



# 25ème Colloque Français des Jeunes Chercheurs en mucoviscidose

**6 FEVRIER 2024**

INSTITUT IMAGINE  
24 boulevard du Montparnasse 75015 PARIS

Avec le soutien de notre  
partenaire :





# Programme

## Colloque Français des Jeunes Chercheurs

### Mardi 6 février 2024

#### Institut Imagine, Paris

- 8:45 - 9:00 **Accueil et mot de bienvenue** : David FIANT, président de Vaincre la Mucoviscidose
- 9:00 - 9:30 **Conférence d'ouverture** par le Pr Isabelle FAJAC, CRCM Hôpital Cochin, APHP, Université Paris Cité; Présidente de la Société européenne de mucoviscidose (ECFS) : « *Que nous disent les Registres européen et français sur l'état de santé des patients atteints de mucoviscidose?* »
- 9:30 - 10:35 **Session 1 : « Le patient au cœur de toutes les recherches ! »**  
modérée par : Estelle RUFFIER et Alexandre HINZPETER
1. Johan SERGHERAERT « Impact des traitements modulateurs de CFTR sur le phénotype ostéoclastique dans la pathologie osseuse relative à la mucoviscidose. »
  2. Sarahdja CORNELIE « Approches thérapeutiques modulant l'activité calcique pour réduire l'inflammation et les lésions tissulaires dans la mucoviscidose »
  3. Lou TAILLANDIER « « Ma mucoviscidose ». Comment passer du général au particulier avec une enquête participative : ExPaParM-ACTION »
  4. Raphaëlle LADUNE « Développement et évaluation de l'acceptabilité d'une application de mesure de la balance décisionnelle en activité physique chez les personnes atteintes de mucoviscidose : l'application MUCO\_BALAD »\*
  5. Angèle BOURSIER « Comparaison de la qualité d'extraction de spermatozoïdes épididymaires et des chances de succès en fécondation in vitro avec injection intracytoplasmique de spermatozoïdes entre les hommes atteints de mucoviscidose et ceux présentant une azoospermie obstructive pour une autre étiologie »

\* : présentation orale au format ma thèse en 180 secondes + 2 min de questions/réponses

**Pause (15 min)**

- 10:50 - 11:35 **Session posters n°1 (nombres impairs)**
- 11:35 - 12:20 **Session 2 : « Une histoire de canaux »**  
modérée par : Virginie DOUINE et Loïc GUILLOT
6. Loréna VALDÉS « Des études d'association à l'échelle de l'épigénome (EWAS) à l'analyse fonctionnelle des régions différentiellement méthylées dans la mucoviscidose »
  7. Clara BLOTAS « Nouvelle approche dans la compréhension des cas complexes de mucoviscidose et de ses formes frontalières »\*
  8. Solène CASTANIER « Etude de l'interactome de CFTR »
  9. Khilian PASCAREL « Etude des effets de l'hypoxie sur le canal TRPA1 dans le contexte physiopathologique de la mucoviscidose »\*

## 12:20 - 13:30 : Pause déjeuner et photo

### 13:30 - 14:15 **Session 3 : « L'ennemi de toujours: *Pseudomonas...* »**

modérée par : Dominique POUGHEON et Romé VOULHOUX

10. Maëlys BORN-BONY « Cellules myéloïdes suppressives : rôle modulateur dans les infections pulmonaires à *Pseudomonas aeruginosa* »
11. Sylvain BRAX « Les mécanismes de défense dépendants de la septine 7 contre *Pseudomonas aeruginosa* sont altérés dans le contexte de la mucoviscidose »
12. Flore NILLY « 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. »

### 14:15 - 15:00 **Session 4 : « Les autres microorganismes présents également ! »**

modérée par : Jean-Luc MAINARDI et Geneviève HERY-ARNAUD

13. Sandra KHAU « Etude de la régulation de l'inflammasome durant la surinfection bactérienne et fongique dans la mucoviscidose »
14. Khadeeja Adam SY « Rôle des médiateurs lipidiques de la résolution de l'inflammation dans la colonisation des cellules épithéliales respiratoires par *Aspergillus fumigatus* »\*
15. Maria BITAR « Optimisation de la prise en charge des infections dues à *Mycobacterium abscessus* basée sur la synergie entre les  $\beta$ -lactamines et les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases de seconde génération. »
16. Clarisse CARVALHO « Rôle des thiorédoxine réductases TrxR1 et TrxR2 dans la pathogénèse des infections à *Scedosporium apiospermum* »\*

## Pause 15 min

### 15 :15 - 16:00 **Session posters 2 (nombres pairs)**

### 16:00 - 16:30 **Prix Michel Chignard 2024 :**



**Intervention lauréate, madame Jeanne Bigot** « Etude du dialogue entre cellules épithéliales bronchiques et les agents fongiques isolés chez les patients atteints de mucoviscidose »

**Remise du prix**

### 16:30 - 16:45 **Annnonce des lauréats des prix du Colloque 2024**

### 16:45- 17:00 **Mot de clôture**



**Nous remercions nos partenaires pour leur soutien à cette journée !**

# Contenu du book

Présentations orales.....	p.1
Posters.....	p.28
Retour en image sur le Colloque des jeunes chercheurs 2023.....	p.66

## Présentations orales :

N°	NOM Prénom	Thématique de recherche	TITRE	Page
1	<b>SERGHERAERT</b> Johan	Pathologies Associées	Impact des traitements modulateurs de CFTR sur le phénotype ostéoclastique dans la pathologie osseuse relative à la mucoviscidose.	1
2	<b>CORNELIE</b> Sarahdja	Inflammation	Approches thérapeutiques modulant l'activité calcique pour réduire l'inflammation et les lésions tissulaires dans la mucoviscidose	3
3	<b>TAILLANDIER</b> Lou	Démographie	« Ma mucoviscidose ». Comment passer du général au particulier avec une enquête participative : ExPaParM-ACTION	5
4	<b>LADUNE</b> Raphaëlle	STAPS	Développement et évaluation de l'acceptabilité d'une application de mesure de la balance décisionnelle en activité physique chez les personnes atteintes de mucoviscidose : l'application MUCO_BALAD	7
5	<b>BOURSIER</b> Angèle	Pathologies Associées	Comparaison de la qualité d'extraction de spermatozoïdes épидидymaires et des chances de succès en fécondation in vitro avec injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (FIV-ICSI) entre les hommes atteints de mucoviscidose (MV) et ceux présentant une azoospermie obstructive (AO) pour une autre étiologie	8
6	<b>VALDÉS</b> Loréna	Génétique	Des études d'association à l'échelle de l'épigénome (EWAS) à l'analyse fonctionnelle des régions différentiellement méthylées dans la mucoviscidose	9
7	<b>BLOTAS</b> Clara	Génétique	Nouvelle approche dans la compréhension des cas complexes de mucoviscidose et de ses formes frontières	10
8	<b>CASTANIER</b> Solène	Fonction CFTR	Etude de l'interactome de CFTR	12
9	<b>PASCAREL</b> Khilian	Fonction CFTR	Etude des effets de l'hypoxie sur le canal TRPA1 dans le contexte physiopathologique de la mucoviscidose	14
10	<b>BORN-BONY</b> Maëlys	Infection	Cellules myéloïdes suppressives : rôle modulateur dans les infections pulmonaires à <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
11	<b>BRAX</b> Sylvain	Infection	Les mécanismes de défense dépendants de la septine 7 contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sont altérés dans le contexte de la mucoviscidose	18
12	<b>NILLY</b> Flore	Infection	Modèle d'infection d'embryon de poisson zèbre pour étudier la persistance d'isolats cliniques de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et l'efficacité des traitements antibiotiques et/ou anti-biofilm.	19
13	<b>KHAU</b> Sandra	Infection	Etude de la régulation de l'inflammasome durant la surinfection bactérienne et fongique dans la mucoviscidose	21
14	<b>SY</b> Khadeeja Adam	Infection	Rôle des médiateurs lipidiques de la résolution de l'inflammation dans la colonisation des cellules épithéliales respiratoires par <i>Aspergillus fumigatus</i>	23
15	<b>BITAR</b> Maria	Infection	Optimisation de la prise en charge des infections dues à <i>Mycobacterium abscessus</i> basée sur la synergie entre les $\beta$ -lactamines et les inhibiteurs de $\beta$ -lactamases de seconde génération.	25
16	<b>CARVALHO</b> Clarisse	Infection	Rôle des thiorédoxine réductases TrxR1 et TrxR2 dans la pathogénèse des infections à <i>Scedosporium apiospermum</i>	26

SERGHERAERT Johan

## IMPACT DES TRAITEMENTS MODULATEURS DE CFTR SUR LE PHENOTYPE OSTEOCLASTIQUE DANS LA PATHOLOGIE OSSEUSE RELATIVE A LA MUCOVISCIDOSE.

Johan Sergheraert<sup>1,2,3</sup>, Christine Guillaume<sup>1</sup>, Claire Dumortier<sup>1</sup>, Julien Braux<sup>1,2,3</sup>, Muriel Griffon<sup>4</sup>, Bruno Ravoninjatovo<sup>4</sup>, Pierre-Régis Burgel<sup>4</sup>, Loïc Pierrard<sup>2,3,5</sup>, Sophie C Gangloff<sup>1,7</sup>, Marie-Laure Jourdain<sup>1,2,3</sup>, Frédéric Velard<sup>1</sup>

1. Université de Reims Champagne-Ardenne, Biomatériaux et Inflammation en Site Osseux, BIOS EA 4691, 51097 Reims, France

2. UFR d'Odontologie, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51097 Reims, France

3. Pôle de Médecine Bucco-Dentaire, Centre Hospitalo-Universitaire de Reims, Reims, France

4. CHU de Reims, Service de pneumologie, CRCM, Reims, France

5. AP-HP, Hôpital Cochin, Service de Pneumologie, CRCM, Paris, France

6. Vieillesse, Fragilité, Université de Reims Champagne-Ardenne, VieFra EA 379751092 Reims, France

7. UFR de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51100 Reims, France

### Objectifs

Les patients atteints de mucoviscidose (CF) bénéficient de nouvelles thérapies modulatrices de CFTR qui permettent l'allongement de leur durée de vie. Cette augmentation de l'espérance de vie est associée à l'apparition de nombreuses comorbidités comme la pathologie osseuse relative à la mucoviscidose (CFBD) complexifiant la prise en charge de ces patients. La CFBD se caractérise par une diminution de la densité minérale osseuse et un risque de fracture accru, dès le plus jeune âge. Une altération du phénotype et de la fonction des ostéoclastes CF a été mise en évidence (Jourdain et al., 2020). Notre étude s'est intéressée à l'effet de la restauration de la fonction de CFTR par des modulateurs sur le phénotype des ostéoclastes (OC) issus de patients porteurs d'une mutation de classe II.

### Matériels et méthodes

Des monocytes circulants précurseurs d'ostéoclastes ont été isolés à partir de sang total de 33 patients atteints de mutations de CFTR de classe II (NCT04877223) et de 23 sujets contrôles (Convention ALC/PIL/DIR/AJR/FO/606), puis marqués pour les récepteurs membranaires RANK et MCSFR et analysés par cytométrie en flux. Après 14 jours de culture, des OC ont été transférés sur des lamelles de dentine afin d'évaluer leurs capacités de résorption. Après 21 jours de culture, un marquage en fluorescence (Vinculine-AlexaFluor®568, Phalloïdine-AlexaFluor®488, DAPI) a permis de déterminer le nombre d'OC, leur taille, leur morphologie et d'évaluer la formation de podosomes. Les monocytes ont été traités par exposition prolongée à l'Elxacaftor, au Tezacaftor et à l'Ivacaftor (ETI 3µM/3µM/1µM). Pour chaque variable quantitative, pour la comparaison des moyennes, un test de Student a été réalisé en tenant compte de l'appariement selon le genre et l'âge. Lorsque les conditions d'application n'étaient pas obtenues, un test de Fisher a été utilisé. Une valeur de  $p < 0,05$  était considérée comme significative.

### Résultats

Nous avons mis en évidence une proportion accrue de cellules RANK+MCSFR+ (2,3 fois plus,  $p < 0,05$ ) dans le sang des patients CF par rapport aux témoins. Les OC CF étaient moins nombreux mais présentaient une surface plus importante (+150%,  $p < 0,05$ ). Le traitement ETI n'a pas restauré le nombre d'OC mais a significativement réduit (-70%,  $p < 0,05$ ) leur taille par rapport aux non-CF. L'activité de résorption, fortement réduite dans les cultures CF (40 fois moins,  $p < 0,05$ ), était augmentée dans les cultures traitées par rapport aux cultures non traitées (12 fois,  $p < 0,05$ ) sans atteindre les niveaux non-CF. La coloration à la vinculine était plus fine et moins co-localisée avec l'anneau d'actine dans les OC portant des mutations de classe II de CFTR que dans les contrôles. Le traitement ETI a permis une restauration partielle de l'organisation du cytosquelette.

### 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 du phénotype des ostéoclastes a été observée. L'exposition

prolongée aux modulateurs de CFTR a permis une restauration partielle du phénotype des ostéoclastes issus de patients porteurs d'une mutation de classe II de CFTR.

### **Références**

*Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose*

CORNELIE Sarahdja

## APPROCHES THERAPEUTIQUES MODULANT L'ACTIVITE CALCIQUE POUR REDUIRE L'INFLAMMATION ET LES LESIONS TISSULAIRES DANS LA MUCOVISCIDOSE

Sarahdja Cornélie (1), Sylvaine Brandt (1), Andres Floto (2), Stephen Renshaw (3), Georges Lutfalla (1), Audrey Bernut (1)

1. Laboratory of Pathogens and Host Immunity, UMR 5294, CNRS, University of Montpellier, Montpellier, France.

2. Molecular Immunity Unit, University of Cambridge Department of Medicine, MRC-Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK.

3. The Bateson Centre, Department of Infection, Immunity and Cardiovascular Disease, University of Sheffield Medical School, Sheffield, UK.

### Objectifs

La mucoviscidose (CF) est une maladie génétique résultant de mutations dans le gène codant pour le canal CFTR. Au niveau des voies respiratoires, l'absence d'un CFTR fonctionnel conduit à des infections chroniques et une inflammation exacerbée directement responsable de lésions pulmonaires progressives aboutissant au décès prématuré des patients. Aujourd'hui, la mise en place de thérapies anti-inflammatoires efficaces et accessibles à tous les patients a été entravée par un manque de compréhension des mécanismes précis impliqués dans l'immuno-pathogénèse inflammatoire associée à la maladie. Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer le phénotype inflammatoire observé dans les voies respiratoires des patients CF, notamment le rôle délétère du calcium épithélial, mais cela reste encore mal compris. Notre objectif ici est i) de comprendre comment un défaut de CFTR affecte les réponses calciques épithéliales et comment l'altération de ce signal serait impliquée dans l'inflammation CF et, ii) d'évaluer le potentiel d'antagonistes du calcium pour réduire l'inflammation et donc prévenir les dommages inflammatoires dans les poumons des patients CF.

### Matériels et méthodes

Pour réaliser ce travail, nous avons développé et exploité différents modèles de zebrafish dépourvus de Cftr, comme systèmes vertébrés innovants d'immuno-pathologie CF. L'expression de cftr dans les larves de zebrafish a été invalidée via l'utilisation de la technologie morpholino et l'inflammation induite par une blessure aseptique (amputation de la nageoire caudale).

### Résultats

Afin de visualiser in vivo l'impact d'un défaut de CFTR sur le signal calcique épithélial au cours de l'inflammation, nous avons utilisé deux approches : l'utilisation de sondes calciques et le développement d'une lignée transgénique de zebrafish exprimant l'indicateur GCaMP6 dans les cellules épithéliales à l'aide du promoteur épithélial K19 nous permettant ainsi de visualiser les flux calciques spécifiquement dans les cellules épithéliales. L'exploitation de ces outils nous a permis de révéler qu'une amputation de la nageoire chez le zebrafish CF entraîne une élévation anormale du calcium épithélial. Point important, nos résultats montrent qu'une diminution de la concentration intracellulaire de calcium, via l'inhibition pharmacologique des canaux Ca<sup>2+</sup> voltage-dépendants (CCVD), permet un rééquilibrage de l'inflammation en réduisant à la fois le stress oxydatif et la mobilisation excessive de neutrophiles à la blessure en condition CF.

