hôpital de La Cavale Blanche, CHU de Brest, Brest, France
2. Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène (ER, GEIHP), Université d'Angers, Université de Brest, Brest, France
3. CIBER de Epidemiologia y Salud Publica and Instituto de Biomedicina de Sevilla, Hospital Universitario Virgen del Rocio/CSIC/Universidad de Sevilla, Seville, Espagne
4. Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Bordeaux, Bordeaux, Bordeaux, France Inserm U1045 – University of Bordeaux, Bordeaux, France
5. Univ Rennes, CHU Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de Recherche en Santé Environnement Travail), UMR_S 1085, Rennes, France
6. Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose, Fondation Ildys, Roscoff, France

Objectifs

La pneumonie à *Pneumocystis* (PPC) reste la maladie la plus fréquente classant SIDA dans les pays développés. Plus régulièrement, des infections bénignes à *Pneumocystis jirovecii* liées à une faible charge fongique pulmonaire, fréquemment considérées comme étant des colonisations, surviennent chez des patients atteints de maladies pulmonaires chroniques, dont la mucoviscidose. Le rôle potentiel de ce champignon en tant que cofacteur de morbidité a été suggéré, et les patients colonisés représentent des sources de contamination potentielles. Pour ces raisons, la caractérisation des populations colonisées ainsi que la caractérisation des souches de *P. jirovecii* au sein de ces populations est une étape nécessaire.

Matériels et méthodes

Cette mini-revue compile et discute les informations disponibles sur *P. jirovecii* et la mucoviscidose à travers le monde.

Résultats

Nous avons mis en évidence des différences significatives dans la prévalence de la colonisation pulmonaire par *P. jirovecii* chez les patients atteints de mucoviscidose européens et brésiliens. Cette revue décrit également le microbiote associé à *P. jirovecii* chez les patients atteints de mucoviscidose colonisés par *P. jirovecii*. De plus, nous avons décrit la diversité génomique de *P. jirovecii* chez des patients atteints de mucoviscidose colonisés. En plus de la colonisation pulmonaire, il semble que la PPC puisse survenir chez les patients atteints de mucoviscidose spécifiquement après une transplantation pulmonaire, nécessitant ainsi des stratégies préventives. À d'autres égards, la primo-infection à *Pneumocystis* est un phénomène mondial survenant chez les nourrissons non immunodéprimés au cours de leurs premiers mois. La primo-infection est généralement asymptomatique, mais elle peut également se présenter sous la forme d'une infection bénigne spontanément résolutive. Elle se produit probablement de la même manière chez les nourrissons atteints de mucoviscidose. Néanmoins, deux cas de primo-infection sévère à *Pneumocystis* imitant la PPC chez des nourrissons atteints de mucoviscidose ont été rapportés, la maladie génétique apparaissant dans ces circonstances comme un facteur de risque de PPC alors que l'interaction hôte-pathogène chez les enfants plus âgés et les adultes atteints de colonisation pulmonaire reste à clarifier.

Discussion et conclusions

Les données sur *P. jirovecii* et la mucoviscidose sont fragmentaires. Ce sujet reste un champ d'investigation ouvert. Une étude prospective multicentrique comprenant des méthodes identiques de dépistage de *P. jirovecii* chez les patients atteints de mucoviscidose, y compris ceux qui ont subi une transplantation pulmonaire, avec une stratification par âge du patient, une analyse des mutations CFTR et une analyse MLST/NGS du génome de *P. jirovecii* combinée avec un examen du microbiome/mycobiome est justifiée.

Ce projet n'a pas de financement

BORN-BONY Maëlys

L'INFECTION PULMONAIRE A PSEUDOMONAS AERUGINOSA AUGMENTE LE POTENTIEL INHIBITEUR DES CELLULES MYÉLOÏDES SUPPRESSIVES SUR L'IMMUNITE ADAPTATIVE

Maëlys BORN-BONY 1, Bérengère VILLERET1, Mélodie BOUTE1, Clémence GAUDIN1, Romé Voulhoux2, Laurye van Maele3, Jean-Claude Sirard3, Ignacio GARCIA-VERDUGO1, Jean-Michel SALLENAVE1

1. Université de Paris, INSERM 1152, Physiopathologie et épidémiologie des maladies respiratoires, Paris
2. LCB-UMR7283, CNRS, Aix Marseille Université, IMM, Marseille
3. Univ. Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR9017 - CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, Lille

Objectifs

Pseudomonas aeruginosa (P.a) est une bactérie opportuniste pathogène, résistante aux antibiotiques, responsable d'infections pulmonaires notamment chez les patients atteints de mucoviscidose.

P.a induit une forte inflammation pouvant entraîner l'insuffisance respiratoire. Dans un but d'intervention 'anti-inflammatoire', nous avons montré que le transfert adoptif de macrophages surexprimant l'élafine et l'IL-6 induisait un phénotype régulateur permettant d'améliorer la survie de souris infectées par P.a1.

En parallèle, une augmentation de la présence de cellules myéloïdes suppressives (MDSC, IL-6 dépendantes) dans les PBMC de patients atteint de mucoviscidose et infectés par P.a a été montrée comme corrélant avec l'amélioration de la capacité pulmonaire2.

Nous avons souhaité étudier le rôle potentiellement bénéfique des MDSCs et la modulation de leur fonction lors d'infection à P.a.

Matériels et méthodes

Les MDSC ont été obtenues par différenciation de moelle osseuse de souris C57Bl6 en présence d'IL-6 et GM-CSF pendant 5 jours. Des tests d'inhibition des splénocytes ont été réalisés pour évaluer la capacité d'inhibition des MDSC dans des plaques standard ou Transwell Co-star.

Les MDSC ont été infectés par P.a. pendant 6 heures. La capacité d'inhibition du surnageant a été évaluée dans les tests d'inhibition des splénocytes.

Résultats

A l'état basal, les MDSC inhibent la prolifération des lymphocytes d'une manière contact-dépendante.

Nous avons ensuite pu constater, post infection par P.a (souche PAO1 et souches cliniques) un gain d'activité inhibitrice du surnageant des MDSCs infectées indiquant une inhibition de la prolifération des lymphocytes non contact-indépendante.

L'infection de MDSC par *Streptococcus pneumoniae*, elle, ne résulte pas en un gain d'activité suppressive indiquant un mécanisme d'action spécifique à P.a.

Des séries d'infections de MDSC WT ou génétiquement modifiées par des souches WT ou mutantes de PAO1 (vivantes ou inactivées par la chaleur) nous ont permis de déterminer que P.a doit-être vivante, et métaboliquement capable de mobilité afin de transmettre un signal immunosuppressif aux MDSCs qui est indépendant de la voie TLR-MyD88.

Enfin, nous avons pu montrer que le lavage bronchoalvéolaire de souris ayant reçu un transfert adoptif de MDSC après infection par P.a avait un effet inhibiteur sur la prolifération des lymphocytes ex vivo, suggérant une relevance in vivo du phénomène observé.

Discussion et conclusions

Nous mettons en évidence une modulation de l'activité suppressive des MDSC par la bactérie P.a.

Nos travaux actuels portent sur l'identification des effecteurs des MDSC impliqués dans l'inhibition des lymphocytes et la mécanistique des interactions P.a-MDSC. Nous étudions actuellement plusieurs pistes, dont celle de l'implication des protéases de l'hôte et/ou de la protéine PD-L1.

L'identification de ces molécules permettra une meilleure compréhension du dialogue entre P.a et le système immunitaire ainsi que de nouvelles perspectives de traitement des infections à P.a.

Références

1. Kheir et al, Mol Ther. 2022;30:355-369.
2. Rieber et al, J Immunol. 2013;190:1276-84

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose & Blanche pour Vaincre la Mucoviscidose

BRAX Sylvain

IMPLICATION DE LA SEPTINE 7 DANS L'INTERACTION DE L'EPITHELIUM BRONCHIQUE AVEC P. AERUGINOSA

S. Brax, C. Calmel, H. Corvol, M. Ruffin, L. Guillot
Sorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche Saint Antoine (CRSA), Mucoviscidose : Physiopathologie et Phénotypologie, Paris

Objectifs

La mucoviscidose ou CF (pour « Cystic Fibrosis ») est causée par des mutations du gène CFTR et touche près de 80 000 personnes dans le monde. L'atteinte du système respiratoire représente aujourd'hui la principale cause de morbidité et de mortalité des patients. En effet, la mutation du canal CFTR entraîne une altération de la clairance mucociliaire qui favorise l'infection des bronches par de nombreux pathogènes et l'instauration d'une réponse inflammatoire exacerbée. Parmi les pathogènes, la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* est retrouvée chez près de 50% des patients adultes. La résistance de cette bactérie aux traitements antibiotiques favorise la colonisation chronique des patients et contribue fortement à la sévérité de la maladie. Les cellules épithéliales bronchiques forment une barrière physique contre les microorganismes pathogènes mais l'intégrité de cet épithélium est altérée par des cycles répétés d'infection-inflammation.

