

Efficacité et mode d'action d'un inhibiteur direct de la protéine InhA de *Mycobacterium abscessus*

ALCARAZ Matthéo¹, Françoise Roquet-Banères¹, Stephen Adonai Leon-Icaza³, Jan Abendroth^{4,5}, Yves-Marie Boudehen¹, Céline Cougoule³, Thomas E. Edwards^{4,5} Laurent Kremer^{1,2}

¹Centre National de la Recherche Scientifique UMR 9004, Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier (IRIM), Montpellier, France.

²INSERM, IRIM, Montpellier, France.

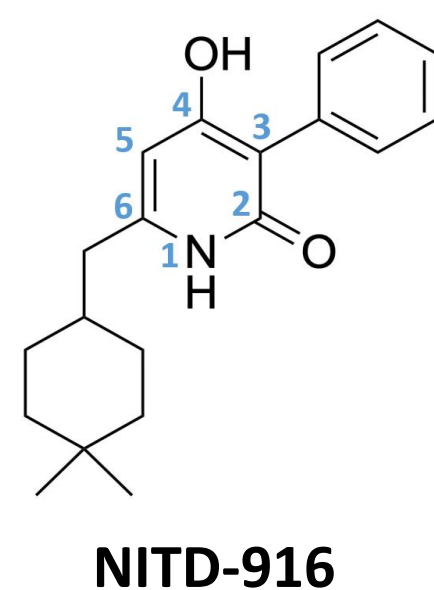
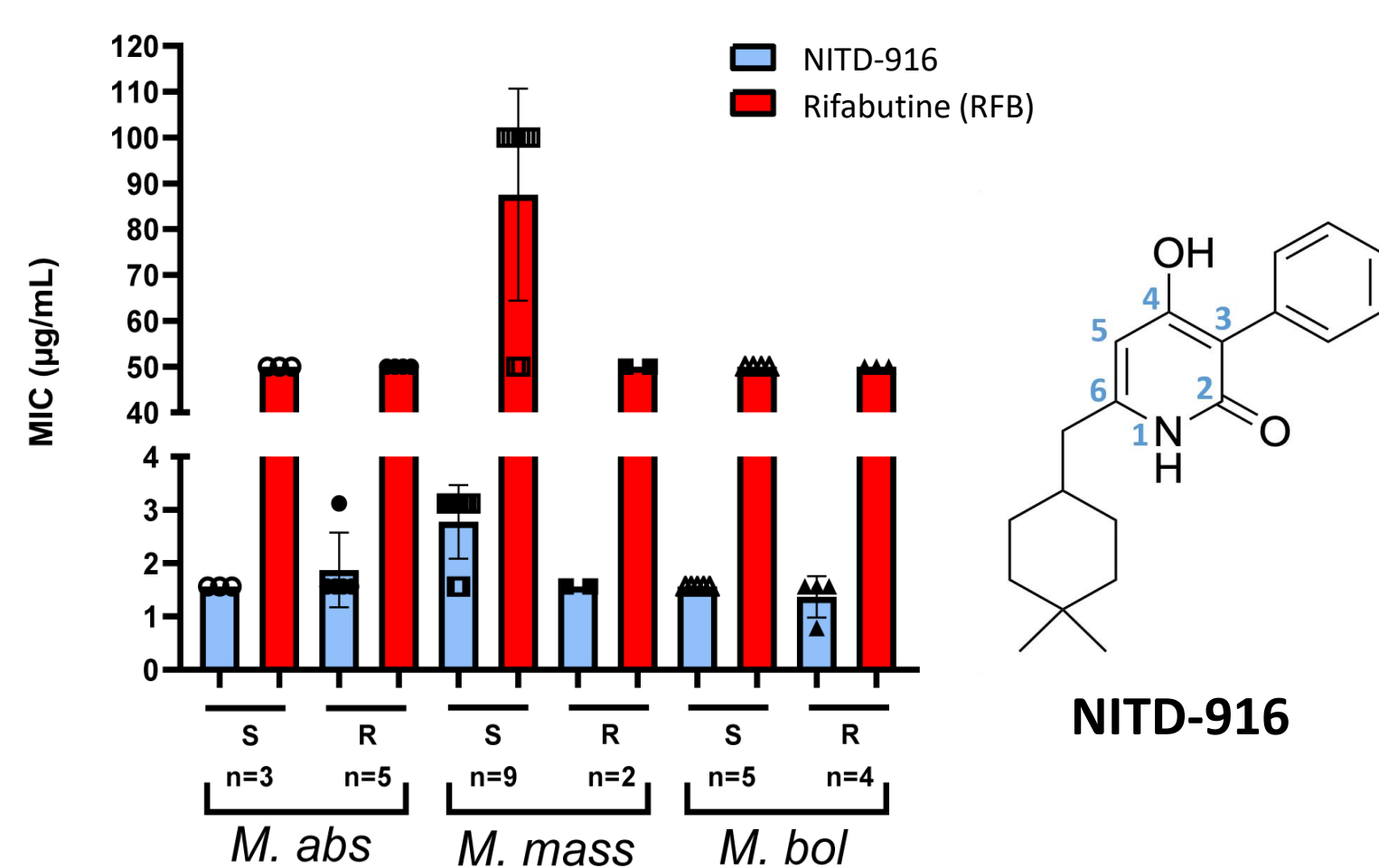
³Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), Université de Toulouse, CNRS, Toulouse, France.

⁴UCB BioSciences, Bainbridge Island, WA 98109 USA

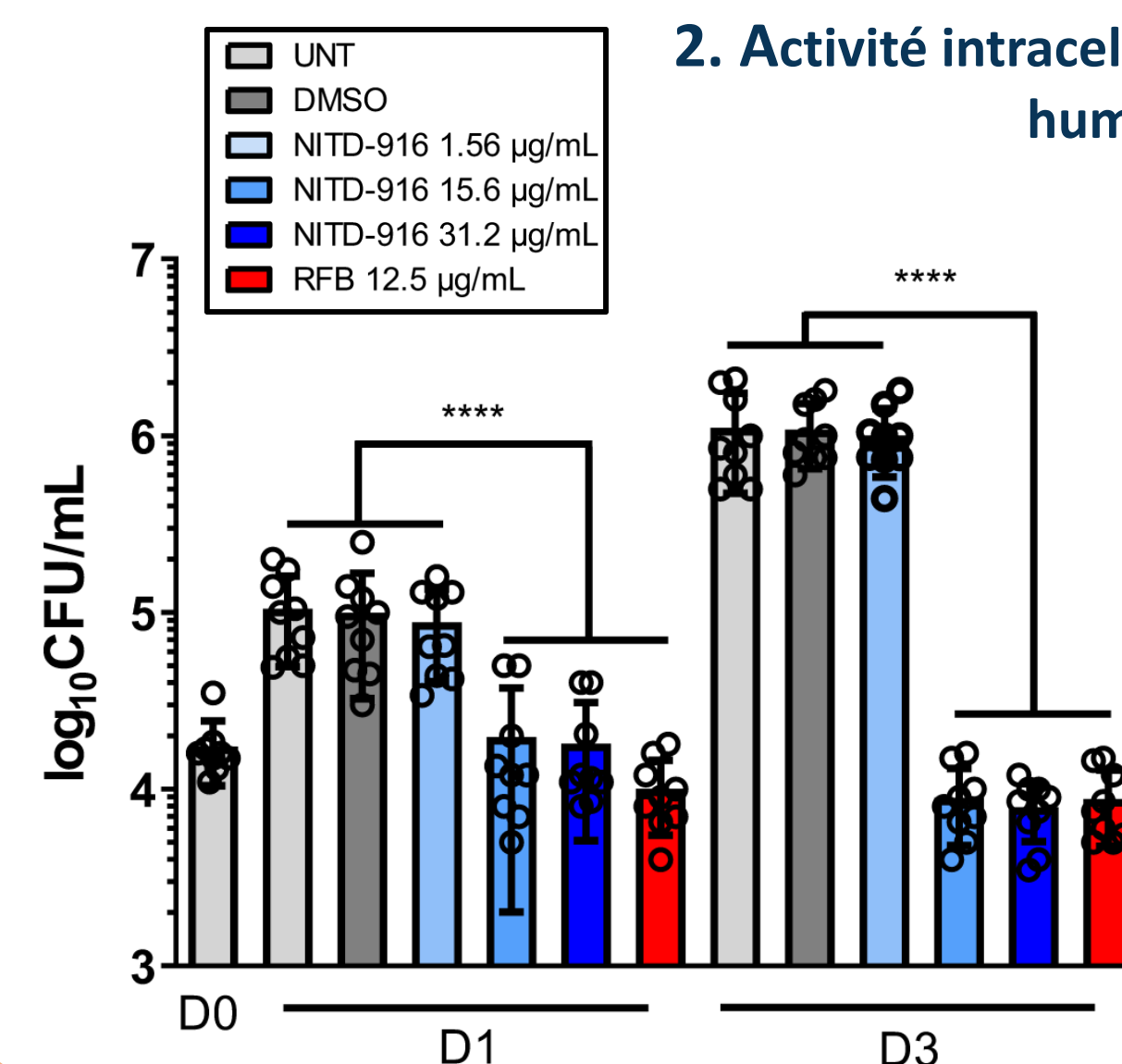
⁵Seattle Structural Genomics Center for Infectious Disease (SSGICD), Seattle, WA 98109 USA

Introduction : *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 la protéine KatG à convertir l'isoniazide en un métabolite actif chez cette bactérie. Ainsi, nous évaluons une nouvelle approche thérapeutique basée sur l'utilisation d'une 4-hydroxy-2-pyridone, NITD-916, un inhibiteur direct d'InhA chez *M. abscessus*.

1. Activité *in vitro* de NITD-916 contre le complexe *M. abscessus*



2. Activité intracellulaire de NITD-916 dans des cellules humaines THP-1 infectées



Morphotype rugueux

3. Effet de NITD-916 sur les cordes mycobactériennes intracellulaires

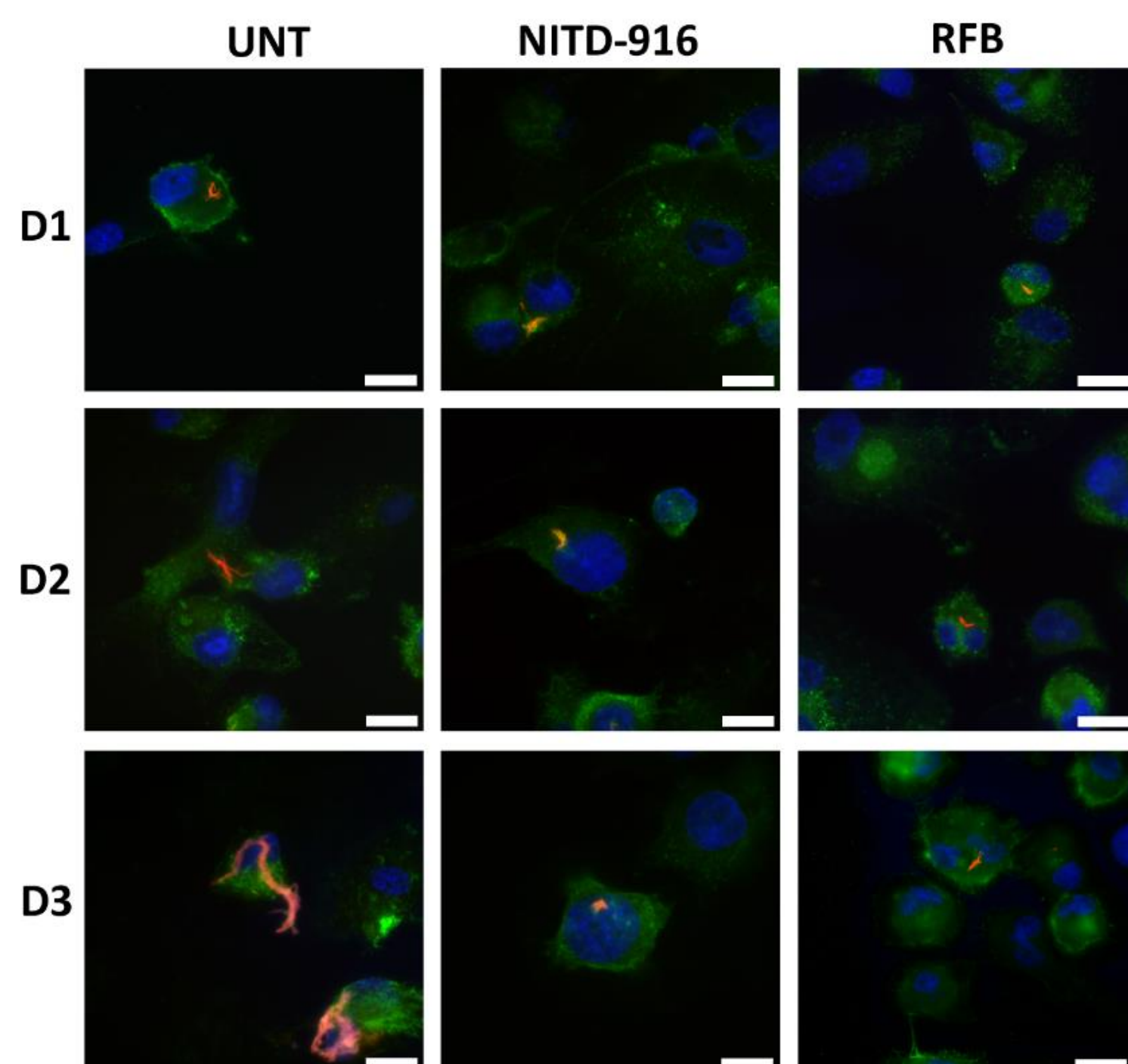
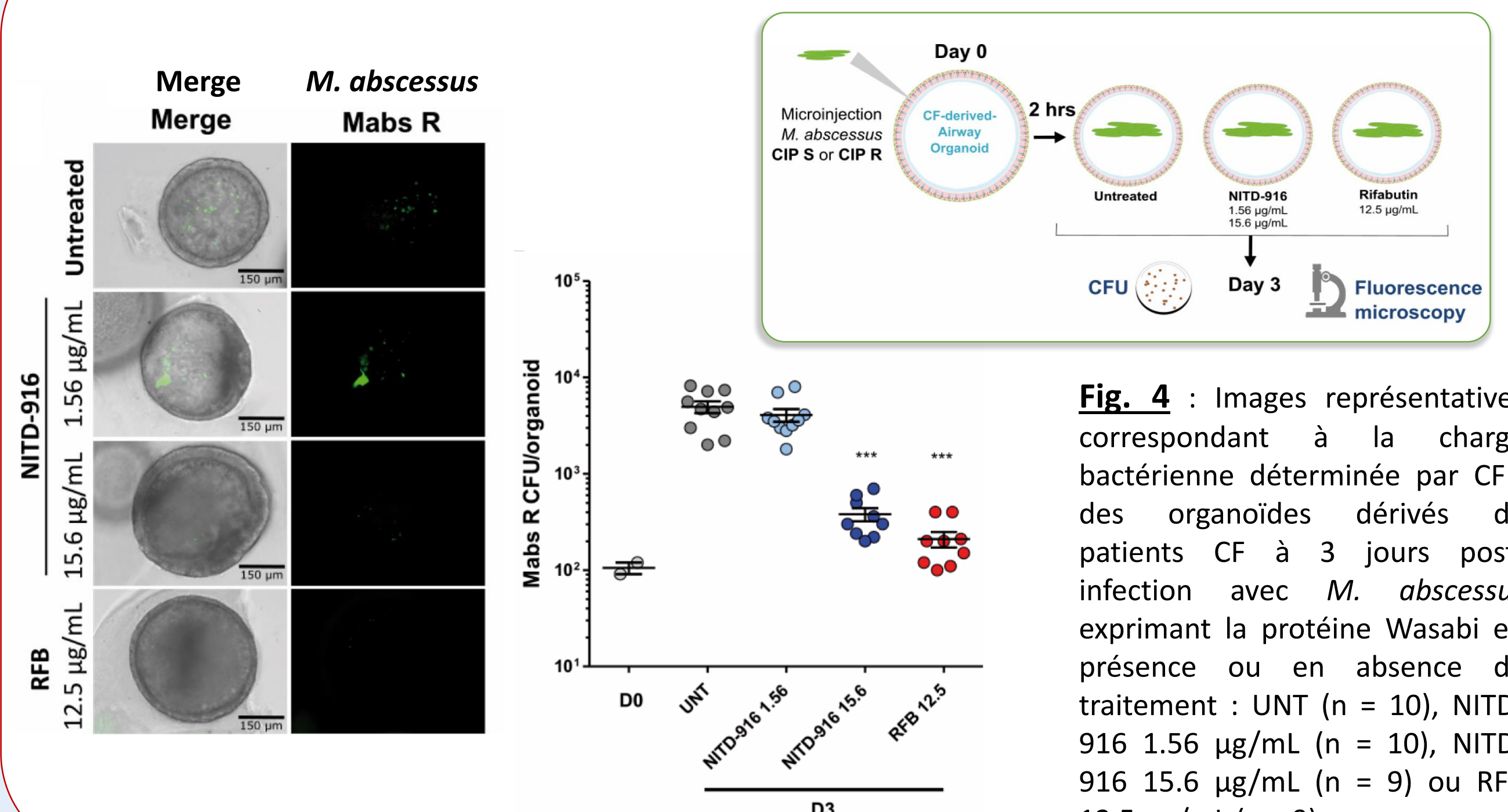


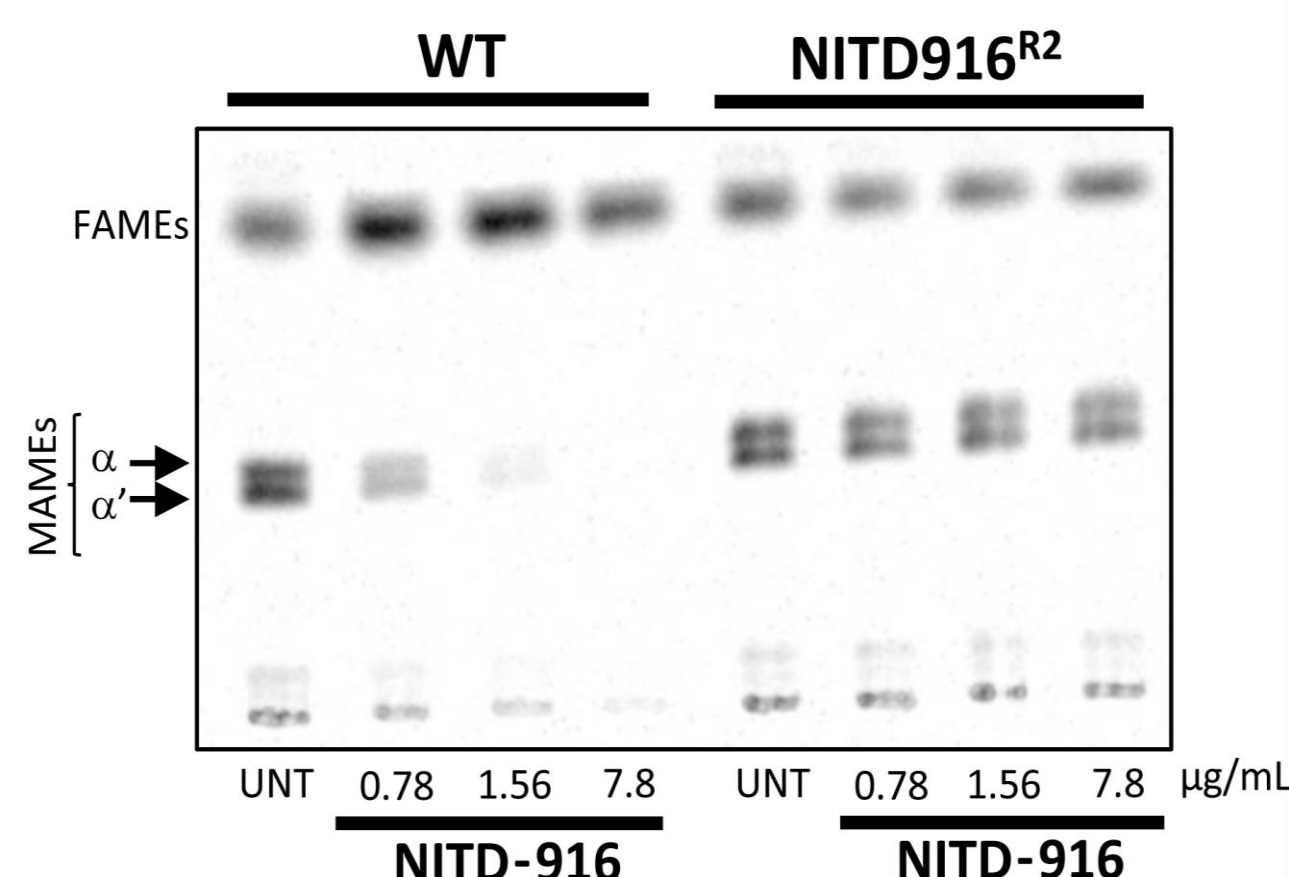
Fig. 3 : Champs d'immunofluorescence représentatifs pris à 1 et 3 jours post-infection montrant des cordes intracellulaires dans les macrophages en absence (UNT), en présence de NITD-916 (15.6 μg/mL) ou de rifabutine (12.5 μg/mL). Les cordes de *M. abscessus* expriment la protéine TdTomato (rouge), la surface et le système endolysosomal des macrophages sont détectés avec des anticorps anti-CD63 (vert). Le noyau est marqué au DAPI (bleu). Echelle, 20 μm.

4. Activité de NITD-916 dans des organoïdes dérivés de patients CF infectés



5. NITD-916 inhibe la synthèse d'acides mycoliques *de novo* de manière InhA dépendante chez *M. abscessus*

Fig. 5 : Effet dose-dépendant de NITD-916 contre *M. abscessus* CIP104536^r CIP S (WT) et un mutant (NITD^{R2}) résistant à NITD-916. L'effet inhibiteur a été étudié avec l'incorporation de [2-¹⁴C]acétate à des bactéries exposées à des concentrations croissantes en NITD-916. Les FAMES et les MAMES radiomarqués ont été extraits. Des coups égaux (50,000 cpm) ont été déposés sur une plaque de chromatographie et les lipides ont été développés en éther de pétrole/acétone (95/5, v/v).



6. NITD-916 est un inhibiteur direct d'InhA_{MAB}

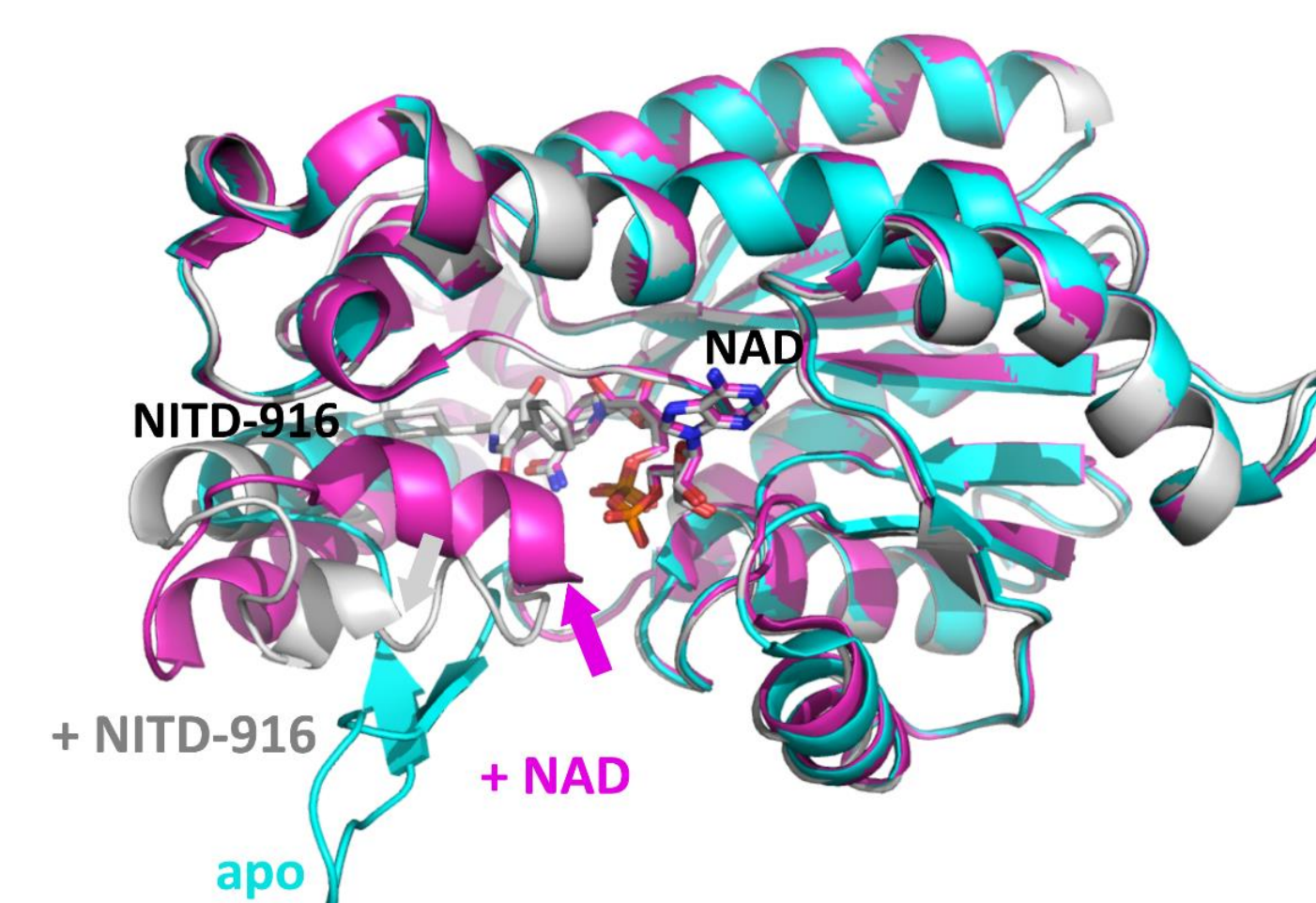


Fig. 6 : Superposition de la structure cristallographique de InhA_{MAB} dans l'état apo (cyan - résolution : 1.75 Å-), liée à NAD (magenta -résolution : 1.85 Å-) et l'état inhibé lié à NAD et NITD-916 (gris -résolution : 1.45 Å-). La boucle couvrant les résidus Thr196 à Gly212 se déplace de manière significative lors de la liaison des cofacteurs et des inhibiteurs.

Conclusion : Nos données génétiques et biochimiques indiquent que InhA_{MAB} représente une cible attractive à exploiter contre *M. abscessus*. Cette étude ouvre également la voie à l'optimisation d'analogues de 4-hydroxy-2-pyridones. Ces études seront poursuivies par une évaluation pré-clinique dans le modèle murin.