En particulier, nous avons montré que certains antagonistes du calcium, tel que le vérapamil, un médicament couramment utilisé pour traiter différentes pathologies cardiaques et connu pour inhiber les CCVD, étaient également capables de rééquilibrer l'inflammation excessive et persistante chez les zebrafish CF. En réduisant l'inflammation ces traitements améliorent également la réparation tissulaire. Point important, les premiers résultats obtenus révèlent que l'activité anti-inflammatoire de ces molécules ne semblent pas affecter les défenses immunitaires dans un contexte d'infections associée à la mucoviscidose.

### Discussion et conclusions

Nos résultats démontrent le rôle du calcium dans la pathologie inflammatoire associée à la mucoviscidose et tout son intérêt en tant que nouvelle cible thérapeutique. Ceci pourrait guider vers des thérapeutiques anti-inflammatoires innovantes visant à rééquilibrer la réponse calcique chez tous les patients CF, avec comme



corollaire la réduction de leurs lésions pulmonaires et donc l'amélioration conséquente de leur qualité et espérance de vie.

### **Références**

***Ce projet est financé par : Centre Français des 3R***

TAILLANDIER Lou

## « MA MUCOVISCIDOSE ». COMMENT PASSER DU GENERAL AU PARTICULIER AVEC UNE ENQUETE PARTICIPATIVE : EXPAPARM-ACTION

Lou Taillandier, Gil Bellis

Dominique Pougheon Bertrand

1. Institut national d'études démographiques (Ined)
2. LEPS UR3412 Université Sorbonne Paris Nord

### Objectifs

A partir d'une banque d'items, l'objectif est de mettre en place un outil permettant à différents terrains d'étude d'être les principaux décisionnaires du contenu d'un questionnaire quantitatif, à partir de problématiques d'étude qui leur sont propres.

### Matériels et méthodes

L'équipe de recherche réunit quatre partenaires : le LEPS, l'Association Vaincre la Mucoviscidose (VLM), Tous Chercheurs et l'Ined. Quatre terrains d'étude sont impliqués dans la phase de test du projet : le Pôle Santé de VLM et trois CRCM, Lyon (Adultes), Nantes (Adultes Transplantés) et Versailles (Pédiatrie). La banque d'items (contenant plus de 400 questions extraites des trois questionnaires réalisés lors du premier volet de l'enquête) a été mise à la disposition des terrains d'étude. Ces derniers ont d'abord été chargés de définir une problématique propre à leur spécialité, puis de sélectionner les modules de questions permettant de construire un questionnaire synthétique. Ce questionnaire « personnalisé » a pour objectif de cibler et d'explorer leurs problématiques, en gardant une longueur limitant les abandons lors de sa passation. Les questionnaires ont ensuite été transférés sur Lime Survey puis mis à disposition des terrains d'étude pour être testés auprès des patients et/ou professionnels de santé de ces terrains.

### Résultats

Du fait de la spécificité de chacun des terrains d'étude, quatre problématiques différentes ont alors été pensées et réfléchies en coordination avec l'équipe de recherche, qui a apporté sa connaissance à la structure des questionnaires, ce qui a permis de guider au mieux les terrains d'étude. Les problématiques portent chacune sur un thème spécifique : les besoins d'accompagnement selon différentes périodes de transitions dans la maladie, le vécu de l'annonce et du diagnostic, le parcours de suivi post transplantation, l'évolution de la relation avec le CRCM des patients sous Kaftrio.

Plusieurs échanges ont eu lieu entre les terrains d'étude et l'équipe de recherche pour réaliser les ajustements et modifications au questionnaire de la manière la plus fidèle aux attentes des terrains d'étude. De manière générale, chaque terrain a proposé une reformulation de certaines parties du questionnaire, pour que l'entièreté des questions permette d'éclairer sa problématique.

### Discussion et conclusions

La phase de test a permis de constater une participation très réactive de la part de tous les terrains. Les différents tests et échanges ont permis de cibler les outils privilégiés par les CRCM et de visualiser le temps, a priori nécessaire, d'échange entre le terrain et l'équipe de recherche pour arriver au résultat attendu par chacun des terrains concernant la version finale de son questionnaire.

Une analyse de la méthode de personnalisation de ce type de questionnaires s'avère indispensable pour mesurer la transférabilité de l'outil proposé à d'autres terrains d'étude ou à d'autres étiologies.

### Références

Gross O., Gagnayre R., 2017. « Caractéristiques des savoirs des patients et liens avec leur pouvoirs d'action : implication pour la formation médicale », Revue Française de Pédagogie, 201, p. 71-82.

Pougheon Bertrand D., Fanchini A., Lombrail P., Rault G., Chansard A., Le Breton N., Frenod C., Milon F., Heymes-Royer C., Segretain D., Silber M., Therouanne S., Haesebaert J., Llerena C., Michel P., Reynaud Q., 2022. « Collaborative research protocol to define patient-reported experience measures of the cystic fibrosis care pathway in France: the ExPaParM study», Orphanet Journal of Rare Diseases, <https://doi.org/10.1186/s13023-023-02640-6>

***Ce projet est financé par : ANR, programme SAPS-RA-RP1***

LADUNE Raphaëlle

## DEVELOPPEMENT ET EVALUATION DE L'ACCEPTABILITE D'UNE APPLICATION DE MESURE DE LA BALANCE DECISIONNELLE EN ACTIVITE PHYSIQUE CHEZ LES PERSONNES ATTEINTES DE MUCOVISCIDOSE : L'APPLICATION MUCO\_BALAD

Raphaëlle Ladune, Meggy Hayotte, Anne Vuillemin, Fabienne d'Arripe-Longueville  
Université Côte d'Azur, laboratoire LAMHESS, Nice

### Objectifs

Cette étude a pour but de présenter le processus de développement et d'évaluer l'acceptabilité d'une application conçue pour mesurer la balance décisionnelle en activité physique chez les personnes atteintes de mucoviscidose.

### Matériels et méthodes

L'étude comprenait deux étapes : (a) la co-conception d'une application numérique permettant la passation numérique du questionnaire MUCO\_BDEX (Filleul et al., 2021) et (b) l'évaluation de son acceptabilité par les personnes atteintes de mucoviscidose, les professionnels de la santé, et les chercheurs. Une approche participative a permis d'impliquer les parties prenantes dans la création de l'application. L'acceptabilité de l'application, basée sur les facteurs décrits dans la théorie unifiée de l'acceptation et de l'utilisation de la technologie (UTAUT2, Hayotte et al., 2021), est essentielle pour une adoption réussie. Les participants se sont portés volontaires, ont donné leur consentement éclairé, étaient âgés de plus de 18 ans et parlaient couramment le français. La collecte des données s'est faite au moyen de présentations vidéo et d'entretiens qualitatifs, avec des analyses de données quantitatives et qualitatives.

### Résultats

Au total, 6 personnes atteintes de mucoviscidose, 11 professionnels de santé, et 5 chercheurs ont participé à la phase de co-conception. Les résultats ont révélé une promotion précoce de l'activité physique par les professionnels de santé, des recommandations personnalisées en activité physique, et les perceptions relatives au questionnaire MUCO\_BDEX. Il a été défini que l'application devait être sécuritaire, facile à utiliser, et permettre le suivi des résultats. Lors de la phase d'évaluation de l'acceptabilité, l'échantillon comprenait 44 personnes atteintes de mucoviscidose, 47 professionnels de santé, et 12 chercheurs. L'analyse a révélé que les mesures d'acceptabilité étaient positives et que l'acceptabilité de l'application ne différait pas selon le profil des utilisateurs. Des entretiens semi-structurés ont permis d'identifier les perceptions positives et négatives de l'application et de l'interface, ainsi que les fonctionnalités manquantes.

### Discussion et conclusions

Cette étude a évalué l'acceptabilité de l'application MUCO\_BALAD et a démontré des résultats qualitatifs et quantitatifs prometteurs. L'outil numérique permettant de mesurer la balance décisionnelle en activité physique chez les personnes atteintes de mucoviscidose est encourageant, et les perspectives de l'étude ont permis d'obtenir des informations précieuses.

### Références

Filleul, V., Ladune, R., Gruet, M., Falzon, C., Fuchs, A., Mély, L., Hayotte, M., Vallier, J., Giovannetti, P., Ramel, S., Vuillemin, A., Corrion, K., & d'Arripe-Longueville, F. (2021). Development and validation of the Cystic Fibrosis Decisional Balance for Physical Activity Scale (CF-DB-PA). *BMC Pulmonary Medicine*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12890-021-01471-0>

Hayotte, M., Thérouanne, P., Gray, L., Corrion, K., & d'Arripe-Longueville, F. (2020). The French eHealth Acceptability Scale Using the Unified Theory of Acceptance and Use of Technology 2 Model: Instrument Validation Study. *Journal of medical Internet research*, 22(4), e16520. <https://doi.org/10.2196/16520>

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

## BOURSIER Angèle

### COMPARAISON DE LA QUALITE D'EXTRACTION DE SPERMATOZOÏDES EPIDIDYMAIRES ET DES CHANCES DE SUCCES EN FECONDATION IN VITRO AVEC INJECTION INTRACYTOPLASMIQUE DE SPERMATOZOÏDES (FIV-ICSI) ENTRE LES HOMMES ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE (MV) ET CEUX PRESENTANT UNE AZOOSPERMIE OBSTRUCTIVE (AO) POUR UNE AUTRE ETIOLOGIE

A. Boursier<sup>1,2</sup>, L. Van Der Henst<sup>3</sup>, A. Boudry<sup>4</sup>, A.B. Camara<sup>5</sup>, J. Prasivoravong<sup>6</sup>, F. Vialard<sup>5</sup>, A. Pagin<sup>7</sup>, A-L. Barbotin<sup>1,2</sup>

1. Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Centre de Biologie Pathologie, Lille
2. INSERM UMR-S1172 – DPNB - Lille
3. Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Centre Hospitalier de Calais
4. ULR2694-METRICS, Université de Lille, Lille
5. Eq RHuMA, UMR-BREED U1198, Montigny Le Bretonneux
6. Service d'Andrologie, Hôpital Huriez, Lille
7. Service de Toxicologie et Génopathies, Centre de Biologie Pathologie, Lille

#### Objectifs

Nous souhaitons déterminer les chances d'extraction de spermatozoïdes épididymaires chez les patients atteints de MV en comparaison de patients avec une AO pour une autre étiologie. Dans un second temps, nous avons comparé les chances de succès en FIV-ICSI dans ces deux populations.

#### Matériels et méthodes

Étude rétrospective sur la période de 2004 à 2021 concernant l'ensemble des patients ayant bénéficié d'une extraction épididymaire de spermatozoïdes dans le contexte d'une AO au CHU de Lille

#### Résultats

La MV était prédictive d'une moins bonne qualité d'extraction épididymaire (OR=0,42 [0,21-0,82] ; p<0,05) et était associée à un plus grand risque d'échec d'extraction épididymaire par rapport aux patients ayant une absence bilatérale des canaux déférents sans MV associée (23,7% versus 8,2%, p<0,01). Parmi les patients atteints de MV, ceux avec un génotype associé à la présence d'une activité résiduelle CFTR avaient deux fois plus de chance d'avoir une extraction de bonne qualité que ceux sans activité CFTR résiduelle (81,8 vs 38,5 %, p < 0,001). Les chances de succès en ICSI étaient identiques en termes de taux de grossesses ou de naissances vivantes entre les couples dont l'homme était atteint de MV et ceux dont l'AO était en rapport avec une autre étiologie.

#### Discussion et conclusions

Malgré une qualité d'extraction épididymaire moindre avec notamment un risque trois fois supérieur d'échec d'extraction, il ne semble pas exister de diminution des chances de succès en ICSI pour les couples dont l'homme est atteint de MV. En revanche, l'altération de la spermatogenèse chez l'homme atteint de MV semble être en lien avec l'existence ou non d'une activité résiduelle de la protéine CFTR ce qui suggère une implication de cette dernière lors de la spermatogenèse.

#### Références

*Ce projet est financé par :*

## VALDÉS Loréna

### DES ETUDES D'ASSOCIATION A L'ECHELLE DE L'EPIGENOME (EWAS) A L'ANALYSE FONCTIONNELLE DES REGIONS DIFFERENTIELLEMENT METHYLEES DANS LA MUCOVISCIDOSE

Loréna Valdés<sup>1</sup>, Jorg Tost<sup>2</sup>, Isabelle Rivals<sup>3</sup>, Milena Magalhães<sup>4</sup>, Florence Busato<sup>2</sup>, Laurent Mely<sup>5</sup>, Sylvie Leroy<sup>6</sup>, Marlène Murriss<sup>7</sup>, Mireille Claustres<sup>4</sup>, Davide Caimmi<sup>8</sup>, Isabelle Vachier<sup>8</sup>, Raphaël Chiron<sup>8</sup> et Albertina De Sario<sup>1</sup>  
(1) PhyMedExp, CNRS, INSERM, Université Montpellier, Montpellier (2) CNRGH, CEA Evry (3) ESPCI Paris, Université PSL, UMR51158, Paris (4) LGMR, Montpellier (5) CRCM Hyères (6) CRCM Nice (7) CRCM Toulouse (8) CRCM Montpellier

#### Objectifs

L'objectif principal du projet est d'identifier des gènes et voies de signalisation impliqués dans la variabilité clinique de la mucoviscidose. En effet, des études sur des jumeaux ont montré que la sévérité de l'atteinte pulmonaire chez les patients CF dépend autant de facteurs génétiques qu'environnementaux. Afin d'étudier le rôle des facteurs non héréditaires dans la mucoviscidose, nous menons des études d'association à l'échelle de l'épigénome (EWAS) dans une cohorte de patients CF et témoins et des analyses fonctionnelles in vitro sur des gènes sélectionnés différenciellement méthylés.

#### Matériels et méthodes

La cohorte MethylCF (51 patients CF F508del/F508del, 24 témoins) a été réunie par quatre CRCM (Montpellier, Hyères, Nice et Toulouse). La méthylation de l'ADN a été analysée tout-génome avec la puce MethylEpic et par pyroséquençage sur des sites CpG sélectionnés (PyroMark Q24), sur des échantillons de sang. Le niveau de transcription a été mesuré par RNAseq (Pineau et al., 2020). Des études fonctionnelles sont réalisées dans des cellules bronchiques primaires humaines (Epithelix) et des lignées (BEAS-2B, THP-1). Le test Luciférase (gène rapporteur) est utilisé pour tester des régions cis-régulatrices (promoteurs, enhanceurs) in vitro. Des cellules traitées au LPS sont utilisées pour analyser les séquences cis-régulatrices endogènes.

#### Résultats

Nous avons montré que la méthylation de l'ADN était fortement altérée dans des échantillons de sang de patients CF avec des gains/pertes de méthylation corrélés à plusieurs traits (mucoviscidose, VEMS, IMC, diabète). La voie de signalisation JAK/STAT était particulièrement affectée. Cinq sites CpG différenciellement méthylés ont été validés par pyroséquençage. Les changements de méthylation étaient surreprésentés dans des enhanceurs et promoteurs prédits. Des études fonctionnelles sont en cours afin de déterminer si les gains/pertes de méthylation affectent la transcription des gènes associés à ces sites CpG. Nous avons optimisé les protocoles pour le test Luciférase et l'analyse de séquences endogènes dans des cellules humaines traitées au LPS. Des résultats préliminaires sont disponibles sur des régions différenciellement méthylées associés à des gènes impliqués dans la régulation des cytokines (SOCS3, LYN), l'apoptose (FADD, LYN), la réponse immunitaire (ATP11A, CLECL1, LYN), le calcium (ASPH), le diabète (RGS1).

#### Discussion et conclusions

Les études épigénomiques révèlent de nouveaux gènes associés à des traits cliniques chez les patients atteints de la mucoviscidose. Des analyses fonctionnelles sur des régions différenciellement méthylées prédites comme cis-régulatrices sont nécessaires afin de comprendre les mécanismes moléculaires responsables de ces associations.

#### 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. 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).

**Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose, Fondation Maladies Rares**

**BLOTAS Clara**

## **NOUVELLE APPROCHE DANS LA COMPREHENSION DES CAS COMPLEXES DE MUCOVISCIDOSE ET DE SES FORMES FRONTIERES**

Clara Blotas 1, Mégane Collobert 1, Anaïs Le Nabec 1, Emmanuelle Masson 1,2, Claude Férec 1 et Stéphanie Moisan 1,2  
1Univ Brest, Inserm, EFS, UMR 1078, GGB, F-29200 Brest, France  
2Laboratoire de génétique moléculaire et d'histocompatibilité, CHRU Brest, Bretagne, France

### **Objectifs**

L'identification du gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) en 1989 a déclenché de nombreuses avancées dans le diagnostic de patients atteints de mucoviscidose mais également d'autres pathologies associées au gène CFTR nommées formes frontières, comme l'agénésie bilatérale des canaux déférents (ABCD) ou la pancréatite. En effet, plus de 2100 variations ont été retrouvées dans le gène CFTR.