Dans ce contexte, notre étude vise à étudier le rôle de la protéine du cytosquelette Septine (SEPT)7 1 comme nouvel acteur moléculaire de l'interaction entre l'épithélium bronchique et *P. aeruginosa* pour développer des stratégies complémentaires aux traitements antibiotiques. En effet, la SEPT7 est capable de piéger des bactéries telles que *P. aeruginosa* dans des structures en forme de cages favorisant leur dégradation par le lysosome dans des cellules HeLa 2.

Matériels et méthodes

Nous avons utilisé des cellules épithéliales bronchiques primaires différenciées ou non à l'interface air-liquide CF et non CF ainsi que trois lignées cellulaires bronchiques, les 16HBE et Calu-3 contrôles (« wild type » (WT)) et soit portant la mutation F508del (16HBE-F508del) soit déficientes pour CFTR (/Calu-3- « knock down » (KD))-CFTR et les BEAS-2B. La souche de *P. aeruginosa* PAK fluorescente (PAK-GFP) a été utilisée.

Résultats

Nos travaux réalisés sur les cellules de lignée Calu-3-WT-CFTR et Calu-3-KD-CFTR montrent une expression (ARN et protéine) diminuée de la SEPT7 dans les cellules KD-CFTR par rapport aux cellules WT. L'infection des cellules par PAK-GFP nous a permis d'observer en microscopie confocale la formation de cages de SEPT7 autour de *P. aeruginosa* dans le cytoplasme des cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B, 16HBE-F508del, et cellules primaires CF. De plus, l'utilisation d'un ARN interférent ciblant la SEPT7 nous a permis de montrer qu'une diminution de l'expression de cette protéine induisait une augmentation du nombre de bactéries intracellulaires dans les cellules BEAS-2B et des cellules primaires CF.

Discussion et conclusions

Nous avons ainsi mis en évidence l'implication de la SEPT7 dans le processus de reconnaissance, de piégeage et de régulation du nombre de bactéries *P. aeruginosa* intracellulaires dans un modèle de cellules épithéliales bronchiques CF. La suite de l'étude visera à mieux comprendre le rôle joué par la SEPT7 dans la réponse anti-infectieuse entre des cellules CF et cellules non-CF, ainsi que dans la régulation de paramètres qui sont liés à cette réponse : l'intégrité épithéliale et la réponse inflammatoire. Cette étude nous permettra de mieux comprendre l'implication de la SEPT7 dans l'infection à *P. aeruginosa* qui survient chez les patients CF.

Références

Ivanov et al., Am J Pathol, 2020. ; 2Krokowski et al., Cell Host Microbe, 2018.

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose & Association Grégory Lemarchal & ANR

CARVALHO Clarisse

ROLE DES THIOREDOXINE REDUCTASES TRXR1 ET TRXR2 DANS LA PATHOGENESE DES INFECTIONS A SCEDOSPORIUM APOSPERMUM

Clarisse Carvalho, Anaïs Hérivaux, Nicolas Papon, Jean-Philippe Bouchara
Université d'Angers, Angers

Objectifs

Au cours de la mucoviscidose, l'épaississement du mucus bronchique et les altérations de la clairance mucociliaire résultant de la mutation du gène CFTR permettent le piégeage des microorganismes inhalés, avec pour conséquence des infections pulmonaires qui constituent la cause majeure de morbidité et de mortalité. Les *Scedosporium* se situent au deuxième rang parmi les champignons filamenteux en cause, et leur éradication est difficile du fait de leur faible sensibilité aux antifongiques. Une meilleure compréhension de la pathogénèse des scédosporioses pourrait fournir de nouvelles pistes pour améliorer le traitement de ces infections et la qualité de vie des patients.

Dans ce contexte, notre projet vise à caractériser les thiorédoxine réductases 1 et 2 (TrxR1 et TrxR2). Ces enzymes joueraient en effet un rôle important dans la protection du champignon contre le stress oxydatif, comme en témoignent nos études de transcriptomique (1, 2) ou l'activité antifongique de l'homokiol vis-à-vis des *Scedosporium* (3). Néanmoins, les gènes correspondants font partie de clusters impliqués dans la synthèse de peptides non ribosomiques (NRP) de type épithiodioxopipérazine (ETP), comme la gliotoxine connue chez *Aspergillus fumigatus* comme immunomodulateur (4).

Matériels et méthodes

Les gènes codant TRXR1 et TRXR2 seront invalidés en utilisant la technologie CRISPR-Cas9. L'impact de ces mutations sur la physiologie fongique sera précisé par étude de la croissance en présence de générateurs de radicaux oxygénés, et évaluation par cytométrie en flux de l'ingestion et du killing après co-culture avec des macrophages (5). Enfin, les répercussions sur la virulence seront évaluées chez l'animal. Selon les résultats obtenus, il pourra être nécessaire de préparer un double mutant TRXR1 Δ /TRXR2 Δ , ce qui nécessitera le recyclage du marqueur de sélection compte tenu du peu de marqueurs de sélection utilisables.

TRXR1 et TRXR2 étant localisés au sein de deux clusters potentiellement impliqués dans la synthèse d'ETPs, nous invaliderons également les gènes NRPS1828 et NRPS10275 codant les enzymes initiales de la voie de biosynthèse de ces métabolites. Les profils métabolomiques de ces mutants et de leur souche parentale seront comparés et les répercussions de ces mutations sur la protection du champignon vis-à-vis des défenses de l'hôte et la virulence seront déterminées.

Résultats

La génération de mutants TRXR1 Δ et TRXR2 Δ et leur analyse phénotypique nous permettront de démontrer le rôle des thiorédoxine réductases dans l'échappement de *S. apiospermum* aux mécanismes de défense de l'hôte. Par ailleurs, la comparaison des profils métabolomiques des mutants NRPS1828 Δ ou NRPS10275 Δ et de leur souche parentale nous permettra d'identifier les métabolites produits par les clusters de gènes correspondants. Enfin, la comparaison de ces différents mutants nous permettra de conclure sur une fonction directe ou indirecte (via la production des ETPs) des thiorédoxine réductases.

Discussion et conclusions

Outre la confirmation du rôle de TrxR1 et TrxR2 dans la pathogénèse des infections à *S. apiospermum*, l'identification du mécanisme de protection permettra d'envisager le développement de nouveaux antifongiques inhibant les thiorédoxine réductases ou bloquant la synthèse des ETPs. Aussi, ce projet pourrait constituer une étape importante pour le développement de nouveaux inhibiteurs en vue d'une amélioration de la prise en charge des infections à *Scedosporium*.

Références

1. Staerck C, Vandeputte P, Gastebois A, Calenda A, Giraud S, Papon N, Bouchara JP, Fleury MJJ. Enzymatic mechanisms involved in evasion of fungi to the oxidative stress: Focus on *Scedosporium apiospermum*. *Mycopathologia*. 2018;183(1):227-239.
2. Staerck C, Tabiasco J, Godon C, Delneste Y, Bouchara JP, Fleury MJJ. Transcriptional profiling of *Scedosporium apiospermum* enzymatic antioxidant gene battery unravels the involvement of thioredoxin reductases against chemical and phagocytic cells oxidative stress. *Med Mycol*. 2019;57(3):363-373.
3. Yaakoub H, Staerck C, Mina S, Godon C, Fleury M, Bouchara JP, Calenda A. Repurposing of auranofin and honokiol as antifungals against *Scedosporium* species and the related fungus *Lomentospora prolificans*. *Virulence*. 2021;12(1):1076-1090.
4. Gupta SK, Srivastava M, Osmanoglu Ö, Xu Z, Brakhage AA, Dandekar T. *Aspergillus fumigatus* versus genus *Aspergillus*: Conservation, adaptive evolution and specific virulence genes. *Microorganisms*. 2021;9(10):2014.
5. Staerck C, Yaakoub H, Vandeputte P, Tabiasco J, Godon C, Gastebois A, Giraud S, Guillemette T, Calenda A, Delneste Y, Fleury M, Bouchara JP. The glycosylphosphatidylinositol-anchored superoxide dismutase of *Scedosporium apiospermum* protects the conidia from oxidative stress. *J Fungi (Basel)*. 2021;7(7):575.

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose & Association Grégory Lemarchal

CASTANIER Solène

ETUDE DE L'INTERACTOME DE CFTR

S. Castanier, B. Chevalier; C. Guerra; I. Sermet-Gaudelus ; A. Edelman and Alexandre. H
INSERM, U1151, Université de Paris Cité, Institut Necker Enfants Malades (INEM), Paris, France

Objectifs

L'abondance du canal CFTR à la surface des cellules est un des facteurs limitant pour la sécrétion. Les canaux nouvellement synthétisés en provenance du réticulum endoplasmique puis de l'appareil de Golgi sont incorporés dans la membrane plasmique où ils sont ensuite soit internalisés pour être recyclés via la voie endosomale soit dégradés par la voie lysosomale. Les partenaires protéiques de CFTR impliqués dans ces différentes étapes ne sont pas encore entièrement connus.

Nous avons identifié par la spectrométrie de masse des partenaires de CFTR selon une méthodologie de marquage de proximité. L'analyse différentielle des données obtenues avec le canal sauvage et trois mutants de classe II (F508del, R1066C et N1303K) a permis d'identifier des partenaires communs ainsi que des partenaires post-RE de CFTR WT.