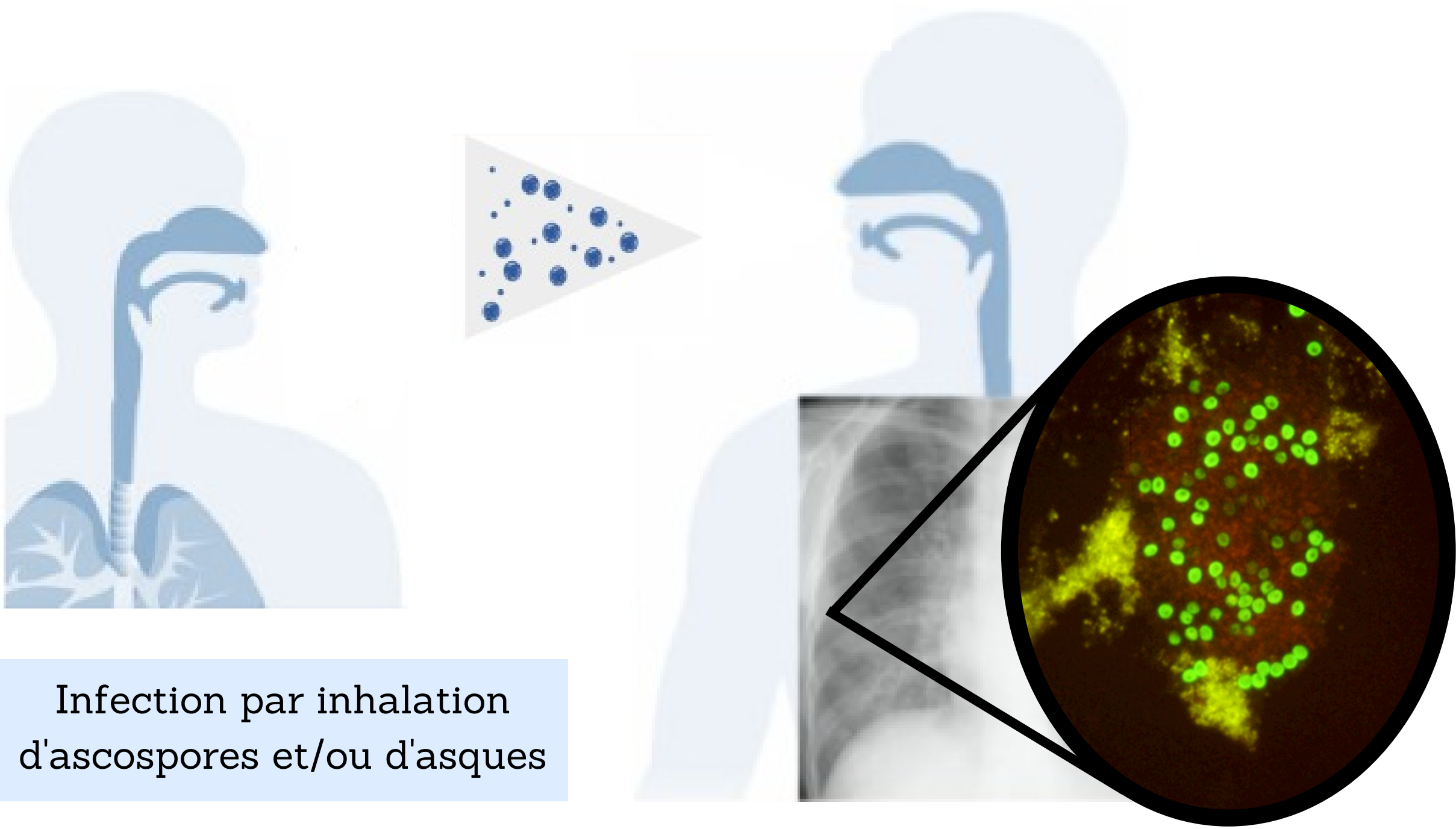


RATIONNEL

Pneumocystis jirovecii est un champion opportuniste transmissible responsable de la pneumonie à *Pneumocystis* (PPC), maladie la plus fréquente classant SIDA dans les pays développés [1, 2]. La PPC survient également chez d'autres patients immunodéprimés, en cas de transplantations d'organes, d'hémopathies malignes, de cancers ou de maladies auto-immunes [3].

Plus régulièrement, des infections bénignes à *P. jirovecii*, fréquemment considérées comme étant des colonisations, surviennent chez des patients atteints de maladies pulmonaires chroniques, dont la mucoviscidose [4].

Le rôle potentiel de ce champignon en tant que cofacteur de morbidité a été suggéré [5], et les patients colonisés représentent des sources de contamination potentielles [6, 7].



Infection par inhalation d'ascospores et/ou d'asques

OBJECTIF

Présenter la revue des données disponibles sur *Pneumocystis jirovecii* et la mucoviscidose.

Différences territoriales dans la prévalence de *P. jirovecii* :

Des différences significatives existent dans la prévalence de la colonisation pulmonaire par *P. jirovecii* chez les patients atteints de mucoviscidose européens et brésiliens (Tableau 1).

Microbiote pulmonaire et colonisation par *P. jirovecii* :

La faible prévalence de *P. jirovecii* au cours des études sur le microbiote pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose rend ardue la comparaison entre les patients colonisés ou non par ce champignon. En outre, aucune étude n'était focalisée sur la relation entre ce microbiote et la colonisation par *P. jirovecii*.

Diversité génomique de *P. jirovecii* :

Il existe une diversité génomique chez *P. jirovecii* au sein des patients atteints de mucoviscidose colonisés. Trois génotypes mtLSUrRNA différents (1, 2 et 3) ont été identifiés dans les études analysées, ainsi que des infections mixtes avec plusieurs souches distinctes de *P. jirovecii*.

Primo-infection à *Pneumocystis* chez les enfants atteints de mucoviscidose :

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.

Risque de PPC après transplantation pulmonaire :

En plus de la colonisation pulmonaire, il semblerait que la PPC puisse survenir chez les patients atteints de mucoviscidose spécifiquement après une transplantation pulmonaire, nécessitant ainsi des stratégies préventives. Le risque de survenue d'une PPC après transplantation apparaît néanmoins très variable d'un pays à l'autre.

TABLE 1 | Comparison of characteristics of cystic fibrosis (CF) patients who underwent *Pneumocystis jirovecii* detection in pulmonary specimens [partly reproduced from Nevez et al. (2018)].

	Germany (Munich)	Spain (Seville)	Brittany, France (Rennes and Brest taken together)	Other French regions and cities (Pays de la Loire, Angers; South West, Bordeaux; North, Dunkirk and Lille)	Brazil (Porto Alegre)	United Kingdom (Manchester)
Number of patients	95	88	162	104	34	111
Median age, years [range]	23.2	15.8 [1–35]	19.0 [3 months–41]	24.0 [15–32]	11.0 [1–35]	31+/- 10 (mean; sd)
Sex ratio M/F	52/43	41/47	81/81	50/54	17/17	59/52
Inclusion period	NA	May 2001–July 2002	February 2005–August 2007	October 2006–March 2009	March 2006 – August 2009	October 2013 – May 2014
Number of specimens	137	88	324	146	NA	226
Pulmonary samples examined for <i>Pneumocystis jirovecii</i> detection	Sputa	Sputa (54) and oropharyngeal washes (34)	Sputa	Sputa	BAL	Sputa
Technique of <i>Pneumocystis jirovecii</i> detection in pulmonary specimens	Nested PCR targeting mtLSUrRNA gene	Nested PCR targeting mtLSUrRNA gene	Real-time PCR targeting mtLSUrRNA gene	Conventional PCR followed by a real-time PCR targeting mtLSUrRNA gene	Nested PCR targeting mtLSUrRNA gene	Real-time PCR targeting mtLSUrRNA gene
Number of patients with a prior treatment with cotrimoxazole	0	2	NA (Rennes) 30 out of 76 (Brest)	NA	5 (cotrimoxazole or azithromycin in the 6 months preceding sampling)	102
Number of patients colonized with <i>Pneumocystis jirovecii</i>	7 (7.4%; CI 95: 2.1–12.7%)	19 (21.6%; CI 95: 12.9–30.1%)	4 (2.5%; CI 95: 0.1–4.9%)	13 (12.5%; CI 95: 6.1–18.9%)	13 (38.2%; CI 95%:21.9–54.5%)	9 (8.1%; CI 95%: 3–13.2%)

BAL, bronchoalveolar lavage; CI, confidence interval; F, female; M, male; mtLSUrRNA, mitochondrial large subunit ribosomal RNA; NA, not available.

DISCUSSION ET CONCLUSION

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.

Les membres du Réseau Muco Ouest sont Chantal Belleguic (CRCM Rennes Adultes), Tiphaine Bihouée (CRCM Nantes Pédiatrique), Laure Cosson (CRCM Tours Pédiatrique), Isabelle Danner-Boucher (CRCM Nantes Adultes), Eric Deneuve (CRCM Rennes-St Brieuc Pédiatrique), Julie Mankikian (CRCM Tours Adultes), Véronique Storni (CRCM Vannes-Lorient mixte), et Françoise Troussier (CRCM Angers-Le Mans mixte).

RÉFÉRENCES

1. Walzer PD and Cushion MT 2004. *Pneumocystis pneumonia*. Marcel-Dekker. Inc., New York.

2. Santé Publique France. Décembre 2021. Bulletin de Santé Publique. Édition Nationale.

3. Roux A et al. 2014. Emerg Infect Dis. 20. 1490-1497.

4. Calderón EJ et al. 2010. Med. Mycol 48(Suppl. 1), S17–S21.

5. Morris A and Norris KA 2012. Clin. Microbiol. Rev. 25. 297–317.

6. Le Gal S et al. 2012. Clin. Infect. Dis. 54. e62–71.

7. Le Gal S et al. 2015. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 82. 137–142.

Scanner pour consulter l'article original



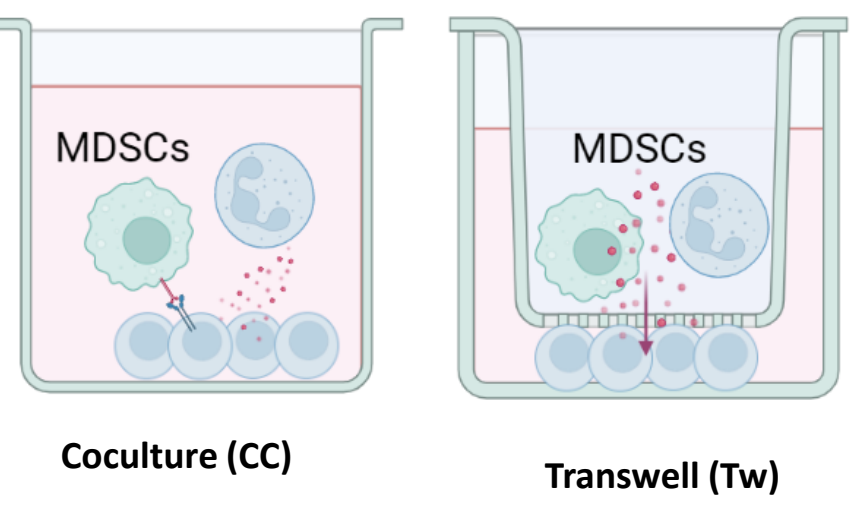
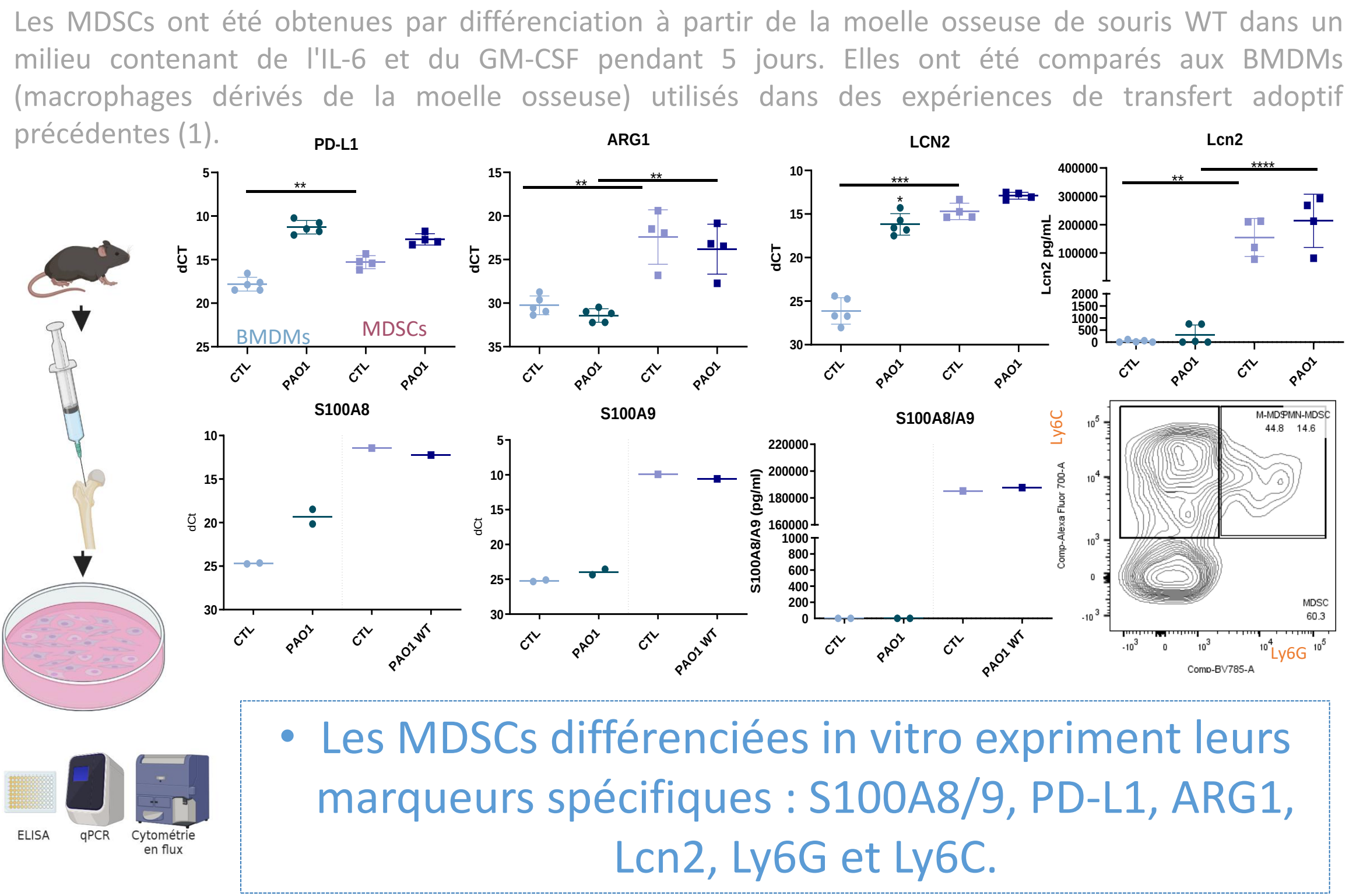
L'infection pulmonaire à *Pseudomonas aeruginosa* augmente le potentiel inhibiteur des cellules myéloïdes suppressives

Maëlys BORN-BONY¹, Bérengère VILLERET¹, Mélodie BOUTE¹, Clémence GAUDIN¹, Romé Voulhoux², Laurye Van Maele³, Jean-Claude Sirard³, Ignacio GARCIA-VERDUGO¹, Jean-Michel SALLENAVE¹

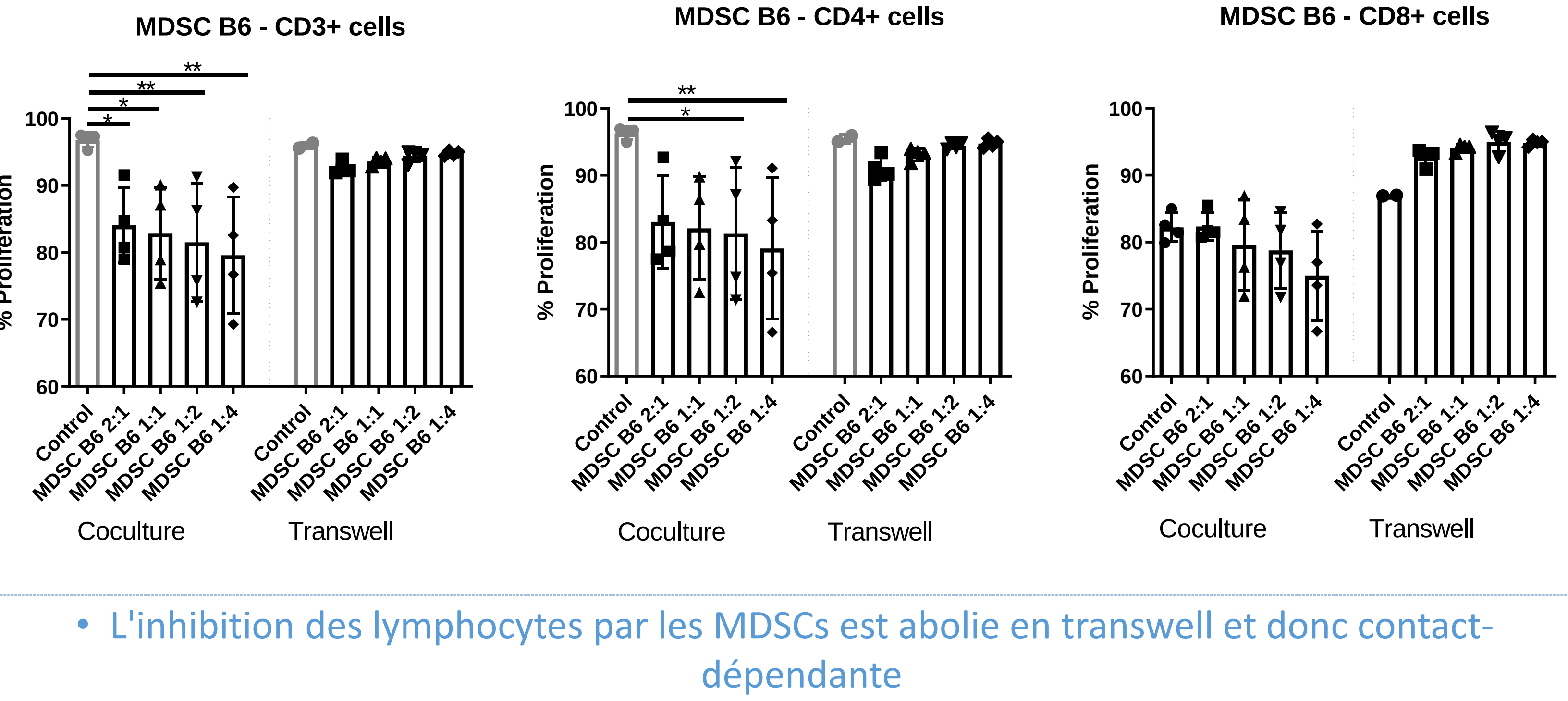
1.Université de Paris, INSERM 1152, Physiopathologie et épidémiologie des maladies respiratoires, F-75018 Paris, France 2.LCB-UMR7283, CNRS, Aix Marseille Université, IMM, 13009, Marseille, France. 3.Univ. Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR9017 - CIL - Center for Infection and Immunity of Lille, F-59000 Lille, France.

Introduction :
Pseudomonas aeruginosa (*P.a*) est une bactérie opportuniste pathogène, résistante aux antibiotiques et classée comme prioritaire par l’OMS pour la recherche de nouveaux traitements. Elle est responsable d’infections pulmonaires chez des patients immuno-déprimés tels que les patients atteint de mucoviscidose (34% des patients français sont infectés par *P.a*). *P.a* est capable de former des biofilms et mène régulièrement à des infections chroniques (20% des patients français atteints de mucoviscidose). Dans ce contexte, *P.a* induit une inflammation du poumon et de forts dégâts tissulaires pouvant entraîner l’insuffisance respiratoire. Dans un but d’intervention ‘anti-inflammatoire’, nous avons montré que le transfert adoptif de macrophages (alvéolaires ou dérivés de la moelle osseuse) modifiés génétiquement pour surexprimer l’élafine et l’IL-6 induisait un phénotype régulateur permettant d’améliorer la survie de souris infectées par *P.a* (Kheir et al, Mol. Ther. 2022). En parallèle, une augmentation de cellules myéloïdes suppressives (MDSCs, IL-6 dépendantes) dans les PBMCs de patients atteint de mucoviscidose et infectés par *P.a* a été montrée comme corrélant avec l’amélioration de la capacité pulmonaire (Rieber, J. Immunol. 2013). Ces résultats semblant indiquer un effet bénéfique des MDSCs, nous avons souhaité étudier dans nos modèles le rôle des MDSCs lors d’infection à *P.a*, ainsi que leur potentiel thérapeutique.

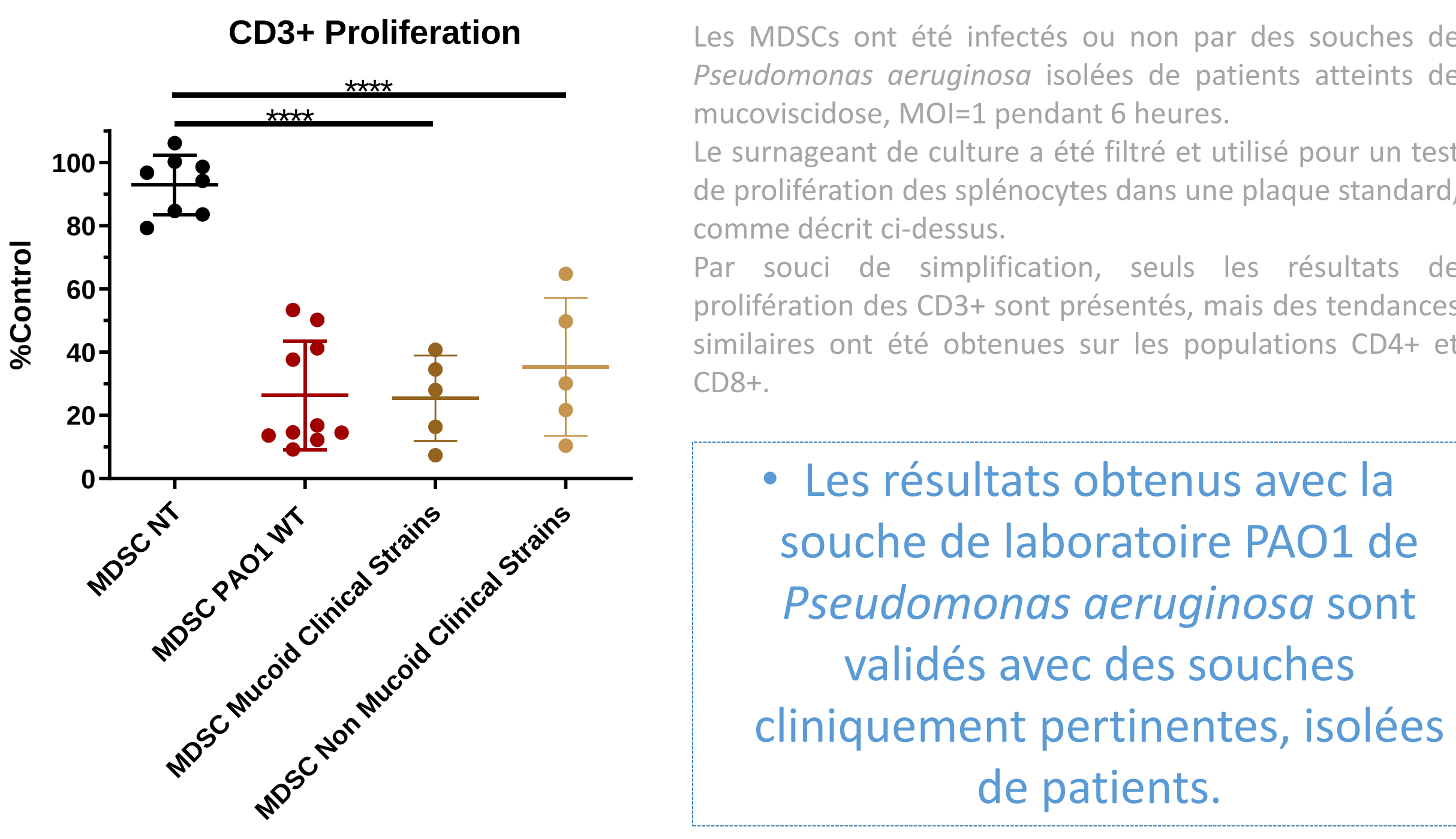
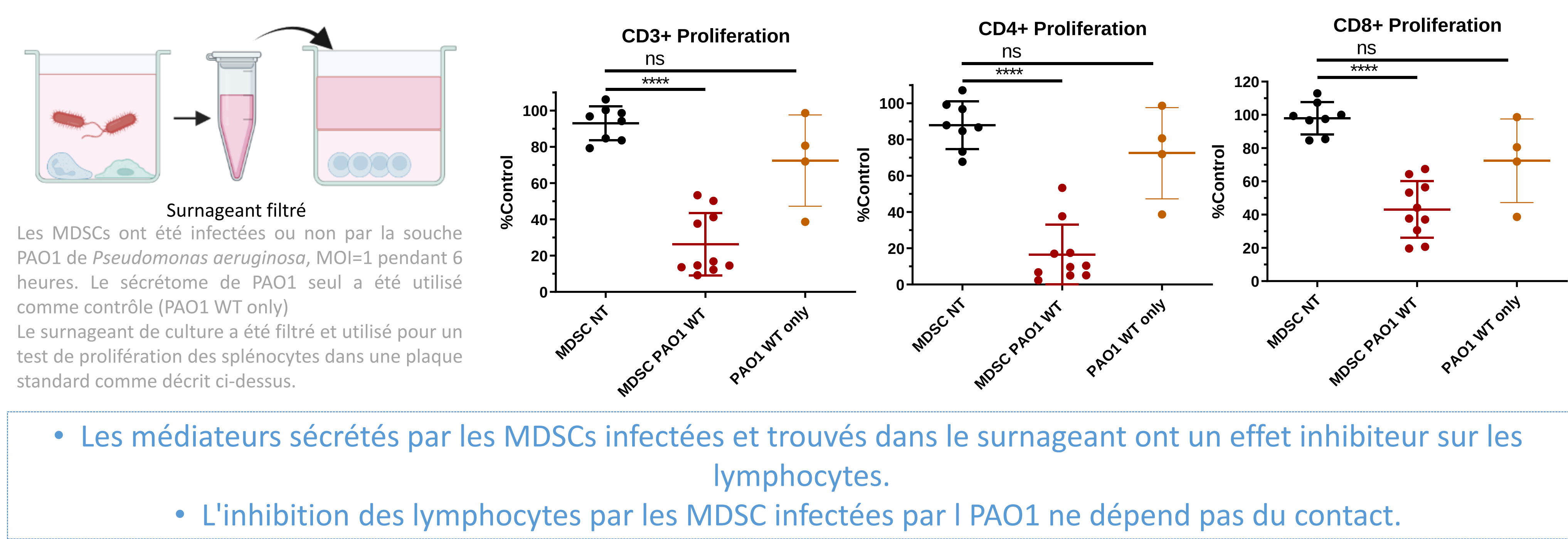
1. Caractérisation des MDSCs à l’état basal



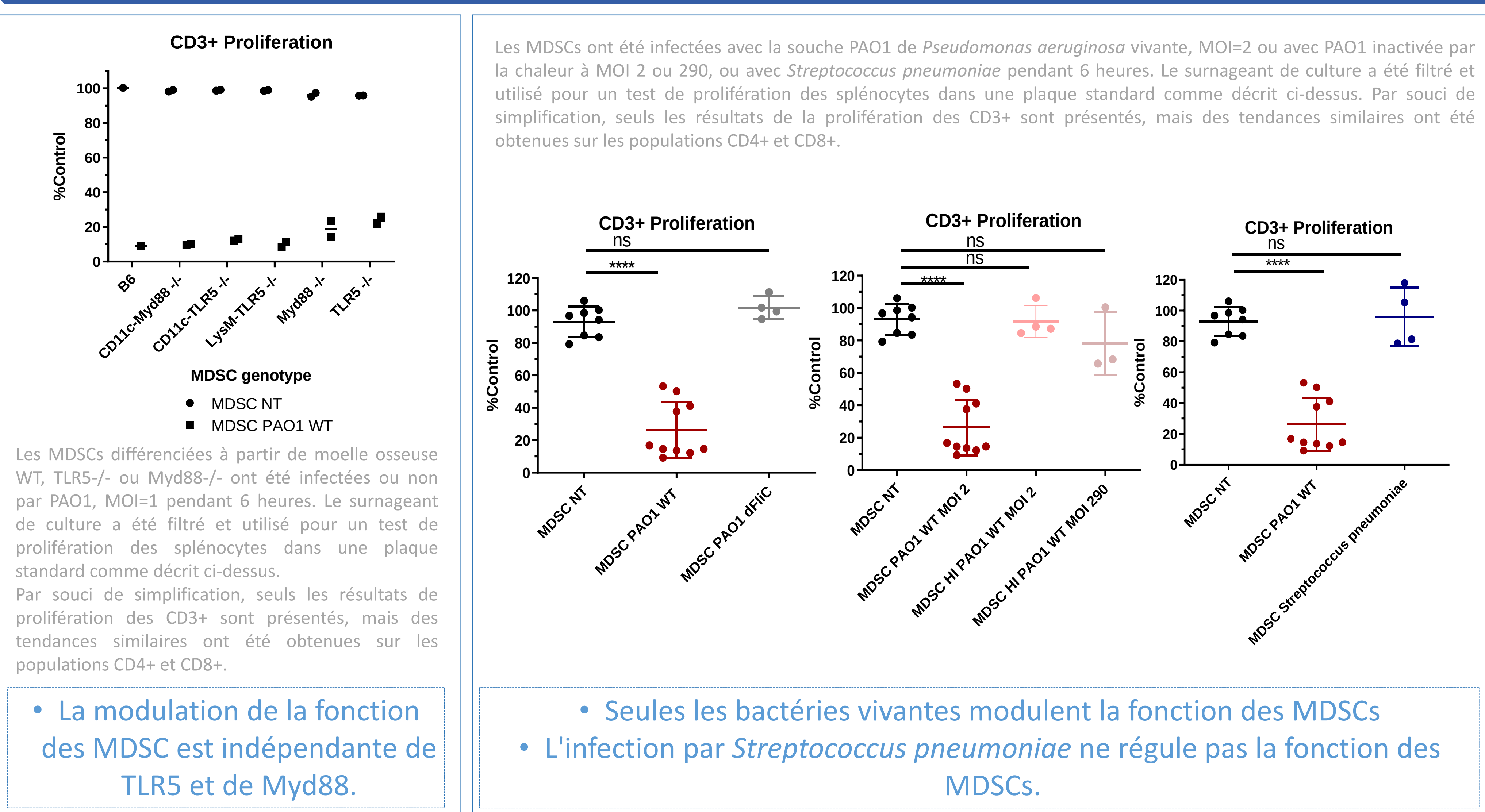
100 000 splénocytes (marqués au CellTraceViolet) ont été cultivés pendant 3 jours avec des stimuli prolifératifs CD3/CD28 dynabeads + IL-2 en présence de ratios croissants de MDSCs (de 2:1 à 1:4) dans une plaque standard (contact permissif) ou en transwell (MDSC et splénocyte dans un compartiment différent, pas de contact, seulement diffusion des molécules sécrétées). La prolifération a été mesurée par cytométrie de flux à partir de la dilution du CTV.