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

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

### **Matériels et méthodes**

La technique de 4C (Circular Chromosome Conformation Capture) est utilisée pour obtenir des profils d'interaction et définir des CREs candidats 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 haut débit du locus CFTR chez des patients atteints de formes frontières.

### **Résultats**

Grâce aux techniques innovantes d'étude de la chromatine nous avons pu définir les interactions engagées par le promoteur du gène CFTR avec des régions régulatrices. Un modèle de cis-régulation a été établi pour nos trois modèles cellulaires qui partagent des similitudes tout en présentant des régulations spécifiques au tissu. De manière majoritaire nous avons identifié des effets enhancer de ces régions. Une région située à +507,6 kb du dernier codon porte un effet silencer. Il s'agit de la première interaction hors du domaine topologiquement associant décrites pour le locus CFTR.

Le séquençage ciblé des patients atteints d'ABCD et de pancréatite a permis d'identifier plusieurs variants cis-régulateurs potentiels. En effet une dizaine de SNP (single nucleotide polymorphism) ont une fréquence significativement différente de ce que l'on peut observer dans la population générale française. 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.

## Références

*Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose*



## CASTANIER Solène

### ETUDE DE L'INTERACTOME DE CFTR

CASTANIER Solène, B. Chevalier<sup>1</sup>, C. Guerrero<sup>2</sup>, V. Jung<sup>2</sup>, A. Edelman<sup>1</sup>, I. Sermet<sup>1</sup>, A. Hinzpeter<sup>1</sup>

1. Equipe Sermet, Mucoviscidose et autres maladies épithéliales respiratoires par défaut de repliement protéique 2.  
Plateforme Protéomique PPN Necker

#### Objectifs

L'abondance du canal chlorure CFTR à la surface des cellules est régulée par plusieurs signaux et différentes protéines partenaires. Ces partenaires impliqués dans la biogénèse de CFTR ne sont pas encore entièrement connus. Les partenaires protéiques de CFTR ont été identifiés par la spectrométrie de masse selon une méthodologie de marquage de proximité. L'analyse différentielle des données obtenues avec CFTR WT 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.

#### Matériels et méthodes

L'abondance des partenaires de CFTR a été modulée (siRNA, knockout et plasmides) et l'effet sur différents paramètres de CFTR évalué, 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 complémentarité de la nanoluciférase).

#### Résultats

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à des protéines impliquées dans le contrôle qualité du réticulum endoplasmique de CFTR et plus particulièrement aux protéines impliquées dans l'ubiquitination des protéines, un processus qui favorise la dégradation des mutants CFTR. Parmi ces protéines, nos résultats identifient PJA2 comme un acteur majeur dans l'ubiquitination de CFTR et les sites d'ubiquitination impliqués sont en cours de recherche. Le complexe EMC (ER membrane complex) qui participe à l'insertion dans la membrane de segments transmembranaires de certaines protéines transmembranaires lors de leur synthèse a également été étudié. Pour se faire nous avons obtenues un modèle cellulaire HeLa KO pour la sous-unité 6 de ce complexe (EMC6). Les résultats obtenus en WB et en fonction montrent que l'absence de EMC6 prévient la maturation et l'activité de CFTR. Cet effet n'est pas prévenu par les correcteurs de CFTR. La correction de CFTR-F508del et CFTR-L206W est également abolie dans ces cellules. La réexpression de EMC6 dans ces cellules rétablit la maturation de CFTR. L'EMC aurait donc un impact majeur dans l'insertion de CFTR dans la membrane. Pour confirmer un défaut d'insertion, nous mettons au point un système permettant de connaître l'orientation des segments transmembranaires. Pour cela, un site de clivage pour la protéase TEV a été inséré dans des boucles extracellulaires de CFTR. Si le segment n'est pas correctement inséré dans la membrane, le site sera orienté vers le cytoplasme et la protéase TEV sera capable de cliver CFTR. Ces constructions sont en cours d'évaluation et permettraient de montrer un nouveau type de défaut de repliement de CFTR possiblement à l'origine de la faible réponse de certains mutants aux correcteurs. L'efficacité du Trikafta à restaurer l'interactome de CFTR-F508del a également été évaluée. Alors que de nombreux partenaires sont restaurés, nous avons identifié la non-restauration de certains partenaires interagissant à la surface des cellules, dont plusieurs transporteurs de la famille SLC. L'effet de ces transporteurs sur la stabilité de surface de CFTR a été évalué et les résultats obtenus avec le test fonctionnel et de complémentarité indiquent que la modulation du niveau d'expression de certains SLC affecte l'activité et l'abondance de CFTR à la surface des cellules

#### Discussion et conclusions

Nos premiers résultats montrent l'implication de PJA2 et du complexe EMC dans la biogénèse de CFTR et ce à une étape précoce ainsi que l'implication d'une famille de transporteur affectant l'activité et l'abondance de CFTR 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.

## Références

*Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose*

PASCAREL Khilian

## ETUDE DES EFFETS DE L'HYPOXIE SUR LE CANAL TRPA1 DANS LE CONTEXTE PHYSIOPATHOLOGIQUE DE LA MUCOVISCIDOSE

Khilian PASCAREL, Jenny COLAS, Isabelle FIXE, Christine BARRAULT, Sandra MIRVAL, Frederic BECQ & Clarisse VANDEBROUCK

1. Laboratoire PRÉTI, Université de Poitiers, France

### Objectifs

Le défaut du transport d'ions chlorures porté par la protéine F508del-CFTR entraîne une accumulation progressive d'un mucus visqueux au niveau des voies aériennes. Les cellules sous-jacentes voient ainsi la pression partielle en oxygène (O<sub>2</sub>) diminuer jusqu'à atteindre le stade d'hypoxie cellulaire.

Parmi les canaux ioniques dont l'activité est régulée par le taux d'oxygène cellulaire, le canal TRPA1 présente plusieurs caractéristiques intéressantes: i) il fait partie de la famille des canaux cationiques TRPs dont plusieurs membres ont été démontré comme ayant des interactions avec le canal CFTR (1); ii) il est intrinsèquement sensible au taux d'oxygène que ce soit en hyperoxie ou en hypoxie (2); iii) il a déjà été démontré comme impliqué dans des mécanismes inflammatoires dans la mucoviscidose (3). C'est pourquoi notre étude vise à mieux connaître l'effet d'une déprivation en oxygène sur l'activité et la localisation de ce canal dans le contexte de la mucoviscidose et de sa thérapie par le Kaftrio®.

### Matériels et méthodes

Des cellules épithéliales bronchiques CFBE /WT et CFBE /F508del sont cultivées dans une atmosphère hypoxique (1% O<sub>2</sub>) contrôlée pour une durée de 0 à 24h. Les cellules CFBE-F508del seront corrigées avec ETI (Elexacaftor ; Tezacaftor ; Ivacaftor), aussi appelé Kaftrio®, pendant 24h. L'expression et la quantification du canal d'intérêt sont obtenues via la technique du western-blotting. L'activité du canal TRPA1 est étudiée par microscopie de fluorescence et l'utilisation de la sonde Fluo-4AM, suite à une activation par AllylIsoThioCyanate (AITC; 100µM /30µM). Enfin, la localisation du canal en condition normoxique et hypoxique est réalisée par immunomarquage.

### Résultats

Après une période d'incubation de 24h à 1% d'O<sub>2</sub>, la quantité globale de protéine TRPA1 n'est pas modifiée dans les CFBE /WT, /F508del et /F508del corrigées par ETI. Cependant, des modulations de son activité calcique suite à la stimulation par un agoniste. La fonction de TRPA1 après ajout d'AITC est systématiquement diminuée quelque soit le type cellulaire ou la correction, en condition hypoxique par rapport aux cellules cultivées en normoxie. Étonnamment, le traitement ETI (ciblant CFTR) semble induire une réduction de l'activité liée à TRPA1, même en normoxie. Enfin, les résultats préliminaires sur les CFBE /WT et CFBE /F508del corrigées par ETI, semblent indiquer une relocalisation du canal TRPA1 au niveau membranaire après 24h en hypoxie.

### Discussion et conclusions

L'hypoxie n'a pas d'impact sur la quantité globale de protéine TRPA1. En revanche, son activité est modulée à la baisse, dans tous les types cellulaires, par la raréfaction des apports en oxygène au niveau cellulaire. Pour finir, la localisation du canal pourrait être impactée par l'hypoxie, induisant sa relocalisation au niveau membranaire. Dans la continuité de nos travaux, il nous paraît intéressant de vérifier si les variations d'activité et de localisation attribuées à TRPA1 peuvent survenir à des temps inférieurs à 24 d'hypoxie. Enfin, l'étude de l'effet des composés du Kaftrio®, de façon individuelle ou combinée, doit être réalisée pour mieux définir le ou les agents dont la présence module l'activité de TRPA1.

### Références

1. Grebert C, et al. Cell Calcium. juill 2019;81:29-37.
2. Takahashi, et al. Nat Chem Biol. 28 août 2011;7(10):701-11.

3. Prandini P, et al. Am J Respir Cell Mol Biol. nov 2016;55(5):645-56.

***Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose***

## BORN-BONY Maëlys

### CELLULES MYELOÏDES SUPPRESSIVES : ROLE MODULATEUR DANS LES INFECTIONS PULMONAIRES A PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Maëlys BORN-BONY 1, Bérengère VILLERET 1, Romé Voulhoux 2, Laurye Van Maele 3, Jean-Claude Sirard 3, Ignacio GARCIA-VERDUGO 1, Jean-Michel SALLENAVE 1

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 - CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, F-59000 Lille, France.

#### Objectifs

*Pseudomonas aeruginosa* (P.a.) est une bactérie pathogène opportuniste, classée comme prioritaire par l'OMS pour la recherche de nouveaux traitements. Cette bactérie est principalement responsable d'infections pulmonaires où elle provoque une inflammation sévère et des lésions tissulaires pouvant conduire à une insuffisance respiratoire. Des études antérieures indiquent un effet bénéfique des macrophages régulateurs dans l'infection des souris P.a. tandis que d'autres suggèrent une implication des cellules myéloïdes suppressives (MDSC) dans l'amélioration de l'état pulmonaire des patients infectés par P.a.

Nous avons donc souhaité étudier le rôle des MDSC au cours de l'infection par P.a., ainsi que leur potentiel thérapeutique.

#### Matériels et méthodes

Les MDSC ont été obtenues par différenciation de la moelle osseuse de souris C57Bl6 en présence d'IL-6 et de GM-CSF pendant 5 jours. La capacité d'inhibition a été évaluée dans des essais de prolifération de lymphocytes, 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 des essais de prolifération de lymphocytes.

#### Résultats

Alors qu'à l'état basal, les MDSC inhibent la prolifération des lymphocytes d'une manière contact-dépendante, nous avons pu démontrer un gain d'activité inhibitrice dans le surnageant des MDSC après infection induisant jusqu'à 100 % d'inhibition de la prolifération. Ce phénomène a été observé avec des souches de laboratoire et des souches cliniques de P.a.

L'infection de MDSCs WT ou génétiquement modifiées, par des souches PAO1 WT ou mutantes (vivantes ou inactivées par la chaleur), ainsi que par *Streptococcus pneumoniae*, nous ont permis de déterminer que ce gain d'activité est spécifique à l'infection par P.a et que P.a doit être vivant et métaboliquement capable de se déplacer pour transmettre un signal immunosuppresseur aux MDSCs, indépendamment de la voie TLR-MyD88.

Parallèlement à son effet inhibiteur sur la prolifération des cellules T, nous avons démontré que le surnageant des MDSC infectées induit une différenciation des lymphocytes naïf et lymphocytes T régulateurs. De plus, l'exposition de cellules épithéliales pulmonaires au surnageant après une blessure in vitro a permis de diviser par deux le temps de réparation.

Enfin, nous avons montré que le lavage broncho-alvéolaire de souris ayant reçu des MDSC infectées par P.a par transfert adoptif était inhibiteur contre les lymphocytes ex vivo, ce qui suggère une pertinence in vivo de la modulation observée des MDSC.

#### Discussion et conclusions

En conclusion, nous montrons que l'activité accrue des MDSC après une infection par P.a. module non seulement les réponses des lymphocytes T, mais améliore également la prolifération des cellules épithéliales pulmonaires, ce qui suggère un effet bénéfique sur la réparation des tissus. Ensemble, nous mettons en

évidence un rôle bénéfique potentiel dans la réponse à P.a. Nos futures études porteront sur les effecteurs impliqués et évalueront l'effet thérapeutique potentiel du ciblage des MDSC in vivo.

### **Références**

***Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose, Blanche pour Vaincre la Mucoviscidose***

**BRAX Sylvain**

## **LES MECANISMES DE DEFENSE DEPENDANTS DE LA SEPTINE 7 CONTRE PSEUDOMONAS AERUGINOSA SONT ALTERES DANS LE CONTEXTE DE LA MUCOVISCIDOSE**

S. Brax<sup>1</sup>, C. Gaudin<sup>1</sup>, C. Calmel<sup>1</sup>, H. Corvol<sup>1</sup>, M. Ruffin<sup>1</sup>, L. Guillot<sup>1</sup>

<sup>1</sup>.Sorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche Saint Antoine (CRSA), Mucoviscidose : Physiopathologie et Phénogénomique, Paris.

### **Objectifs**

La mucoviscidose ou CF (« cystic fibrosis ») est causée par des variants du gène CFTR. La conséquence de ces variants est l'altération du processus de clairance mucociliaire menant à la prolifération des pathogènes dans les bronches. La bactérie à gram négatif *Pseudomonas aeruginosa* est retrouvée chez près de 50% des patients adultes. La colonisation bactérienne bronchique mène à une inflammation chronique, ce qui va léser le tissu pulmonaire et conduire au déclin de la fonction respiratoire des patients.

Dans l'optique de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques contre *P. aeruginosa*, nous nous intéressons au cytosquelette de septines (SEPT). Il est impliqué dans l'intégrité de la barrière des voies respiratoires<sup>1</sup> et dans la réponse anti-infectieuse<sup>2</sup>. En particulier, la SEPT7 participe au maintien du complexe de SEPT et la reconnaissance des bactéries intracellulaires ce qui conduit à leur dégradation<sup>3</sup>. Cependant son rôle dans l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* dans la mucoviscidose et la réponse inflammatoire associée n'est pas connu.

### **Matériels et méthodes**

Nous avons utilisé des cellules épithéliales bronchiques primaires CF et non CF, deux lignées cellulaires bronchiques, 16HBE (sauvage et mutée F508Del (16HBE/F508Del)) et BEAS-2B. Les cellules épithéliales bronchiques primaires ont été cultivées de manière immergée ou sur un insert semi-perméant à l'interface air-liquide. Des souches fluorescentes (GFP) PAK et PaO1 de *P. aeruginosa* ont été utilisées. Un ARN interférent (siARN) ciblant la SEPT7 a été utilisé pour inhiber son expression.

### **Résultats**

Nous n'avons pas observé de différence de localisation ou d'expression (ARNm et protéine) de la SEPT7 entre des cellules bronchiques CF et non-CF. L'infection par *P. aeruginosa* ne module pas l'expression de la SEPT7. Cette protéine est capable de former des structures en forme de cage autour de *P. aeruginosa* intracellulaire dans tous nos modèles. L'inhibition de la SEPT7 dans les cellules épithéliales bronchiques non-CF (BEAS-2B et 16HBE) entraîne une augmentation du nombre de bactéries intracellulaires ainsi qu'une diminution de la production d'interleukine 6 (IL-6). Cela suggère que la SEPT7 joue un rôle dans le contrôle de l'infection. Toutefois dans les cellules épithéliales CF (16HBE/F508Del et primaires CF) ces effets ne sont pas retrouvés suggérant une altération des mécanismes de défense SEPT7-dépendants. L'utilisation d'Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor ne corrige pas cette altération suggérant que l'altération de la fonction de CFTR n'est pas directement impliquée.

### **Discussion et conclusions**

Nos résultats montrent que la SEPT7 joue un rôle essentiel dans le contrôle de l'infection des cellules bronchiques par *P. aeruginosa*. Dans le contexte de la mucoviscidose, ce rôle est altéré. La suite du travail visera à déterminer dans quelle mesure cette altération pourrait favoriser la persistance de l'infection des cellules épithéliales bronchiques.