Dans ce projet, nous évalueront le rôle de certains partenaires sur la stabilité et l'activité de CFTR. L'efficacité du Trikafta à restaurer l'interactome de CFTR-F508del sera également évaluée ainsi que l'importance de CFTR sur l'activité de certains de ces partenaires.

Matériels et méthodes

L'abondance des partenaires de CFTR sera modulée (siRNA ou knockout) et l'effet sur différents paramètres de CFTR seront évalués, comme la maturation de CFTR (Western blot, WB), l'activité du canal (test fonctionnel basé sur la YFP) et l'abondance de CFTR à la surface des cellules (test de complémentation de la nanoluciférase).

L'interactome de CFTR-F508del corrigé par le Trikafta sera établi en utilisant la méthodologie de marquage de proximité. En parallèle, l'effet de CFTR sur le partenaire (e.g. transporteurs de la famille SLC) sera évalué en modulant l'activité de CFTR au moyen de modulateurs (activateurs, correcteurs ou inhibiteurs).

Résultats

Parmi les partenaires communs identifiés, nous nous sommes intéressés aux protéines du complexe EMC (ER-membrane complex) qui participe à l'insertion dans la membrane de certaines protéines transmembranaires lors de leur synthèse. Les résultats obtenus en WB montrent que l'absence de la protéine EMC6 (cellules HeLa KO) prévient la maturation de CFTR. Cet effet n'est pas prévenu par les correcteurs VX-661 et VX-445, seul ou en combinaison. La correction de CFTR-F508del et CFTR-L206W est également abolie dans ces cellules. Par la suite, nous allons rétablir l'expression de l'EMC6 pour observer si cela permet de restaurer la maturation de CFTR, validant ainsi que l'EMC joue un rôle dans le repliement de CFTR.

Afin d'affiner l'analyse de la restauration de l'interactome de CFTR-F508del par la combinaison VX-661/VX-445 (rescued CFTR-F508del ou rCFTR-F508del), une nouvelle série d'expérience a été réalisée afin d'identifier des partenaires non-restaurés par le traitement.

Discussion et conclusions

L'identification de partenaires de CFTR permettra de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le repliement de la protéine ainsi que dans la régulation de son abondance à la surface des cellules. Nos premiers résultats montrent l'implication du complexe EMC dans la biogénèse de CFTR et ce à une étape précoce. La comparaison de l'interactome de CFTR-WT et de rCFTR-F508del est en cours afin d'identifier des partenaires de CFTR non-restaurés pouvant rendre compte de l'instabilité de rCFTR-F508del à la surface des cellules. A plus long terme, ce projet permettra d'identifier de nouvelles cibles afin d'augmenter la quantité de CFTR à la surface des cellules et le cas échéant de développer des molécules stabilisant CFTR à la surface ou stabilisateurs.

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose

CHOTTIN Claire

MODULATION DE LA SENSIBILITE NEONATALE AU VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL PAR DES BACTERIES PRIMO-COLONISATRICES DU POUMON

C Chottin 1*, Q Marquant 1*, V Saint-Criq 2, D Laubretton 1, C Drajac 1, E Bouguyon 1, A Remot 3, M Thomas 2, S Riffault 1, D Descamps 1

1 Université Paris-Saclay, INRAE, UVSQ, VIM, Jouy-en-Josas, France

2 Université Paris-Saclay, INRAE, Micalis, Jouy-en-Josas, France

3 Université de Tours, INRAE, ISP, Nouzilly, France

Objectifs

Introduction

La bronchiolite est la principale pathologie respiratoire chez le nourrisson qui est causée par l'infection au virus respiratoire syncytial (VRS). Cette sensibilité du nourrisson est intrinsèquement liée aux caractéristiques de la muqueuse pulmonaire en période néonatale qui est associée à la mise en place de l'immunité et de la colonisation du poumon par un microbiote bactérien. Notre hypothèse est que les bactéries commensales primo-colonisatrices, qui sont les premiers micro-organismes à « conquérir » le tractus respiratoire, participeraient à la maturation de l'immunité de la muqueuse pulmonaire, et donc à la sensibilité du nouveau-né à des pathologies pulmonaires. La manipulation de ces souches permettrait d'orienter la réponse immunitaire vers une immunité protectrice contre l'infection VRS. Notre projet vise à faire la preuve de concept qu'il est possible par l'utilisation de souches primo-colonisatrices de la flore commensale du poumon de limiter la sévérité de l'infection par le VRS en période néonatale.

Matériels et méthodes

Méthode

-Criblage des souches isolées de poumons de souriceaux pour leur capacité immunostimulante et d'interférence avec la réplication du VRS à partir de cultures d'explants de poumons de souriceaux.

-Validation de l'effet anti-VRS sur des cultures primaires humaines d'adultes en interface Air-Liquide (ALI, MucilAir, Epithelix).

-Comparaison de l'action des souches bénéfiques sur la réplication du VRS dans des cultures primaires humaines d'enfants sains ou atteints de mucoviscidose.

Résultats

Résultats

Vingt-cinq souches primo-colonisatrices ont été caractérisées sur des explants de poumons de souriceaux par la nature des cytokines sécrétées et par leur effet sur la réplication du VRS. Ainsi, nous avons identifié plusieurs bactéries non cytotoxiques pour le tissu pulmonaire avec la capacité de faire sécréter, par les explants, des cytokines d'immunité de type 1 (Interleukine-12, IFN γ et/ou à interférer avec la réplication virale. La bactérie 17 a été sélectionnée pour avoir généré une signature cytokinique originale (immunité de type 1 et interleukine-9) et pour son effet inhibiteur sur la réplication du VRS in vivo. Cet effet a ensuite été confirmé sur des cultures primaires de cellules épithéliales humaines d'adultes en ALI pré-exposées à la bactérie 17.

Discussion et conclusions

Conclusions

La bactérie 17 exerce une action anti-VRS ex vivo sur des explants pulmonaires et des cellules épithéliales humaines d'origine adulte. L'administration préventive de cette bactérie candidate chez le souriceau a également montré une diminution de la réplication virale dans les poumons des animaux. De plus, nous souhaitons étendre l'utilisation de cette bactérie bénéfique au contexte pathologique de la mucoviscidose, en soutient potentiel aux thérapeutiques actuellement développées. Aussi, l'action anti-VRS de la bactérie 17 sera

testée prochainement dans un modèle de cultures de cellules épithéliales nasales de jeunes patients sains ou atteints de mucoviscidose afin d'évaluer si son effet bénéfique est conservé dans un contexte physiopathologique (collaboration I. Sermet-Gaudelus).

Infection-Inflammation

Les auteurs n'ont aucun conflit d'intérêts réel ou perçu, en relation avec ce résumé.

Projet soutenu par l'association VLM.

Références

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose & Association Grégory Lemarchal

DREANO Elise

TRAITEMENT PAR KAFTRIO® DE CELLULES PRIMAIRES NASALES ET ORGANOÏDES RECTAUX DE PATIENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE ET PORTEURS DE MUTATIONS RARES NON ELIGIBLES A CETTE TRITHÉRAPIE EN VUE D'UNE MÉDECINE PERSONNALISÉE

E Dreano¹, A Hatton¹, B Chevalier¹, A Golec¹, M Kelly¹, C Marguet², PR Burgel³, A Hinzpeter¹, E Girodon^{1,3}, I Pranke¹, I Sermet-Gaudelus¹

1. U1151, INSERM, Paris

2. CHU de Rouen, Rouen

3. Hôpital Cochin, Paris

Objectifs

L'émergence de l'ivacaftor ou de la triple combinaison Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor (ETI, Trikafta), modulateurs très efficaces de CFTR, a remanié les perspectives thérapeutiques pour les patients atteints de mucoviscidose avec une amélioration spectaculaire de la fonction respiratoire, de la qualité de vie et du statut infectieux. Aujourd'hui, plus de 80 % des patients peuvent accéder à ces thérapies. A partir de la base de données in vitro, l'ETI est désormais approuvé par l'Agence américaine des médicaments (FDA) pour 178 variants de CFTR portés par les personnes atteintes de mucoviscidose. Cependant, il reste un nombre important de mutations encore inconnues qui pourraient être corrigées par cette puissante stratégie pharmacologique. En Europe, seuls les patients porteurs de la mutation F508del sur au moins un allèle sont éligibles à l'ETI. Considérant qu'un certain nombre de patients sévères pourraient bénéficier de l'ETI, les autorités françaises ont lancé un programme d'attribution compassionnelle. Un frottis nasal ainsi qu'une biopsie rectale ont été proposées aux patients afin de corréler l'efficacité clinique avec la correction de l'activité de CFTR qui est évaluée in vitro dans les cultures de cellules épithéliales nasales humaines (HNE) et les organoïdes rectaux.