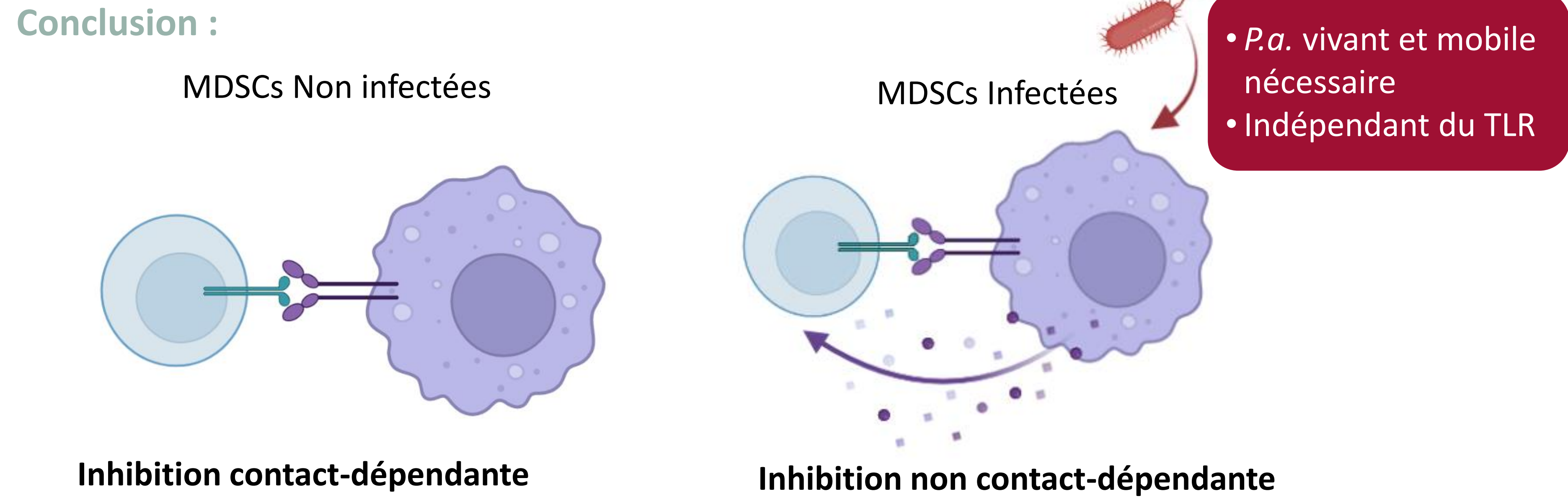
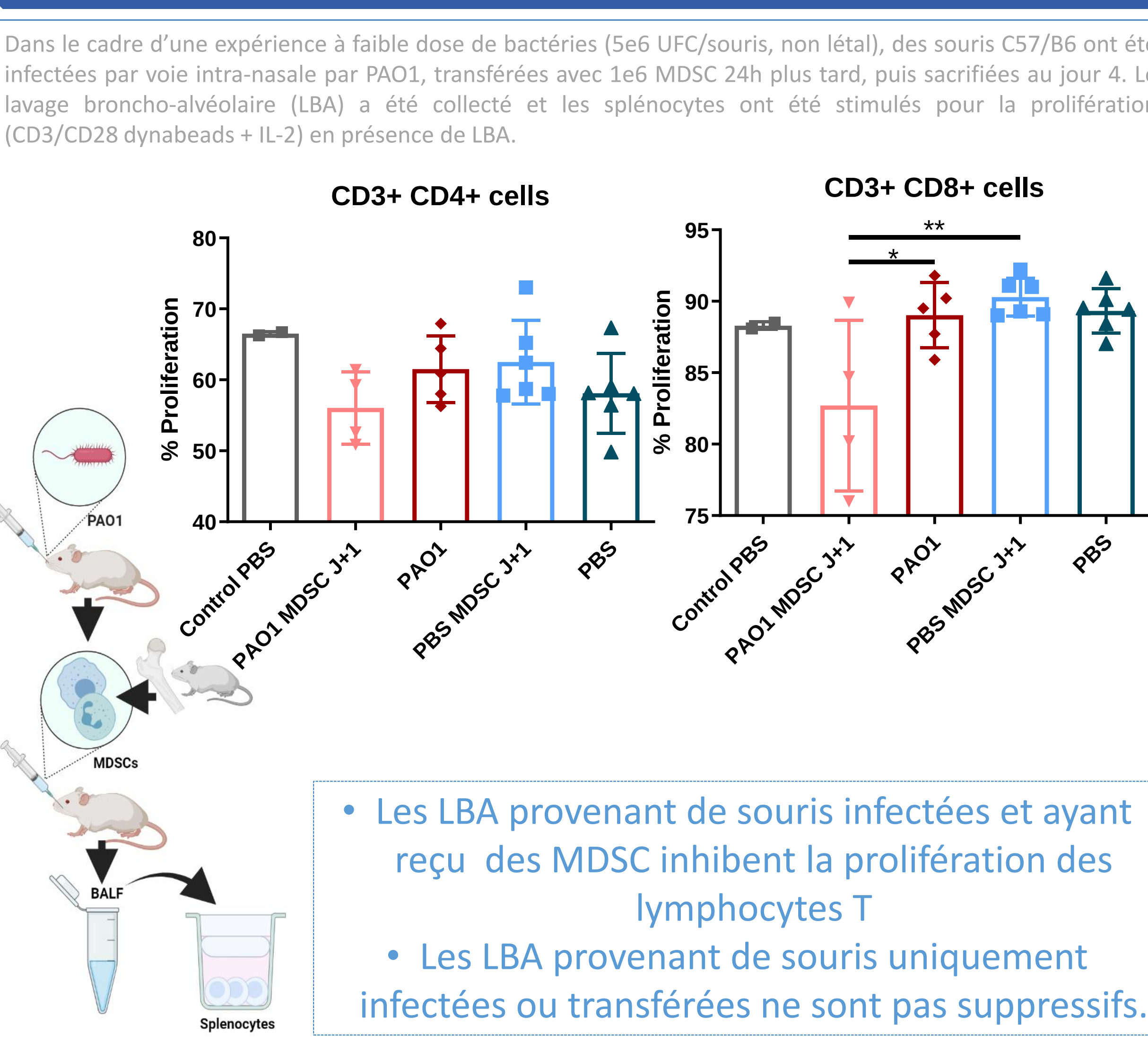
2. Effet de *Pseudomonas aeruginosa* sur l’activité des MDSCs



3. Mécanismes impliqués dans la modulation de l’activité des MDSCs



4. Activité des MDSC pendant l'infection *in vivo*



Perspectives :

- Caractérisation fonctionnelle des MDSCs infectés : Identification des médiateurs modifiés (spectrométrie de masse)
- Etude de la réponse des cellules T : sous-types impactés ?
- Effet sur d'autres cellules ?
- Elucidation du mécanisme par lequel *P.a.* influence les MDSCs
- Etudes *in vivo* du potentiel thérapeutique des MDSCs

References :

- Kheir et al., Mol Ther 2021
- Tesi et al., Trends in Pharmacological Sciences 2019
- Rieber et al., The Journal of Immunology 2013
- Öz et al., Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 2016



Rôle des thiorédoxine réductases dans la pathogénèse des infections à *Scedosporium apiospermum*

Carvalho Clarisse¹, Hérivaux Anaïs¹, Bouchara Jean-Philippe¹

¹U.R. Infection Respiratoires Fongiques, Université d'Angers

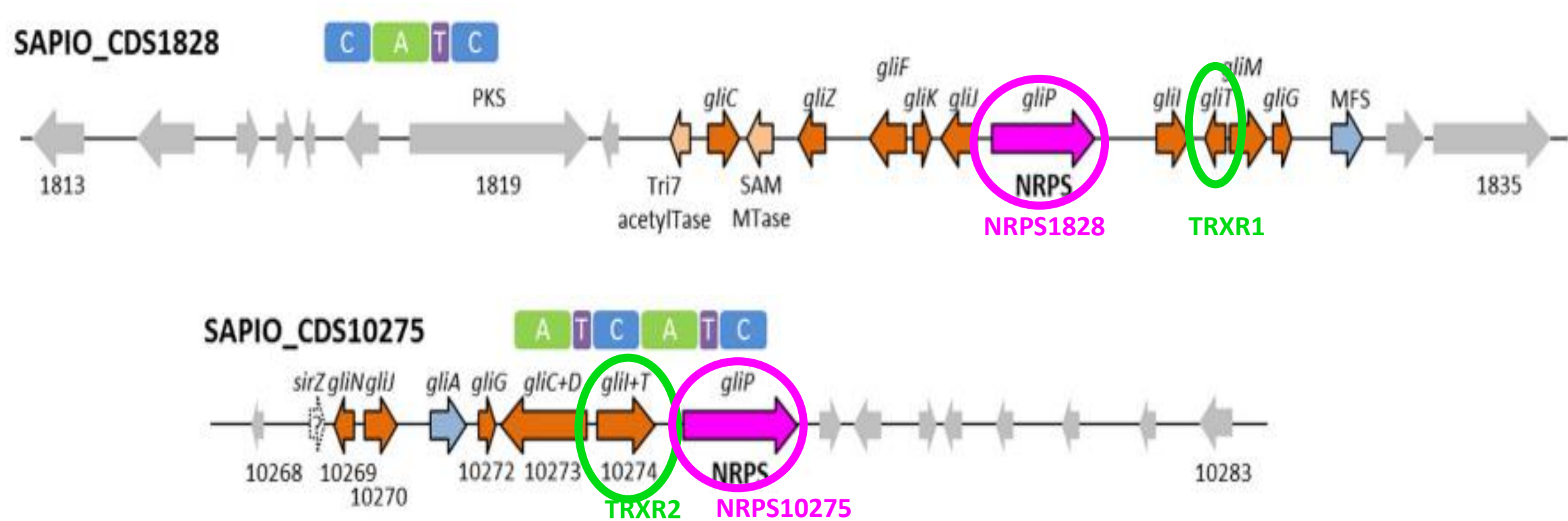
Introduction

La mucoviscidose est due à des mutations du gène *CFTR* codant un transporteur membranaire situé au pôle apical des cellules épithéliales. Plusieurs organes peuvent être affectés par ces mutations, mais le tableau clinique est dominé par les atteintes de l'appareil respiratoire. En effet, ces mutations sont à l'origine d'un épaissement du mucus bronchique qui favorise la colonisation des voies respiratoires par les micro-organismes.

Diverses espèces fongiques peuvent coloniser le tractus respiratoire et engendrer parfois des infections. Cependant, l'épidémiologie et la physiopathologie de ces colonisations/infections fongiques sont encore peu connues.

En dépit de sa rareté dans l'environnement, *Scedosporium apiospermum* se situe au deuxième rang parmi les champignons filamenteux rencontrés au cours de la mucoviscidose, après *Aspergillus fumigatus*. De plus, ce champignon peut engendrer des infections disséminées sévères, parfois même fatales en cas de déficit immunitaire (traitement immunosuppresseur pour transplantation pulmonaire) car il présente une résistance intrinsèque à la plupart des antifongiques actuels. Il est donc important de mieux connaître les mécanismes de pathogénicité de ce champignon.

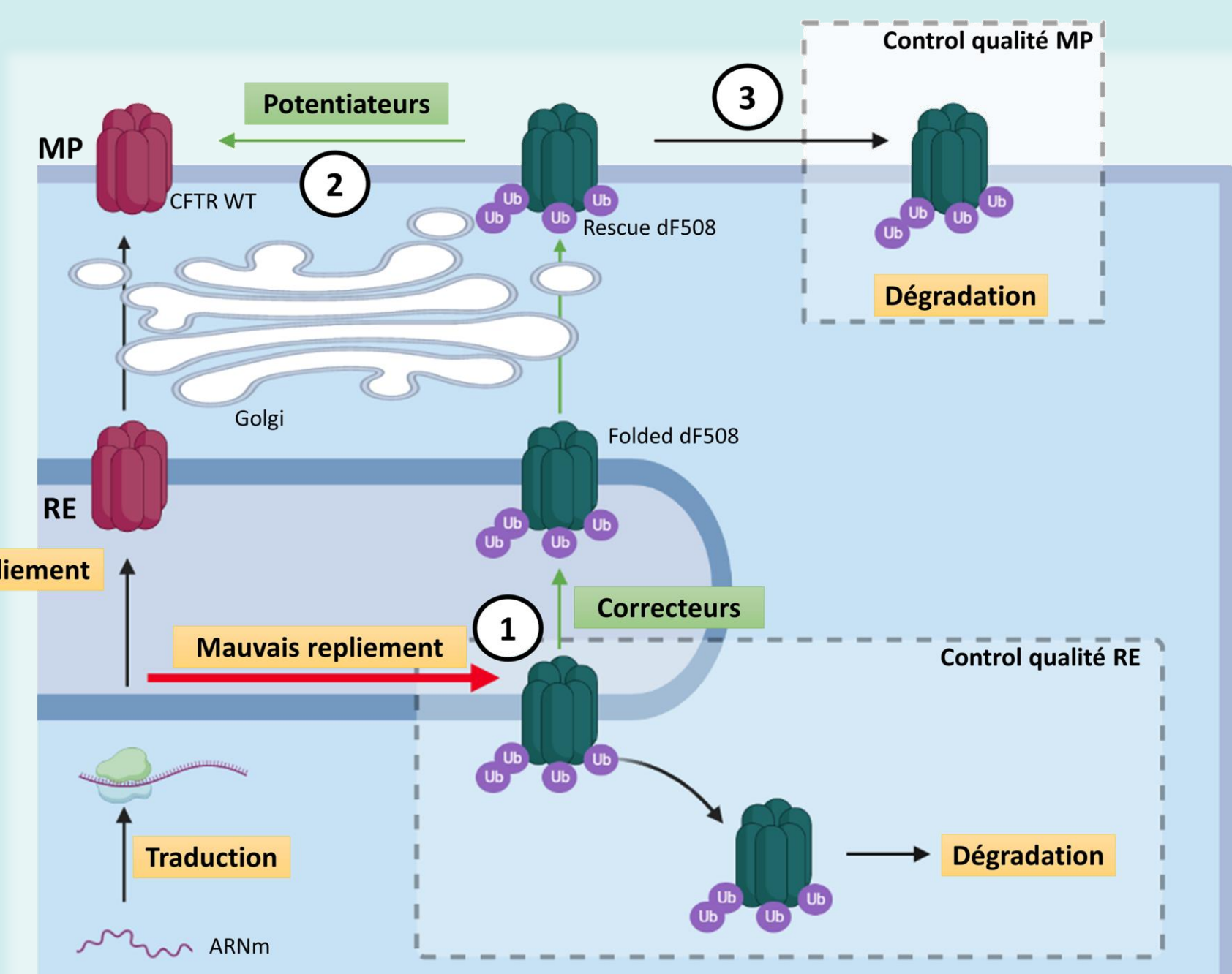
Les travaux menés au cours de ces dernières années suggèrent l'implication des enzymes du stress oxydatif, notamment des deux thiorédoxine réductases TrxR1 et TrxR2 présentes chez *S. apiospermum*, dans l'échappement du champignon aux radicaux oxygénés produits par les cellules phagocytaires. En effet, les gènes codant ces deux enzymes figurent parmi les gènes les plus surexprimés en réponse à un stress oxydatif induit chimiquement ou par exposition à des cellules macrophagiques. Néanmoins, le génome de *S. apiospermum* comprend également différents clusters de gènes permettant la synthèse de métabolites secondaires, et deux de ces clusters, centrés sur les gènes *NRPS* (*non ribosomal peptide synthase*) 1828 et 10275 et comprenant respectivement les gènes codant TrxR1 et TrxR2, sont susceptibles de jouer un rôle important dans la pathogénèse des scédosporioses, car ils permettent la synthèse de peptides non ribosomiques de type épidthiodioxopipérazine (ETP), les thiorédoxine réductases permettant la création d'un pont disulfure hautement réactif.



Introduction

La mucoviscidose est la maladie monogénique la plus répandue dans la population caucasienne. Cette maladie est causée par des mutations dans le gène CFTR, qui code pour un canal chlorure situé sur la membrane apicale des cellules épithéliales. L'altération de CFTR entraîne une réduction de la sécrétion dans les épithéliums et une accumulation de mucus épais dans de nombreux organes. La mutation la plus fréquente, appelée F508del, induit:

- Une rétention dans le réticulum endoplasmique associée à une dégradation de la protéine
- Une activité réduite du canal
- Une instabilité à la surface des cellules



Récemment, une thérapie (Trikafta) combinant deux pharmaco-chaperonnes (correcteurs ; VX661, VX445) et un potentialisateur (VX-770) de l'activité du canal a montré une grande efficacité chez les patients porteurs de la mutation F508del. Cependant, cette correction ne corrige que partiellement le niveau d'ubiquitination et l'instabilité de surface de CFTR-F508del.

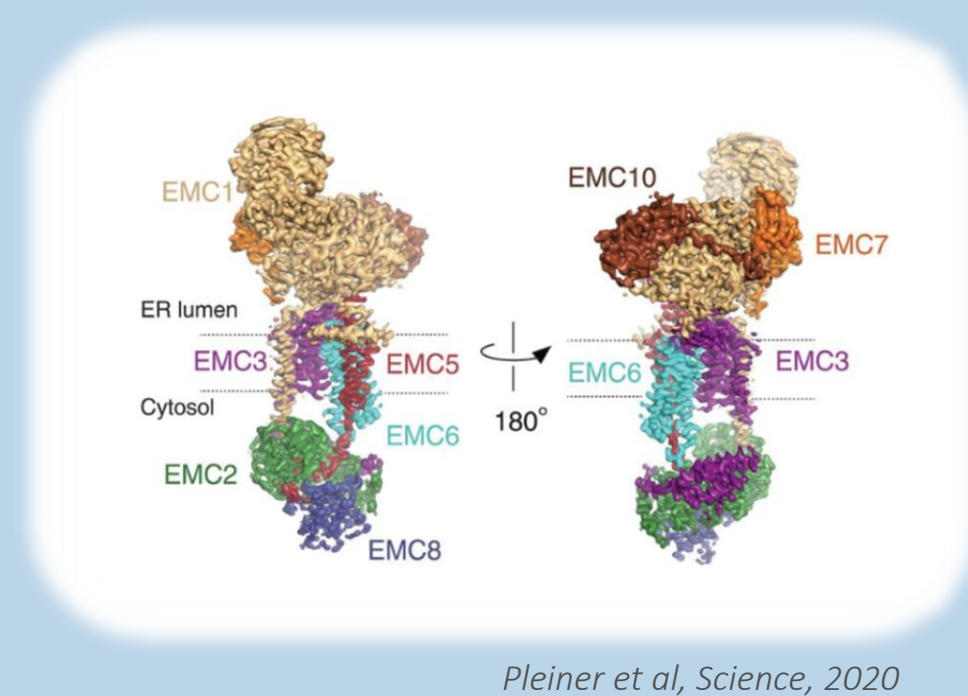
Les canaux nouvellement synthétisés à partir du réticulum endoplasmique, puis de l'appareil de Golgi, sont incorporés dans la membrane plasmique. Ils sont ensuite soit internalisés et recyclés vers la surface cellulaire par la voie endosomale, soit dégradés par la voie lysosomale. Les partenaires protéiques de CFTR qui favorisent son recyclage ou sa dégradation ne sont pas encore totalement connus et pourraient être ciblés pour augmenter l'abondance de CFTR.

Objectifs

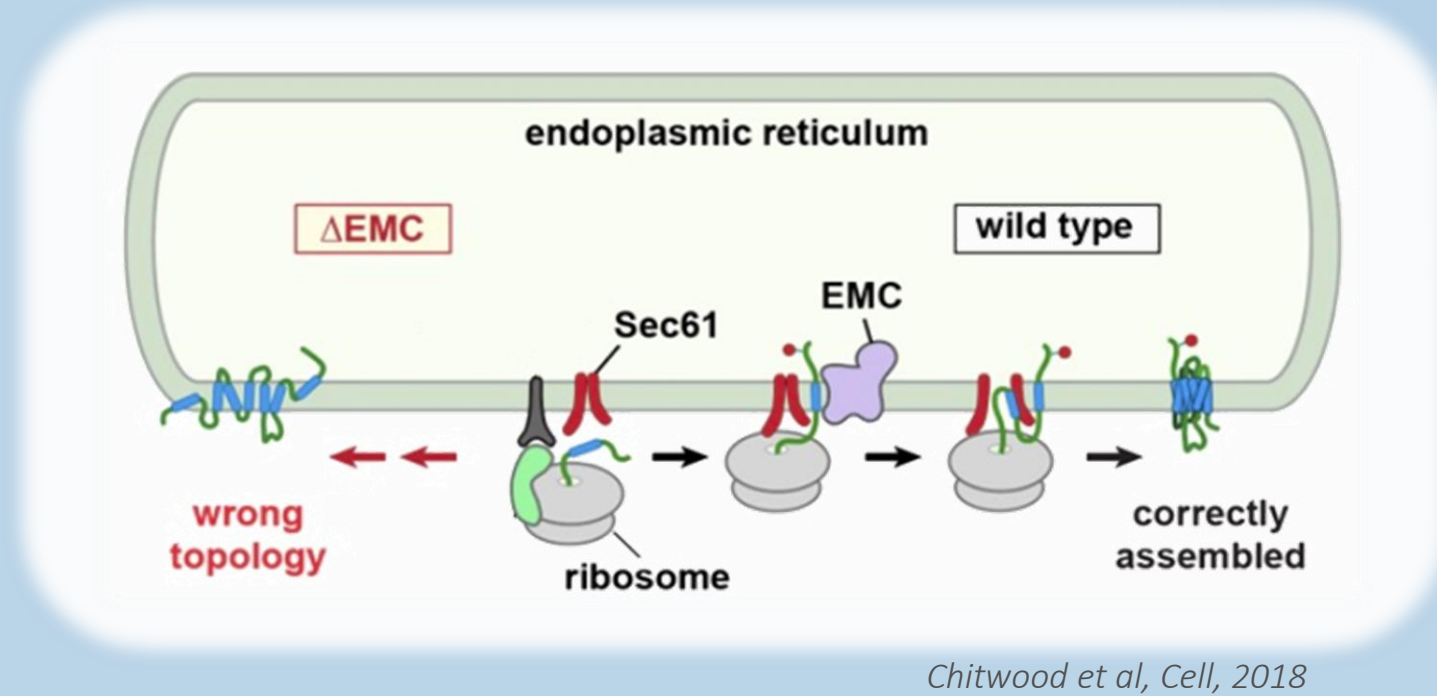
- Évaluer les effets des partenaires sur la quantité de CFTR, son activité et son abondance à la surface des cellules.
- Identifier les interactions CFTR-F508del restaurées par Trikafta.
- Évaluer l'effet de CFTR sur certains de ses partenaires.

Effet des partenaires sur CFTR: EMC

❖ EMC: Complexe protéique de la membrane du RE



Pleiner et al, Science, 2020



Chitwood et al, Cell, 2018

➤ EMC interagit avec de nombreuses protéines membranaires de manière co-translationnelle et favorise leur biosynthèse.

➤ La perte d'une sous-unité mènent à la diminution de l'expression de certaines protéines transmembranaires:

- Canaux et transporteurs ayant des charges dans des segments transmembranaires

Tian et al, Cell Rep, 2019

➤ EMC serait une cible pour augmenter l'insertion de CFTR WT / muté:

- Rôle de chaperonne ?
- Rôle protecteur du TM avant son association avec le TM suivant ?

➤ Cibler l'étape avant l'ubiquitination:

- Augmentation du nombre de CFTR pouvant être corrigé par les correcteurs
- Obtenir un CFTR non-ubiquitiné plus stable à la surface

➤ Modèle cellulaire:

- HeLa KO pour EMC4 et EMC6

- Modulation du complexe EMC:
 - Surexpression de EMC6
 - Sous expression de EMC10

➤ Mesure de l'ubiquitination de CFTR

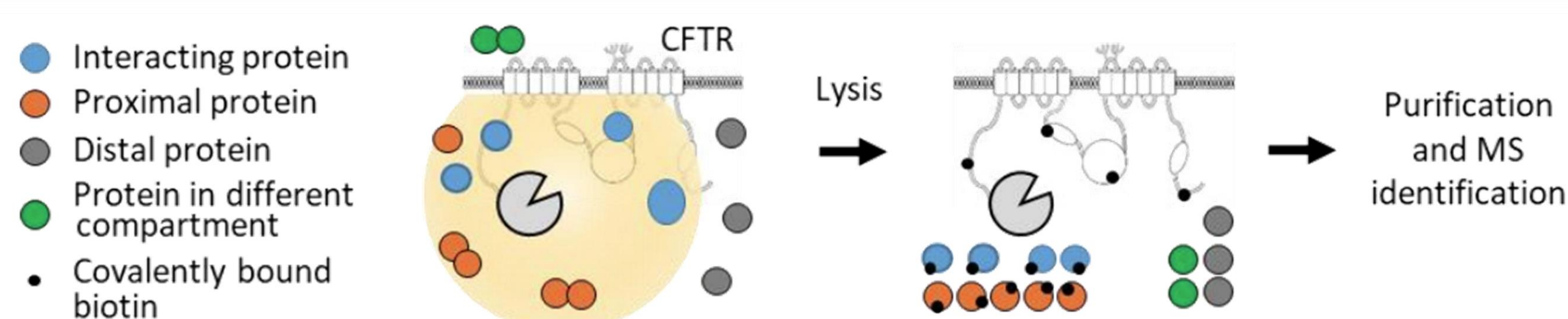
- Implication de EMC dans l'insertion dans la membrane de CFTR WT et muté :
 - Modèle permettant de suivre l'orientation des TM

❖ Perspectives

Peut-on cibler les partenaires protéiques de CFTR pour augmenter l'efficacité des traitements?