### **Références**

<sup>1</sup>Sidhaye et al., Am J Respir, 2011. ; <sup>2</sup>Ivanov et al., Am J Pathol, 2020. ; <sup>3</sup>Krokowski et al., Cell Host Microbe, 2018.

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

**NILLY Flore**

**MODELE D'INFECTION D'EMBRYON DE POISSON ZEBRE POUR ETUDIER LA PERSISTANCE D'ISOLATS CLINIQUES DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA ET L'EFFICACITE DES TRAITEMENTS ANTIBIOTIQUES ET/OU ANTI-BIOFILM.**

Flore Nilly<sup>1</sup>, Stéphane Pont<sup>1</sup>, Laurence Berry<sup>1</sup>, Anne Bonhoure<sup>1</sup>, Morgan A. Alford<sup>2</sup>, Mélissande Louis<sup>3</sup>, Olivier Lesouhaitier<sup>3</sup>, Robert E. W. Hancock<sup>2</sup>, Patrick Plésiat<sup>4</sup> et Anne Blanc-Potard<sup>1</sup>  
1 LPHI (Laboratory of Pathogen and Host Immunity), UMR CNRS 5294, Montpellier  
2 Centre for Microbial Diseases and Immunity Research, University of British Columbia, Vancouver, Canada  
3 CBSA (Laboratoire de microbiologie Communication Bactérienne et Stratégies Anti-Infectieuses), UR4312, Rouen  
4 Chrono-environnement UMR 6249, CNRS, Université Bourgogne-Franche Comté, Besançon, France

**Objectifs**

La résistance aux antibiotiques cause des problèmes majeurs dans le traitement des infections bactériennes. Les infections bactériennes chroniques sont particulièrement difficiles à traiter du fait d'une résistance adaptative aux antibiotiques, qui est due à différents facteurs dont la formation de biofilm. Nous travaillons plus particulièrement sur la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, qui a une implication majeure dans la mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose qui sont chroniquement infectés. Il est donc crucial de disposer de modèles animaux adaptés au criblage de nouveaux traitements. 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. Notre objectif est d'établir dans ce modèle une infection persistante à l'aide de souches cliniques isolées de patients atteints de mucoviscidose afin d'identifier des traitements efficaces contre les infections chroniques.

**Matériels et méthodes**

En utilisant une nouvelle méthode d'infection, basée sur l'immersion d'embryons de poisson zèbre blessés au niveau de la queue, nous avons suivi la capacité des souches à persister au sein de l'hôte pendant 3 jours, ainsi que leur sensibilité vis-à-vis d'antibiotiques connus, en association avec des composés anti-biofilm. La visualisation de l'infection en temps réel *in vivo* par microscopie confocale est possible du fait de la transparence des embryons, permettant d'observer l'interaction entre bactéries et cellules immunitaires dans le contexte d'une infection persistante. De plus, des observations à plus haute résolution sont également faites en microscopie électronique.

**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, alors que d'autres sont éliminés. Les bactéries persistantes sont capables de coloniser le site d'infection sous forme d'agrégats, dont certains localisés au sein des macrophages, pouvant y résider plusieurs heures. Cette persistance est associée à une diminution de la sensibilité à plusieurs antibiotiques classiquement utilisés en clinique contre *P. aeruginosa*. Un antibiotique connu pour pénétrer efficacement dans les cellules est apparu comme le plus efficace contre ces bactéries persistantes, suggérant que leur localisation intracellulaire contribue à limiter l'action des traitements *in vivo*. De plus, ces bactéries persistantes peuvent être re-sensibilisées aux antibiotiques lors de l'ajout de molécules anti-biofilm. La dispersion d'agrégats bactériens par ces molécules anti-biofilm a par ailleurs été visualisée en temps réel *in vivo*.

**Discussion et conclusions**

Nous avons ainsi établi un nouveau modèle d'infection persistante à *P. aeruginosa* chez le poisson zèbre, imitant l'échec des traitements antibiotique retrouvé lors d'infections chroniques. Ce modèle, dont nous avons par ailleurs validé la transposition dans un modèle d'infection persistante chez la souris, dispose d'outils d'imagerie uniques pour aborder les mécanismes associés à l'établissement de la persistance de *P. aeruginosa* et identifier des stratégies pour contrer ces mécanismes. Notre modèle apparaît donc particulièrement pertinent pour identifier des traitements efficaces dans un contexte d'infection persistante à *P. aeruginosa*.



## 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

Sandra Khau<sup>1,2</sup>, Amandine Roussel<sup>1,2</sup>, Delphine Fouquet; Camille David<sup>1,2</sup>; Virginie Vasseur<sup>1,2</sup>; Loïc Guillot<sup>3</sup>; Viviane Balloy<sup>3</sup>; Nicolas Riteau<sup>4</sup>; Bernhard Ryffel<sup>4</sup>; Valérie Quesniaux<sup>4</sup>; Mustapha Si-Tahar<sup>1,2</sup>; Benoit Briard<sup>1,2</sup>

1. Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires, UMR1100, Inserm (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), 37012 Tours, France.

2. Faculté de Médecine, Université de Tours, 37012 Tours, France.

3. Sorbonne Université, Inserm U938, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), 75012 Paris, France

4. Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics Laboratory (INEM), CNRS Orleans (UMR7355) and University of Orleans, Orleans, France.

### Objectifs

*Pseudomonas aeruginosa* et *Aspergillus fumigatus* sont des micro-organismes fréquemment identifiés chez les patients atteints de mucoviscidose. La surinfection par *A. fumigatus* chez les patients déjà colonisés par *P. aeruginosa* provoque une hypersécrétion de l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) dépendante de l'inflammasome. Malheureusement, une libération élevée d'IL-1 $\beta$  contribue aux lésions pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose et diminue les fonctions pulmonaires. Les conséquences néfastes de la suractivation de l'inflammasome représentent une menace significative pour les patients atteints de mucoviscidose. Notre projet de recherche a ainsi pour but d'étudier les mécanismes de régulation de l'inflammasome lors des surinfections microbiennes chez les patients atteints de mucoviscidose.

### Matériels et méthodes

La régulation de l'inflammasome est étudiée sur des modèles *in vitro* de macrophages générés à partir de moelle osseuse de souris ou de macrophages alvéolaires murin. Les macrophages sont infectés d'abord par *P. aeruginosa* puis par *A. fumigatus*.

L'activation de l'inflammasome est évaluée par l'analyse du clivage de la protéine caspase-1, la sécrétion de la cytokine IL-1 $\beta$  et l'induction de la mort cellulaire (pyroptose). Pour décrypter les mécanismes moléculaires permettant la suractivation de l'inflammasome lors d'une surinfection bactérienne-fongique, des macrophages de type sauvage et transgéniques, dépourvus de voies de signalisation de la réponse immunitaire et de l'inflammasome, ainsi que des inhibiteurs, ont été utilisés. Nous avons également exploré l'implication de la protéine CFTR dans l'activation de l'inflammasome lors de la surinfection en utilisant des macrophages issus de souris Cfr<sup>-/-</sup> et  $\Delta$ F508d/d. Des souches mutantes de *P. aeruginosa* et *A. fumigatus* sont également utilisées pour caractériser les motifs bactériens et fongiques impliqués dans cette suractivation de l'inflammasome.

### Résultats

Dans notre étude, une primo infection par *P. aeruginosa* a montré une potentialisation des macrophages permettant la suractivation de l'inflammasome lors de la surinfection par *A. fumigatus*. En effet, la surinfection fongique de ces cellules potentialisée par la bactérie conduit à une hyperactivation de l'inflammasome NLRP3, des caspases -1 et -8, et à une sursécrétion d'IL-1 $\beta$ . Les résultats montrent que cette hyperactivation de l'inflammasome lors de la surinfection fongique est spécifique à une infection primaire par la bactérie *P. aeruginosa*. Cette suractivation de l'inflammasome est également dépendante du canal CFTR. De manière intéressante, cette dépendance est liée à la classe de mutation du gène Cfr. Enfin, différents motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) de *P. aeruginosa* et *A. fumigatus* sont impliqués dans ce mécanisme, tels que les pili de type IV, la flagelline, les systèmes de sécrétion de type II et de type III de *P. aeruginosa*, et le galactosaminogalactane d'*A. fumigatus*.

### Discussion et conclusions

Une infection primaire par *P. aeruginosa* entraîne la potentialisation des macrophages, provoquant ainsi la suractivation de l'inflammasome et une sécrétion excessive d'IL-1 $\beta$  en réponse à une surinfection secondaire par *A. fumigatus*. Ceci pourrait expliquer l'aggravation des fonctions pulmonaires chez les patients co-infectés.

L'étude de la réponse immunitaire déclenchée par cette interaction bactérienne et fongique dans la mucoviscidose est cruciale et des recherches supplémentaires sont nécessaires.

### **Références**

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

**SY Khadeeja Adam**

## **ROLE DES MEDIATEURS LIPIDIQUES DE LA RESOLUTION DE L'INFLAMMATION DANS LA COLONISATION DES CELLULES EPITHELIALES RESPIRATOIRES PAR ASPERGILLUS FUMIGATUS**

Khadeeja Adam SY 1,2, Maëlle Briottet 1, Isabel Valsecchi 2, Elie-Flore Barny1, Sephora John 1, Marie Vaudin 1, Mapathé Faye 1, Françoise Botterel 2 et Valérie Urbach 1  
1.IMRB, INSERM U955, UPEC, Créteil  
2.Dynamyc, UPEC, EnvA, USC ANSES, Créteil

### **Objectifs**

La mucoviscidose (CF) se caractérise par une infection respiratoire associée à une inflammation persistante qui engendre des dommages structuraux et une altération progressive de la fonction respiratoire. La réponse inflammatoire est normalement autorégulée par une phase de résolution active mettant en jeu des médiateurs lipidiques spécialisés (SPMs pour specialized pro-resolving mediators), comme les lipoxines (LX), les resolvines (Rv), les protectines (PD) et les marésines dont les effets impliquent des récepteurs couplés aux protéines G (FPR2, GPR32, GPR37, ChemR23, GPR18, LGR6 et BLT1). Nous avons montré que des anomalies de production de SPMs dans les voies aériennes des patients CF pourraient contribuer à la persistance de l'inflammation et à son inefficacité contre les pathogènes, tels que le champignon *Aspergillus fumigatus*. Notre objectif est d'explorer l'impact des SPMs dans l'interaction entre *A. fumigatus* et l'épithélium des voies aériennes de patients CF.

### **Matériels et méthodes**

Des cellules épithéliales nasales issues de patients (HNEC) ainsi que la lignée épithéliale bronchique CFBE sont cultivées sur plastique ou en interface air-liquide. Des conidies ou un filtrat d'*A. fumigatus* (Dsred) sont inoculées (MOI 1:6, 24h) sur les cellules exposées ou non aux SPMs (LXA4, LXB4 RvE1, RvD5, PD1, 10nM). L'intégrité épithéliale est évaluée par la mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER) et la visualisation de ZO-1 en microscopie confocale. La croissance d'*A. fumigatus* est étudiée en microscopie confocale, qPCR et mesure de DO en présence ou non d'épithélium ou de son surnageant de culture. Le rôle des récepteurs aux SPMs est évalué grâce au WRW4 (antagoniste du FPR2), à l'anti-GPR32, au Tx14A (agoniste de GPR37) et à la chemérine (agoniste de ChemR23).

### **Résultats**

Les cellules HNEC très différenciées (TEER > 1000  $\Omega$ .cm<sup>2</sup>, cils et mucus) inhibent la croissance d'*A. fumigatus* et son invasion dans l'épithélium dont l'intégrité n'est pas altérée. L'exposition des HNEC moins différenciées ou des cellules CFBE (TEER <400  $\Omega$ .cm<sup>2</sup>) inhibent de façon moindre la croissance d'*A. fumigatus*. Dans ce cas *A. fumigatus* altère l'intégrité épithéliale contrairement à son filtrat. Le surnageant de cellules CFBE inhibe la croissance d'*A. fumigatus*.

Les SPMs stimulent la formation des jonctions serrées au cours de la différenciation épithéliale et protègent leur altération produite par *A. fumigatus*. Ces effets protecteurs des SPMs impliquent les récepteurs FPR2, ChemR23, GPR32 et GPR37. Alors que les SPMs n'affectent pas la croissance d'*A. fumigatus* en l'absence d'épithélium, le traitement des cellules aux SPMs inhibe la croissance d'*A. fumigatus* et stimule la transcription de la défensine HBD2 et HD5.

### **Discussion et conclusions**

Ainsi, la différenciation de l'épithélium jouerait un rôle protecteur contre *A. fumigatus* dont les effets semblent nécessiter une interaction directe avec l'épithélium. Les SPMs protégeraient la barrière épithéliale en inhibant la croissance et l'action fongique. 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*.

### **Références**

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

**BITAR Maria**

**OPTIMISATION DE LA PRISE EN CHARGE DES INFECTIONS DUES A MYCOBACTERIUM ABSCESSUS BASEE SUR LA SYNERGIE ENTRE LES  $\beta$ -LACTAMINES ET LES INHIBITEURS DE  $\beta$ -LACTAMASES DE SECONDE GENERATION.**

M. Bitar 1.2.3, V. Le Moigne 4, M. Arthur 1.2.3, JL. Herrmann 4,5, JL. Mainardi 1.2.3.6

1. INSERM, UMRS1138, Équipe 12 du Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, F- 75006, France
2. Sorbonne Université, UMRS1138, Paris, France
3. Université Paris Cité, UMRS1138, Paris, France
4. Université Versailles Saint-Quentin, UMR1173, Montigny le Bretonneux, France
5. Service de Microbiologie AP-HP, Hôpital Raymond Poincaré, Garches, Paris, France
6. Service de Microbiologie AP-HP, GHU Paris Centre, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

**Objectifs**

*Mycobacterium abscessus* est un pathogène opportuniste responsable d'infections pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose. Le traitement de ces infections repose sur une quadrithérapie, incluant un carbapénème (l'imipénème), dont l'efficacité est faible (25-50%). Il a été montré que les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases de seconde génération appartenant à la famille des diazabicyclooctanes (DBOs), l'avibactam et le relebactam, améliorent l'efficacité de l'imipénème in vitro, dans le modèle de macrophage et dans le modèle de poisson-zèbre. Récemment, il a été montré qu'une autre  $\beta$ -lactamine, l'amoxicilline, agit en synergie avec l'imipénème en présence de DBOs. Le but du travail est d'évaluer les différentes combinaisons d'imipénème, d'amoxicilline et de DBOs sur *M. abscessus* et de déterminer les mécanismes responsables de cette synergie.

**Matériels et méthodes**

L'efficacité des combinaisons a été évaluée in vitro sur *M. abscessus* CIP104536 en déterminant les CMI, les indices FIC et l'activité bactéricide. Ces combinaisons ont aussi été évaluées dans un modèle de macrophage infecté et dans un modèle murin C3HeB/FeJ.

**Résultats**

En termes de CMI, il a été confirmé qu'il existe une synergie entre l'amoxicilline, l'imipénème et le relebactam. En effet, la CMI de l'amoxicilline en présence d'imipénème (1 mg/L) et de relebactam (4 mg/L) diminue d'un facteur 64 par rapport à la CMI de l'amoxicilline en présence du DBO seul (de 64 mg/L à 1 mg/L). La CMI de l'imipénème diminue d'un facteur 4 en présence d'amoxicilline (4 mg/L) et de relebactam (4 mg/L) par rapport à la CMI de l'imipénème en présence du DBO seul (de 2 mg/L à 0.5 mg/L). Cette synergie a été confirmée par la détermination de l'indice FIC qui est de 0.31 (FIC < 0.50). Les courbes de cinétique de bactéricidie in vitro montrent que cette triple combinaison est bactéricide avec une réduction de 3.4 log<sub>10</sub> et entraîne une tuerie bactérienne de 82% dans le modèle de macrophage infecté. Dans le modèle murin, la combinaison imipénème-avibactam entraîne une diminution significative de la charge bactérienne du morphotype S de *M. abscessus* dans le rein par rapport à l'imipénème seul. Cette combinaison prévient aussi la formation d'abcès rénaux.

**Discussion et conclusions**

La triple combinaison d'amoxicilline, d'imipénème et de relebactam a montré une synergie in vitro et en intracellulaire. Cette triple combinaison sera évaluée in vitro sur un panel de souches cliniques et in vivo dans le modèle murin. L'association imipénème-relebactam étant disponible en clinique, la triple combinaison avec l'amoxicilline pourrait être utile dans le traitement des infections pulmonaires à *M. abscessus*.