Matériels et méthodes

La correction de l'activité de CFTR a été étudiée à l'état basal (condition DMSO) et après traitement par ETI. Comme un certain nombre d'HNE présentaient une activité résiduelle basale, le niveau de correction a été obtenu après déduction de l'activité de CFTR en condition DMSO, ceci à la fois pour l'activation de CFTR par la Forskoline ($\Delta FETI/DMSO = \Delta FETI - \Delta FDMSO$) et pour son inhibition par l'inhibiteur 172 ($\Delta IETI/DMSO = \Delta IETI - \Delta FDMSO$). Cette correction est de plus exprimée en % de l'activité normale de CFTR après traitement par ETI ($\Delta FETI/DMSO\%WT$ et $\Delta IETI/DMSO\%WT$).

Onze patients étaient porteurs de variants éligibles à l'ETI selon la liste de la FDA. Trente portaient des variants non répertoriés par la FDA comprenant, entre autres, de grandes délétions ; des variants non-sens ; des délétions ponctuelles pouvant inhiber l'initiation de la traduction ou induire un décalage du cadre de lecture ; des mutations d'épissage pouvant altérer gravement la maturation de la transcription ou donner naissance à un variant WT résiduel (2789+5G>A, 4096-3C>G) ; des mutations faux-sens générant un repliement très imparfait (I507del, N1303K, R334W, R1066C, L558S) ou des mécanismes qui n'ont pas encore été documentés (Q552P).

Résultats

Le niveau de correction de CFTR ($\Delta IETI/DMSO\%WT$) était significativement corrélé à la réponse clinique tant pour la variation du ppVEMS ($R=0,617$; $R^2=0,380$; $p<0,0001$), que pour le test de la sueur ($R=-0,611$, $R^2:0,373$; $p<0,0001$). Des résultats similaires ont été observés pour la réponse à la Forskoline. La correction de CFTR a été significativement augmentée chez les patients répondeurs, augmentant leur ppVEMS de plus de 10 % (8,3% (14,2) contre 0,6% (4,5), $p=0,0003$).

Discussion et conclusions

Il s'agit de la première étude démontrant que la correction de la fonction CFTR dans les cultures cellulaires HNE et les organoïdes intestinaux 2D de différents génotypes peut prédire l'amélioration respiratoire par les modulateurs de CFTR au niveau individuel.

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose

FRATACCI Alison

LA PROTEINE CHAPERON HSP90 EST IMPLIQUEE DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Alison Fratacci^{1 2}

¹Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires (UMR 7255), ²Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines (UMR 7281), and ³Plate-forme protéomique, IMM

CNRS, Aix Marseille Univ, 31 chemin Joseph Aiguier, CS70071, Marie Corteggiani 2, Régine Lebrun 3, Manel Khelil-Berbar 3, Sophie Bleves 1, Bérengère Ize 1, Olivier Genest 2.

¹ Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires (UMR 7255)

² Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines (UMR 7281)

³ Plate-forme protéomique, IMM

1, 2, 3 :CNRS, Aix Marseille Univ, 31 chemin Joseph Aiguier, CS70071, 13402 Marseille Cedex 09 France.

Objectifs

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène opportuniste humain redouté dans les hôpitaux pour la grande variété d'infections (pulmonaires, cutanées, oculaires) qu'il provoque. Il est également responsable d'infections chroniques, souvent mortelles chez les patients atteints de mucoviscidose. Les infections à *P. aeruginosa* sont persistantes en raison de sa résistance intrinsèque aux antibiotiques et du développement de souches multirésistantes ; elle est à l'origine de 10% des infections nosocomiales. *P. aeruginosa* a été classée par l'OMS parmi les six agents pathogènes ESKAPE qui constituent une menace en raison de leur capacité à devenir de plus en plus résistants à tous les antibiotiques disponibles. Il a récemment été proposé que la protéine chaperon Hsp90 soit impliquée dans la virulence de plusieurs bactéries pathogènes dont *P. aeruginosa*, cependant les mécanismes moléculaires n'ont pas été décryptés.

Matériels et méthodes

Le but de notre étude est de comprendre le rôle d'Hsp90 dans la physiologie de *P. aeruginosa* et en particulier son implication dans sa pathogénie.

Résultats

Dans ce poster, nous présentons nos résultats sur l'implication d'Hsp90 dans la biosynthèse d'un facteur de virulence majeur de *P. aeruginosa*. Nous avons également découvert qu'Hsp90 participe à d'autres processus importants pour la pathogénie de *P. aeruginosa*, notamment la formation de biofilms.

Discussion et conclusions

Nous pensons que nos recherches pourraient conduire au développement de stratégies d'anti-virulence en ciblant Hsp90, une alternative prometteuse à l'utilisation massive d'antibiotiques.

Références

Ce projet est financé par : Bourse doctorale ministérielle

JOUAULT Albane

ÉTUDE DU POTENTIEL THERAPEUTIQUE DU PEPTIDE ANTIMICROBIEN CG-BIGDEF1 POUR TRAITER LES INFECTIONS SARM

A. Jouault 1, 2, I. Ben Hadj Kaddour 1, 2

Z. Xu 1, 2

G. Dupuis 1, 2

L. Touqui 1, 2

1. Centre de Recherche Saint-Antoine, Inserm, Sorbonne Université

2. Institut Pasteur, Mucoviscidose et Bronchopathies Chroniques, Département Santé Globale, 75012 Paris, France

Objectifs

Les souches bactériennes de *Staphylococcus aureus* résistantes à la pénicilline (SARM) infectent de manière chronique les voies respiratoires des patients atteints de la mucoviscidose (CF) et sont associées à un pronostic défavorable pour les patients (1). Les peptides antimicrobiens (PAMs) représentent une alternative aux antibiotiques pour traiter les infections à SARM mais leur activité bactéricide peut être altérée chez les patients CF. Les cellules, la présence d'un mucus abondant et visqueux ainsi que des concentrations anormales de sel sont connues pour altérer l'activité des PAMs dans les voies respiratoires CF. Cg-BigDef1 (BD1), un PAM isolé de l'huître *Crassostrea gigas*, maintient son activité antimicrobienne à des concentrations élevées de sel et semble donc être un bon candidat pour traiter les SARM chez les patients CF (2). Nous avons choisi de continuer à explorer son potentiel thérapeutique en prenant en compte les caractéristiques des voies respiratoires des patients CF.

Matériels et méthodes

Dans un premier temps, l'efficacité de BD1 contre *S. aureus* a été évaluée en présence de différentes lignées de cellules épithéliales bronchiques ou de mucus artificiel mimant le mucus CF. Dans un second temps, la dégradation de BD1 a été analysée par western blot après deux heures d'incubation en présence d'expectorations provenant de patients CF ou de protéases retrouvées chez ces patients.

Résultats

Nous avons montré que BD1 maintient son activité bactéricide vis-à-vis de *S. aureus* en présence de cellules épithéliales bronchiques et que le mucus artificiel CF n'empêche pas l'accès de BD1 à *S. aureus*. Cependant, nous observons également une dégradation du peptide par les protéases présentes dans les expectorations des patients CF.

Discussion et conclusions

Ces premiers résultats soutiennent un potentiel d'utilisation de BD1 pour traiter les infections à SARM dans le contexte de la mucoviscidose. Des stratégies sont en cours d'étude afin de protéger le peptide. Nous testerons également l'activité de BD1 sur le biofilm qui correspond au mode de vie en communauté des bactéries.

Références

(1) : Blanchard et Waters, *Semin Respir Crit Care Med* 2019.

(2) : Loth et al., *mbio* 2019.

Ce projet est financé par : ANR

LEFEBVRE Delphine

CARACTERISATION D'UNE NOUVELLE PHOSPHOLIPASE ANTIBACTERIENNE DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Delphine Lefebvre, Chantal Soscia, Bérengère Ize & Sophie Bleves
Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires (UMR7255), IMM, Centre National de la Recherche Scientifique and Aix-Marseille University, Marseille, France,

Objectifs

Le pathogène opportuniste *P. aeruginosa* est responsable d'infections chroniques sévères chez les patients immunodéprimés comme les malades atteints de la mucoviscidose. Développer de nouvelles stratégies anti-virulence en alternative aux antibiotiques est primordial et commence par le décryptage des mécanismes moléculaires de virulence. Notre équipe s'intéresse aux toxines, sécrétées par le système de sécrétion de type VI (T6SS), qui sont employées pour prendre contrôle de l'hôte ou éliminer d'autres bactéries. Le T6SS fonctionne comme une arbalète qui injecte une flèche chargée en toxines dans les cellules cibles. Le projet est centré sur la caractérisation d'une nouvelle toxine antibactérienne de *P. aeruginosa*, la phospholipase Tle1 (1). Nos objectifs sont de déterminer, i) l'identité de l'antitoxine qui contrecarre son activité et ii) son mécanisme et ses partenaires de sécrétion. Le gène *tle1* est dans un locus contenant 4 autres gènes, dont les produits sont des candidats pouvant exercer ces fonctions.