Identification des partenaires

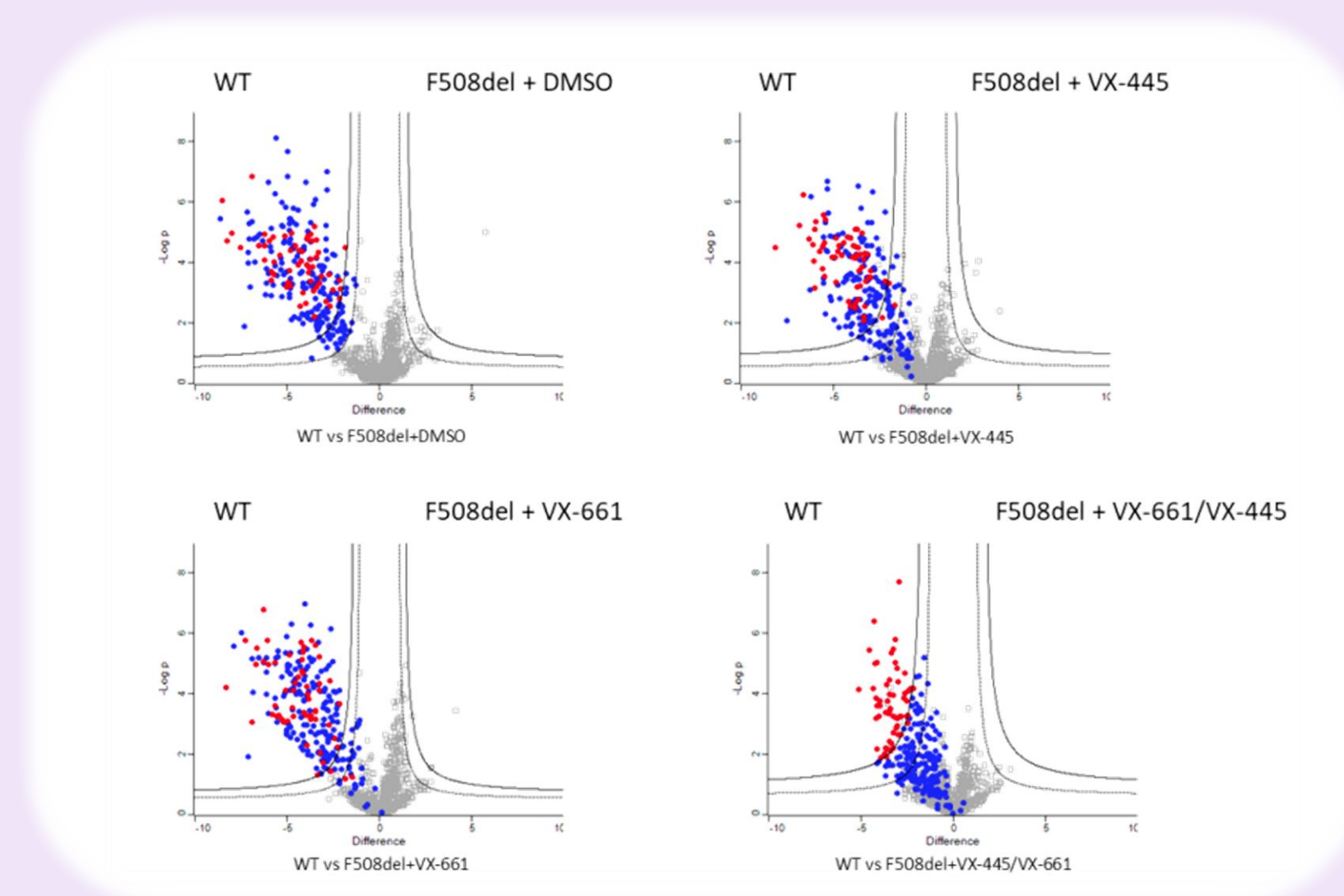
❖ Méthode : marquage de proximité couplé à la spectrométrie de masse



Représentation schématique de la stratégie de marquage de proximité.

Des enzymes de marquage ont été fusionnées à l'extrémité N-terminale de CFTR pour marquer à la biotine les protéines proximales et d'interaction, tandis que les protéines distales et les protéines séparées par une membrane ne sont pas marquées.

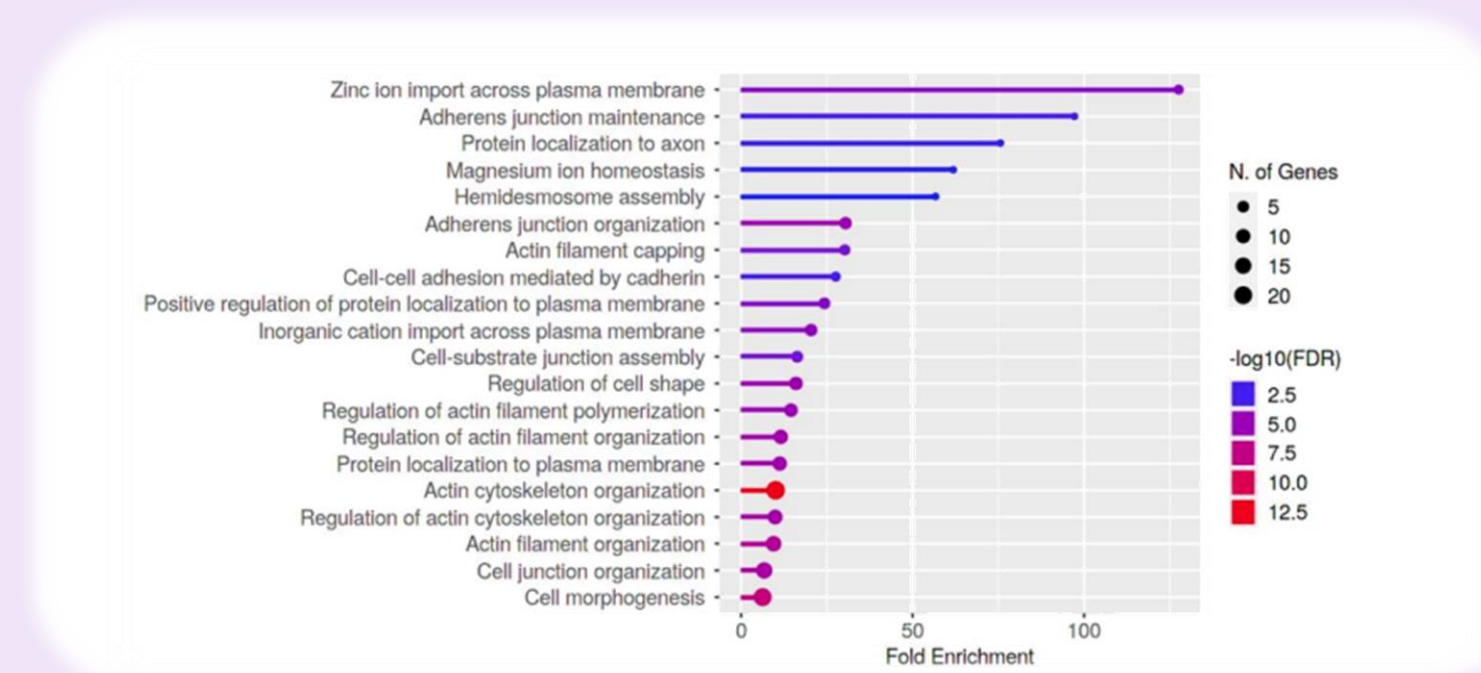
❖ Le traitement Trikafta restaure l'interactome CFTR



Différences de diagrammes de volcan obtenues pour les échantillons analysés par spectrométrie de masse

Les points bleus indiquent les protéines identifiées comme significativement enrichies dans les échantillons WT. Les points rouges indiquent les protéines qui ne sont pas restaurées dans la condition CFTR-F508del+VX-445/VX-661.

❖ Mais pas complètement

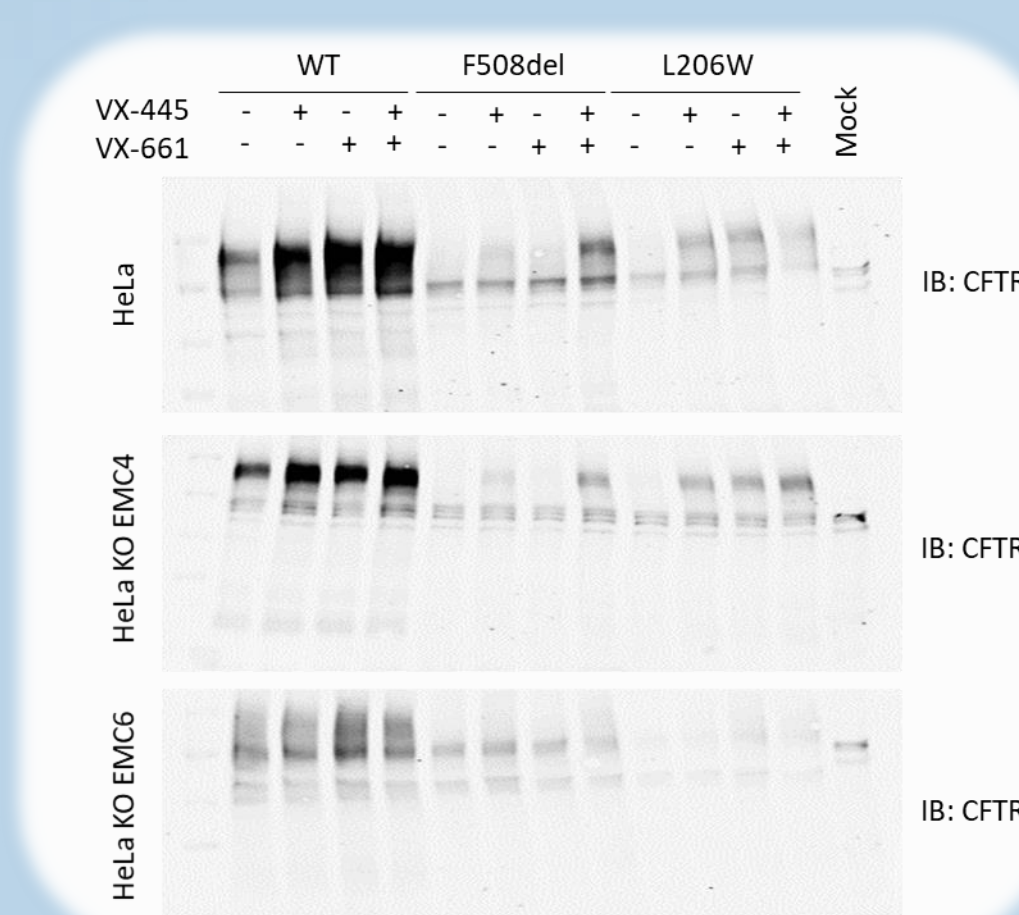


Analyse d'enrichissement

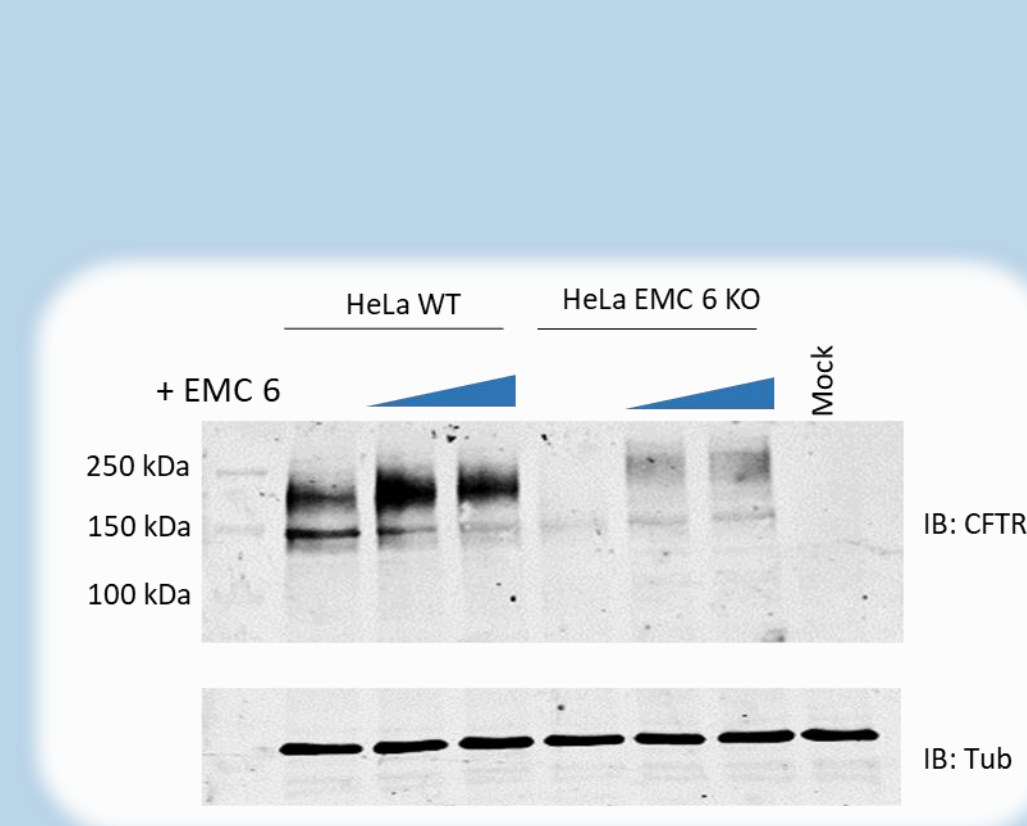
Chaque ligne du tableau correspond à un "processus biologique", trié en fonction de l'enrichissement en plis. Le diamètre des cercles représente le nombre de protéines trouvées enrichies pour chaque terme correspondant.

❖ Effet sur la maturation de CFTR WT et muté

■ Effet de l'absence d'EMC4 ou 6 sur CFTR et la correction



■ Effet de la restauration de l'EMC6 sur CFTR



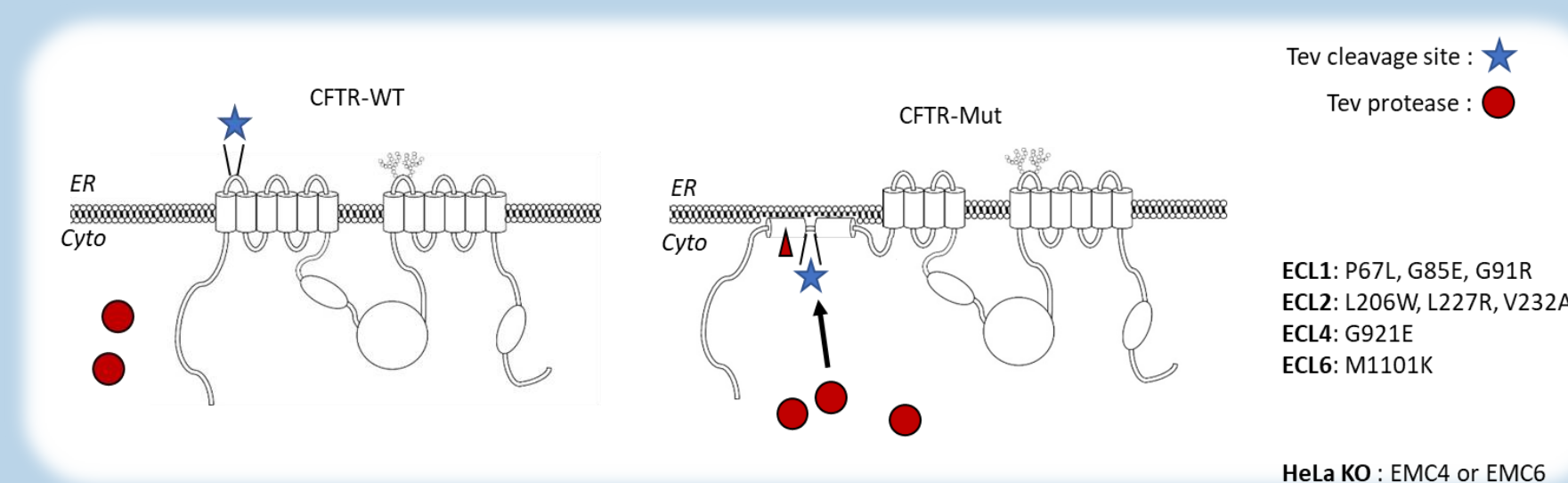
➤ L'absence d'EMC4 n'affecte pas la maturation de CFTR ou l'effet des correcteurs

➤ La surexpression d'EMC6 augmente la maturation de CFTR dans les cellules HeLa WT

➤ L'absence d'EMC6 inhibe la maturation de CFTR

➤ La surexpression d'EMC6 restaure la maturation de CFTR dans les cellules HeLa EMC6 KO

➤ Les correcteurs ne restaurent la maturation de CFTR en absence d'EMC6



Conclusion

➤ Ces partenaires pourraient permettre le développement de molécules stabilisant le CFTR à la surface des cellules.

➤ L'efficacité des thérapies actuelles pourrait être accrue en combinant les modulateurs existants avec des stabilisateurs ciblant certaines interactions protéine-protéine.

➤ L'identification des transporteurs dont l'activité est altérée en raison de la non-restauration des interactions protéine-protéine même sous traitement par Trikafta pourrait conduire à la proposition de thérapies complémentaires aux patients.

Étude du potentiel thérapeutique du peptide antimicrobien Cg-BigDef1 pour traiter les infections à SARM chez les patients atteints de mucoviscidose ?

A. Jouault^{1,3}, I. Ben Hadj Kaddour^{1,2}, G. Dupuis^{1,3}, Z. Xu^{1,2} L. Touqui^{1,2}

1. Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine, Mucoviscidose : Physiopathologie et Phénotypologie, Paris 2. Institut Pasteur, Département Santé Global, Mucoviscidose et Bronchopathies Chroniques, Paris 3. Institut Pasteur, Département Biologie Structurale et Chimie, Unité de Biochimie des Interactions Macromoléculaires, Paris

La problématique des infections à SARM chez les patients atteints de mucoviscidose

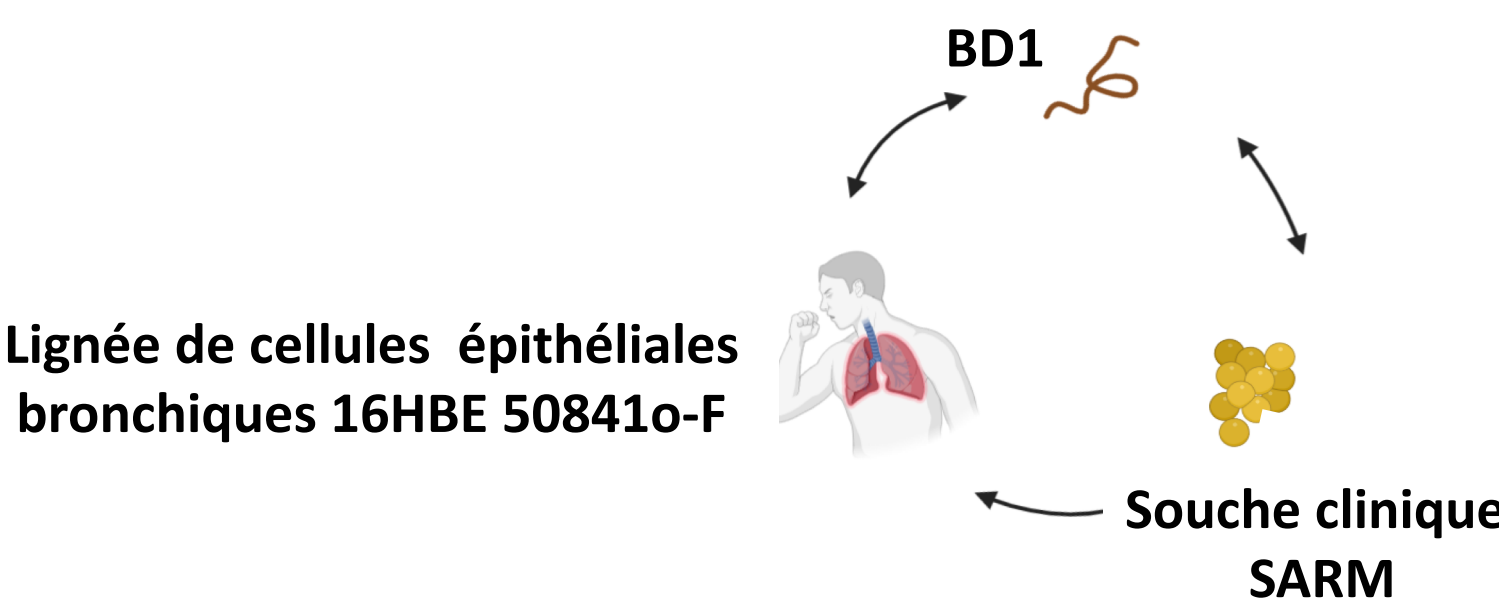
La **mucoviscidose (CF pour cystic fibrosis en anglais)** est une maladie génétique qui entraîne une **diminution de la clairance mucociliaire** au niveau des voies respiratoires aériennes, favorisant ainsi la **colonisation chronique** par des pathogènes comme *Staphylococcus aureus*. Cette bactérie peut-être traitée par les antibiotiques cependant depuis quelques années des souches de ***S. aureus*** **résistances à la méthicilline (SARM)** sont apparues. Ces souches sont plus difficiles à traiter et sont associées à une issue négative pour le patient.

Il est donc nécessaire de trouver une alternative aux antibiotiques conventionnels. Les **peptides antimicrobiens (PAMs)** sont de bons candidats mais plusieurs paramètres peuvent réduire leur efficacité comme une concentration en sel importante. Le **peptide antimicrobien Cg-BigDef1* (BD1)**, isolé de l’huitre, possède une activité bactéricide envers des souches SARM même à des fortes concentrations en sel alors...

* Loth et al., 2019.

BD1 est-il un bon candidat pour traiter les infections à SARM chez les patients CF ?

Paramètres étudiés



Activité en présence de cellules

Les cellules peuvent sécréter des molécules limitant l’activité des PAMs.

Activité en présence de mucus

Le mucus des patients CF est épais et visqueux et peut limiter la diffusion des PAMs à leur cible, les bactéries.

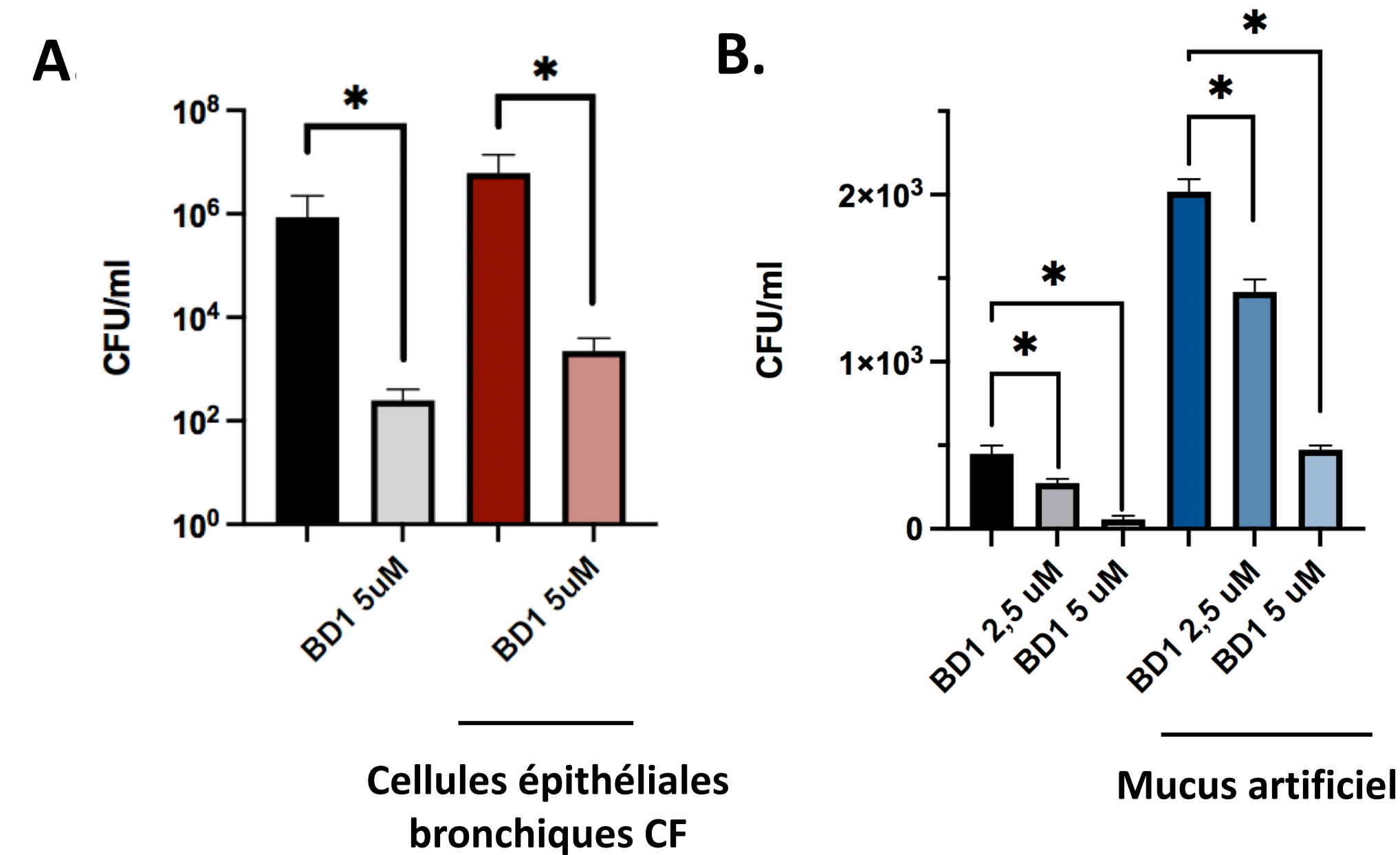
Stabilité dans un environnement CF

Les patients CF possède une quantité importante de protéases dans leurs expectorations due à une inflammation chronique.

Activité sur le biofilm

Le biofilm est un mode de vie en communauté sessile où les bactéries adhèrent à une surface et sécrètent une matrice qui les englobent et les protègent des stress environnementaux, tels que les antibactériens.

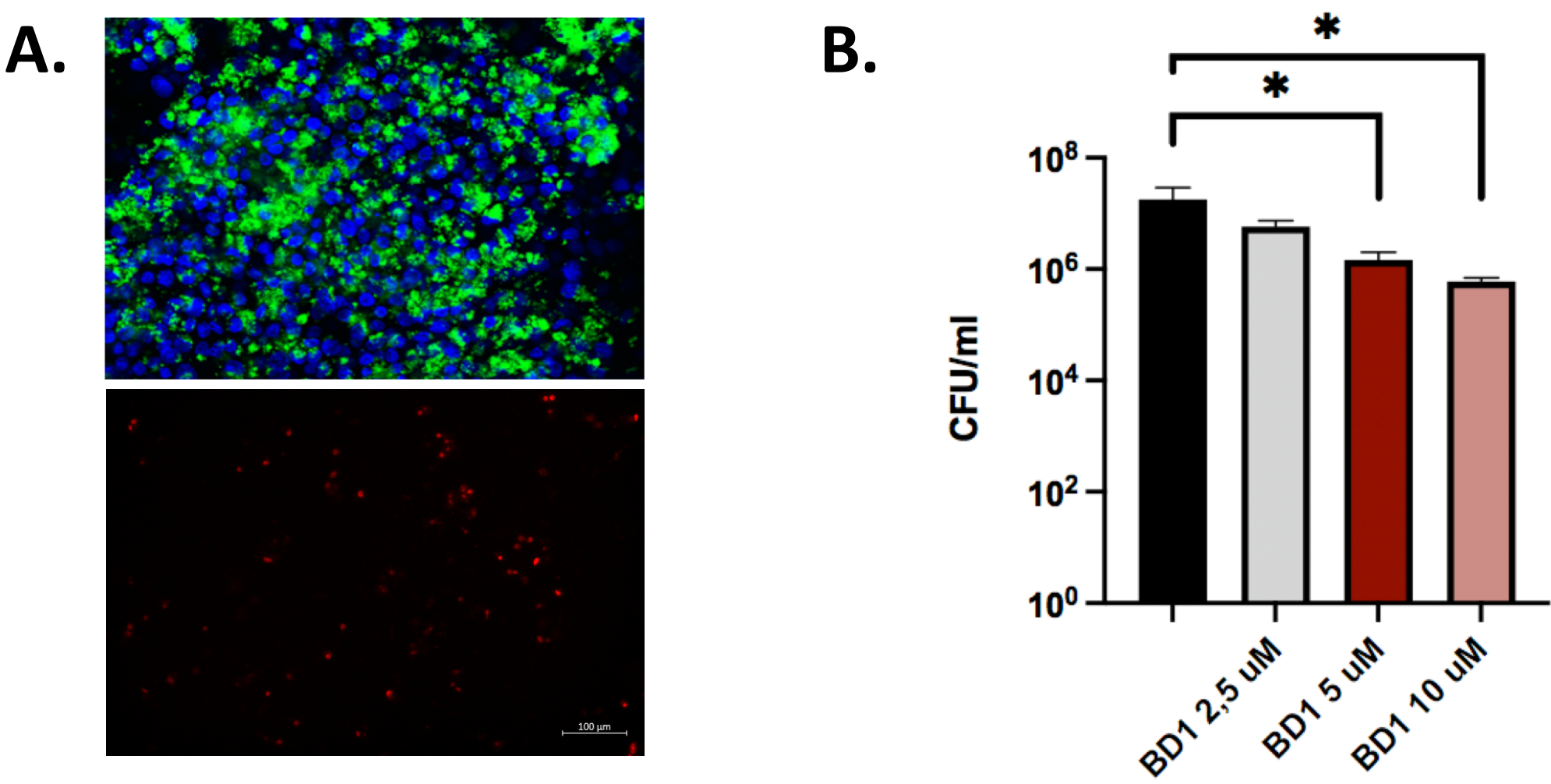
• BD1 conserve son activité bactéricide en présence de cellules bronchiques et de mucus



A. Après une infection de 2h (MOI 1) de cellules bronchiques CF par *S. aureus*, une diminution significative du nombre de CFU est observée lorsque que BD1 est ajouté au début de l’infection.
B. Après 2h d’incubation dans du mucus artificiel mimant du mucus CF, une diminution significative du nombre de CFU est observée lorsque BD1 est ajouté au début de l’incubation.