**Références**

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

CARVALHO Clarisse

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

Clarisse Carvalho<sup>1</sup>, Anaïs Hérivaux<sup>1</sup>, Nicolas Papon<sup>1</sup>, Jean-Philippe Bouchara<sup>1</sup>

1. Université d'Angers, Angers

### Objectifs

L'échappement du champignon à la réponse immunitaire de l'hôte, assurée majoritairement par les cellules phagocytaires, constitue un processus essentiel pour son établissement dans le tractus respiratoire et le développement d'infections. Des travaux réalisés au sein de notre équipe de recherche suggèrent que les deux thiorédoxine réductases TrxR1 et TrxR2, produites par le champignon filamenteux *Scedosporium apiospermum*, jouent un rôle dans la protection du champignon contre les radicaux oxygénés produits par les cellules phagocytaires. En effet, les gènes codant ces enzymes figurent parmi les gènes les plus surexprimés en réponse à un stress oxydatif induit chimiquement ou par exposition à des cellules macrophagiques. Ces enzymes sont également impliquées dans la synthèse de peptides non ribosomiques (NRP) de type épithiodioxopipérazine (ETP) par la formation d'un pont disulfure, support de l'activité redox de ces métabolites secondaires.

Ce projet vise à démontrer le rôle des thiorédoxine réductases dans l'échappement de *S. apiospermum* au stress oxydatif et à déterminer si l'action des thiorédoxine réductases est directe, par réduction des thiorédoxines oxydées, ou indirecte, via la formation du pont disulfure des métabolites produits par les clusters.

### Matériels et méthodes

Les gènes TRXR1 et TRXR2 codant les thiorédoxine réductases ont été invalidés grâce à la technologie CRISPR - Cas9. Une cassette conférant un gène de résistance à l'hygromycine B (hph) a été insérée au locus ciblé afin de sélectionner les mutants. Après extraction de l'ADN, deux techniques moléculaires ont été utilisées pour la validation des transformants : l'amplification par PCR du locus ciblé afin de vérifier l'intégration de la cassette en lieu et place du gène cible, et la détermination du nombre de copies du gène hph par qPCR afin de vérifier l'absence d'intégration ectopique. Enfin, des tests phénotypiques ont été initiés afin d'étudier l'impact de la délétion des gènes cibles sur la sensibilité aux agents de stress pariétal.

### Résultats

Les expérimentations réalisées ont permis d'invalider le gène TRXR2 et de valider huit mutants TRXR2 $\Delta$  contenant une cassette de sélection unique, située au locus ciblé ; ceux-ci semblent présenter une moindre sensibilité aux agents de stress pariétal. En revanche, les transformants TRXR1 $\Delta$  ont intégré un grand nombre de cassettes.

### Discussion et conclusions

De nouvelles transformations seront réalisées pour le gène TRXR1 afin d'obtenir des transformants dépourvus d'intégration ectopique. Dans un futur proche, nous évaluerons également la réponse des mutants TRXR2 $\Delta$  au stress oxydatif en laser néphélométrie. En parallèle, nous étudierons par cytométrie en flux la capacité de macrophages M1 humains à internaliser et tuer nos souches mutantes.

### Références

Staerck, C. et al. Transcriptional profiling of *Scedosporium apiospermum* enzymatic antioxidant gene battery unravels the involvement of thioredoxin reductases against chemical and phagocytic cells oxidative stress. *Medical Mycology* 57, 363–373 (2019).

Staerck, C. et al. The Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Superoxide Dismutase of *Scedosporium apiospermum* Protects the Conidia from Oxidative Stress. *JoF* 7, 575 (2021).

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



## Posters :

n°	NOM Prénom	Type de recherche	Thématique de recherche	TITRE	Page
1	<b>BARDIN</b> Pauline	Fondamentale	Thérapie Génique	AAV6.2FF : nouvelle opportunité de thérapie génique à tropisme pulmonaire pour traiter tous les patients atteints de mucoviscidose	30
2	<b>BIANCHINO</b> Gabriella	Fondamentale	Infection	La métalloenzyme IspH, une source pour la découverte de nouveaux agents antimicrobiens	31
3	<b>BONNARDOT</b> Margaux	Fondamentale	Infection	Photo-éradication ciblée de bactéries résistantes aux antimicrobiens : Intérêt pour un traitement des infections respiratoires dans la mucoviscidose	33
4	<b>BOSC</b> Lola	Fondamentale	Pathologies Associées	Caractérisation fonctionnelle de la voie d'import de zinc dépendant de la pseudopaline chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
5	<b>BOULIC</b> Pierrick	Fondamentale	Infection	Projet BiPlan : Impact des Bactéries des microbiotes Pulmonaire et intestinal sur la pharmacocinétique des modulateurs du CFTR	37
6	<b>BOUSSERRHINE</b> Yasmine	Clinique	Atteinte pulmonaire	Impact de l'environnement (tabagisme passif) chez les patients pédiatriques atteint de Mucoviscidose	43
7	<b>CHABLE DE LA HERONNIERE</b> François	Fondamentale	Inflammation	Etude de l'interactome du PCNA des neutrophiles de patients atteints de mucoviscidose : caractérisation protéomique, métabolomique et effets des nouveaux traitements modulateurs de CFTR	44
8	<b>COSTES</b> Floriane	Fondamentale	Infection	Infection persistante à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> chez le zebrafish : réponse inflammatoire associée et étude dans un modèle mucoviscidose	46
9	<b>DERRIEN</b> Julie	Clinique	Epidémiologie	Etude de la survie des patients atteints de mucoviscidose au niveau régional et national par différentes approches statistiques	47
10	<b>DUPUIS</b> Gabrielle	Fondamentale	Infection	Rôle de la toxine ExoY de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dans l'infection des cellules pulmonaires	49
11	<b>FELGEROLLE</b> Chloé	Fondamentale	Thérapie Génique	Conception d'oligonucléotides bloqueurs pour corriger l'effet de mutations introniques profondes du gène CFTR.	51
12	<b>FOUBERT</b> Maëlle	Fondamentale	Infection	Identification des mécanismes de résistance aux Mycobactériophages	52
13	<b>HAMON</b> Laurine	Fondamentale	Pathologies Associées	L'adiposité de la moelle osseuse pourrait jouer un rôle clé dans la pathologie osseuse liée à la mucoviscidose	53

14	<b>LYKO</b> Camille	Fondamentale	Fonction CFTR	Profile inflammatoire des cellules épithéliales bronchiques humaines mucoviscidosiques en réponse à la correction de la fonction du CFTR : Correcteurs versus expression génique	55
15	<b>MARTIN-SERRANO ORTIZ</b> Ángela	Fondamentale	Infection	Une approche deux-en-un pour lutter contre Pseudomonas aeruginosa	56
16	<b>MIENZANZAMBI</b> Stecy	Fondamentale	Fonction CFTR	Mucoviscidose: Recherche de traitements pour une mutation non-sens (CFTR_Y122X) et évaluation de l'impact de la pollution atmosphérique	57
17	<b>ROCHARD</b> Camille	Fondamentale	Infection	Etude de l'effet antifongique de ETD151 un peptide antimicrobien sur Aspergillus fumigatus	59
18	<b>SIMONNEAU</b> Benjamin	Fondamentale	Fonction CFTR	Modulation pharmacologique de COMMD1 : effet stabilisateur de CFTR-F508del dans le contexte de la mucoviscidose ?	61
19	<b>SUIRE</b> Bastien	Fondamentale	Fonction CFTR	Impact du traitement Kaftrio sur l'infection par M. abscessus chez les patients atteints de mucoviscidose.	63
20	<b>TARIZZO</b> Marine	Fondamentale	Infection	Identification des récepteurs impliqués dans la reconnaissance par les cellules épithéliales bronchiques de la lectine fongique FleA d'Aspergillus fumigatus	65

**BARDIN Pauline**

**AAV6.2FF : NOUVELLE OPPORTUNITE DE THERAPIE GENIQUE A TROPISME PULMONAIRE POUR TRAITER TOUS LES PATIENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE**

Pauline Bardin 1, Nathalie Rousselet 1, Yanlong Pei 2, Sarah K. Wootton 2, Olivier Tabary 1

1. INSERM, UMR\_S938 : Centre de Recherche Saint Antoine & Faculté des Sciences, Sorbonne Université, Paris, France

2. Department of Pathobiology, Ontario Veterinary College, University of Guelph, Guelph, Canada

**Objectifs**

La mucoviscidose est la maladie génétique mortelle la plus fréquente dans la population caucasienne, causée par des mutations du gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator). CFTR code pour un canal chlorure (Cl<sup>-</sup>), essentiel à l'équilibre osmotique des liquides de surface des voies respiratoires et à l'élimination du mucus. La mutation la plus courante, F508del, entraîne l'absence du canal au niveau de la membrane apicale et provoque un déséquilibre ionique avec une diminution de l'efflux de Cl<sup>-</sup>, une augmentation de l'influx de sodium et un épaissement du mucus. L'hyperviscosité qui en résulte entrave la clairance mucociliaire, favorisant la colonisation bactérienne et l'établissement de cycles d'infection/inflammation. Des tentatives de thérapie génique curative utilisant des vecteurs pour rétablir un CFTR normal ont été proposées, mais ont échoué en raison du mucus et de l'inflammation induite par le vecteur. Ce projet vise à transférer la technologie développée pour la fibrose pulmonaire idiopathique (Bardin et al., 2 articles soumis) à la mucoviscidose.

**Matériels et méthodes**

Basé sur des travaux antérieurs, nous développons une nouvelle thérapie génique innovante utilisant un AAV6.2FF pour traiter et corriger le gène CFTR défectueux en le remplaçant par une version saine. L'AAV6.2FF présente un tropisme pulmonaire très élevé, tout en induisant une inflammation limitée, et une durée de vie importante (collaboration : S. K. Wootton).

**Résultats**

Nous avons montré sa capacité à transduire les cellules cultivées en interface air-liquide CF et NCF, à travers le mucus et quel type spécifiquement in vitro. Nous étudierons l'effet de l'AAV-CFTR sur différentes classes de variants et paramètres dérégulés dans la mucoviscidose. Nous testerons l'AAV-CFTR par voie intranasale chez des souris surexprimant ENaC pour déterminer la capacité à transduire à travers le mucus in vivo, et compléter les données sur la toxicologie et l'inflammation pulmonaire (collaboration : Angélique Mottais & Sophie Gohy).

**Discussion et conclusions**

Cette stratégie démontrera le bénéfice d'une nouvelle approche de thérapie génique dans la correction de CFTR en utilisant un nouveau transporteur pour cibler tous les patients atteints de mucoviscidose.

**Références**

*Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose, AFM Téléthon*

**BIANCHINO Gabriella**

## **LA METALLOENZYME ISPH, UNE SOURCE POUR LA DECOUVERTE DE NOUVEAUX AGENTS ANTIMICROBIENS**

Gabriella Bianchino<sup>1</sup>, Lucia D'Auria<sup>2</sup>, Franck Borel<sup>2</sup>, Philippe Chaignon<sup>1</sup>, Myriam Seemann<sup>1</sup>

1. Institut de Chimie, Université de Strasbourg/CNRS, Strasbourg; 2. Institut de Biologie Structurale, Université Grenoble Alpes/CEA/CNRS, Grenoble

### **Objectifs**

L'une des menaces les plus préoccupantes pour la santé mondiale est l'incidence croissante de la résistance des agents pathogènes aux antibiotiques. L'un des moyens de pallier ce problème consiste à se focaliser sur une série sous-exploitée d'enzymes cibles essentielles à la survie de ces pathogènes. L'objectif principal du projet de doctorat est de surexprimer et de purifier l'enzyme IspH qui est cruciale pour les bactéries *P. aeruginosa* et *M. tuberculosis* afin de procéder au criblage *in vitro* de chimiothèques pour découvrir de nouveaux inhibiteurs. En outre, le développement d'un promédicament a été exploité pour un des deux meilleurs inhibiteurs d'IspH de *E. coli* (le diphosphate de (E)-4-amino-3-méthylbut-2-ényle, nommé AMBPP)<sup>1</sup> déjà connu. En effet, ce dernier n'est pas actif *in cellulo* en raison de son impossibilité à traverser les membranes des bactéries à Gram négatif.

### **Matériels et méthodes**

Une approche multidisciplinaire a été appliquée au cours de ce projet. Les orthologues d'IspH ont été surexprimés en utilisant des cellules *E. coli* comme hôte. En raison de la grande sensibilité à l'oxygène des enzymes IspH, l'utilisation d'une boîte à gants a été nécessaire pour effectuer la purification des enzymes d'intérêt dans des conditions anaérobies. Ensuite, une série de chimiothèques a été criblée *in vitro* en utilisant un lecteur de microplaques afin de trouver de nouveaux inhibiteurs d'IspH. La cristallographie aux rayons X a été utilisée pour résoudre la structure tridimensionnelle des enzymes. En outre, la synthèse organique a été exploitée pour synthétiser les prodrogues mentionnées ci-dessus.

### **Résultats**

Les enzymes IspH de *P. aeruginosa* et de *M. tuberculosis* ont été produites et purifiées en anaérobiose dans la boîte à gants. Un test d'activité a été établi et optimisé pour ces deux orthologues et ces dernières sont révélés actifs. Une fois ces enzymes en main, elles ont été utilisées dans un criblage *in vitro* de composés chimiques conduisant à la découverte d'un nouvel inhibiteur ciblant IspH de *P. aeruginosa* et de *M. tuberculosis*. Différentes études enzymatiques ont ensuite été menées afin de comprendre le mécanisme d'inhibition. En collaboration avec l'Institut de biologie structurale de Grenoble (IBS), la structure sans précédent d'IspH-Pa et d'IspH-Mt a été résolue. Une prodrogue de l'AMBPP a été conçue pour favoriser la perméation de l'inhibiteur dans les cellules bactériennes. La prodrogue souhaitée a été obtenue et sa purification reste à réaliser.

### **Discussion et conclusions**

Au cours de ce travail de thèse, les métalloenzymes IspH sensibles à l'oxygène de *P. aeruginosa* et *M. tuberculosis* ont été obtenus avec succès pour la première fois. Un test enzymatique pour chacune de ces enzymes a été développé. Un criblage de différentes chimiothèques a conduit à l'identification d'un nouvel inhibiteur d'IspH. Les perspectives issues de ce projet multidisciplinaire consistent à tester la prodrogue synthétisée sur les bactéries *P. aeruginosa* et *M. tuberculosis*. Si elle est active sur au moins un de ces microorganismes, la première molécule ciblant IspH et montrant des propriétés antimicrobiennes aura été découverte. Ainsi, ce projet pourrait aboutir à la production de nouveaux antibiotiques notamment pour les patients atteints de mucoviscidose afin de remédier aux résistances bactériennes observées dans le traitement des infections à *P. aeruginosa* et à certaines mycobactéries.

### **Références**

(1) Janthawornpong, K.; Krasutsky, S.; Chaignon, P.; Rohmer, M.; Poulter, C. D.; Seemann, M. Inhibition of IspH, a [4Fe-4S]<sup>2+</sup> Enzyme Involved in the Biosynthesis of Isoprenoids via the Methylerythritol Phosphate Pathway. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135 (5), 1816–1822.

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

**BONNARDOT Margaux**

## **PHOTO-ERADICATION CIBLEE DE BACTERIES RESISTANTES AUX ANTIMICROBIENS : INTERET POUR UN TRAITEMENT DES INFECTIONS RESPIRATOIRES DANS LA MUCOVISCIDOSE**

Margaux Bonnardot, Adeel Nasir (a), Ali Balasini (b), Franck Thétiot (c), Ulrich Jonas (b), Gilles Lemerrier (d,e), Tristan Montier (a), et Tony Le Gall (a)

a- Univ Brest, INSERM, EFS, UMR 1078, GGB-GTCA, F-29200 Brest, France – margaux.bonnardot@etudiant.univ-brest.fr

b- Macromolecular Chemistry, Department of Chemistry and Biology, University of Siegen, Adolf-Reichwein-Straße 2, 57076 Siegen, Germany

c- Unité Mixte de Recherche (UMR), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) 6521, Université de Brest (UBO), CS 93837, 29238 Brest, France

d- ITODYS - UMR CNRS 7086, Université Paris Cité 15, rue Jean-Antoine de Baïf, 75013 Paris, France

e- Université de Reims Champagne-Ardenne, URCA, 51687 Reims, France

### **Objectifs**

La thérapie photodynamique présente le potentiel de lutter contre la propagation de la multirésistance aux antimicrobiens, en particulier chez *Pseudomonas aeruginosa* ou *Staphylococcus aureus* responsables d'infections respiratoires difficiles à traiter chez les patients atteints de mucoviscidose. Généralement, la combinaison d'un photosensibilisateur (PS) non toxique, d'oxygène moléculaire et de lumière permet de générer des espèces réactives de l'oxygène capables d'inactiver les pathogènes environnants, quel que soit leur profil de résistance (1). Dans le cadre du projet ANR TARGET-THERAPY (2), nous avons rapporté que certains PS peuvent exercer de puissants effets photodynamiques contre des bactéries multirésistantes (3). Dans cette étude, nous avons voulu déterminer à quel point il est possible de contrôler l'irradiation locale afin d'éradiquer de façon ciblée des bactéries multirésistantes.