Matériels et méthodes

Des tests de toxicité hétérologue ont été employés pour confirmer l'identité de l'antitoxine de Tle1. Ils consistent à la co-production chez *Escherichia coli* de la toxine et de ses antitoxines. Le double hybride a été utilisé pour détecter des interactions entre Tle1 et ses antitoxines. L'effet antibactérien de Tle1 et son mode de sécrétion ont été étudiés par des tests de compétition. Ils consistent à co-cultiver différentes souches de *P. aeruginosa* attaquant avec une souche cible ne produisant plus les antitoxines de Tle1 et à suivre le nombre de cibles survivantes ayant poussées sur milieu sélectif.

Résultats

Le caractère antibactérien de Tle1 a été confirmé en identifiant son compartiment cellulaire d'action, le périplasma, par le test de toxicité hétérologue chez *E. coli*. Le double hybride a révélé des interactions entre Tle1 et deux antitoxines candidates (Tli1a et Tli1b) codées par le locus de *tle1*. Le test de compétition intra-*Pseudomonas* a apporté des conclusions sur le mécanisme de sécrétion de Tle1 : l'implication d'une des trois machineries T6SS de *P. aeruginosa* (H2-T6SS) et de la protéine de la pointe perforatrice de la flèche du T6SS codée par le gène *vgrG4a* du locus *tle1*. Le double hybride a montré l'interaction de VgrG4a et de Tla1, une potentielle protéine chaperonne dont le gène est codé dans le locus *tle1*.

Discussion et conclusions

Pour étudier le mécanisme moléculaire de neutralisation de Tle1 par ses deux antitoxines, caractéristique rare dans la littérature, des approches structurales de cristallisation aux rayons X seront utilisées durant cette thèse. Nos résultats ont mis en exergue l'effet antibactérien de Tle1, qui pourrait favoriser l'établissement de *P. aeruginosa* au sein du microbiote pulmonaire. Chez les malades atteints de la mucoviscidose, bien qu'elle ne soit pas la plus fréquemment retrouvée chez les jeunes patients, elle devient le pathogène majoritaire à l'âge adulte. Il est envisageable que les poumons soient le lieu d'une compétition entre *P. aeruginosa* et d'autres agents pathogènes souvent rencontrés comme *Burkholderia* et *Acinetobacter* qui possèdent des T6SS. L'effet de Tle1 dans cette concurrence sera analysé par des tests de compétition inter-espèces. Etant sécrétée par la machinerie H2-T6SS, impliquée dans l'internalisation de *P. aeruginosa* dans des cellules non phagocytaires de l'hôte et dans l'autophagie (2,3,4,5), le rôle anti-eucaryote de Tle1 sera testé grâce à des tests d'infection de lignées cellulaires.

Références

- (1) Hu et al. (2014) doi:10.1107/S1399004714012899

- (2) Berni et al. (2019) doi : 10.3389/fmicb.2019.01218
- (3) Sana et al. (2012) doi:10.1074/jbc.M112.376368
- (4) Jiang et al. (2014) doi: 10.1016/j.chom.2014.04.010
- (5) Jiang et al. (2016) doi: 10.1016/j.celrep.2016.07.012

Ce projet est financé par : Aix-Marseille Université, CNRS

LUSSAC-SORTON Florian

ÉVOLUTION DES MICROBIOTES ET MYCOBIOTES PULMONAIRE ET DIGESTIF CHEZ LES PATIENTS MUCOVISCIDOSIQUES SOUS LUMACAFTOR/IVACAFTOR

Florian Lussac-Sorton¹, Éléna Charpentier¹, Stéphanie Bui^{1,2}, Michael Fayon^{1,2,3}, Julie Macey^{1,4}, Élodie Blanchard^{1,4}, Sébastien Imbert^{1,5}, Thierry Schaevebeke⁶, le Groupe d'Investigation LumIvaBiota, Raphaël Enaud^{1,2,3}, Laurence Delhaes^{1,5}

1. Université de Bordeaux, INSERM U1045, France
2. CRCM pédiatrique, CHU de Bordeaux, France
3. CIC pédiatrique 1401, CHU de Bordeaux, France
4. CRCM adultes, CHU de Bordeaux, France
5. laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Bordeaux, France
6. service de Rhumatologie, CHU de Bordeaux, France

Objectifs

La mucoviscidose est une maladie systémique associée à un déséquilibre des écosystèmes microbiens au niveau des muqueuses pulmonaire et digestive. Sa prise en charge est actuellement marquée par le développement des modulateurs de CFTR, dont l'association Lumacaftor/Ivacaftor (Lum-Iva). Le protocole national LUM-IVA-BIOTA vise à étudier l'impact de Lum-Iva sur l'évolution de des dysbioses bactérienne et fongique chez les patients mucoviscidosiques.

Matériels et méthodes

Des patients mucoviscidosiques débutant un traitement par Lum-Iva ont été inclus dans l'étude (75 patients de plus de 12 ans et 162 enfants de moins de 12 ans), pour qui des prélèvements d'expectorations et de selles ont été collectés avant initiation du traitement (T0) et à 3 (M3), 6 (M6) et 12 (M12) mois post-traitement. L'analyse du microbiote et du mycobiote a été réalisée par séquençage haut débit sur MiSeq® (Illumina) ciblant respectivement les régions V3-V4 de l'ADNr 16S et ITS2 de l'ADNr, et complétée par l'évaluation de la biomasse totale par qPCR. L'inflammation muqueuse a été évaluée par le dosage de la calprotectine.

Résultats

Parmi les patients de plus de 12 ans, l'analyse des expectorations retrouve une augmentation significative à M6 de l' α -diversité bactérienne uniquement chez les patients non colonisés par *Pseudomonas aeruginosa*. Dans la cohorte pédiatrique, des résultats préliminaires obtenus lors de l'analyse des selles de 32 patients montrent une amélioration de la diversité du mycobiote fécal à M6 (augmentation de l' α -diversité fongique, diminution du ratio Basidiomycètes/Ascomycètes), associée à une diminution significative de la calprotectine fécale.

Discussion et conclusions

Cette étude décrit pour la première fois l'évolution des microbiotes et mycobiotes pulmonaire et digestif chez les patients traités par Lum-Iva. Les résultats obtenus témoignent de l'intérêt d'une instauration précoce du traitement par modulateurs de CFTR, en particulier avant que les patients ne soient colonisés par *P. aeruginosa*. Ils devront être confirmés sur l'ensemble de la cohorte pédiatrique avec l'analyse conjointe des expectorations et selles pour intégrer la dimension d'axe intestin-poumon dans la mucoviscidose.

Références

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose & Bourse Vertex Pharmaceuticals

MITRI Christie

DEVELOPPEMENT D'UNE APPROCHE POUR TRAITER TOUS LES PATIENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE AVEC DES OLIGONUCLEOTIDES ANTISENS

Christie MITRI, Nathalie ROUSSELET, Harriet CORVOL, Olivier TABARY

1. Sorbonne Université, Inserm, UMRS938, Paris, FR

2. AP-HP, Hôpital Trousseau, Paris, FR

Objectifs

Dans les dernières années, les correcteurs et les potentiateurs de la protéine CFTR ont donné de bons résultats cliniques chez les patients présentant des mutations spécifiques du gène CFTR. Cependant, en raison de la multiplicité des mutations, il existe encore des patients pour lesquels ces traitements ne sont pas adaptés et qui ont besoin de stratégies alternatives indépendantes de CFTR tel que les patients de classe I. Bien que CFTR soit le principal canal chlorure au niveau pulmonaire, l'anoctamine 1 (TMEM16A), un canal chlorure activé par le calcium, pourrait compenser la déficience de l'activité de CFTR [1]. Dans des études antérieures, nous avons montré que l'expression et l'activité de TMEM16A sont diminuées dans les cellules épithéliales bronchiques CF en raison de la surexpression du microARN-9. À cette fin, nous avons développé un oligonucléotide antisens (ASO TMEM16A) qui empêche le microARN-9 de se lier à l'ARNm de TMEM16A, rétablissant ainsi l'expression et l'activité du canal TMEM16A au niveau des épithéliums [2].

Ce travail vise à étudier les effets in vitro et in vivo de l'ASO TMEM16A sur les paramètres dérégulés dans la mucoviscidose afin de préparer les futures études cliniques.

Matériels et méthodes

Les expériences sont réalisées sur des lignées cellulaires et des cellules primaires avec diverses mutations. Le modèle de souris porteuses de mutations F508del et G542X est aussi utilisé.

Résultats

Les résultats montrent in vitro que l'ASO TMEM16A améliore la clairance mucociliaire et l'activité chlorure lié à TMEM16A de manière spécifique, même dans les cellules primaires de patients porteurs de mutations de classe I.

Des études sur des souris CF qui meurent normalement d'une obstruction intestinale au moment du sevrage (36 jours), démontrent que l'injection en sous cutané de l'ASO TMEM16A augmente significativement la médiane de vie des souris jusqu'à 200 jours. En outre, les résultats montrent une amélioration de la fertilité des souris CF mâles, également décrite chez les hommes atteints de mucoviscidose.

Discussion et conclusions

L'ensemble de nos résultats montrent que cette stratégie pourrait s'appliquer à tous les patients atteints de mucoviscidose, quelles que soient leurs mutations. Elle peut être associée à des modulateurs de CFTR ou à des potentiateurs de TMEM16a pour obtenir des effets additifs et cibler plusieurs fronts tels que les symptômes pulmonaires et gastro-intestinaux.