⇒ **La présence de cellules et mucus ne perturbe pas l’activité de BD1**

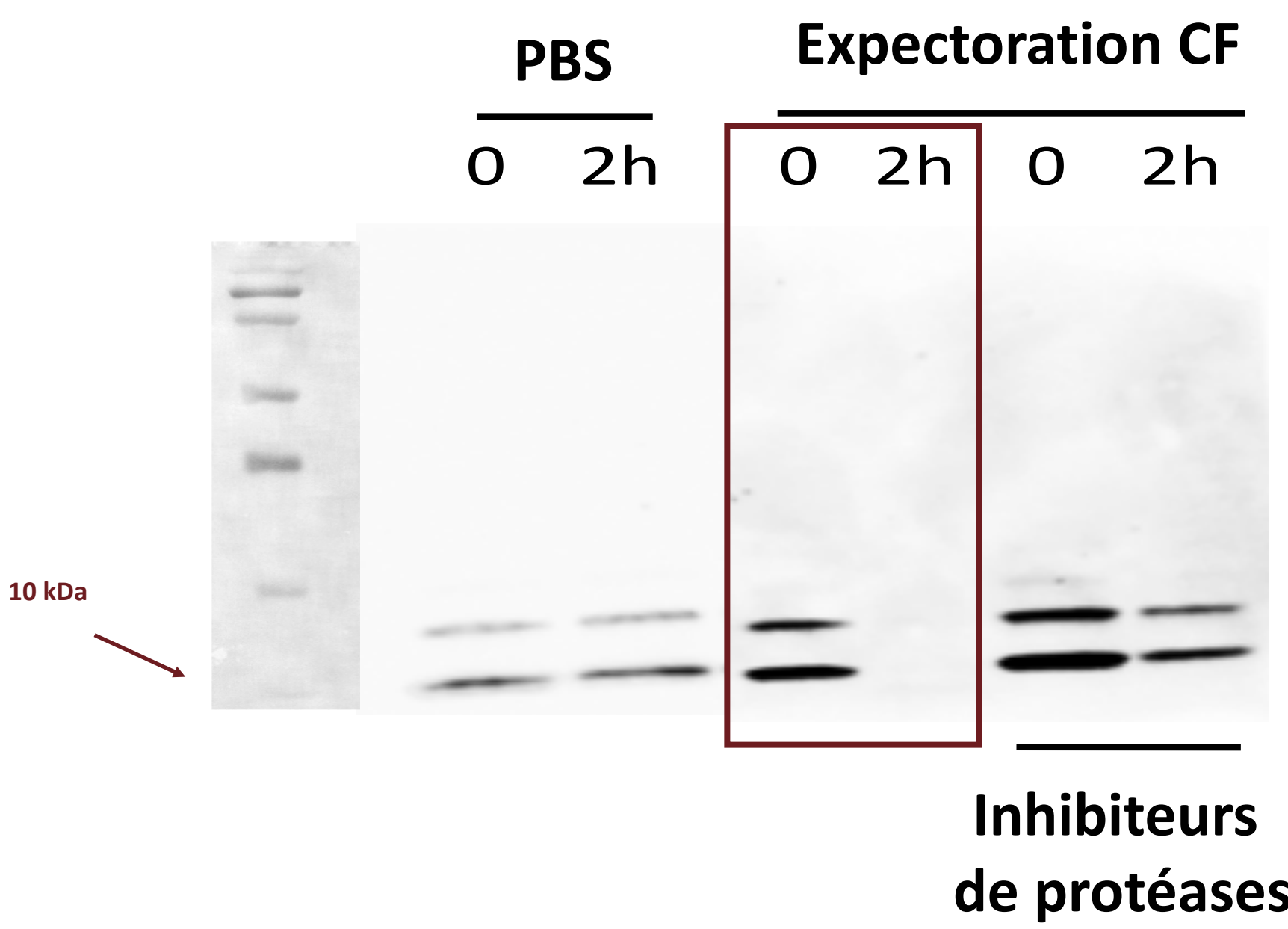
• BD1 est actif sur le biofilm



A. Croissance du biofilm de *S. aureus* GFP sur **cellules bronchiques** (DAPI). Peu de **cellules endommagées** (PI) sont observées après 16h de croissance.
B. Après un traitement de 2h sur un biofilm préformé, une diminution significative et dose-dépendante du nombre de CFU au sein du biofilm est observée. Cependant, l’effet est moins important qu’en condition planctonique.

⇒ **BD1 est actif sur les cellules en biofilm, il sera cependant nécessaire d’augmenter la concentration**

• BD1 est rapidement dégradé



Après 2h d’incubation dans des expectorations CF, le peptide n’est plus détecté par Western Blot contrairement à une incubation dans du PBS ou des expectorations CF préalablement traitées avec des inhibiteurs de protéases.

⇒ **BD1 rapidement dégradé par les protéases présentes dans les expectorations de patients CF**

BD1 est une alternative aux antibiotiques prometteuse mais le PAM nécessite d’être protégé de la dégradation par les protéases

→ Encapsulation ou changement de la séquence en acides aminés ?

Modèle d'infection d'embryon de poisson zèbre pour étudier la persistance d'isolats cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* et l'efficacité des traitements antibiotiques et/ou anti-biofilm

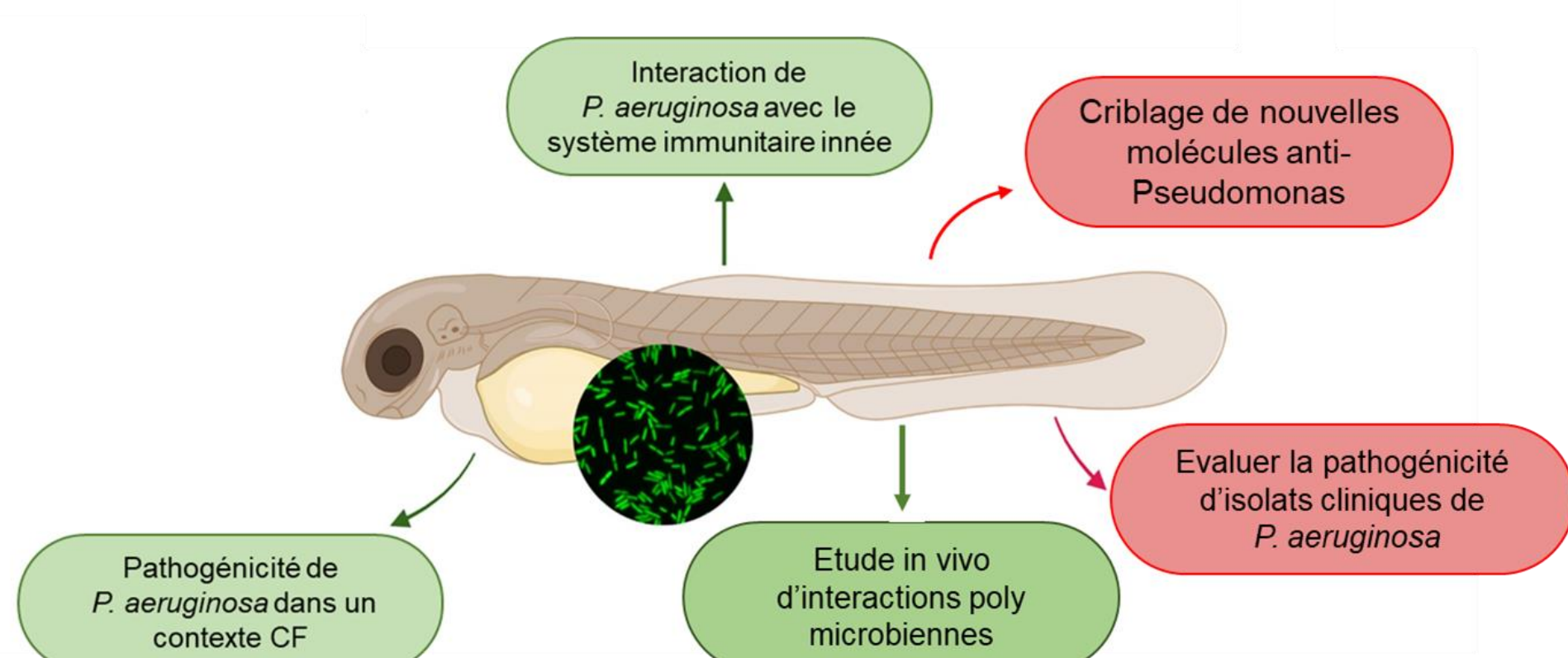
Flore NILLY, Stéphane PONT, Anne BLANC-POTARD

Laboratory of Pathogens and Host Immunity (LPHI), équipe Immunité, Inflammation et virulence bactérienne, CNRS U5294 Montpellier

Introduction

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 aiguës 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 d'étudier l'efficacité de nouvelles molécules anti-biofilm (en combinaison ou non avec des antibiotiques).

Applications du poisson-zèbre pour l'étude de *P. aeruginosa*

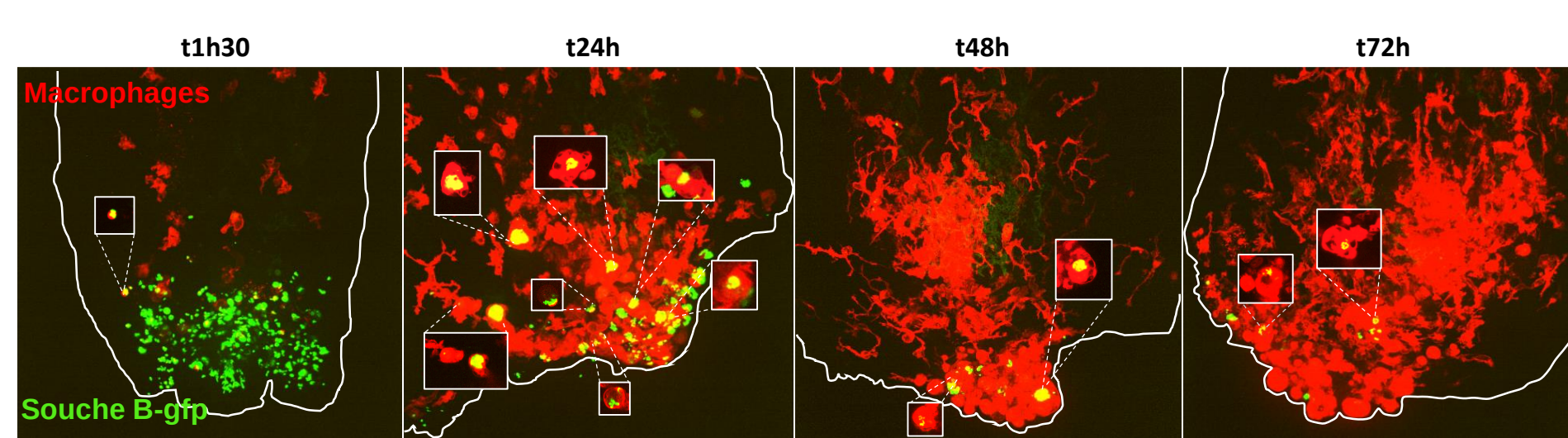
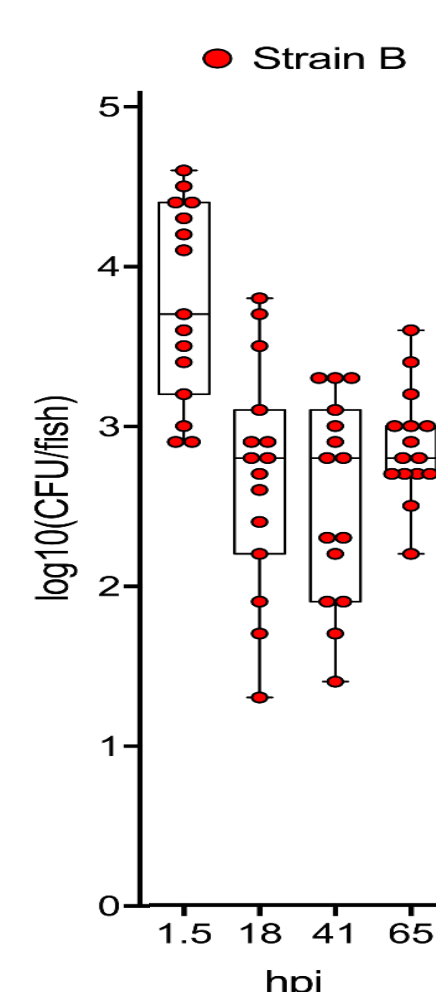


Pont & Blanc-Potard, 2021

Un isolat de *P. aeruginosa* persiste dans l'embryon infecté

Plusieurs isolats cliniques de *P. aeruginosa* à phénotype persistant ont été identifiés. Nos études actuelles portent sur l'isolat persistant B

L'isolat B colonise les sites d'infections sous forme d'agrégats extra et intra-macrophagiques qui pourraient avoir des caractéristiques de biofilm

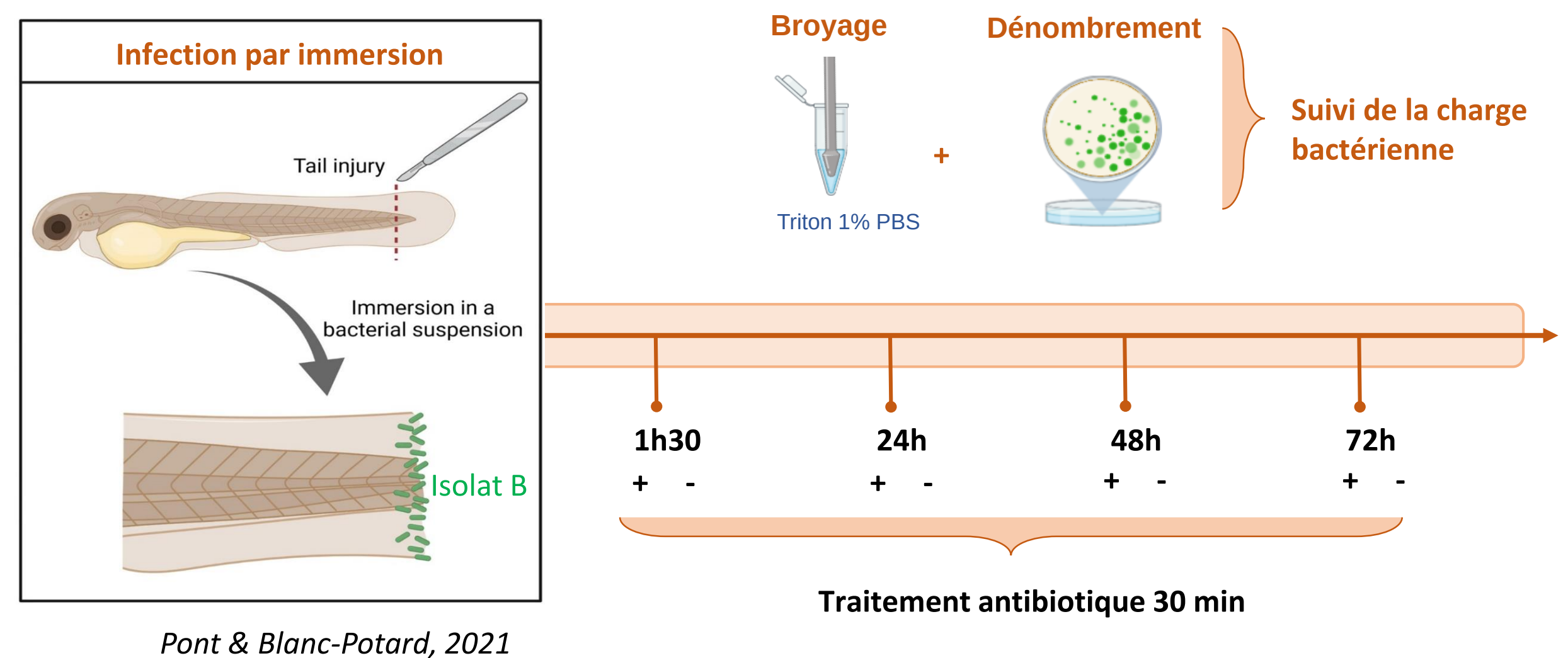


Pour en savoir plus les mécanismes responsables de la persistance de l'isolat B, rendez vous au poster n°17



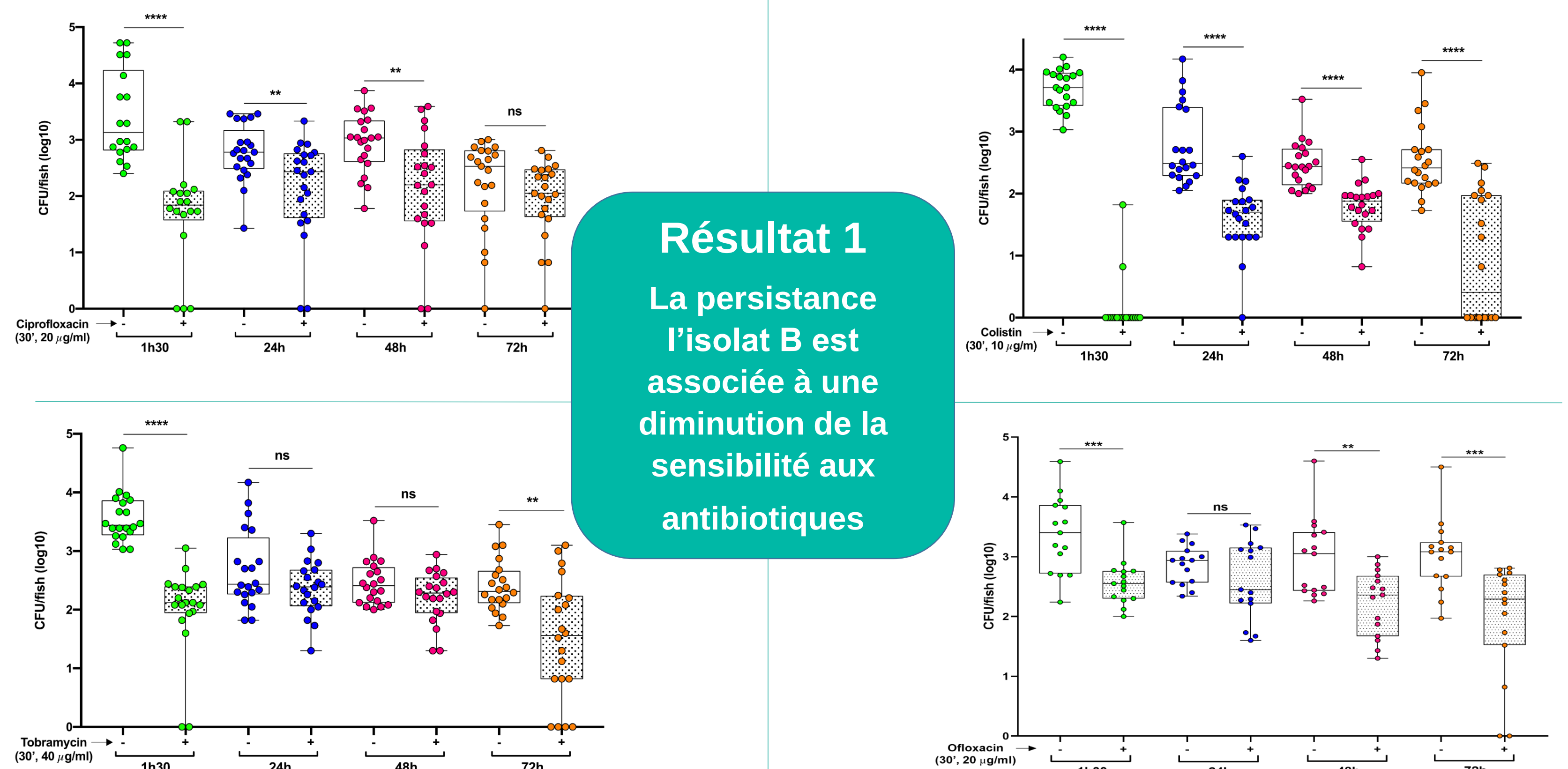
Résultats : Traitement d'une infection persistante

• Méthodologie : Infection persistante et traitement antibiotique

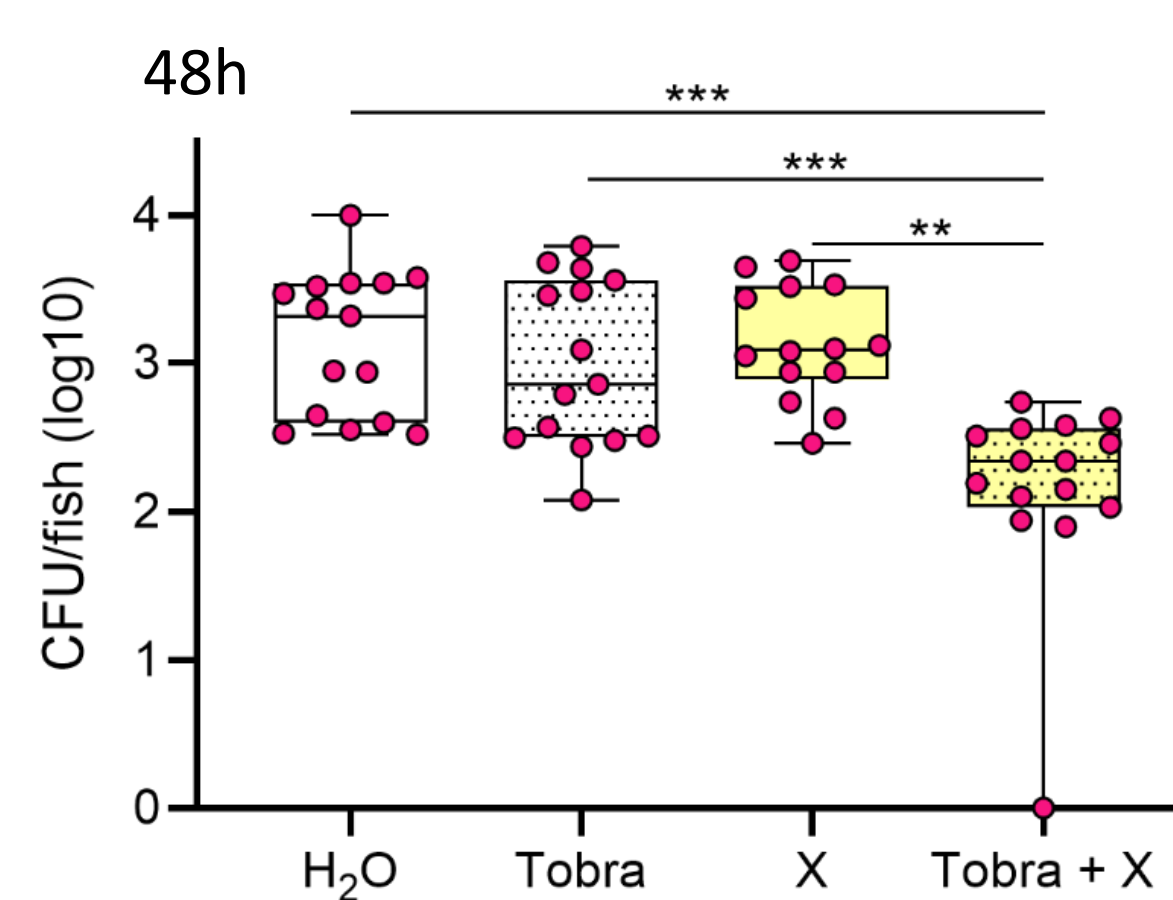


Pont & Blanc-Potard, 2021

• Traitement d'infection persistante par différents antibiotiques utilisés en clinique contre *P. aeruginosa*



• Traitement d'infection persistante par une molécule anti-biofilm en combinaison ou non avec un antibiotique



Résultat 2

La molécule anti-biofilm X en combinaison avec la tobramycine réduit significativement la charge bactérienne dans le contexte d'une infection persistante par l'isolat B

Conclusion et perspectives

Nouveau modèle animal d'infection persistante à *P. aeruginosa* permettant de reproduire le phénomène de tolérance aux antibiotiques rencontré en clinique et d'identifier des traitements efficaces

- Visualisation des bactéries suite au traitement antibiotique + molécule anti-biofilm
- Tester d'autres composés anti-biofilm (en combinaison ou non avec des antibiotiques) dans le contexte d'infection persistante
- Décrypter le mécanisme impliqué dans la tolérance aux antibiotiques
- Etudier l'efficacité des traitements d'une infection persistante dans un contexte CF (utilisation d'une lignée poisson *cftr* +/-)

Zebrafish embryo to model a persistent infection with clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates and assess the efficiency of therapeutics

Stéphane PONT, Flore NILLY, Anne BLANC-POTARD

Laboratory of Pathogens and Host Immunity, Montpellier, France

Contact: stephane.pont@umontpellier.fr

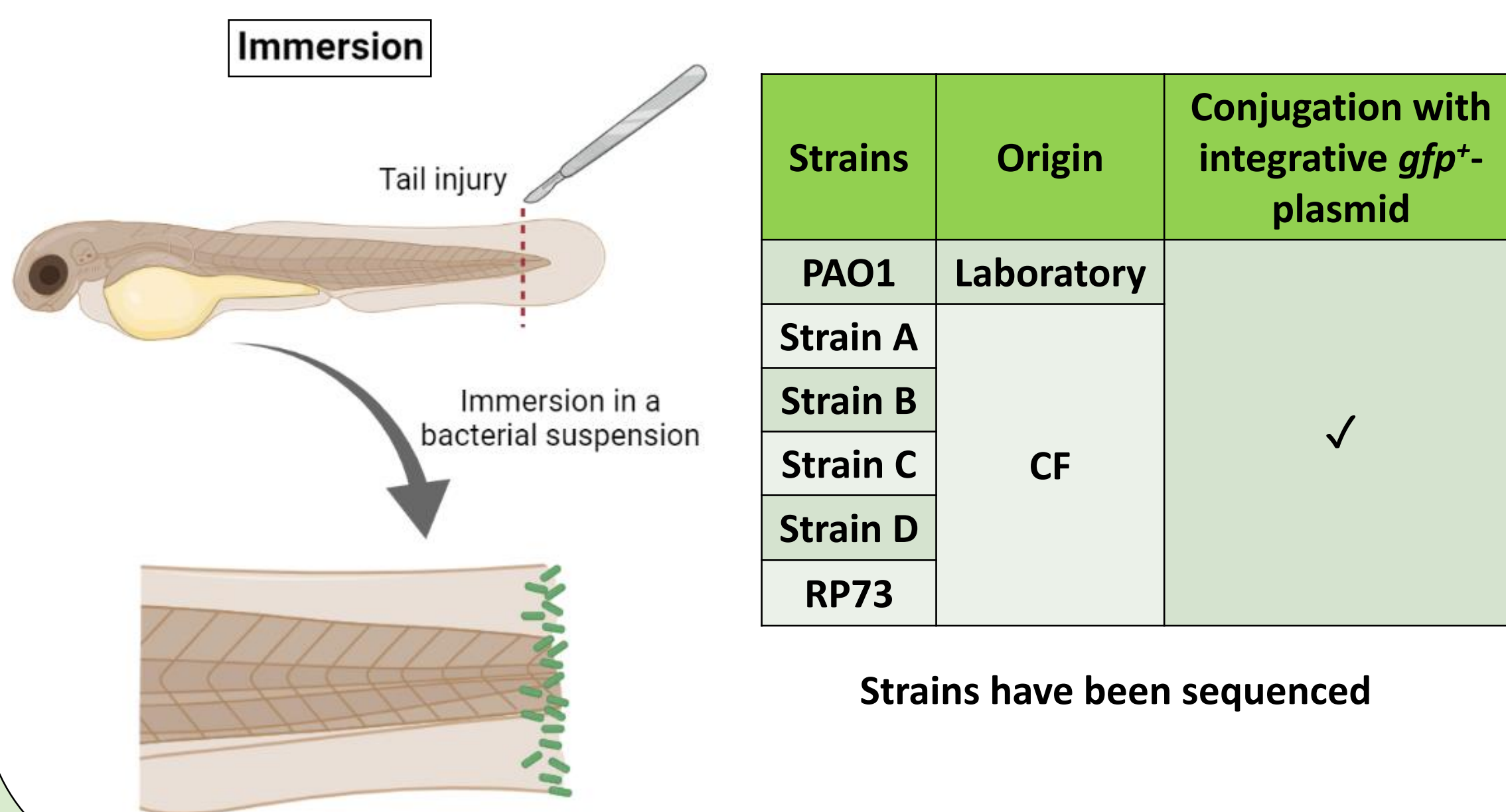
Context

P. aeruginosa is an opportunistic pathogen, the 4th cause of nosocomial infections in France, frequently isolated from cystic fibrosis (CF) individuals. This bacterium causes severe chronic infections in those patients, degrading their lung function and worsening their prognosis. *P. aeruginosa* persists within the organism through numerous virulence factors allowing it to face the host innate immune system. In addition, this pathogen is highly resistant to most available antibiotics. A better understanding of the strategies underlying *P. aeruginosa* pathogenicity in a context of persistent infection and the search for alternative therapeutics are essential to fight against this major public health problem. The goal of the project is thus to develop a simple model of *P. aeruginosa* persistent infection using the zebrafish embryo (*Danio rerio*), and to screen molecules with anti-virulence properties.