### **Matériels et méthodes**

Des géloses nutritives ont étéensemencées par inondation avec une souche de *P. aeruginosa* ou *S. aureus* préalablement mélangée avec un PS. De la lumière à une longueur d'onde adéquate a ensuite été appliquée localement, en modulant la puissance au moyen soit de masques à différentes opacités soit d'une fibre optique (4) pour une durée déterminée.

### **Résultats**

Nous montrons que la filtration précisément contrôlée d'une source lumineuse permet d'obtenir des zones d'inhibition très bien définies, avec une corrélation entre la puissance lumineuse appliquée et l'intensité des effets antibactériens mesurés. Les tests réalisés au moyen d'une fibre optique détaillent davantage les résultats obtenus, avec là aussi des effets photodynamiques très bien résolus.

### **Discussion et conclusions**

Dans l'ensemble, nos travaux participent à démontrer l'intérêt de la thérapie photodynamique dirigée contre des pathogènes responsables d'infections respiratoires récalcitrantes. De multiples optimisations sont cependant encore nécessaires afin de disposer de PS plus efficaces et de pouvoir précisément contrôler leur photo-activation dans l'espace et le temps (2).

### **Références**

1- Youf R, Müller M, Balasini A, Thétiot F, Müller M, Hascoët A, Jonas U, Schönherr H, Lemerrier G, Montier T, Le Gall T. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Latest Developments with a Focus on Combinatory Strategies. *Pharmaceutics* 2021, 13, 1995

2-<http://www.target-therapy-project.eu/>

3-Youf R, Nasir A, Müller M, Thétiot F, Haute T, Ghanem R, Jonas U, Schönherr H, Lemerrier G, Montier T, Le Gall T. Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes for Antimicrobial Photodynamic Therapy: Prospects for Application in Cystic Fibrosis

Lung Airways. *Pharmaceutics* 2022, 14(8), 1664; Youf R, Ghanem R, Nasir A, Lemerrier G, Montier T, Le Gall T. Impact of mucus and biofilm on antimicrobial photodynamic therapy: Evaluation using Ruthenium(II) complexes. *Biofilm* 2023, 5, 100113

4-<https://www.evosen.fr/>

***Ce projet est financé par : ANR; MESRI, Région Bretagne, UBO, Inserm, Association Gaëtan Salaun, EFS***

## CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE LA VOIE D'IMPORT DE ZINC DEPENDANT DE LA PSEUDOPALINE CHEZ PSEUDOMONAS AERUGINOSA

L. Bosc<sup>1</sup>, G. Ball<sup>1</sup>, C. Laffont<sup>3</sup>, M. Tribout<sup>1</sup>, L. Ouerdane<sup>4</sup>, T. Secher<sup>5</sup>, N. Heuzé-Vourc'h<sup>5</sup>, P. Arnoux<sup>3</sup>, R. Voulhoux<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>CNRS/Aix-Marseille Université LCB UMR7283, Marseille, France

<sup>3</sup>CEA/CNRS/Aix-Marseille Université, BIAM UMR 7265, CEA Cadarache, Saint-Paul-lez Durance, France

<sup>4</sup>Université de Pau et des Pays de l'Adour/CNRS – UMR5254, Pau, France

<sup>5</sup>SINSERM/Université de Tours, Centre d'Étude des Pathologies Respiratoires, U1100, Tours, 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. Elle est particulièrement étudiée du fait de sa forte résistance à de nombreux antibiotiques couramment utilisés, ce qui risque de limiter les possibilités de traitement, aussi il est important de caractériser les moyens mis en place par Pa pour survivre dans l'hôte. Afin de contrer la carence en métaux imposée par le système immunitaire, Pa synthétise, sécrète et récupère de petites molécules à très forte affinité pour ces métaux, les métallobactines. Ainsi, Pa répond à la carence en zinc en sécrétant la pseudopaline (Pp) (1). La voie d'import de zinc par ce métallobactine (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 plus en détail cette voie essentielle lors de 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 la protéine cible. 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

Suite à une infection à *Pseudomonas aeruginosa*, des anticorps dirigés contre une protéine de la voie pseudopaline sont retrouvés dans le sérum des patients infectés. Ceci montre l'induction de la voie dans ces conditions d'infection et donc la nécessité pour la bactérie de produire ce métallobactine. De plus, une souche ne produisant pas de Pp est moins virulente chez la souris. Il a par ailleurs été montré qu'une souche incapable de produire de la pseudopaline (cntL) voit sa capacité de formation de biofilm affectée. Ces résultats montrent l'importance de la voie Pp pour le développement des bactéries au sein de l'hôte, aussi il est essentiel de poursuivre sa caractérisation. Nous avons ainsi identifié un nouveau composant de la voie Pp : la méthyltransférase CntT dont nous montrons qu'elle permet la production d'une forme méthylée de la pseudopaline. Deux signaux sont nécessaires pour la production de cette méthyltransférase : la levée de la répression par Zur suite à une forte carence en zinc et un stress de température (42°C). Par ailleurs, nous observons qu'un mutant de délétion de cette méthyltransférase voit lui aussi sa capacité à former un biofilm diminuée, suggérant un rôle de la forme méthylée de la Pp dans ces conditions.

### Discussion et conclusions

Nos résultats démontrent l'importance de la voie Cnt lors de l'infection, avec notamment un rôle important sur la formation de biofilms, structures conférant une protection supplémentaire aux bactéries et rendant plus difficile leur éradication. Un nouveau composant de la voie produisant une forme modifiée de la Pp a été identifié, et semble être important dans les biofilms. De nouveaux résultats à venir nous permettront de comprendre le rôle et l'importance de cette forme modifiée pour *Pseudomonas aeruginosa*.

### 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 : ANR***

## BOULIC Pierrick

### PROJET BIPLAN : IMPACT DES BACTERIES DES MICROBIOTES PULMONAIRE ET INTESTINAL SUR LA PHARMACOCINETIQUE DES MODULATEURS DU CFTR

Pr Geneviève Héry-Arnaud, Pierrick Boulic

Clémence Beuruelle

INSERM UMR 1078 GGB – Axe Microbiota , Faculté de médecine de Brest, Brest

#### Objectifs

Contexte :

La mucoviscidose est une maladie génétique atteignant le gène CFTR. Ce gène code la formation d'un canal transmembranaire présent dans un grand nombre de cellules de l'organisme, notamment pulmonaire et digestive. Cette maladie entraîne une dysrégulation des microbiotes, c'est ce qu'on appelle une dysbiose. Ces altérations sont bien décrites dans la mucoviscidose (Zemanick ET and co2, A.Françoise and co3).

Depuis quelques années, le traitement de la mucoviscidose a grandement progressé grâce à l'utilisation des modulateurs du CFTR. Aujourd'hui, les plus utilisés sont sous forme de trithérapie comprenant l'ivacaftor en association avec le tezacaftor et l'alexacaftor (nom du médicament : KAFTRIO®). Bien que leur grande efficacité ait été prouvée dans les essais cliniques à l'échelle de groupes de malades, on constate que certains patients ne répondent pas ou peu à ces traitements (Heijerman, H.G.M4, David P. Nichols and co5, N Mayer.Hamblett and co6).

Des études ont déjà tenté de trouver des explications à ces non répondes : cause inflammatoire ? cause génétique ? ... pour l'instant il n'y a de franche réponse (Lutful Kabir, F and co7, Paul D.W. Eckford and co8).

En parallèle, les progrès dans le domaine du microbiote ont permis l'émergence d'une nouvelle spécialité : la pharmacomicrobiomique (Zehra Esra Ilhan, Patricia Lepage9 , Anukriti Sharma10). Celle-ci cherche à établir un lien entre les populations bactériennes et la pharmacocinétique des médicaments et permet d'expliquer les différences observées parmi les malades dans leur réponse aux traitements. Cette nouvelle science étudie les capacités de dégradation des médicaments par les bactéries du microbiote. Par exemple, il a été démontré que la digoxine était dégradé et rendue inactive par une bactérie du microbiote intestinale Eggerthela lenta (Haiser HJ and co11). De même, certaines bactéries intervenant dans la pharmacocinétique de traitement anticancéreux pédiatrique (Leardini D. and co12).

Néanmoins, elle n'a pas encore été utilisée dans l'étude de la réponse aux modulateurs du CFTR.

Enfin, une partie de la médecine actuelle cherche à s'émanciper de l'idée une maladie = des malades. Au contraire, on tend à s'intéresser à l'individu dans son contexte de maladie. Cette vision de la prise en charge correspond à la médecine personnalisée (Mariam Reyad Rizkallah13).

Objectifs :

Dans cette étude, nous tenterons de déterminer si les bactéries des microbiotes intestinal et pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose ont un impact sur les modulateurs du CFTR. Pour cela, nous étudierons la capacité de 24 bactéries différentes habituellement présentes dans l'intestin ou les poumons des malades à modifier les 3 principales molécules qui composent la trithérapie KAFTRIO. Certaines de ces bactéries sont des pathogènes couramment rencontrés chez les mucos et d'autres sont de simples habitants de la flore intestinale ou pulmonaire. Notre objectif est de quantifier l'effet de ces bactéries des patients mucoviscidosiques sur les modulateurs du CFTR en jouant sur différentes conditions de culture qui miment ce qui se passe dans le corps des malades (Zimmermann M and co16, C. Lamoureux17).

Ce travail sera réalisé en collaboration avec le laboratoire du Pr Schneider à Melbourne, reconnue pour son expertise dans le dosage des principes actifs du KAFTRIO et leurs métabolites (Elena K. Schneider and co18, Felisa Reyes-Ortega and co19).

#### Matériels et méthodes

## 1/ Constitution d'une souchothèque d'intérêt (Microbiota-UMR1078).

Les souches bactériennes étudiées représenteront les principales espèces bactériennes composant le « core microbiote » intestinal et pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose,

- soit considérées comme commensales (notées #)
- soit considérées comme pathogènes opportunistes (notées \*),
- soit déjà connues pour impacter le métabolisme de principes actifs dans un contexte autre que la mucoviscidose, cette question n'ayant jamais été étudiée dans la mucoviscidose (espèces notées ^);

(sachant qu'une espèce bactérienne peut cumuler plusieurs de ces conditions.)

Pour chaque espèce étudiée, nous étudierons une souche de référence et, dans la mesure du possible, un isolat clinique provenant d'un patient CF. Au total, 24 souches seront étudiées :

- Espèces-clé du microbiote intestinal (9,10) : n=9 souches dont 6 anaérobies
  - *Bacteroides fragilis*#^ (Bacteroidetes) : souche de référence CIP104785
  - *Prevotella coprii*# (Bacteroidetes) : souche de référence CIP105107
  - *Veillonella parvula*# (Firmicutes) : souche de référence CIP60.1
  - *Escherichia coli*# (Pseudomonadota, ex-Proteobacteria) : souche de référence CIP76.24
  - *Enterococcus faecalis*#^ (Firmicutes) : souche de référence CIP103214 ; souche CF Efae-VL
  - *Clostridioïdes difficile*\* (Firmicutes) : souche de référence CIP107932
  - *Eggerthella lenta*^ (Actinobacteria) : souche de référence CIP104211
  - *Bifidobacterium longum*#^ (ActinomycèteActinobacteria) : souche de référence CIP64.63
- Espèces-clé du microbiote respiratoire (1,9,10) : n=15 souches dont 4 anaérobies strictes
  - *Pseudomonas aeruginosa*\*(Pseudomonadota) : souche de réf. PAO1 CIP104116 ; souche CF mucoïde PAM ; souche CF nonmucoïde PANM
  - *Staphylococcus aureus*\* (Firmicutes) : souche de référence CIP76.25 ; souche CF SA-VL
  - *Stenotrophomonas maltophilia*\*(Pseudomonadota): souche de réf. CIP107275 ; souche CF SM
  - *Prevotella melaninogenica*# (Bacteroidetes) : souche de réf. CIP104591 ; souche CF PM
  - *Haemophilus influenzae*\*(Pseudomonadota) : souche de réf. CIP100606 ; souche CF HI
  - *Achromobacter xylosoxidans*\* (Pseudomonadota) : souche de réf. CIP104124 ; souche CF AX
  - *Veillonella atypica*# (Firmicutes) : souche de réf. DSM20739 ; souche CF VA

Après repiquage sur gélose au sang de mouton-Columbia réalisé à partir des cryobilles (conservation des souches en cryotubes à -80°C), l'incubation se fera à 37°C en condition aérobie (atmosphère : 95% O<sub>2</sub> et 5% de CO<sub>2</sub>) ou anaérobie (85% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub>) entre 1 et 6j selon les spécificités de croissance de la souche étudiée (10 souches anaérobies) et de la demi-vie du principe actif étudié (cf. ci-après). Le laboratoire Microbiota-UMR1078 a l'expertise de la culture des bactéries anaérobies et possède une souchothèque unique de souches anaérobies provenant de patients CF (Lamoureux 2019). Une fois la primo-culture obtenue et contrôle de la pureté, les colonies bactériennes seront repiquées (1) en milieu liquide riche Brain Heart Infusion (BHI) (2) en milieu pauvre M9 Salts (volume : 4 mL chacun). Selon la biogéographie pulmonaire ou intestinale, le métabolisme des bactéries peut fluctuer ; il peut donc y avoir une répercussion sur la capacité de métabolisation des modulateurs du CFTR. Afin de simuler les environnements respiratoire et digestif, la culture en milieu minimum M9 sera réalisée en présence de mucines pour les souches anaérobies lesquels peuvent utiliser les mucines comme substrats de croissance ; la récupération des mucines humaines étant très contraignantes (cf. projet EXIT, Clémence Beauvue), un « coup de sonde » sera fait sur mucines de porc pour commencer ; dans le futur, si les résultats sont probants, des cultures en présence de mucines de patients pourront être réalisées. L'incubation sera réalisée à 37°C pendant 16h-24h en aérobie et anaérobie.

Pour chaque bouillon de culture, une dilution au 1/10e sera réalisé dans le milieu GMM mimant l'environnement abiotique des microbiotes et contenant 100 µM d'ivacaftor (IVA) ou 100 µM d'alexacaftor

(ELE) ou 100  $\mu\text{M}$  de tezacaftor (TEZ). Chacune des molécules sera étudiée séparément car celles-ci ont une pharmacocinétique différente. Par exemple l'ivacaftor et l'elexacaftor dépendent de la présence de graisses pour avoir une absorption correcte, tandis que le tezacaftor ne nécessite pas d'apport de graisse. L'ivacaftor et le tezacaftor seront métabolisés en plusieurs métabolites, tandis que l'elexacaftor ne se retrouve que sous une seule forme. Les échantillons sont incubés dans des tubes en verre dans une étuve à 37°C en milieu aérobie ou anaérobie selon les caractéristiques bactériologiques de chaque souche étudiée. En parallèle, des échantillons contrôle seront préparés :

1° Des échantillons sans principe actif afin de quantifier l'inoculum bactérien en fonction du temps. Ces échantillons serviront à contrôler l'absence d'effet antibactérien (bactéricide ou bactériostatique des 3 modulateurs du CFTR analysés).

2° Des échantillons avec l'un des 3 principes actifs (ivacaftor, tezacaftor ou elexacaftor) sans bactérie afin de quantifier la métabolisation spontanée des 3 modulateurs du CFTR dans le milieu de croissance bactérien.

2/ Recueil des "échantillons tests" (Equipe Microbiota-UMR 1078, Brest)

Afin d'évaluer la cinétique d'évolution de l'ivacaftor et de ses 2 métabolites, M1 (métabolite actif) et M6 (métabolite inactif), dutezacaftor et de l'elexacaftor dans les milieux préparés, nous réaliserons plusieurs prélèvements à des temps donnés (3 temps par molécule).