Actuellement, nous nous attachons à étudier les effets de la molécule in vitro et in vivo sur des modèles ayant des mutations de classe 1 et à comparer les résultats par rapport aux nouvelles molécules de Vertex.

Références

[1] Mitri C, et al. Cells. 2021.

[2] Sonnevile F, et al. Nat Commun. 2017.

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose & Blanche pour Vaincre la Mucoviscidose & Fondation maladies rares

NILLY Flore

PERSISTANCE D'ISOLATS CLINIQUES DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA ET EFFICACITE DES TRAITEMENTS ANTIBIOTIQUES ET/OU ANTI-BIOFILM CHEZ LE POISSON ZEBRE.

Flore Nilly, Stéphane Pont et Anne Blanc-Potard
LPHI (Laboratory of Pathogen Host Interactions), UMR CNRS 5235, Montpellier

Objectifs

La résistance aux antibiotiques cause des problèmes majeurs dans le traitement des infections bactériennes. Nous travaillons plus particulièrement sur la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, qui est responsable d'une variété d'infections aigües et a une implication majeure dans la mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose qui sont chroniquement infectés. Notre approche s'est orientée vers l'utilisation du poisson zèbre *Danio rerio*, qui est désormais établi comme un modèle vertébré pertinent pour la compréhension de la pathogénicité bactérienne et la validation de nouveaux traitements. Notre objectif est d'étudier dans ce modèle la persistance de souches cliniques isolées de patients atteints de mucoviscidose (en collaboration avec P. Plésiat, CHU Besançon) et l'efficacité des traitements.

Matériels et méthodes

Nous avons développé une nouvelle méthode d'infection basée sur la technique d'immersion d'embryons de poisson zèbre infectés au niveau de la queue. La capacité des souches à persister au sein de l'hôte est évaluée pendant 3 jours, ainsi que leur sensibilité vis-à-vis d'antibiotiques connus, par quantification d'UFC (Unité formant colonie). La visualisation de l'infection en temps réel *in vivo* est également possible du fait de la transparence des embryons.

Résultats

L'évolution de la charge bactérienne au sein des embryons infectés jusqu'à 3 jours nous a permis d'identifier plusieurs isolats à phénotype persistant. Nos études actuelles portent sur un isolat persistant particulier (isolat B), capable de coloniser les sites d'infections sous forme d'agrégats, qui pourraient avoir des caractéristiques de biofilm. Nous avons montré que la persistance de cet isolat est associée à une diminution de la sensibilité à plusieurs antibiotiques classiquement utilisés en clinique contre *P. aeruginosa*. Nous testons actuellement l'efficacité de molécules anti-biofilm, en combinaison ou non avec des antibiotiques, pour éliminer les bactéries persistantes.

Discussion et conclusions

Nous avons montré que la persistance d'isolat clinique de *P. aeruginosa* dans l'embryon de poisson zèbre est associée à une tolérance au traitement antibiotique, ce qui rejoint la problématique rencontrée en clinique. Notre modèle apparaît donc pertinent pour étudier l'efficacité de traitement dans un contexte d'infection persistante. Dans ce contexte, nos projets visent maintenant à définir l'efficacité de nouvelles molécules anti-biofilm (en combinaison ou non avec des antibiotiques) dans l'élimination d'une infection à *P. aeruginosa* persistante.

Références

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose & Association Grégory Lemarchal

PONT Stéphane

PATHOGENICITE DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA ET REPONSE IMMUNITAIRE INNEE ASSOCIEE AU COURS D'UNE INFECTION PERSISTANTE DANS UN MODELE D'EMBRYON DE POISSON ZEBRE

Stéphane PONT, Flore NILLY, Anne BLANC-POTARD
Laboratory of Pathogen Host Interaction, Montpellier, France

Objectifs

L'objectif de ce travail est d'établir un modèle d'infection persistante à *P. aeruginosa* in vivo facile à utiliser, afin de mieux caractériser l'interaction hôte-pathogène sous-jacente à la persistance de *P. aeruginosa* et de tester de nouvelles molécules anti-Pseudomonas.

Matériels et méthodes

Nous utilisons comme modèle d'infection l'embryon de poisson zèbre, un vertébré aux caractéristiques uniques pour l'étude des interactions hôte-pathogène grâce à de nombreux outils génétiques et à la possibilité d'imagerie in vivo en temps réel. Suite à une blessure à la queue, les embryons sont incubés en présence d'isolats cliniques issus de patients atteints de mucoviscidose (source : CHU Besançon, Patrick PLESIAT), induisant la colonisation de la plaie. La capacité des souches à persister au sein de l'hôte pendant trois jours est évaluée, ainsi que l'interaction entre les bactéries et le système immunitaire inné, notamment leur internalisation par les macrophages/neutrophiles et le recrutement de ces phagocytes au niveau du site d'infection. De plus, les isolats cliniques sont caractérisés phénotypiquement (résistance à la phagocytose, capacité à former un biofilm...).

Résultats

Nous avons montré que certains isolats cliniques (dont la souche B) persistent au sein de l'hôte sans induire de mortalité, alors que les autres isolats testés sont totalement éradiqués en deux ou trois jours. Les bactéries persistantes sont régulièrement retrouvées sous forme d'agrégats à l'intérieur ou à l'extérieur des macrophages, certaines de ces structures pouvant persister au moins 10h dans la cellule. Contrairement aux souches non-persistantes, l'isolat B résiste aux macrophages et est capable de former des biofilms in vitro.

Discussion et conclusions

Nous avons pu développer un modèle simple de colonisation persistante chez un hôte vertébré, basé sur l'analyse d'isolats cliniques issus de patients atteints de mucoviscidose. Nos résultats indiquent que le système immunitaire inné et l'état intracellulaire des bactéries contribuent à la persistance. Des études complémentaires sont en cours afin de caractériser les mécanismes responsables de la persistance de l'isolat B. De plus, des composés sont actuellement testés dans le but d'augmenter l'efficacité d'antibiotiques, généralement peu efficaces contre les bactéries qui persistent. Nos résultats offrent un nouveau modèle d'infection persistante pour tester des molécules anti-Pseudomonas dans un contexte normal ou CF (à l'aide d'une lignée de poisson cftr-/-).

Références

Pont S, Blanc-Potard AB. Zebrafish embryo infection model to investigate Pseudomonas aeruginosa interaction with innate immunity and validate new therapeutics. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021.

Ce projet est financé par : *Vaincre la Mucoviscidose & Association Grégory Lemarchal*

POUCET Eloi

IDENTIFICATION DES RECEPTEURS CELLULAIRES ET DES LIGANDS FONGIQUES IMPLIQUES DANS LA SYNTHÈSE D'IL-8 PAR LES CELLULES ÉPITHÉLIALES BRONCHIQUES INFECTÉES PAR ASPERGILLUS FUMIGATUS.

Eloi Poucet, Jeanne Bigot, Audrey Moreau, Loïc Guillot, Thierry Fontaine, Viviane Balloy
INSERM, CRSA (centre de recherche Saint-Antoine), Institut Pasteur

Objectifs

Aspergillus fumigatus (Af) se propage sous forme de spores qui peuvent pénétrer dans le tractus respiratoire où elles sont éliminées par l'immunité innée. En présence d'un déficit immunitaire, les spores peuvent germer et former des filaments. Nous avons montré que les cellules épithéliales bronchiques (CEB), premières cellules respiratoires à entrer en contact avec les pathogènes, reconnaissent les filaments induisant la synthèse d'IL-8, une chimiokine pro-inflammatoire (1). Le récepteur ephrin type-A récepteur 2 (EphA2), identifié dans des cellules épithéliales orales, est décrit pour interagir avec le β -glucane de *Candida albicans* (2). Nos données transcriptomiques issues de CEB infectées par Af ont montré une surexpression d'EphA2 en présence des filaments. Dans cette étude, notre but est d'identifier les récepteurs cellulaires, tel que EphA2, les ligands fongiques et les voies de signalisation impliqués dans la réponse inflammatoire des CEB infectées par Af.

Matériels et méthodes

Les CEB de la lignée BEAS-2B ont été cultivées dans du milieu F12 supplémenté en antibiotiques et sérum de veau fœtal. Les composés pariétaux purifiés de paroi d'Af ont été fournis par le Dr Fontaine. La phosphorylation de EphA2 a été mesurée par Western Blot. Des expériences d'ARN interférence ont été réalisées afin d'étudier l'implication de EphA2 dans la synthèse d'IL-8, mesurée par ELISA. Un inhibiteur de STAT3, le niclosamide, a été utilisé afin d'étudier son rôle dans l'activation des CEB infectées par Af.

Résultats

Nous avons montré qu'EphA2 était significativement phosphorylé après 6 et 8 heures d'infection des CEB par Af et que sa diminution d'expression était associée à une diminution de synthèse d'IL-8. De même, l'inhibition de STAT3 entraîne une diminution de la synthèse d'IL-8. Nous avons mis en évidence le rôle de plusieurs composés pariétaux d'Af, le galactosaminogalactane et les α -1-3 glucanes, dans la synthèse d'IL-8 par les CEB.