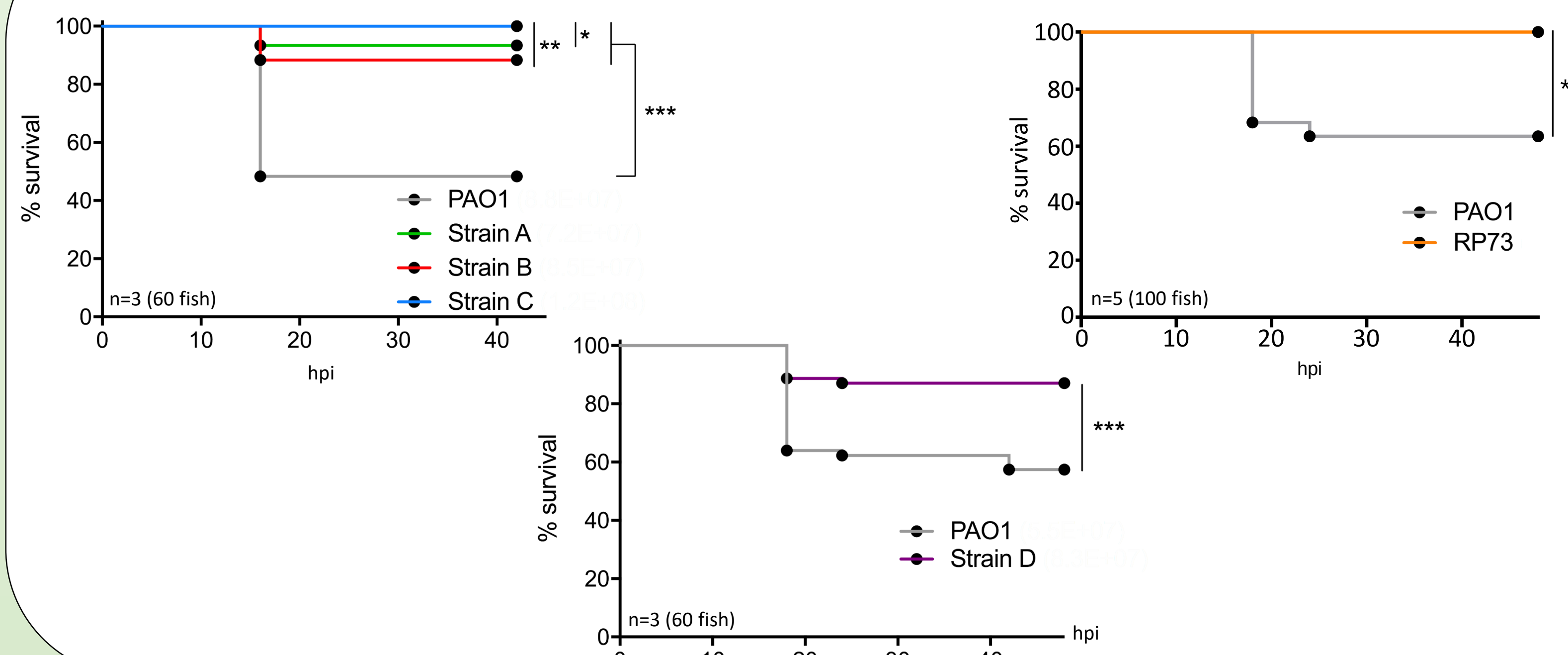
This work will allow to:

- Obtain a simple vertebrate model of persistent *P. aeruginosa* infection easy to manipulate
- Better understand the interplay between *P. aeruginosa* and the host innate immune system in a context of persistent infection
- Validate *in vivo* the use of anti-*Pseudomonas* molecules using clinical strains isolated from CF patients

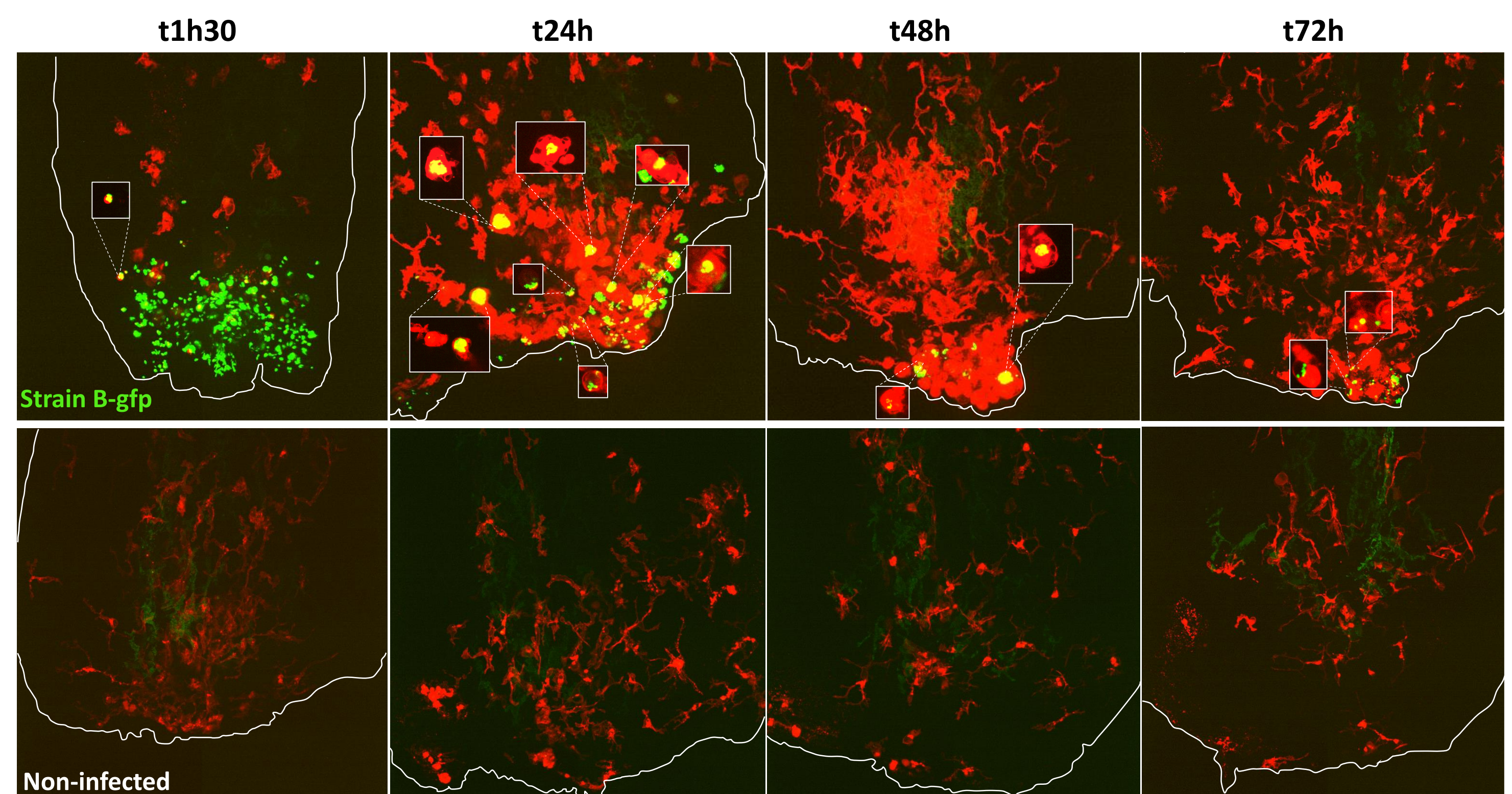
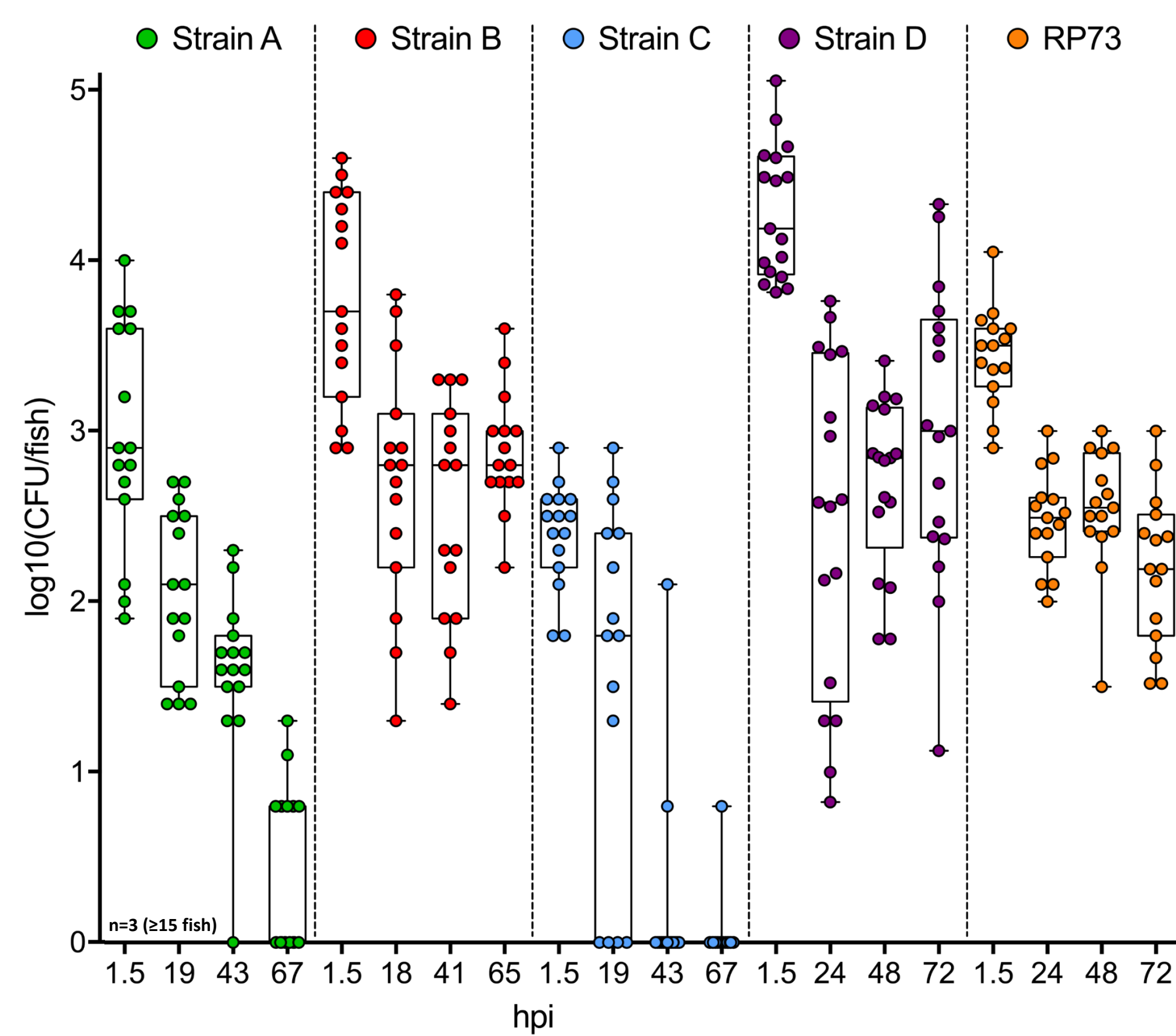
Route of infection and strains used in this study



CF isolates are less virulent than the reference strain PAO1



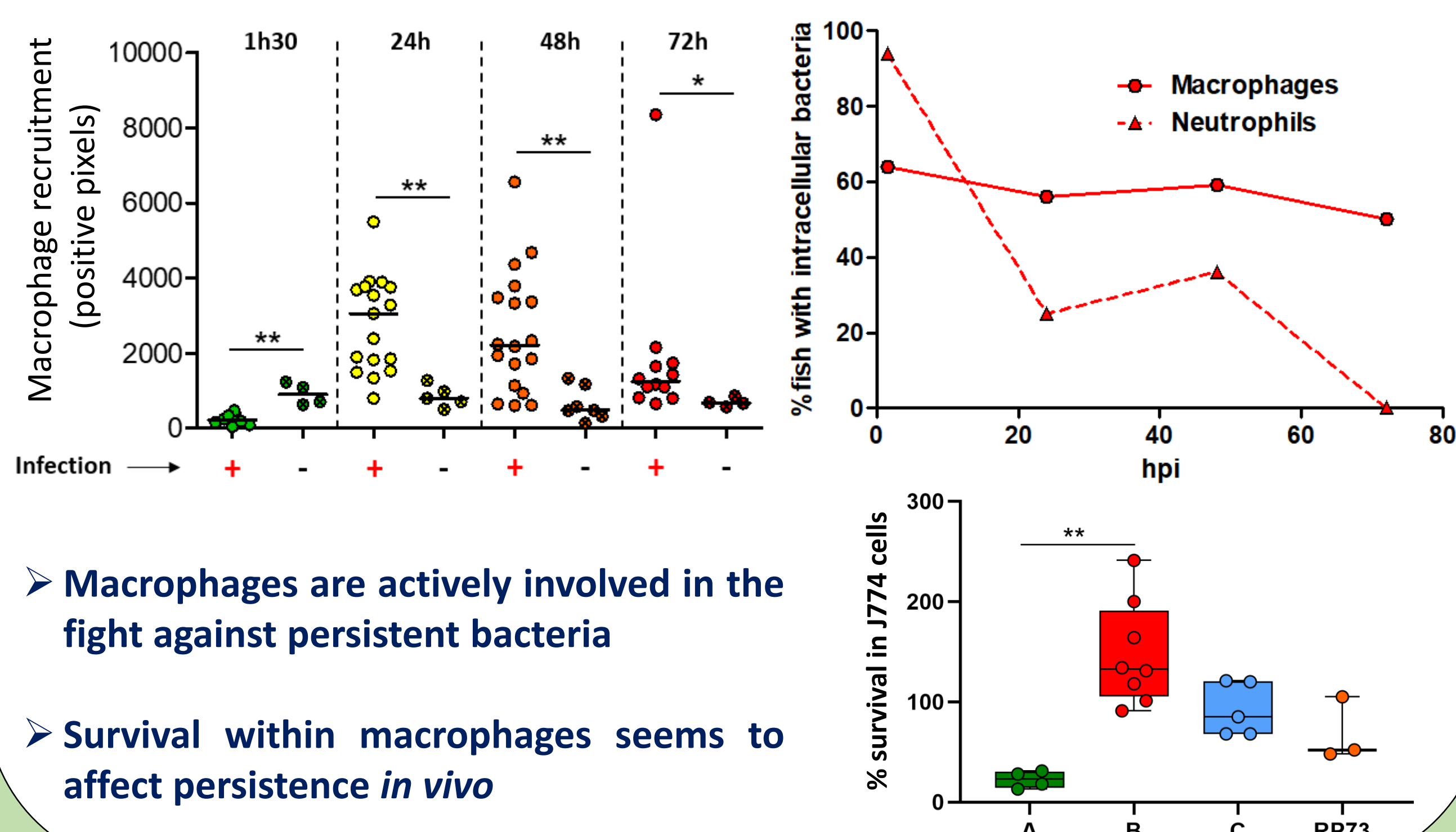
Are these CF isolates avirulent or persistent in this immersion model of infection?



- Strain B forms large clusters *in vivo*, some of which are found within macrophages

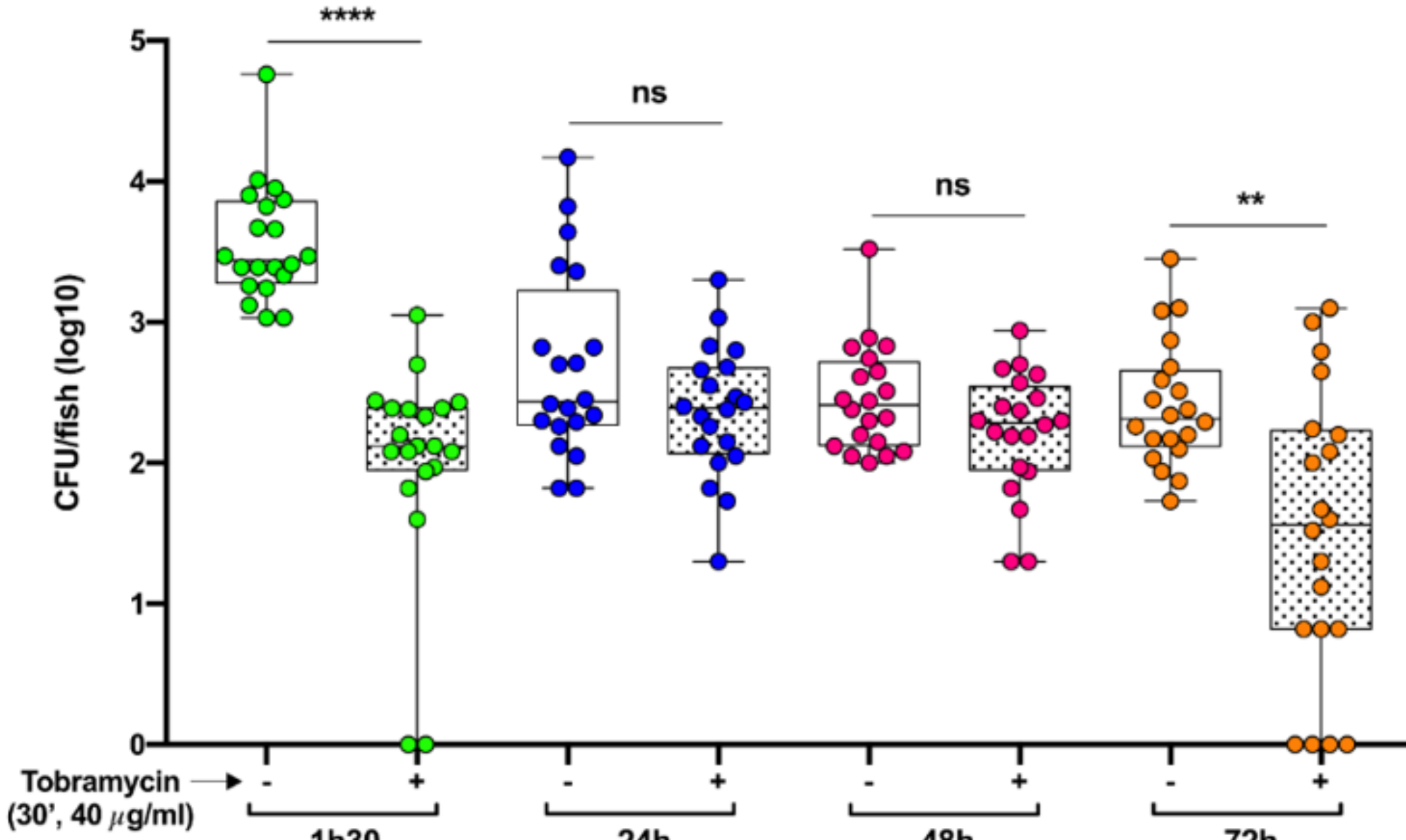
- Some isolates are completely eliminated by the fish, while other persist for 3 days

Interaction between isolate B and innate immune cells



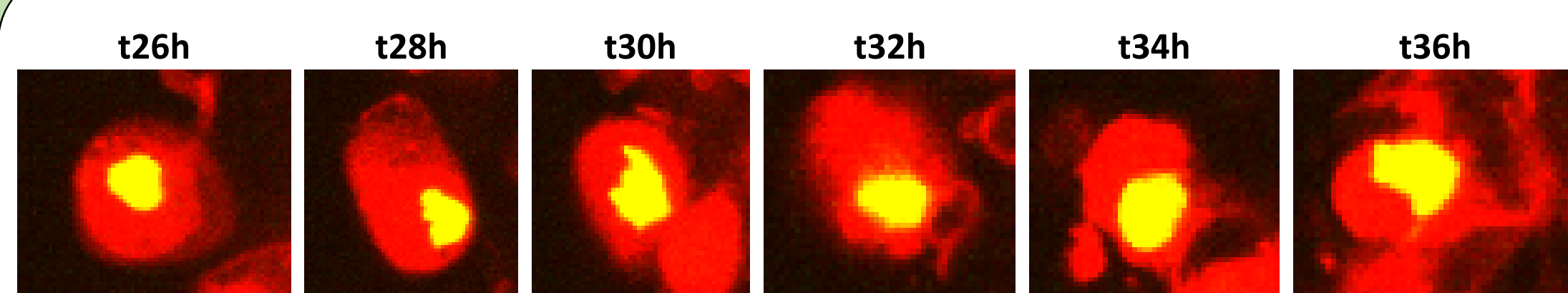
- Macrophages are actively involved in the fight against persistent bacteria
- Survival within macrophages seems to affect persistence *in vivo*

How persistence interferes with the efficiency of antibiotic treatments?



- Upon establishment of a persistent infection, strain B rapidly acquire the ability to withstand an antibiotic challenge

Similar results observed with other antibiotics



Persistent intramacrophagic aggregates?