- Ivacaftor (demi-vie de 12h) et M1 et M6 ; T0 (inoculation des bactéries dans le milieu contenant le principe actif) : dosage à T = 30 min (T1), T = 6h (T2), et T = 24h (T3)
- Elexacaftor (demi-vie de 24h) : T1, T2 et T3
- Tezacaftor (demi-vie de 60h) : T1, T3, T4 (72h)

Ces prélèvements seront filtrés puis 10  $\mu\text{L}$  seront mélangés à 10  $\mu\text{L}$  d'acétonitrile. Ces solutions seront stockées à -80°C jusqu'à expédition en Australie pour le dosage des 3 principes actifs et des métabolites (M1, M6). Nous observerons pour chaque échantillon la concentration de l'ivacaftor et de ses métabolites M1 et M6, du tezacaftor et de l'elexacaftor (Schneider 2016, Reyes-Ortega 2020). Nous ne réaliserons pas le dosage des métabolites du tezacaftor car nous ne disposons pas de données sur un dosage fiable en routine de ces métabolites et parce que le laboratoire partenaire sait réaliser le dosage du tezacaftor seul (Reyes-Ortega 2020).

Nous devons également déterminer si la densité bactérienne évolue en présence ou absence des molécules d'intérêt afin de vérifier si le principe actif a un impact sur la croissance des bactéries sélectionnées.

Au total, 792 échantillons (en comptant les contrôles) seront à analyser par le partenaire 1.

3/ Dosage des métabolites par le partenaire 1 (E. Schneider, Melbourne).

Matériaux : Les métabolites ivacaftor-carboxylate/ivacaftor-M6 (numéro de catalogue 510242247CS) et hydroxyméthyl-ivacaftor/ivacaftor-M1 (numéro de catalogue 510240849CS) seront obtenus auprès de Clearysynth (Canada) et seront utilisés comme étalons internes (IS) dans du méthanol à 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Le méthanol (MeOH, qualité HPLC LC-MS  $\geq 99,9\%$ ), l'acétonitrile (qualité HPLC LC-MS  $\geq 99,9\%$ ) et l'acide formique de qualité LCMS seront obtenus auprès de Sigma-Aldrich (Australie). Les expériences seront réalisées sur un LC-MS Shimadzu 8030 à triple quadripôle utilisant une colonne C8 (Phenomenex ; 2,6  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$  ; 50  $\times$  2,1 mm) avec la colonne de garde C8. (Phenomenex ; Colonnes à ID de 2,1 mm, 3/Pk).

Préparation des étalons : Des solutions mères indépendantes de l'étalon interne de chaque analyte (ivacaftor, ivacaftor-M1, ivacaftor-M6, tezacaftor et elexacaftor) seront préparées dans du méthanol pour chaque série d'analyses à 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  et par des dilutions supplémentaires, des solutions mères de travail de 0,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  seront préparées. Dix solutions mères d'étalonnage de chaque analyte à 0,001, 0,0025, 0,005, 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5 et 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  seront préparées dans du méthanol par dilution en série des solutions mères de 100 ou 0,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Développement de la méthode Multiple Reaction Monitoring (MRM) : Dans un essai MRM, la sensibilité d'une paire d'ions MRM est directement liée à l'intensité du signal de l'ion fragment qui est transmis à travers le quadripôle 3 (Q3) et qui peut frapper le détecteur. En bref, tous les analytes (0,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dans du méthanol et les étalons dilués correspondants) seront injectés seuls en mode positif et négatif pour déterminer quel mode Q3 génère le signal le plus élevé. Dans un deuxième temps, nous ferons varier la tension d'énergie de collision dans le spectromètre de masse (-10 à 40 V), ce qui affecte le schéma de fragmentation des analytes et les

intensités relatives des ions fragments. Dans un troisième temps, les précurseurs de fragments seront calculés sur la base des valeurs  $m/z$  prédites et identifiés pour chaque analyte. Pour chaque paire d'ions MRM, les chromatogrammes d'ions extraits seront générés, et les cinq pics de plus forte intensité seront identifiés sur la base de leur énergie de collision (EC) correspondante. Enfin, la méthode d'acquisition MRM optimisée sera générée.

Analyse par MRM-MS : L'analyse des échantillons sera réalisée sur un système LCMS Shimadzu 8030 couplé aux spectromètres de masse quadripolaires triples 8030. Le flux de la phase mobile sera divisé avant d'entrer dans le spectromètre de masse dans un rapport 2:1 (entrée déchets/MS). Les analytes seront détectés en utilisant la surveillance de réactions multiples (MRM). Les transitions ioniques sont pour : l'ivacaftor  $393,1 \rightarrow 337,0$   $m/z$ , de l'ivacaftor-M1  $408,5 \rightarrow 353,0$   $m/z$ , de l'ivacaftor-M6  $423,1 \rightarrow 367,0$   $m/z$ , du tezacaftor  $521,1 \rightarrow 440,0$   $m/z$  et de l'elexacaftor  $597,7 \rightarrow 598$   $m/z$ . La séparation chromatographique sera réalisée à l'aide d'une colonne C8 (2,6  $\mu m$  ; 100 Å ; 50  $\times$  2,1 mm) équipée d'une colonne de garde C8 (colonnes d'ID 2,1 mm, 3/Pk). La phase mobile sera constituée d'acide formique à 0,1 % dans l'eau (A) et d'acétonitrile (B). Le volume d'injection sera de 2  $\mu L$ . Le gradient commencera à 30 % de B au temps 0 et augmentera à 90 % de B à 4,00 min, maintenu à 90 % de B jusqu'à 4,5 min, puis réduit à 20 % de B à 5,50 min.

Validation de la méthode : Le traitement des données MRM et la reconnaissance des pics des analytes seront réalisés à l'aide du logiciel d'intégration post-run (Shimadzu). Les paramètres d'intégration des pics par défaut seront définis pour détecter les pics en utilisant une fenêtre de rétention de 1 min autour du temps de rétention des analytes. Les courbes d'étalonnage de l'ivacaftor, de l'ivacaftor-M1, de l'ivacaftor-M6, du tezacaftor et de l'elexacaftor seront construites avant chaque cycle d'analyse en utilisant la relation entre les rapports de surface de pic de l'analyte/fragment aux normes internationales et les concentrations nominales des normes d'étalonnage de l'ivacaftor, de l'ivacaftor-M1, de l'ivacaftor-M6, du tezacaftor et de l'elexacaftor (Figure 1). Une analyse de régression linéaire des moindres carrés avec pondération  $1/C^2$  sera effectuée en fonction de la réciproque des concentrations de concentrations (Shimadzu).

#### 4/ Analyses des résultats (Microbiota-UMR 1078 en partenariat avec l'équipe d'E. Schneider)

La comparaison des différentes concentrations de IVA, M1, M6, TEZ et ELE, sera réalisée par un test ANOVA ou un test t de Student. Tous les résultats seront saisis et analysés sur le logiciel Graph Pad Prism (version 9) et envoyés à l'équipe Microbiota-UMR1078 sous cette forme par l'équipe australienne. Nous déterminerons ainsi pour chaque espèce et souche bactérienne si l'incubation a eu un effet significatif sur la concentration des 5 molécules testées et ce aux différents testés.

## Résultats

Résultats Préliminaires :

Une étude pilote autofinancée a déjà montré quelques résultats.

6 souches ont été utilisées : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacteroides fragilis*, *Enterococcus faecalis* et *Prevotella melaninogenica*. C'est six souches ont été mise en culture de l'ivacaftor.

L'ivacaftor et ses 2 métabolites M1 et M6 ont été dosés par spectrométrie de masse de type MRM (Multiple Reaction Monitoring) à différents temps d'incubation (30 min, 6h et 24h).

Les principaux résultats acquis sont les suivants :

- Absence d'impact de l'ivacaftor sur la croissance bactérienne de *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*.
- Absence de métabolisation de l'ivacaftor et de ses métabolites incubés dans les milieux de culture BHI et M9 en l'absence de bactérie.
- Métabolisation de l'ivacaftor selon une cinétique et un niveau qui semblent différents selon les espèces étudiées. Étant donné les différences observées entre les concentrations des métabolites M1 et M6 mesurées au cours du temps, ces différences pourraient s'expliquer par des voies de métabolisation propres à chaque espèce bactérienne.

Cette étude pilote a démontré la faisabilité du protocole expérimental mis en place et consolidé les liens de partenariat entre l'équipe Microbiota-UMR 1078 et celle du Dr E. Schneider.

## Discussion et conclusions

Perspectives :

Avec cette étude, nous espérons pouvoir développer une prise en charge individuelle du patient en comprenant mieux les facteurs microbiens qui conditionnent l'efficacité des traitements modulateurs du CFTR. Cela permettra une meilleure adaptation de ces traitements afin d'augmenter leur taux de succès.

## Références

1. Héry-Arnaud G., Boutin S., Cuthbertson L., J Elborn S., M Tunney M. The lung and gut microbiome: what has to be taken into consideration for cystic fibrosis? *J Cyst Fibros.* 2019 Jan;18(1):13-21
2. Zemanick ET, Wagner BD, Robertson CE, et al. Airway microbiota across age and disease spectrum in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2017; 50: 1700832
3. Alice Françoise and Geneviève Héry-Arnaud The Microbiome in Cystic Fibrosis Pulmonary Disease. *Genes* 2020, 11, 536; doi:10.3390/genes11050536
4. Heijerman, H.G.M.; McKone, E.F.; Downey, D.G.; Van Braeckel, E.; Rowe, S.M.; Tullis, E.; Mall, M.A.; Welter, J.J.; Ramsey, B.W.; McKee, C.M.; et al. Efficacy and safety of the elexacaftor plus tezacaftor plus ivacaftor combination regimen in people with cystic fibrosis homozygous for the F508del mutation: A double-blind, randomised, phase 3 trial. *Lancet* 2019, 394, 1940–1948.
5. David P. Nichols, Alex C. Paynter, Sonya L. Heltshe, Scott H. Donaldson, Carla A. Frederick, Steven D. Freedman, Daniel Gelfond, Lucas R. Hoffman<sup>1</sup>, Andrea Kelly, Michael R. Narkewicz, Jessica E. Pittman, Felix Ratjen, Margaret Rosenfeld, Scott D. Sagel, Sarah Jane Schwarzenberg, Pradeep K. Singh, George M. Solomon, Michael S. Stalvey, John P. Clancy, Shannon Kirby, Jill M. Van Dalfsen, Margaret H. Kloster, and Steven M. Rowe; for the PROMISE Study Group. Clinical Effectiveness of Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor in People with Cystic Fibrosis A Clinical Trial. *Am J Respir Crit Care Med* Vol 205, Iss 5, pp 529–539, Mar 1, 2022
6. N Mayer. Hamblett, ET Zemanick, K Oden. Davis, D VanDevanter, M Warden, SM Rowe, J Young, MW Konstan, for-the-CHEC-SC-Study-Group. Characterizing CFTR modulated sweat chloride response across the cf population: Initial results from the CHEC-SC study. *Journal of Cystic Fibrosis* 10.1016/j.jcf.2022.07.008
7. Lutful Kabir, F.; Ambalavanan, N.; Liu, G.; Li, P.; Solomon, G.M.; Lal, C.V.; Mazur, M.; Halloran, B.; Szul, T.; Gerthoffer, W.T.; et al. MicroRNA-145 Antagonism Reverses TGF-beta Inhibition of F508del CFTR Correction in Airway Epithelia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*
8. Paul D.W. Eckford, Jacqueline McCormack, Lise Munsie, Gengming He, Sanja Stanojevic, Sergio L. Pereira, Karen Ho, Julie Avolio, Claire Bartlett, Jin Ye Yang, Amy P. Wong, Leigh Wellhauser, Ling Jun Huan, Jia Xin Jiang, Hong Ouyang, Kai Du, Michelle Klinge, Lianna Kyriakopoulou, Tanja Gonska, Theo J. Moraes, Lisa J. Strug, Janet Rossant, Felix Ratjen, Christine E. Bear. The CF Canada-Sick Kids Program in individual CF therapy: A resource for the advancement of personalized medicine in CF. *Journal of Cystic Fibrosis* 18 (2019) 35–43
9. Zehra Esra Ilhan, Patricia Lepage. Microbiotes, réponse aux traitements et métabolisme des médicaments. *La revue des microbiotes*, numéro 19, Mars 2021.
10. Anukriti Sharma, Mary M. Buschmann, Jack A. Gilbert. Pharmacomicrobiomics: The Holy Grail to Variability in Drug Response? *Pharmacogenetics Pharmacogenomics*, Volume 106, Issue 2, August 2019
11. Haiser HJ, et al. Predicting and manipulating cardiac drug inactivation by the human gut bacterium *Eggerthella lenta*. *Science*. 2013;341:295-8.
12. Leardini, D.; Venturelli, F.; Baccelli, F.; Cerasi, S.; Muratore, E.; Brigidi, P.; Pession, A.; Prete, A.; Masetti, R. Pharmacomicrobiomics in Pediatric Oncology: The Complex Interplay between Commonly Used Drugs and Gut Microbiome. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 15387. <https://doi.org/10.3390/ijms232315387>
13. Mariam Reyad Rizkallah, Rama Saad and Ramy Karam Aziz. The Human Microbiome Project, Personalized Medicine and the Birth of Pharmacomicrobiomics. *Current Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. Volume 8, Issue 3, 2010.

14. De Lisle, R.C.; Borowitz, D. The Cystic Fibrosis Intestine. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2013, 3, a009753.
15. Howlett, C.; Ronan, N.J.; NiChroinin, M.; Mullane, D.; Plant, B.J. Partial restoration of pancreatic function in a child with cystic fibrosis. *Lancet Respir. Med.* 2016, 4, e21–e22.
16. Zimmermann M, Zimmermann-Kogadeeva M, Wegmann R, Goodman AL. Separating host and microbiome contributions to drug pharmacokinetics and toxicity. *Science* (80- ). 2019. doi:10.1126/science.aat9931
17. Claudie Lamoureux, Charles-Antoine Guilloux, Clémence Beauruelle, Stéphanie Gouriou, Sophie Ramel, Anne Dirou, Jean Le Bihan, Krista Revert, Thomas Ropars, Rosyne Lagrèfeuille, Sophie Vallet, Rozenn Le Berre, Emmanuel Nowak & Geneviève Héry-Arnaud . An observational study of anaerobic bacteria in cystic fibrosis lung using culture dependant and independent approaches. *Scientific reports.* (2021) 11:6845
18. Elena K. Schneider, Felisa Reyes-Ortega, John W. Wilson, Tom Kotsimbos, Dominic Keating, Jian Li, and Tony Velkov. Development of HPLC and LC-MS/MS methods for the analysis of ivacaftor, its major metabolites and lumacaftor in plasma and sputum of cystic fibrosis patients treated with ORKAMBI or KALYDECO *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2016 December 01; 1038: 57–62
19. Felisa Reyes-Ortega, Fiona Qiu, and Elena K. Schneider-Futschik. Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry for the Drug Monitoring of Ivacaftor, Tezacaftor, and Elexacaftor Treatment Response in Cystic Fibrosis: A High-Throughput Method. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* 2020, 3, 987–996

***Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose***

**BOUSSERRHINE Yasmine**

**IMPACT DE L'ENVIRONNEMENT (TABAGISME PASSIF) CHEZ LES PATIENTS PEDIATRIQUES ATTEINT DE MUCOVISCIDOSE**

Yasmine Bousserhine, Michelle Leemans

Ralph Epaud

- Dr. Michelle LEEMANS , Postdoctoral research fellow, Clinical Epidemiology & Aging, Université Paris-Est Créteil
- Pr Ralph Epaud, Responsable du Centre de Référence des Maladies Respiratoires Rares-RespiRare-Site Créteil et du Centre de Ressources et de Compétences pour la Mucoviscidose, INSERM U955 (IMRB), équipe GEIC2O
- Yasmine BOUSSERRHINE, Faculté de médecine Sorbonne-Université, Paris

**Objectifs**

Description clinique des patients atteints de mucoviscidose et impact du tabagisme passif chez ces patients

**Matériels et méthodes**

Inclusion de patients entre 6 et 21 ans à partir du registre de Vaincre la Mucoviscidose

Analyse statistique, avec description clinique des patients qui sont divisés en cinq clusters selon leur présentation clinique

Evaluation du taux de tabagisme passif chez ces patients

**Résultats**

Division des patients en 5 clusters selon leur présentation clinique sur le plan respiratoire

Description de ces différents clusters

Tendance à une exposition au tabagisme passif plus important chez les patients les plus sévères sur le plan respiratoire

**Discussion et conclusions**

Comme toute pathologie respiratoire, il est nécessaire de prendre en considération le tabagisme passif chez ces patients, qui pourrait notamment avoir un impact sur l'évolution de la fonction respiratoire.