Nos objectifs sont maintenant d'étudier l'interaction de ces composés pariétaux avec EphA2 et des co-récepteurs potentiels et d'identifier les voies de signalisation activées lors de cette interaction. Les données obtenues poseront les bases pour l'étude de médiateurs autres que l'IL-8 induits par cette interaction hôte-pathogène.

Discussion et conclusions

Nous avons montré qu'EphA2 était significativement phosphorylé après 6 et 8 heures d'infection des CEB par Af et que sa diminution d'expression était associée à une diminution de synthèse d'IL-8. De même, l'inhibition de STAT3 entraîne une diminution de la synthèse d'IL-8. Nous avons mis en évidence le rôle de plusieurs composés pariétaux d'Af, le galactosaminogalactane et les α -1-3 glucanes, dans la synthèse d'IL-8 par les CEB.

Nos objectifs sont maintenant d'étudier l'interaction de ces composés pariétaux avec EphA2 et des co-récepteurs potentiels et d'identifier les voies de signalisation activées lors de cette interaction. Les données obtenues poseront les bases pour l'étude de médiateurs autres que l'IL-8 induits par cette interaction hôte-pathogène.

Références

1. Balloy V, Sallenave JM, Wu Y, Touqui L, Latgé JP, Si-Tahar M, et al. *Aspergillus fumigatus*-induced Interleukin-8 Synthesis by Respiratory Epithelial Cells Is Controlled by the Phosphatidylinositol 3-Kinase, p38 MAPK, and ERK1/2 Pathways and Not by the Toll-like Receptor-MyD88 Pathway. *J Biol Chem*. 11 juill 2008;283(45):30513-21.

2. Swidergall M, Solis NV, Millet N, Huang MY, Lin J, Phan QT, et al. Activation of EphA2-EGFR signaling in oral epithelial cells by *Candida albicans* virulence factors. *PLoS Pathog.* 20 janv 2021;17(1):e1009221.

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose & Association Grégory Lemarchal

ROCHARD Camille

ETUDE DE L'EFFET ANTIFONGIQUE D'UN PEPTIDE ANTIMICROBIEN SUR ASPERGILLUS FUMIGATUS

C. ROCHARD¹, J. BIGOT², V. BALLOY¹, P. BULET³, C. HENNEQUIN², J. GUITARD²

¹ Sorbonne Université, Inserm U938, Centre de Recherche Saint-Antoine, 75012 Paris, France

² Centre de Recherche Saint-Antoine, AP-HP, Inserm, Hôpital Saint-Antoine, Service de Parasitologie-Mycologie, Sorbonne Université, 75012 Paris, France

³ Université Grenoble Alpes, Institut des biosciences avancées, Inserm UI209, CNRS UMR 5309, 38700 La Tronche, France.

Objectifs

La colonisation bronchique par les pathogènes fongiques, notamment par *Aspergillus fumigatus*, est associée à une diminution des performances respiratoires des patients atteints de mucoviscidose. Elle constitue le point de départ de complications allergiques au cours de la pathologie. Les traitements antifongiques actuels consistent à administrer par voie orale des azolés qui sont les molécules les plus actives contre les champignons filamenteux. Cependant elles présentent un certain nombre d'interactions médicamenteuses et d'effets secondaires. Par ailleurs, on observe une émergence de souches d'*A. fumigatus* résistantes. Les peptides antimicrobiens apparaissent comme une approche thérapeutique prometteuse et pourraient constituer une alternative ou un complément aux traitements antifongiques conventionnels.

Un peptide antimicrobien XY, analogue d'une l'héliomicine de lépidoptère, a montré une activité antifongique vis-à-vis du phytopathogène *Botrytis cinerea*, un champignon filamenteux comme *A. fumigatus*. Notre objectif est d'étudier le potentiel thérapeutique de ce peptide vis-à-vis d'*A. fumigatus*. Dans un premier temps, nous allons caractériser son activité anti-aspergillaire sur les différents morphotypes (spores et filaments) de souches cliniques d'*A. fumigatus*, sensibles et résistantes aux azolés.

Matériels et méthodes

L'activité antifongique a été testée vis-à-vis d'une souche d'*A. fumigatus* de référence (Af293) et d'une souche clinique résistante aux azolés (HEGP4017). L'activité métabolique des spores traitées par une gamme de concentrations du peptide (0,156 – 10 μ M), pendant 15 heures, a été étudiée au moyen d'un test métabolique cinétique à la résazurine. L'activité fongicide du peptide vis-à-vis des filaments a été mesurée grâce à une coloration au Sytox green, après 3 heures de traitement. L'impact du peptide sur la morphologie des filaments a été observée au microscope.

Résultats

L'activité métabolique de la souche de référence est inhibée de 40% après 12 heures de traitement par 5 μ M du peptide. Cette diminution d'activité s'accompagne d'une modification morphologique des filaments qui deviennent courts, hyperramifiés et tortueux. Par ailleurs dès 5 μ M le peptide devient fongicide (100% de mortalité).

Concernant la souche clinique résistante aux azolés, l'activité métabolique des spores est inhibée de 70% dès les plus faibles concentrations de peptide (0,156 μ M).

Discussion et conclusions

Ces derniers résultats nous laissent très optimistes quant à la suite des expériences. L'activité antifongique du peptide va être testée sur d'autres souches cliniques et en contexte infectieux, in vitro, en présence de cellules épithéliales bronchiques. Une analyse transcriptomique du champignon, traité ou non par ce peptide à différents temps, est en cours et devrait permettre de mieux comprendre l'impact du peptide sur le champignon. Il sera important également de vérifier que le champignon n'acquière pas de résistance vis-à-vis de ce peptide.

Ce projet n'a pas de financement

TIDJANI Abdoul-Razak

ROLE DES POLYAMINES DANS LA VIRULENCE DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA AU COURS DE L'INFECTION PULMONAIRE CHRONIQUE CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE

Abdoul-Razak TIDJANI 1, Eric FAUDRY 2, Mylène ROBERT-GENTHON 2, Ina ATTREE 2, Bertrand TOUSSAINT 1, Audrey LE GOUELLEC 1

1. Laboratoire de Recherche Translationnelle et Innovation en Médecine et Complexité (TIMC), Grenoble
2. Institut de Biologie Structurale (IBS), Grenoble

Objectifs

En utilisant une approche métabolomique non ciblée à haute résolution, nous avons précédemment démontré que les souches de *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) provenant de 32 adultes atteints de mucoviscidose pouvaient être classées en 3 métabotypes, les souches de chaque métabotype présentant des profils métaboliques similaires. Parmi les métabolites identifiés, les polyamines notamment la spermidine, représentent un des métabolites discriminants de l'appartenance à un métabotype. Nos travaux ont démontré une corrélation entre l'augmentation de la production bactérienne de ces métabolites et une augmentation de la cytotoxicité des isolats de Pa. Cette étude vise à identifier les mécanismes par lesquels Pa module sa production de polyamines au cours de l'infection chronique chez les patients CF et à déterminer l'impact de cette modulation sur l'expression de ses facteurs de virulence.

Matériels et méthodes

À partir de 28 souches sélectionnées parmi une cohorte de 66 isolats provenant de 32 patients, nous avons formé deux groupes de souches : celles produisant un niveau élevé de polyamines (PH) et celles produisant un faible niveau de polyamines (PL). Nous avons ensuite séquencé les génomes des 28 souches et les transcriptomes des 6 souches PH et des 5 souches PL et utilisé une approche de génomique comparative et de transcriptomique pour identifier les mécanismes par lesquels ces souches modulent leur production de polyamines.

Résultats

L'analyse phylogénomique a confirmé l'affiliation des souches provenant d'un même patient (évolution de la même souche au cours de l'infection chez chaque patient). L'analyse de l'expression différentielle des gènes entre les souches PH et PL a confirmé les résultats précédemment obtenus par analyse métabolomique : corrélation entre l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des polyamines et l'expression des gènes de virulence chez Pa avec cependant plusieurs mécanismes pouvant conduire aux phénotypes observés.

Discussion et conclusions

En utilisant une approche combinée de métabolomique, de transcriptomique et de génomique, nous avons identifié comment Pa pouvait moduler sa production de polyamine et l'impact que cela pourrait avoir sur la virulence et la physiopathologie de cette bactérie.