Perspectives

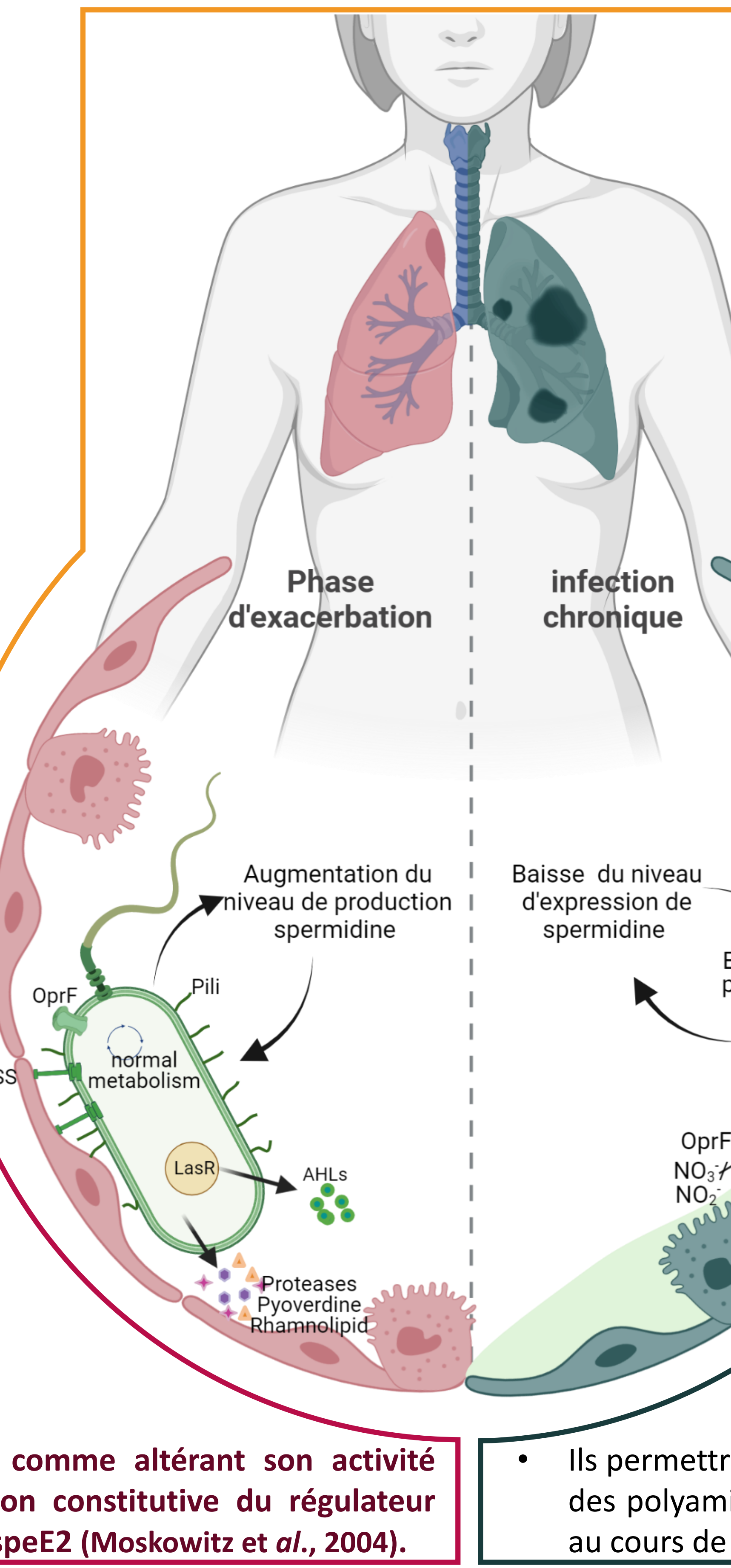
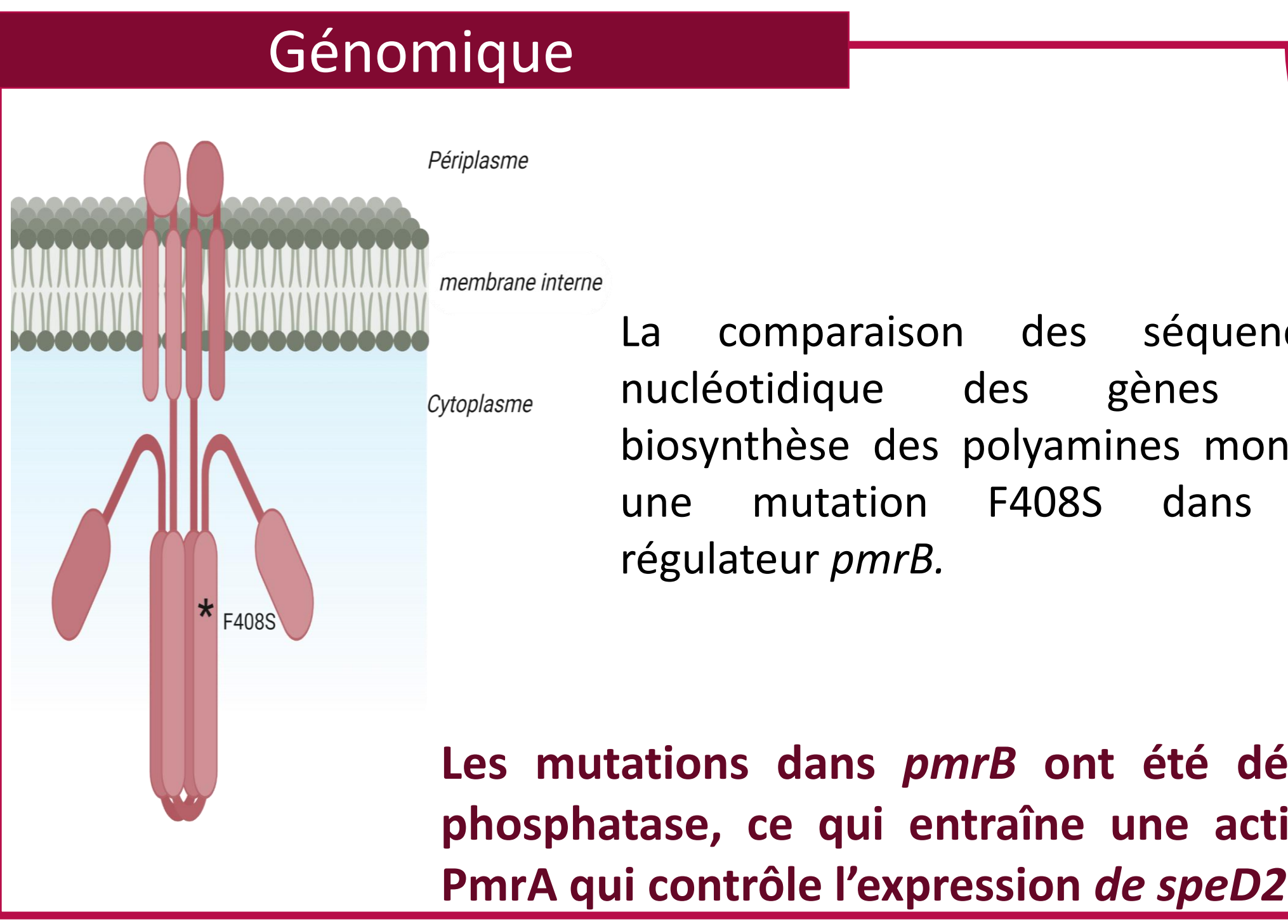
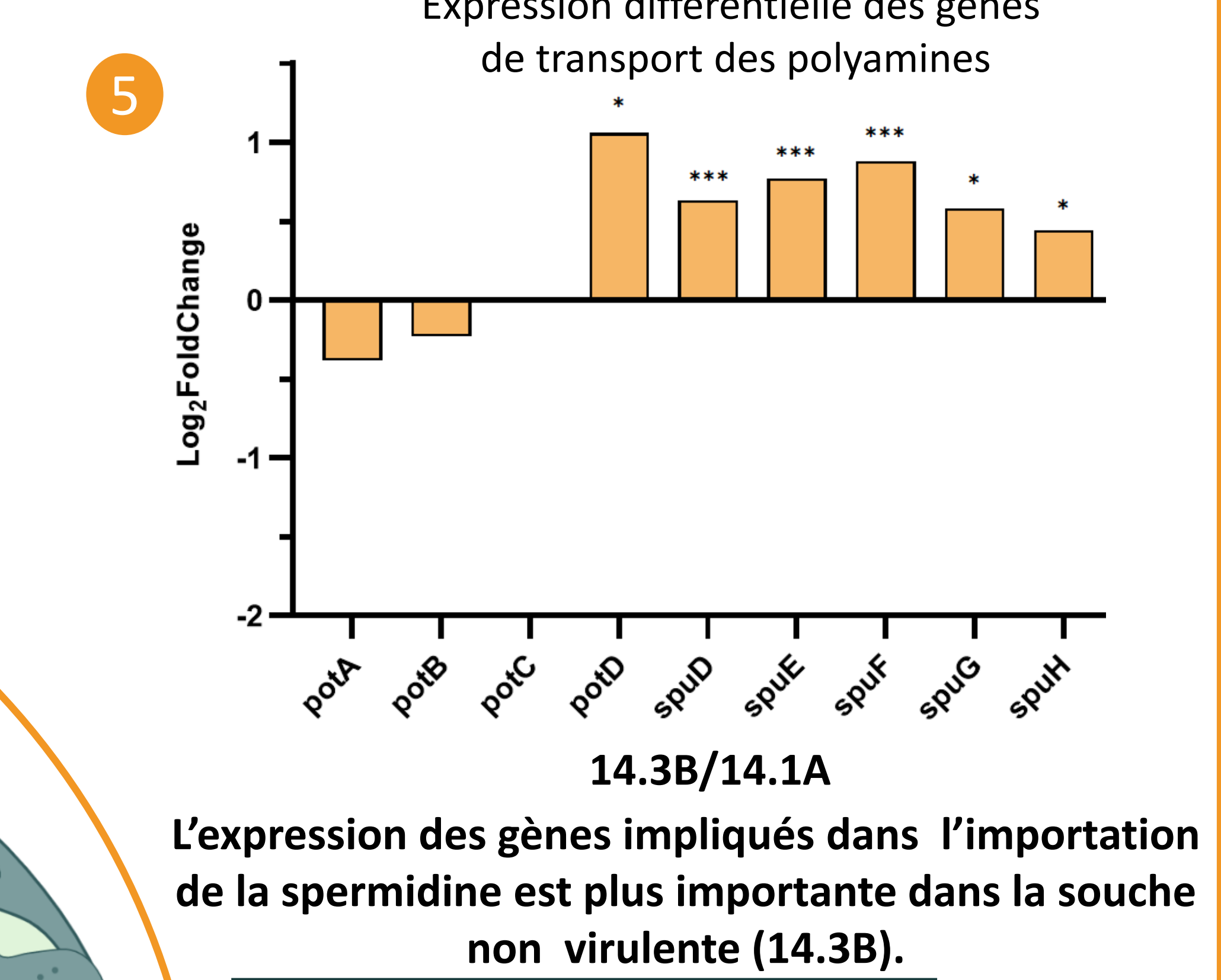
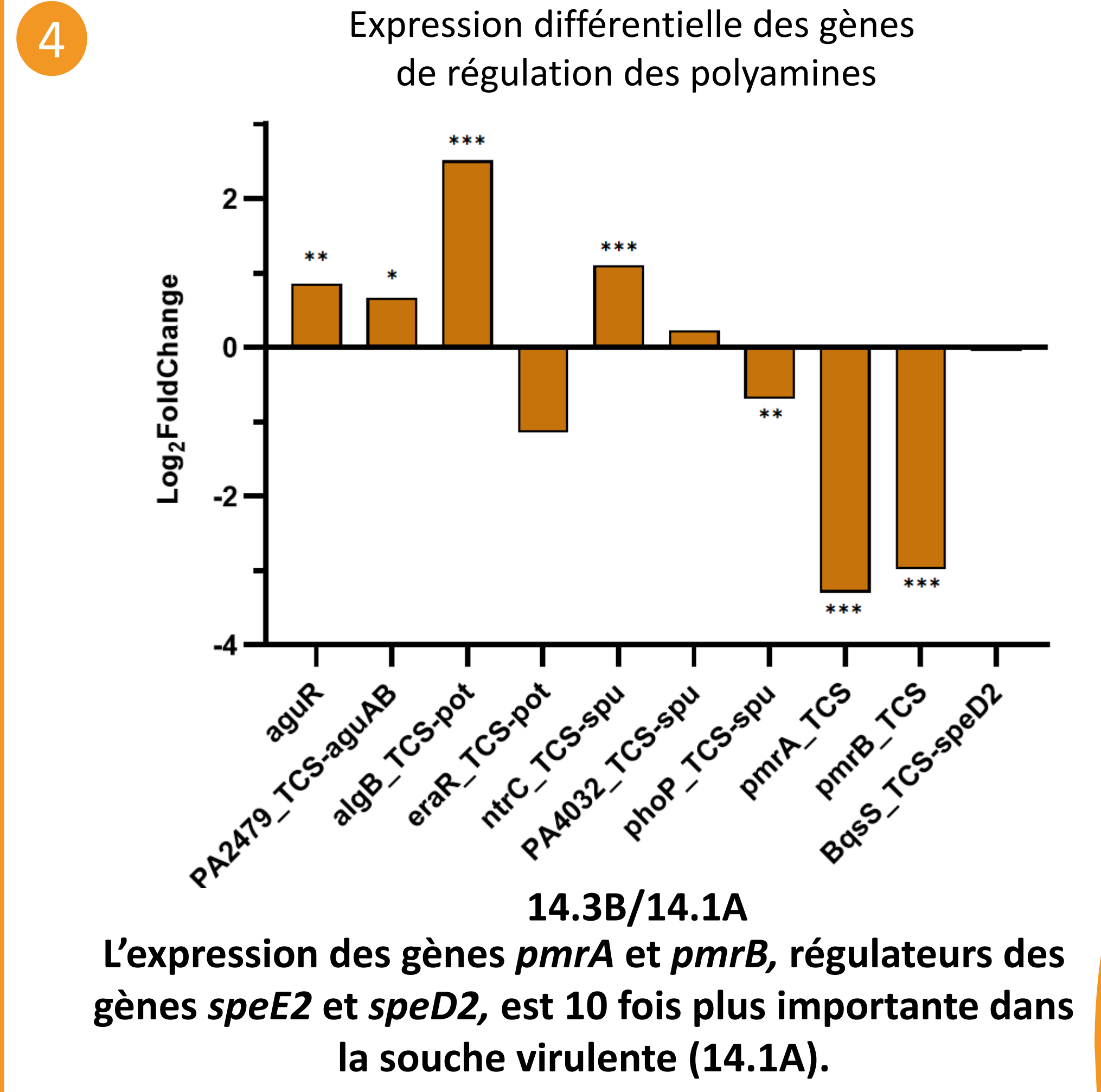
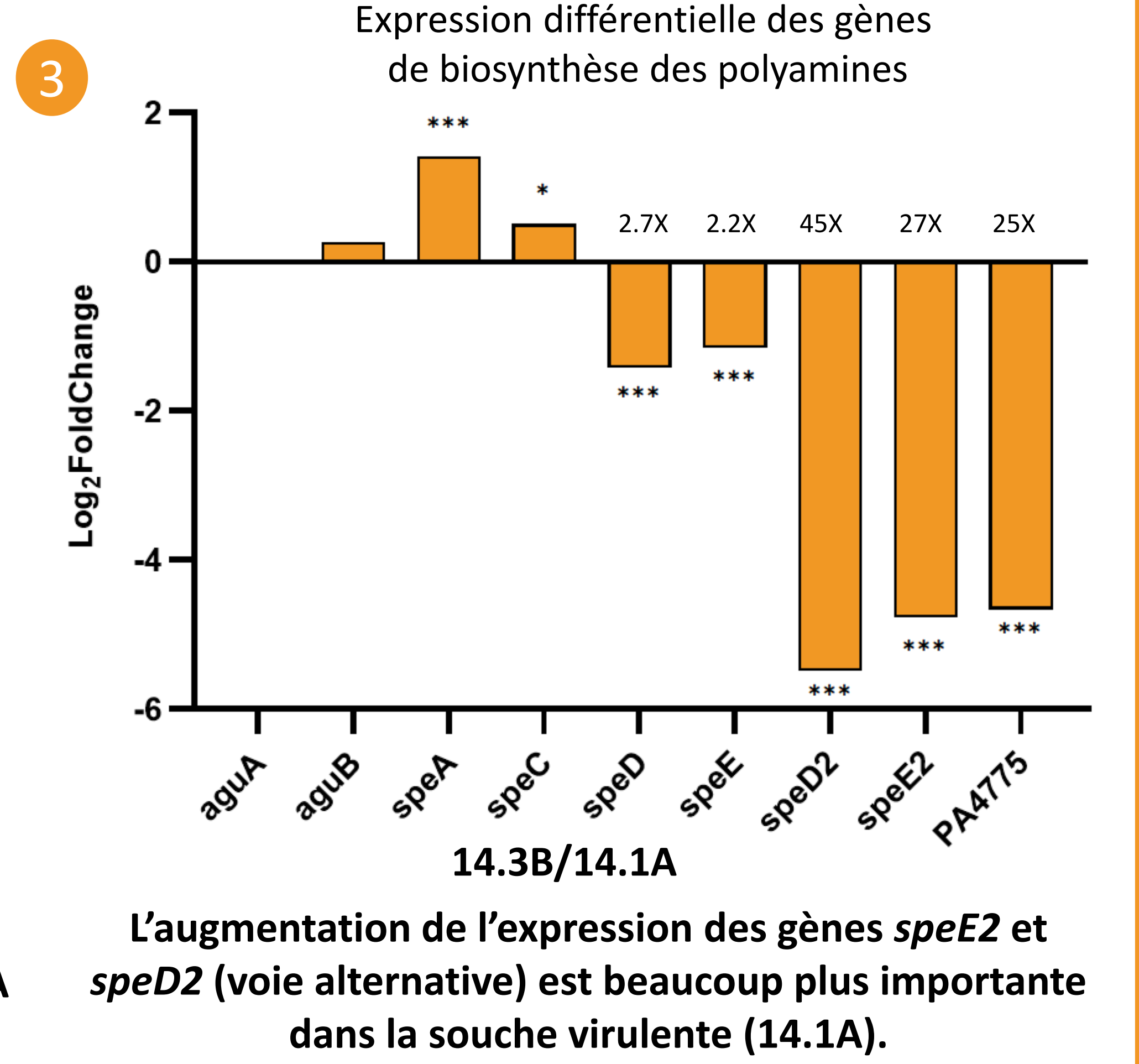
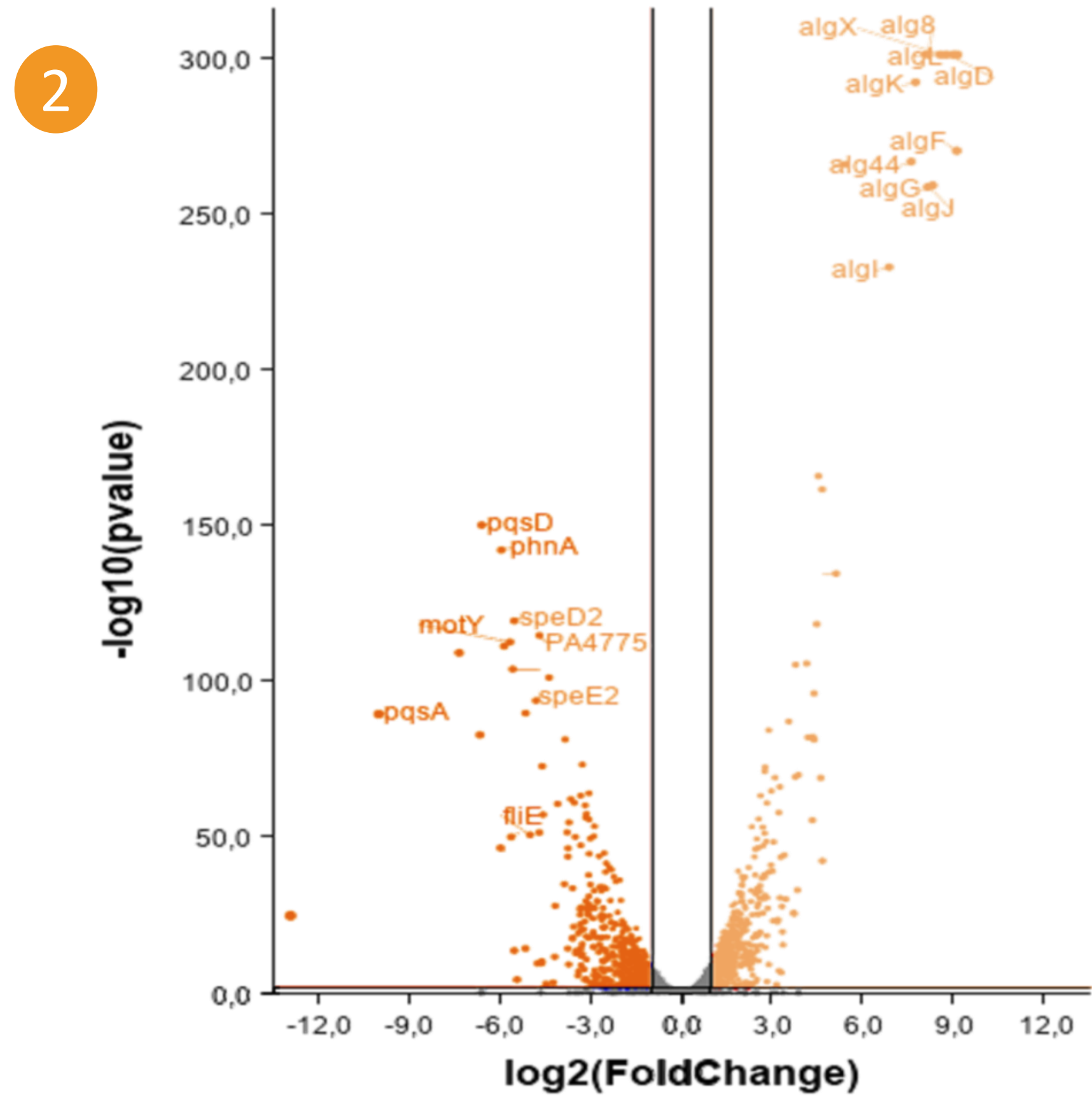
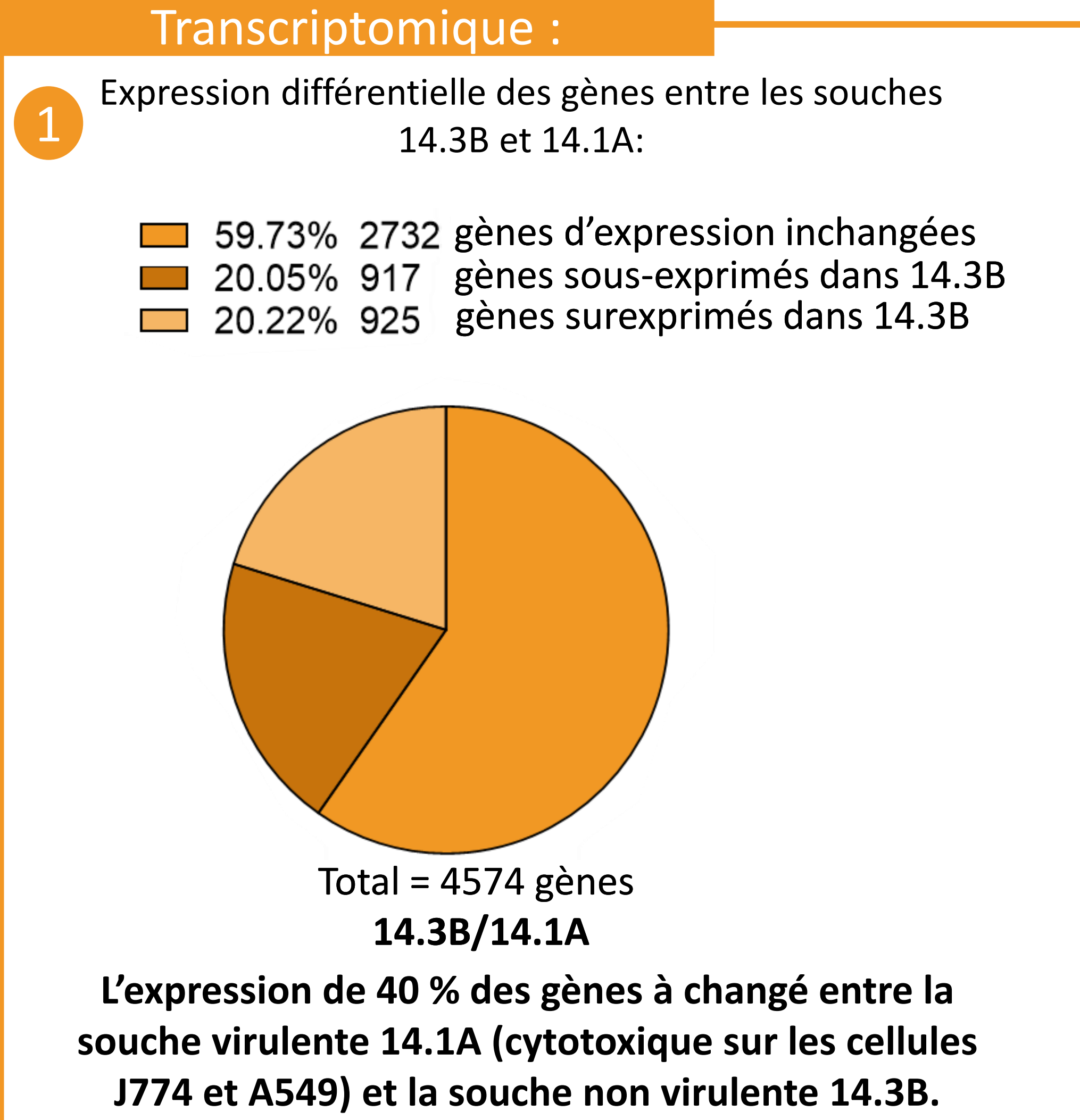
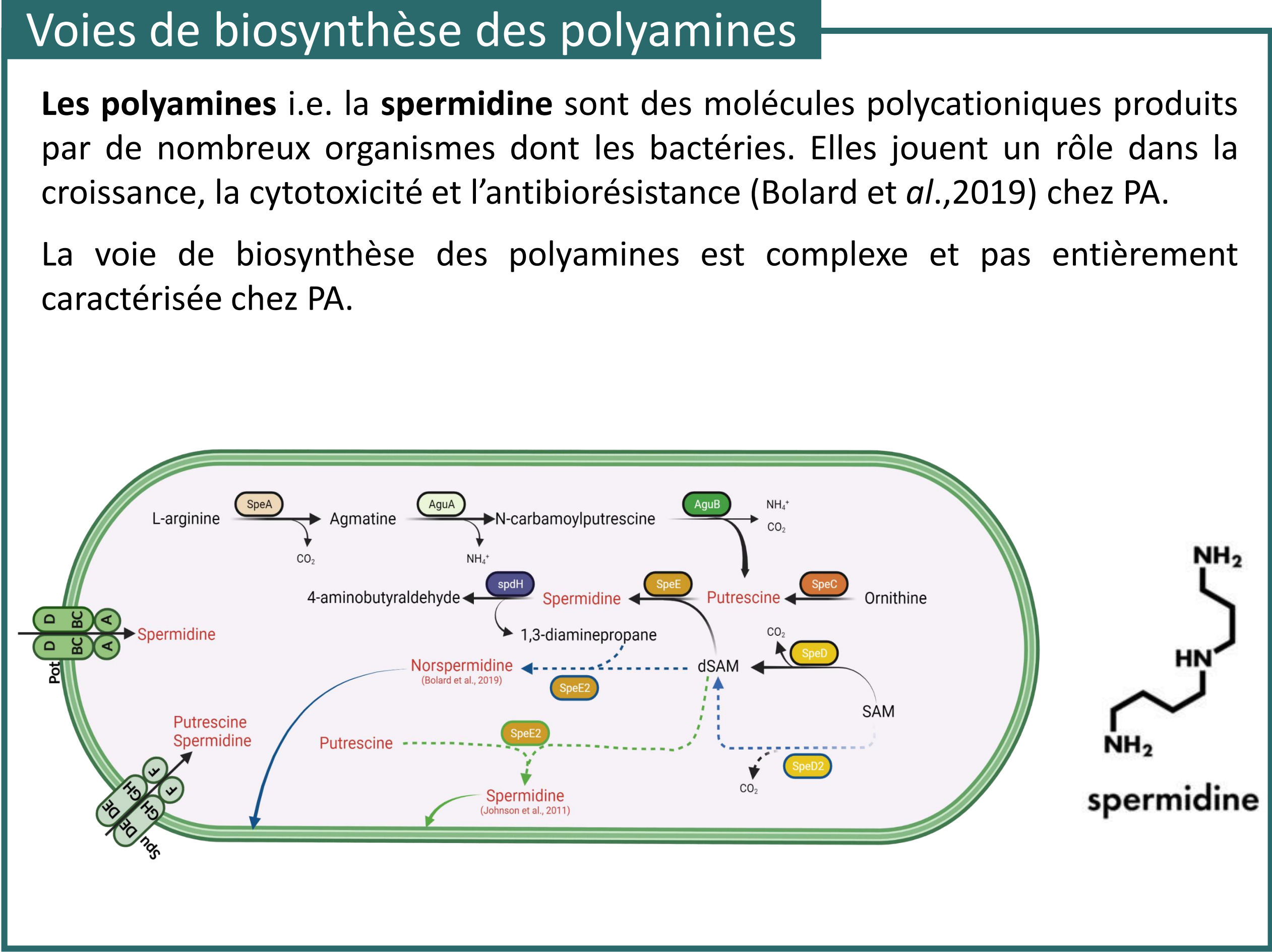
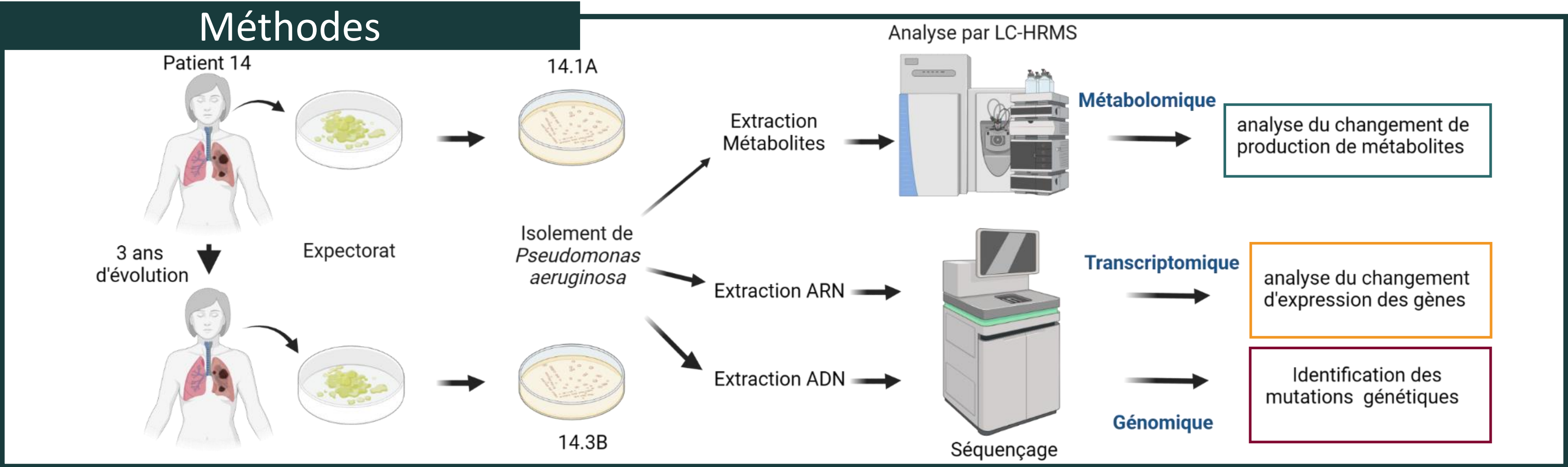
- Validate new anti-virulent compounds in this specific persistent context
- Use of *cftr*^{-/-} fish to assess the role of CFTR loss in the establishment of a persistent infection
- Assess the location and metabolic status of antibiotic tolerant cells
- Find relations between genomic data and the strain's pathogenicity

Rôle des polyamines dans la virulence de *Pseudomonas aeruginosa* au cours de l'infection chronique pulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose

Abdoul-Razak TIDJANI¹, Mireille ROBERT-GENTHON³, Éric FAUDRY³, Ina ATTREE³, Bertrand TOUSSAINT^{1,2} et Audrey LE GOUELLEC^{1,2}

Introduction

Pseudomonas aeruginosa (PA) est une bactérie opportuniste responsable d'infections pulmonaires chroniques chez les personnes atteintes de **mucoviscidose** (Pressler et *al.*, 2011). Sa présence est associée à une plus grande fréquence d'**exacerbations** et une diminution progressive de la fonction respiratoire (Schaedel et *al.*, 2002). Au laboratoire, nous étudions l'évolution des souches de PA dans le poumon du patient atteint de mucoviscidose. Nous avons montré une corrélation entre le haut niveau de production des molécules de la famille des polyamines avec la virulence de PA et la fréquence d'exacerbation des patients CF (Moyne et *al.*, 2021). Notre objectif est de mieux comprendre le **mécanisme moléculaire à l'origine de cette surproduction de polyamines** et d'établir un lien causal avec la virulence des souches.



Hypothèse

Pseudomonas aeruginosa contrôlerait sa virulence en modulant la production de polyamines via les gènes régulateurs *pmrAB*

Perspectives

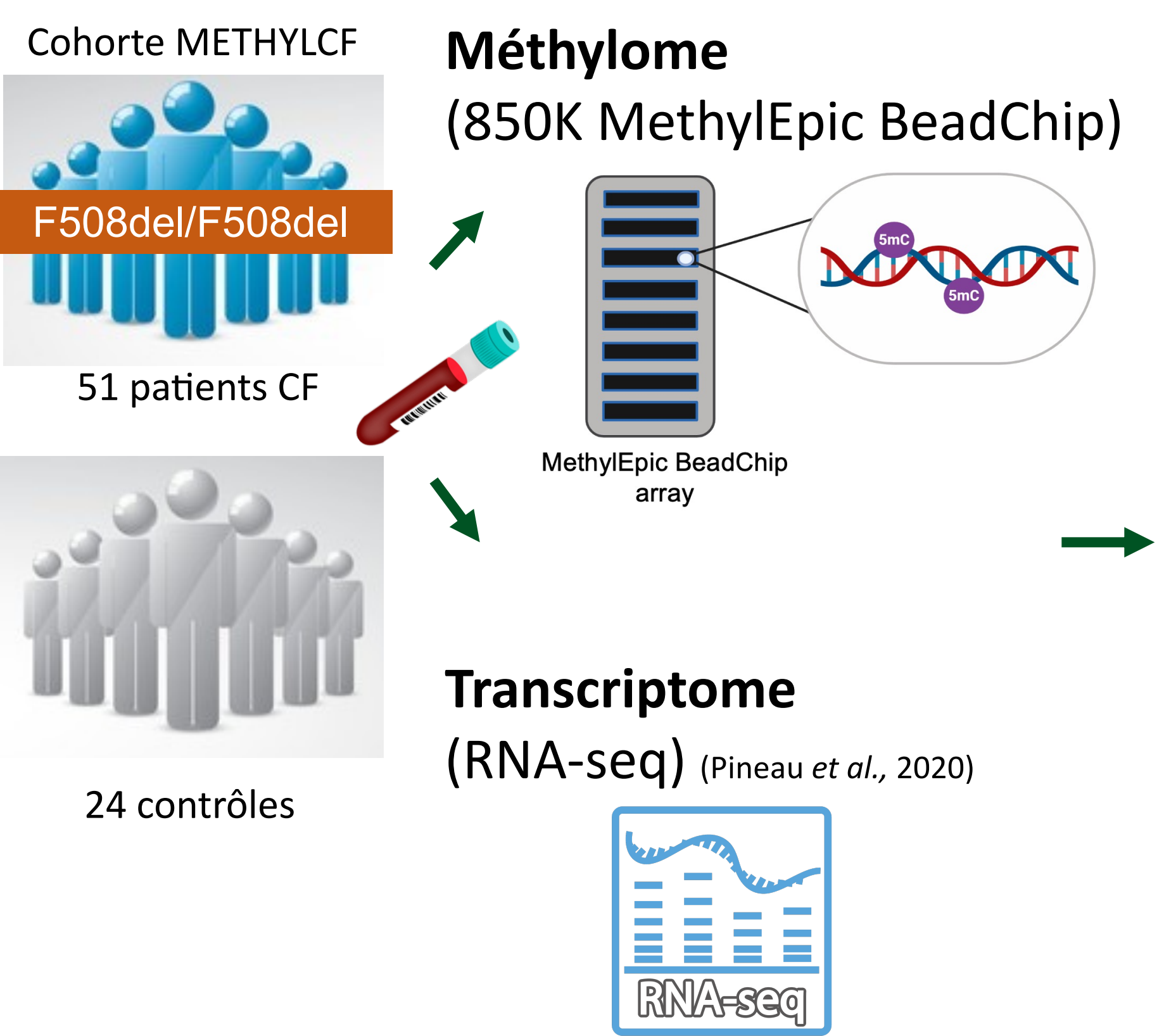
- L'approche multi omiques a permis d'identifier un des mécanismes par lequel PA pourrait contrôler sa virulence.
- Pour vérifier cette hypothèse, des mutants des voies de biosynthèse et de régulation des polyamines ont été construits:
($\Delta speE$, $\Delta speD$, $\Delta speE2$, $\Delta speD2$, $\Delta PA4775$, $\Delta pmrA$, $\Delta pmrB$, $\Delta speE\Delta speD$, $\Delta speE2\Delta speD2$, $\Delta speE2\Delta speD$, $\Delta speE\Delta speD2$ et $\Delta pmrA\Delta pmrB$).
- Ces mutants seront testés dans des modèles d'infection *in vitro* et *in vivo*.
- Ils permettraient de mieux caractériser les voies de biosynthèse et de régulation des polyamines et de comprendre comment PA utilise ces voies pour s'adapter au cours de l'infection chronique chez les patients atteints de mucoviscidose.

VARIATIONS DE MÉTHYLATION DE L'ADN DANS DES GÈNES IMPLIQUÉS DANS L'INFLAMMATION CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE

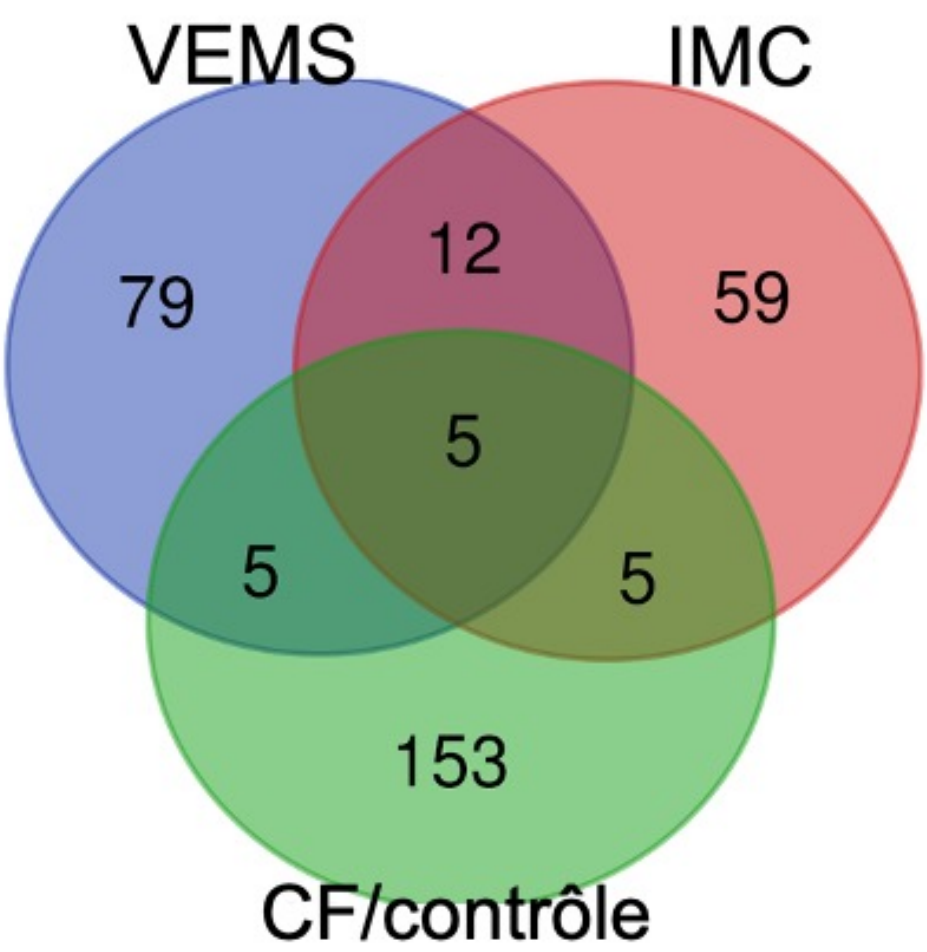
Objectifs: (i) comprendre la variabilité phénotypique observée dans la mucoviscidose (CF) ;
(ii) identifier des gènes et voies de signalisation impliqués dans la réponse inflammatoire systémique

Loréna Valdés¹, Jorg Tost², Isabelle Rivals³, Florence Busato², Laurent Mely⁴, Sylvie Leroy⁵, Marlène Murris⁶, Mireille Claustres⁷, Davide Caimmi⁸, Isabelle Vachier⁸, Raphaël Chiron⁸ et Albertina De Sario¹.
(1) PhyMedExp, CNRS, INSERM, Université de Montpellier, Montpellier (2) CNRGH, CEA, Evry (3) ESPCI Paris, Université PSL, UMR51158, Paris (4) CRCM Hyères (5) CRCM Nice (6) CRCM Toulouse (7) Laboratoire de Génétique Moléculaire, Montpellier (8) CRCM Montpellier
Ce projet est financé par Vaincre La Mucoviscidose

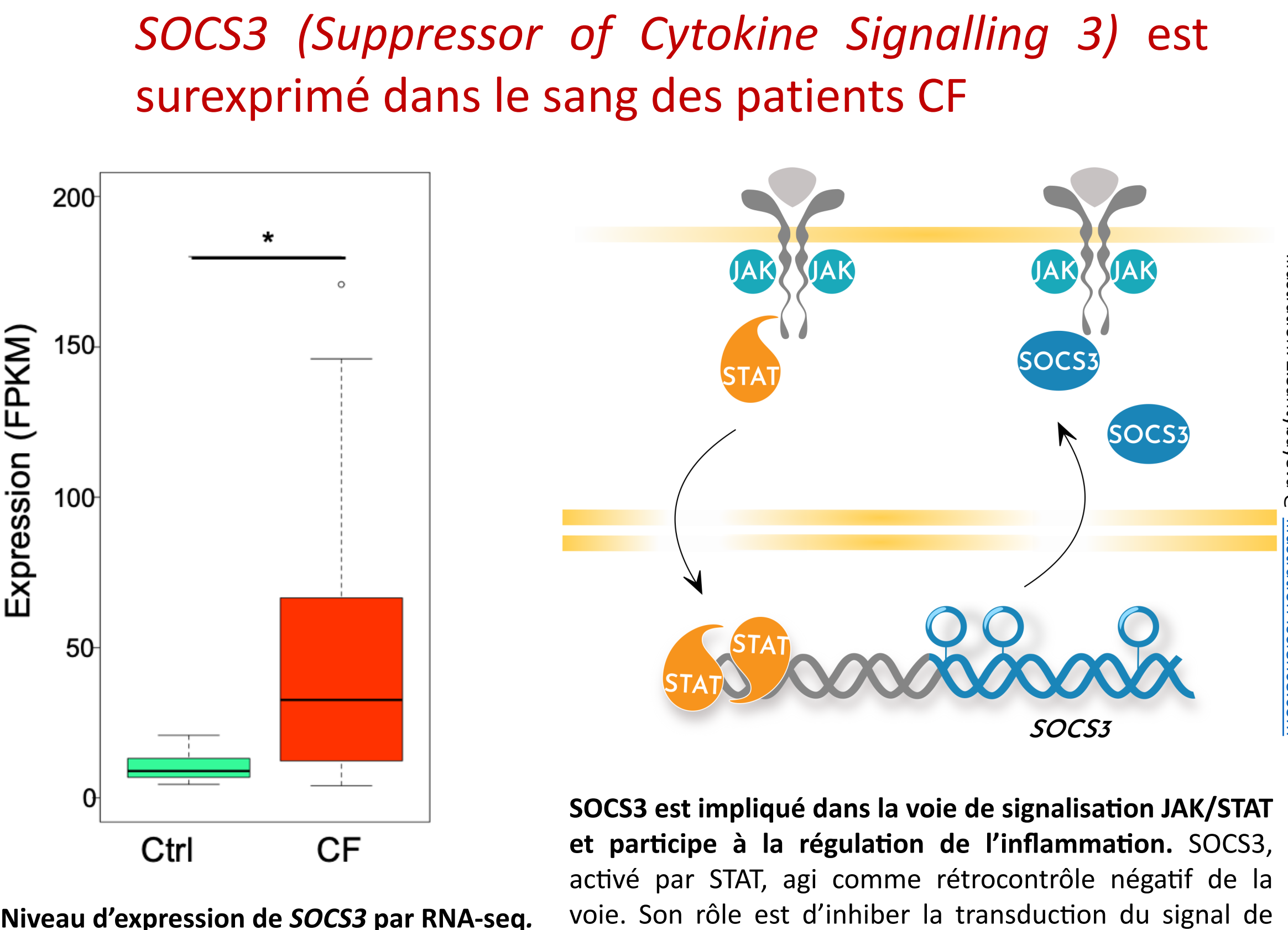
I/-Identification de CpG différenciellement méthylés qui corrèlent avec une ou plusieurs variables cliniques



La méthylation de nombreux gènes impliqués dans la voie de signalisation JAK/STAT est altérée dans la mucoviscidose



Nombre de gènes dont le niveau de méthylation des CpG associés corrèle avec une ou plusieurs variables cliniques (VEMS, IMC et la condition CF/contrôle).



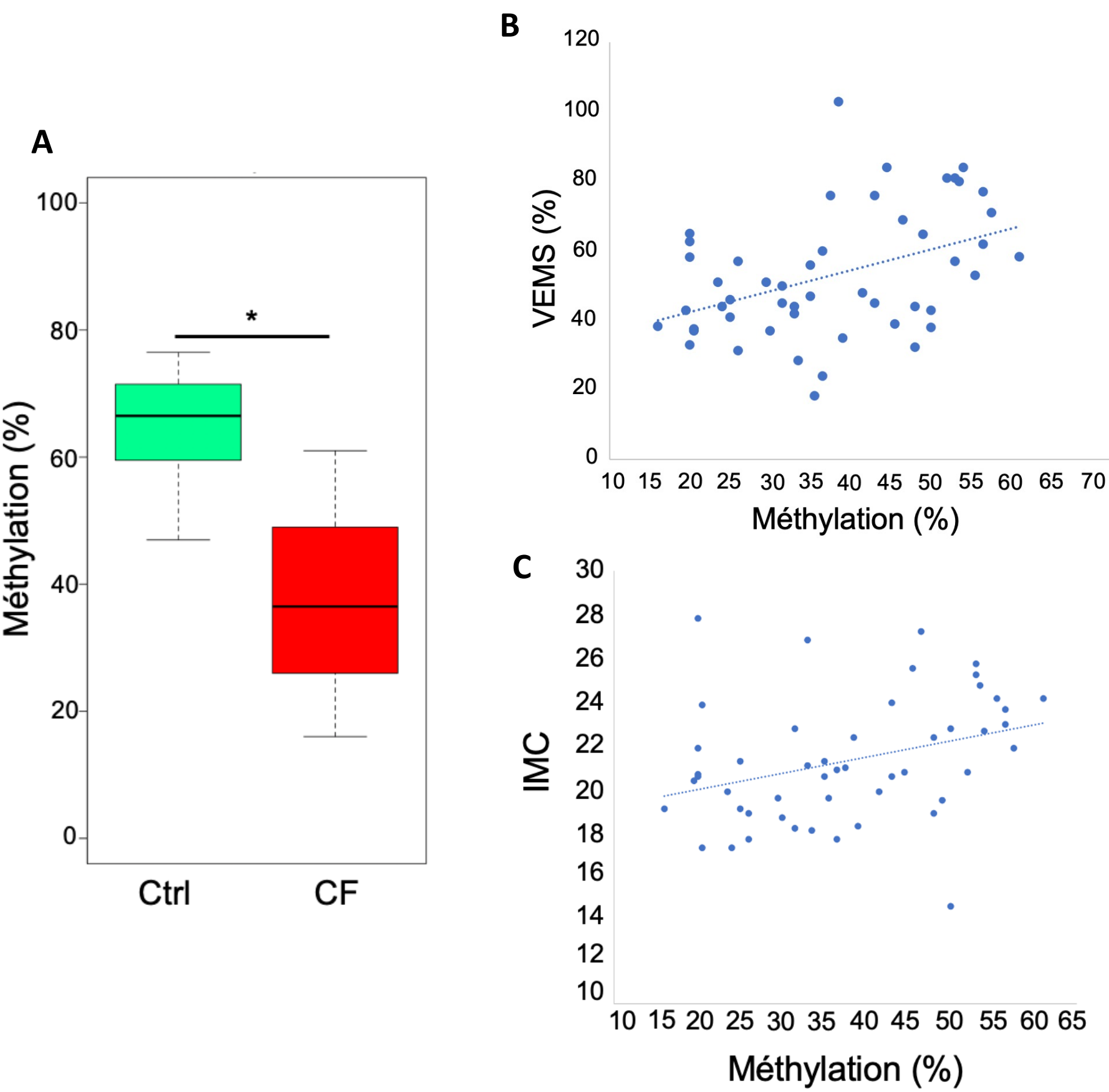
II/-Validation de gènes d'intérêt

Nous avons validé 5 CpG d'intérêt par pyroséquençage (PyroMarkQ24) une méthode de mesure quantitative de la méthylation de l'ADN.

Gène	Trait clinique	Coefficient de corrélation*	P-valeur
SOCS3	CF/contrôles	-0.67	1.70E-09
	VEMS	0.42	2.15E-03
	IMC	0.40	4.50E-03
CLECL1	Diabète	-0.29	4.52E-02
	VEMS	-0.34	1.60E-02
FADD	IMC	-0.38	7.16E-03
	Diabète	-0.29	4.03E-02
FADD	VEMS	-0.15	2.83E-01
	IMC	-0.13	3.64E-01
SBNO2	CF/contrôles	-0.56	1.64E-05
	IMC	0.33	3.18E-02

Une valeur positive signifie un niveau de méthylation plus élevé chez les patients CF comparé aux contrôles.
*Coefficient de Spearman ou de Pearson selon si la distribution est de type normale ou non.

SOCS3 corrèle avec la condition CF, le VEMS et l'IMC des patients CF



(A) Niveau de méthylation de l'ADN d'un CpG associé à *SOCS3* chez les patients CF (n=51) et les contrôles (n=13) par pyroséquençage. (B) Corrélation entre le niveau de méthylation de l'ADN et le VEMS des patients. (C) Corrélation entre le niveau de méthylation de l'ADN et l'IMC des patients.

- Magalhães M et al. Dynamic changes of DNA methylation and lung disease in cystic fibrosis: lessons from a monogenic disease. Epigenomics. (2018).
- Scott M, De Sario A. DNA methylation changes in cystic fibrosis: Cause or consequence? Clin Genet. (2020) Review.
- Pineau F et al. Blood co-expression modules identify potential modifier genes of diabetes and lung function in cystic fibrosis. PLoS One. (2020).
- Pineau, F et al. DNA Methylation at ATP11A cg11702988 Is a Biomarker of Lung Disease Severity in Cystic Fibrosis : A Longitudinal Study. Genes, (2021).

III/- Déterminer par quel mécanisme la méthylation de l'ADN participe au phénotype CF

Analyse *in silico*: Nous avons analysé le profil de 3 marques d'histones dans 3 tissus (neutrophiles, monocytes, poumon) et la lignée A549, à partir de données de ChIP-seq disponibles sur *Roadmap Epigenomics project* (<http://www.roadmapepigenomics.org>).

H3K27Ac et H3K4me3 prédisent une région promotrice.

H3K27Ac, H3K4me1 et l'absence de H3K4me3 prédisent une région enhancer.

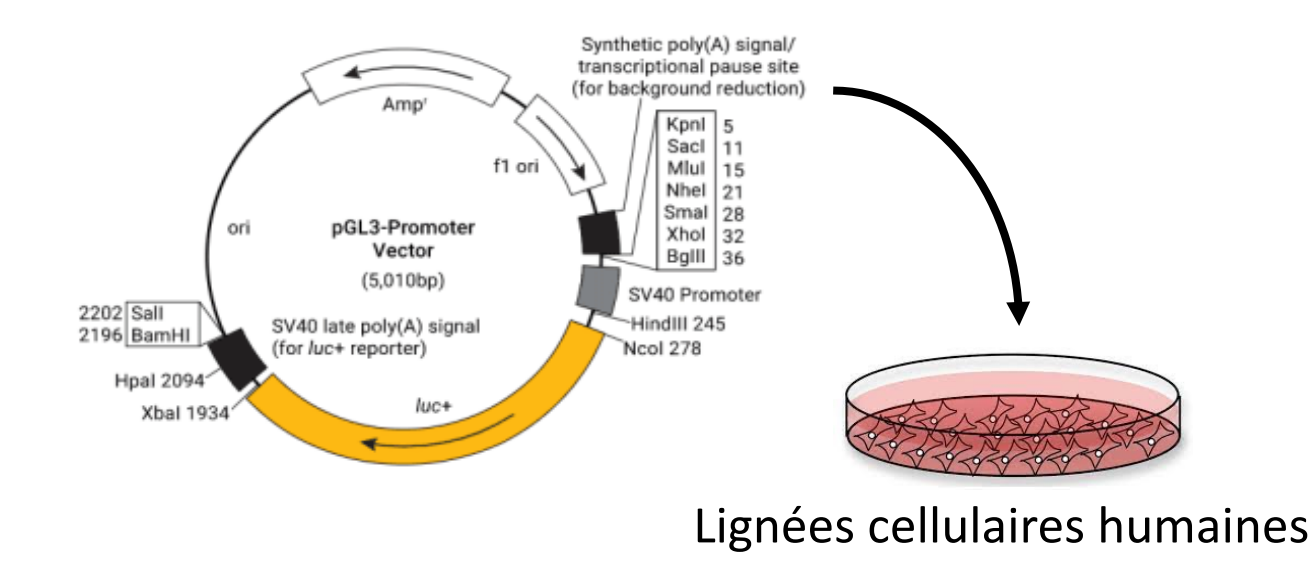
Nous avons prédit 4 régions *enhancers* associées aux gènes *SOCS3*, *ATP11A*, *LYN*, *ASPH* et 3 régions promotrices dans les gènes *FADD*, *CLECL1*, *RGS1*

Tests fonctionnels:

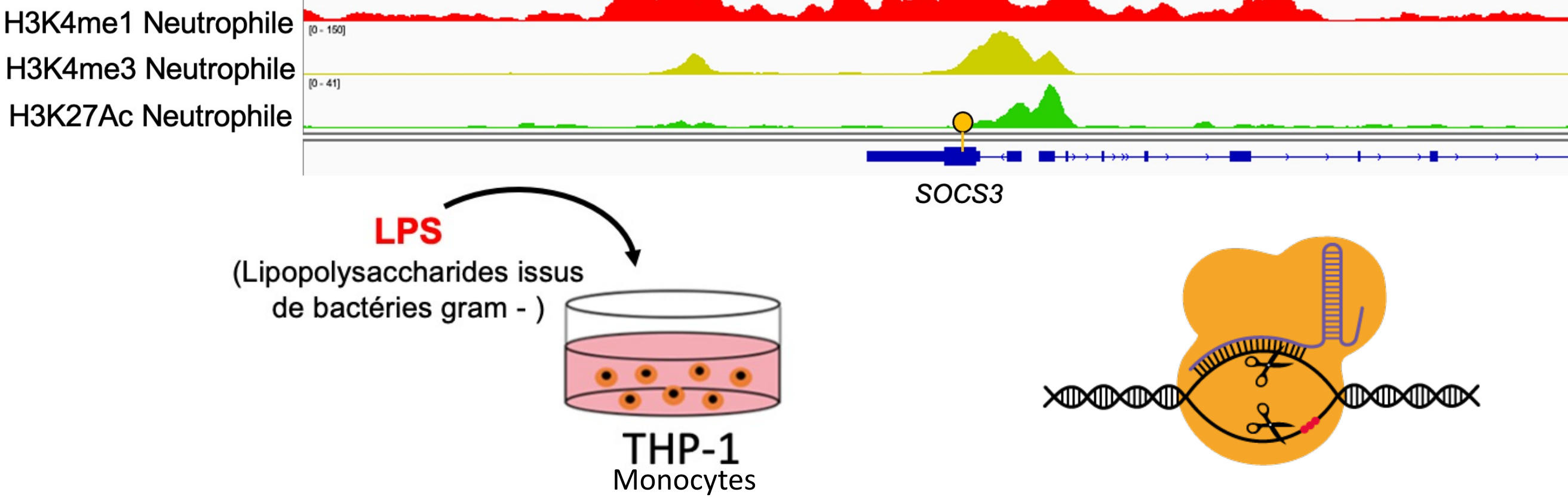
-**Luciferase assay**

-**Modèle d'inflammation au LPS**

-**CRISPR-dCas9**



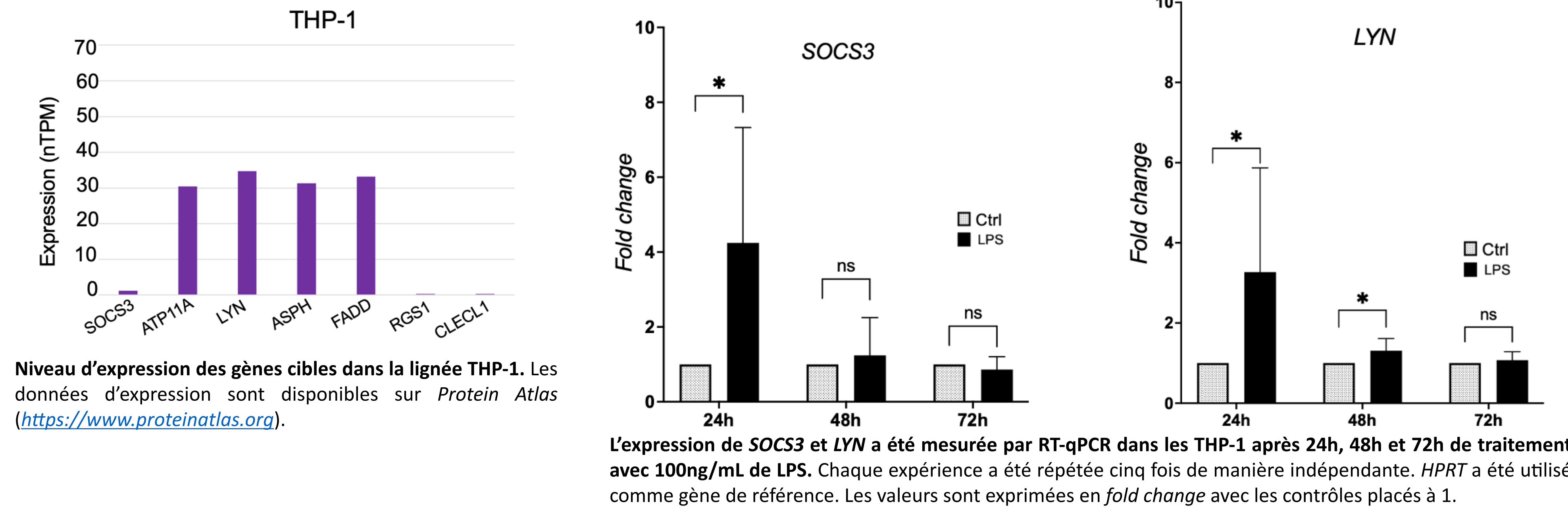
Luciferase assay permet de tester si les régions prédites sont des séquences *cis*-régulatrices *in vitro*.



Modèle d'inflammation induite au LPS permet de caractériser la corrélation entre variation de méthylation dans une séquence *cis*-régulatrice et impact sur la chromatine, la transcription et la protéine.

CRISPR-dCas9 fusionnée à DNMT3A ou TET1 permet de méthyler ou déméthyler la région endogène.

SOCS3 et LYN sont induits par LPS



Discussion/Conclusion

L'analyse du méthylome d'échantillons de sang de patients CF met en évidence le rôle de la **voie de signalisation JAK/STAT** et plus particulièrement le gène **SOCS3**. *SOCS3* est surexprimé et moins méthylé chez les patients CF. Des analyses fonctionnelles sur des lignées cellulaires sont en cours afin de caractériser le mécanisme à travers lequel des changements de méthylation de l'ADN affectent la transcription de gènes cibles et modulent le phénotype CF. Nous analyserons 7 régions génomiques associées à une chromatine prédictive de la fonction promotrice ou *enhancer* et contenant 10 CpG corrélés à des traits cliniques de la mucoviscidose. Ces CpG sont associés à des gènes codant pour des protéines importantes pour la régulation des cytokines (*SOCS3*, *LYN*), l'apoptose (*FADD*, *ATP11A*, *LYN*), la réponse immunitaire (*ATP11A*, *CLECL1*, *LYN*), la libération de calcium (*ASPH*) et le diabète (*RGS1*).