Références

Moyne, O.; Castelli, F.; Bicout, D.J.; Boccard, J.; Camara, B.; Cournoyer, B.; Faudry, E.; Terrier, S.; Hannani, D.; Huot-Marchand, S.; Léger, C.; Maurin, M.; Ngo, T.-D.; Plazy, C.; Quinn, R.A.; Attree, I.; Fenaille, F.; Toussaint, B.; Le Gouëllec, A. Metabotypes of *Pseudomonas aeruginosa* Correlate with Antibiotic Resistance, Virulence and Clinical Outcome in Cystic Fibrosis Chronic Infections. *Metabolites* 2021, 11, 63. <https://doi.org/10.3390/metabo11020063>

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose & Association Grégory Lemarchal

TRIBOUT Mathilde

ÉTUDE DU RECEPTEUR IMPLIQUÉ DANS L'IMPORT DU METALLOPHORE PSEUDOPALINE CHEZ LA BACTÉRIE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

M. Tribout¹, L. Bosc¹, G. Ball¹, P. Plésiat², P. Arnoux³, T. Secher⁴, N. Heuzé-Vourc'h⁴, R. Voulhoux¹
1CNRS/ Université d'Aix-Marseille, LCB UMR7283, Marseille, France
2CNRS/Université de Bourgogne Franche-Comté, Lab. de Microbiologie, UMR 6249, Besançon, France
3CEA/CNRS/Aix-Marseille Université, BIAM UMR 7265, CEA Cadarache, Saint-Paul-lez Durance, France
4INSERM/Université de Tours, Centre d'Étude des Pathologies Respiratoires, U1100, Tours, France

Objectifs

La bactérie pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) est responsable d'infections pulmonaires aiguës mais aussi de colonisations chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose (CF). Pour survivre face à l'immunité nutritionnelle de l'hôte, les bactéries sécrètent de petites molécules appelées métallobactines présentant de fortes affinités pour les métaux. La pseudopaline (Pp) est un métallobactine produit, sécrété puis récupéré par Pa lui permettant d'acquiescer du zinc en condition de forte carence en ce métal [1]. Cette voie s'avère nécessaire à la croissance de Pa dans le mucus pulmonaire [2]. L'import de la Pp complexée au métal est médié par CntO, un récepteur de membrane externe appartenant à la famille des « TonB-Dependent Transporter » [1]. L'objectif de cette étude est de mieux caractériser le récepteur CntO afin de mieux comprendre son rôle et son mode de fonctionnement dans la voie Cnt.

Matériels et méthodes

Les souches de Pa PA14 sauvage (PA14WT) et délétée de cntO (PA14ΔcntO) ou cntL (PA14ΔcntL) sont cultivées en milieu minimum succinate (MS) supplémenté en EDTA (milieu MCM) afin d'induire la carence métallique nécessaire à l'activation de la voie Cnt. Les phénotypes de croissance et de formation de biofilm ont été comparés entre les différentes souches. L'induction de la voie Cnt après infection chez la souris est déterminée par Western Blot. La présence de l'anticorps anti-CntO a été recherchée par Western Blot dans des sérums de patients CF ayant développé une infection à Pa. Les études de microscopie ont été menées via l'utilisation d'une Pp couplée à la fluorescéine (P-FL) [3].

Résultats

Nos expériences montrent qu'en milieu MCM, la souche PA14ΔcntO présente, par rapport à PA14WT, un défaut de croissance et de formation de biofilm similaire à la souche PA14ΔcntL, déficiente pour la synthèse de Pp. Ce lien phénotypique supporte l'implication de CntO dans la voie Cnt. L'utilisation de la P-FL qui s'avère fonctionnelle, révèle un signal de fluorescence à la surface de la bactérie sauvage absent dans la souche PA14ΔcntO. Ces résultats montrent la fixation spécifique de la Pp sur son récepteur CntO confirmant ainsi son implication dans la voie Cnt. Enfin, la mise en évidence d'anticorps anti-CntO dans les sérums de patients CF ayant développé une infection à Pa ainsi que la détection de l'antigène CntO dans les lavages bronchoalvéolaires 30 min ou 2h post-infection confirment l'induction et donc l'importance de la voie Cnt en condition d'infection chez les patients CF.

Discussion et conclusions

Nos résultats confirment que CntO est le récepteur principal de la pseudopaline lorsque celle-ci retourne dans la bactérie pour l'approvisionner en métal. Sa détection en condition d'infection rapporte l'induction de la voie dans ces conditions et par conséquent son essentialité puisque cette voie n'est induite qu'en carence de zinc, c'est à dire lorsque la bactérie manque de zinc. Enfin, notre capacité à détecter la Pp associée à CntO à la surface de la bactérie représente un outil de choix pour étudier le mode de reconnaissance de la Pp par son récepteur.

Références

1. Lhospice S, Gomez NO, Ouerdane L, Brutesco C, Ghssein G, Hajjar C, et al. *Pseudomonas aeruginosa* zinc uptake in chelating environment is primarily mediated by the metallobactin pseudopaline. *Sci Rep.* déc 2017;7(1):17132.

2. Gi M, Lee K-M, Kim SC, Yoon J-H, Yoon SS, Choi JY. A novel siderophore system is essential for the growth of *Pseudomonas aeruginosa* in airway mucus. *Sci Rep.* déc 2015;5(1):14644.
3. Zhang J, Zhao T, Yang R, Siridechakorn I, Wang S, Guo Q, Bai Y, Shen HC, Lei X. De novo synthesis, structural assignment and biological evaluation of pseudopaline, a metallophore produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem Sci.* 2019 May 30;10(27):6635-6641.

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose & Association Grégory Lemarchal

VALDÉS Loréna

VARIATIONS DE METHYLATION DE L'ADN DANS DES GENES IMPLIQUES DANS L'INFLAMMATION CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE

Loréna Valdés, Jorg Tost, Isabelle Rivals, Milena Magalhães, Florence Busato, Laurent Mely, Sylvie Leroy, Marlène Murriss, Mireille Claustres, Davide Caimmi, Isabelle Vachier, Raphaël Chiron et Albertina De Sario

1. PhyMedExp INSERM U1046, Montpellier
2. CNRS, Montpellier
3. Université de Montpellier, Montpellier

Objectifs

L'objectif général de notre étude est de comprendre la variabilité phénotypique observée dans la mucoviscidose. En croisant des données cliniques avec des données épigénomiques générées à partir d'échantillons de sang, nous recherchons des gènes et voies de signalisation impliqués dans la réponse inflammatoire systémique.

Matériels et méthodes

La cohorte MethylCF (51 patients CF F508del/F508del et 24 témoins) a été réunie par quatre CRCM (Montpellier, Hyères, Nice et Toulouse). La méthylation de l'ADN a été analysée par hybridation sur puce MethylEpic (Illumina) sur des échantillons de sang. En utilisant des modèles de régression linéaire, nous avons corrélé les données épigénomiques avec les données cliniques des patients, notamment la condition patient/témoin, la fonction pulmonaire et l'IMC. Le logiciel WebGestalt a été utilisé pour étudier la fonction des gènes associés aux dinucléotides CpG différenciellement méthylés. La chromatine a été analysée en utilisant des données de ChIP-seq disponibles sur Epigenomic RoadMap project. Enfin, les données de méthylation de l'ADN ont été croisées avec des données transcriptomiques (RNA-seq) générées auparavant sur les mêmes échantillons de sang (Pineau et al., 2020). Les niveaux de méthylation de l'ADN de CpG d'intérêt ont été validés par pyroséquençage avec le PyroMark Q24 (Qiagen).

Résultats

Nous avons identifié de nombreux dinucléotides CpG dans lesquels le niveau de méthylation de l'ADN corrèle avec une ou plusieurs variables cliniques, notamment la condition patient/témoin, la fonction pulmonaire et l'IMC. Après étude de la chromatine, dix CpG différenciellement méthylés chez les patients sont associés à des régions prédites comme cis-régulatrices (promoteurs ou enhanceurs); trois CpG sont associés au gène SOCS3 (Suppressor of Cytokine Signaling 3). SOCS3, fortement exprimé dans le sang de patients atteints de mucoviscidose, code pour une protéine régulatrice de l'inflammation. Enfin, les niveaux de méthylation de l'ADN de CpG associés à quatre gènes ont été validés par pyroséquençage.

Discussion et conclusions

L'analyse du méthylome d'échantillons de sang met en évidence le rôle de gènes impliqués dans l'inflammation, notamment la voie de signalisation JAK/STAT. Des analyses fonctionnelles sur des lignées cellulaires sont en cours afin de caractériser la corrélation entre le changement de méthylation dans des séquences cis-régulatrices et la transcription des gènes cibles.

Références

1. Magalhães M et al. Dynamic changes of DNA methylation and lung disease in cystic fibrosis: lessons from a monogenic disease. *Epigenomics*. 10(8):1131-1145. doi: 10.2217/epi-2018-0005 (2018).
2. Scott M, De Sario A. DNA methylation changes in cystic fibrosis: Cause or consequence? *Clin Genet*. doi: 10.1111/cge.13731. (2020) Review.
3. Pineau F et al. Blood co-expression modules identify potential modifier genes of diabetes and lung function in cystic fibrosis. *PLoS One*.15(4):e0231285. doi: 10.1371/journal.pone.0231285. eCollection (2020).

4. Pineau, F et al. DNA Methylation at ATP11A cg11702988 Is a Biomarker of Lung Disease Severity in Cystic Fibrosis : A Longitudinal Study. *Genes*, 12(3), 441. doi: 10.3390/genes12030441 (2021).

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose & Fondation Maladies Rares et CBS2

Remerciements :



A l'année prochaine !

Organisation :

Vaincre la Mucoviscidose
Pôle Recherche
181, rue de Tolbiac – 75013 PARIS
recherche@vaincrelamuco.org