Résultats non significatifs, qui seront à réévaluer après avoir inclus tous les patients atteints de mucoviscidose (pour le moment, non n'avons pas l'accès à toutes les données du registre Vaincre la Mucoviscidose).

**Références**

*Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose*



## CHABLE DE LA HERONNIERE François

### ETUDE DE L'INTERACTOME DU PCNA DES NEUTROPHILES DE PATIENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE : CARACTERISATION PROTEOMIQUE, METABOLOMIQUE ET EFFETS DES NOUVEAUX TRAITEMENTS MODULATEURS DE CFTR

François Chable de la Héronnière<sup>1,2</sup>, Giovanni Saraceni-Tasso<sup>1</sup>, Lucie Pesenti<sup>1</sup>, Pierre-Régis Burgel<sup>2</sup> et Véronique Witko-Sarsat<sup>1</sup>

1. Institut Cochin, Inserm U1016, CNRS UMR8104, Université Paris-Cité, Paris, France

2. Service de Pneumologie & Centre de Référence Maladies Rares Mucoviscidose, site coordonnateur, Hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris-Centre & Université de Paris-Cité, Paris, France

#### Objectifs

La mucoviscidose est une maladie à composante respiratoire causée par des mutations dans le gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). La dysfonction de CFTR engendre une accumulation de mucus respiratoire excessivement épais obstruant les voies aériennes. Ceci favorise les infections et l'entretien d'une inflammation bronchique délétère, dominée par les neutrophiles et conduisant à une altération des fonctions respiratoires. Les neutrophiles des patients malades ont un profil altéré, avec une survie accrue et des mécanismes antimicrobiens défectueux, ainsi qu'un défaut de maturation et un profil inflammatoire. De précédentes études sur le Kaftrio, nouveau traitement modulateur de CFTR apportant un bénéfice clinique majeur, ont montré que ce dernier impacte le phénotype des neutrophiles et normalise leur nombre et leur survie. Les données actuelles de recherche suggèrent également que ce traitement ait un effet sur l'expression et l'interactome de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), facteur anti-apoptotique clé dans la régulation des voies d'activation et survie des neutrophiles. Cependant l'effet du Kaftrio sur les neutrophiles et les mécanismes sous-jacents restent à ce jour peu décrits. L'objectif de ce projet de thèse est de caractériser au niveau protéomique et métabolomique l'effet de ce traitement sur les neutrophiles de patients atteints de mucoviscidose en s'intéressant également à PCNA et son interactome.

#### Matériels et méthodes

Nous disposons de culots secs et cytosols de neutrophiles de patients atteints de mucoviscidose conservés AVANT et APRES initiation du traitement Kaftrio, ainsi que des neutrophiles de donneurs sains de l'Établissement Français du Sang (EFS). Nous caractériserons et comparerons entre les patients avant et après initiation du traitement Kaftrio et des donneurs sains de l'EFS, le métabolome des neutrophiles circulants par analyse chromatographique ainsi que leur protéome global et interactome de PCNA par spectrométrie de masse précédée ou non de co-immunoprécipitation de PCNA. Les potentiels interactants identifiés pourront être validés par des techniques conventionnelles (ELISA, Western-Blot, Proximity Ligation Assay, immunofluorescence). Certains pourront être recherchés dans le plasma des patients, également conservés avant et après initiation du traitement.

#### Résultats

\*

#### Discussion et conclusions

Ce projet nous permettrait de mieux caractériser l'effet du Kaftrio sur les neutrophiles de patients mucoviscidosiques. Nous pourrions également identifier des mécanismes clés d'activation et survie des neutrophiles associés ou non à PCNA, modulés ou non par le traitement Kaftrio et qui pourraient être ciblés par une approche thérapeutique complémentaire, également identifier de potentiels nouveaux marqueurs sanguins de réponse à ce traitement. Cette étude permettrait de considérer davantage PCNA comme cible de stratégie thérapeutique anti-inflammatoire dans ce contexte pathologique et envisager de nouvelles thérapies complémentaires de la correction de CFTR.

#### Références

***Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose***

COSTES Floriane

## INFECTION PERSISTANTE A PSEUDOMONAS AERUGINOSA CHEZ LE ZEBRAFISH : REPONSE INFLAMMATOIRE ASSOCIEE ET ETUDE DANS UN MODELE MUCOVISCIDOSE

Floriane Costes, Flore NILLY, Stéphane PONT, Audrey BERNUT, Anne BLANC POTARD  
Laboratory of Pathogen and Host Immunity (LPHI), équipe interaction hôte-bactérie et stratégies anti-infectieuses,  
Université de Montpellier. Montpellier, France

### Objectifs

Dans de précédents travaux réalisés au sein de notre équipe, un modèle d'infection persistante à *P. aeruginosa* a été établi chez l'embryon de zebrafish. Ce dernier possède des caractéristiques uniques pour l'étude des interactions hôte-pathogène grâce à la possibilité d'imagerie in vivo en temps réel et à de nombreux outils génétiques. L'étude d'isolats cliniques issus de patients atteints de mucoviscidose a permis de montrer que certains isolats cliniques persistent au sein de l'hôte sans induire de mortalité, alors que d'autres isolats testés sont totalement éradiqués en deux ou trois jours. Ces résultats ont pu être transposés dans un modèle d'infection chronique chez la souris dans le cadre d'une collaboration.

Un des objectifs de mon projet de thèse est de mieux caractériser l'interaction hôte-pathogène sous-jacente à la persistance de *P. aeruginosa* dans le modèle zebrafish, d'une part en se plaçant dans un contexte mucoviscidose, et, d'autre part en évaluant la réponse inflammatoire associée.

### Matériels et méthodes

Mon travail se base sur des souches cliniques déjà bien caractérisées dans un modèle d'immersion d'embryons blessés. Afin de mimer un contexte mucoviscidose, nous utilisons une lignée de zebrafish CFTR +/- établie, pour obtenir une progéniture CFTR -/- sur laquelle nous réalisons nos expériences. Nous pouvons également utiliser une autre approche, basée sur l'injection de morpholino qui bloquent l'expression du gène CFTR, qui permet de travailler avec différentes lignées transgéniques. La capacité des souches à persister au sein de l'hôte est évaluée par dénombrement (CFU) et des analyses en microscopie à fluorescence sont effectuées pour localiser les bactéries persistantes. L'étude de la réponse inflammatoire de l'hôte est permise grâce par l'utilisation d'une lignée de zebrafish rapportrice permettant de suivre l'expression de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 $\beta$  par fluorescence. L'expression plus globale des acteurs de l'inflammation sera évaluée par q-RT-PCR.

### Résultats

Dans le cadre des expériences réalisées jusqu'à présent, le contexte mucoviscidose mimé par la mutation CFTR ou les morpholino ne montre pas d'impact significatif sur l'infection par les souches de *P. aeruginosa* testées (virulence et charge bactérienne). Cette étude est actuellement étendue à d'autres souches et est complétée par des études avec une autre route d'infection par microinjection.

### Discussion et conclusions

La blessure des embryons réalisée juste avant l'infection par immersion est connue pour induire une inflammation, qui pourrait masquer l'impact de la mutation CFTR sur l'infection. C'est pourquoi nous testons un autre mode d'infection, par microinjection, moins inflammatoire, pour évaluer l'impact du contexte mucoviscidose. Sur la base de nos résultats, il apparaît particulièrement pertinent de mieux comprendre le rôle de la réponse inflammatoire dans l'établissement d'une infection persistante à *P. aeruginosa* dans ce modèle.

### Références

*Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose, Association Grégory Lemarchal, Ecole doctorale CBS2 de Montpellier*

**DERRIEN Julie**

## **ETUDE DE LA SURVIE DES PATIENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE AU NIVEAU REGIONAL ET NATIONAL PAR DIFFERENTES APPROCHES STATISTIQUES**

Julie Derrien<sup>1</sup>, Virginie Scotet<sup>1</sup> ; Carine L'Hostis<sup>1</sup>

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

### **Objectifs**

La survie des patients atteints de mucoviscidose a considérablement augmenté au cours des dernières décennies, la médiane de survie prédite dépassant 50 ans dans la population d'origine européenne. Ces progrès sont attribuables à la standardisation et l'intensification des soins, au diagnostic précoce via le dépistage néonatal, ... et récemment à l'avènement de nouveaux traitements (les modulateurs de CFTR).

Toutefois, l'interprétation des données de survie demeure complexe car il existe plusieurs indicateurs de survie fournissant des résultats différents. Cela résulte de l'existence de deux types de registres, l'un traitant des cas prévalents (cas présents dans une population à un moment donné), et l'autre des cas incidents (nouveaux cas apparus dans une population au cours d'une période donnée), ce qui engendre l'utilisation de méthodes d'analyse de survie différentes.

L'objectif de la thèse est donc d'étudier la survie des patients atteints de mucoviscidose en utilisant deux registres, l'un national et l'autre régional, et en appliquant les méthodes d'analyse les plus pertinentes.

### **Matériels et méthodes**

Il s'agira :

A partir du registre breton constitué de 800 patients nés en Bretagne depuis 1970 (cas incidents) :

1) d'étudier la survie de manière longitudinale à l'aide de la méthode de Kaplan-Meier et de modèles de Cox. Ces approches permettent de générer des courbes de survie par cohorte de naissance (1970-79, ...), d'estimer des probabilités de survie à un âge donné (ex : 30 ans) et d'estimer les médianes de survie réelles (âge auquel la moitié des patients d'une cohorte est décédée).

2) d'appliquer un modèle de vieillissement accéléré pour les cohortes récentes (pour lesquelles moins de la moitié des patients sont décédés et où la médiane de survie ne peut donc pas être estimée). Ce type de modèle a la capacité de prolonger les courbes au-delà de la période de suivi, permettant ainsi de prédire la médiane de survie.

A partir du Registre Français de la Mucoviscidose constitué de 7 500 patients suivis en France (cas prévalents) :

1) d'étudier la survie de manière transversale grâce au modèle de Cox à entrée retardée qui prend en compte la durée depuis laquelle les patients sont entrés dans le registre. Ce type de modèle permet d'estimer la médiane de survie prédite.

2) de prédire la médiane de survie prédite conditionnelle au fait d'avoir survécu à un âge donné (ex : 30 ans), un indicateur très pertinent pour les patients ayant dépassé l'âge prédit à la naissance.

3) d'étudier la survie de manière longitudinale pour les patients nés depuis la mise en place du Registre en 1992.

4) de décrire la cohorte des longs survivants ( $\geq 50$  ans) et d'analyser comment elle a évolué.

5) de rechercher les facteurs prédictifs d'une meilleure survie, en étudiant notamment l'effet des modulateurs de CFTR.

### **Résultats**

Ayant commencé ma première année de doctorat le 1er Novembre, aucun résultat n'est disponible à ce stade précoce de ma recherche.

## **Discussion et conclusions**

Les retombées attendues de cette thèse sont de fournir des estimations de survie récentes et personnalisées, cruciales pour les patients et leurs familles. Ces estimations seront utiles pour la planification des soins et le développement de nouvelles thérapies, contribuant ainsi à améliorer les décisions cliniques et les politiques de santé. Les résultats devraient également contribuer à évaluer l'impact des modulateurs sur la survie des patients atteints de mucoviscidose.

## **Références**

*Ce projet est financé par : Inserm et région Bretagne*

DUPUIS Gabrielle

## ROLE DE LA TOXINE EXOY DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA DANS L'INFECTION DES CELLULES PULMONAIRES

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 retrouvée chez près de 50% des patients CF adultes, où elle est responsable d'infections respiratoires chroniques, et sa présence est corrélée à la survie des patients.

*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. Dans les cellules, ces toxines se lient à leur co-activateur eucaryote pour initier leur activité enzymatique, entraînant une perturbation du fonctionnement cellulaire et favorisant la survie et la prolifération de la bactérie. Chez *P. aeruginosa*, 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 l'actine filamenteuse [2], et induit l'accumulation de nucléotides monophosphates cycliques (cNMP), avec une préférence pour le cGMP.

Alors que le rôle des autres toxines du T3SS est bien caractérisé, le rôle de ExoY dans la virulence de *P. aeruginosa* n'a pas encore été clairement élucidé.

### Matériels et méthodes

En utilisant des modèles de cellules épithéliales bronchiques primaires cultivées à l'interface air-liquide, nous étudions l'impact de ExoY sur la physiologie cellulaire pendant l'infection. Nous avons d'abord mis au point l'infection dans ce modèle, en étudiant différents paramètres : résistance transépithéliale, synthèse de cGMP et réponse inflammatoire (expression et sécrétion de cytokines). Puis, afin d'identifier l'ensemble des voies moléculaires modulées par ExoY, nous avons réalisé une analyse RNAseq sur des cellules de donneurs sains infectées par différentes souches de *P. aeruginosa*, exprimant ou non ExoY.

### Résultats

Nous avons sélectionné deux temps d'infection, 4h et 8h, où la synthèse de cGMP – caractéristique de l'activité de ExoY – et la réponse inflammatoire sont augmentées, et où l'épithélium est toujours intègre ou non, respectivement.

L'analyse RNAseq est en cours de traitement et nous attendons les résultats pour début 2024.

### Discussion et conclusions

Une meilleure compréhension du rôle et du mécanisme d'action de ExoY lors d'une infection des voies respiratoires par *P. aeruginosa* permettra de mieux comprendre la pathogénicité de la bactérie et d'expliquer comment ce pathogène peut facilement survivre et proliférer dans les poumons.

### 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***

FELGEROLLE Chloé

## CONCEPTION D'OLIGONUCLEOTIDES BLOQUEURS POUR CORRIGER L'EFFET DE MUTATIONS INTRONNIQUES PROFONDES DU GENE CFTR.

Chloé Felgerolle, Karine Deletang, Magali Taulan-Cadars  
Phymedexp, Inserm U1046, CNRS UMR 9214, Université de Montpellier

### Objectifs

La majorité des patients CF porteurs de mutations affectant les mécanismes d'épissage n'est pas éligible aux modulateurs de CFTR. Les mutations d'épissage représentent environ 12% des mutations du gène CFTR. Actuellement, nos travaux de recherche se concentrent spécifiquement sur 10 mutations introniques profondes qui, en renforçant ou créant un site donneur ou accepteur d'épissage, induisent des épissages aberrants lors de la maturation du pré-ARNm CFTR, ce qui aboutit le plus fréquemment à l'inclusion d'un pseudo-exon dans l'ARNm produit. Pour bloquer spécifiquement les effets de ces mutations introniques profondes, nous avons conçu des oligonucléotides antisens bloqueurs (Target Site Blockers, TSB) qui se lient aux pré-ARNm CFTR.

### Matériels et méthodes

Les TSB propres à chaque mutation sont évalués in vitro sur une lignée de cellules bronchiques Beas transfectées avec des minigènes, i.e. des plasmides contenant les séquences introniques sauvages (WT) ou mutées. L'efficacité de ces oligonucléotides est quantifiée par RT-PCR en mesurant leur capacité à empêcher l'inclusion des pseudo-exons, et donc à permettre l'expression d'ARNm de taille identique à ceux transcrits en conditions WT.

### Résultats

Cette stratégie oligonucléotidique s'est révélée efficace dans le cas de mutations telles que c.1680-883A>G, c.1680-886A>G, c.3469-1304C>G, c.3874-4522A>G et c.1585-9412A>G, avec une augmentation de 20 à 60% du taux d'ARNm de taille normale. Ces résultats encourageants nous portent maintenant à optimiser les TSB pour augmenter leur efficacité à générer une large proportion d'ARNm CFTR WT, en améliorant leur capacité à se fixer de manière stable sur le pré-ARNm ciblé, mais aussi leur taux d'internalisation, ainsi que minimiser leur toxicité. Pour ce faire, nous agissons sur la composition des nucléotides constitutifs des TSB en y apportant des modifications chimiques. Nos expériences actuelles consistent à faire varier la proportion de nucléotides modifiés et leurs positions dans les TSB, pour différentes modifications chimiques (Locked Nucleic Acid, LNA ; O-Methoxyethyl, OME ; O-Methyl, OM). Les résultats préliminaires montrent une efficacité similaire pour les TSB-LNA en diminuant le nombre de nucléotides modifiés. Cependant, étant donné le nombre de modifications à tester, et le système d'évaluation par RT-PCR étant fastidieux, nous avons développé de nouveaux minigènes contenant la séquence du gène de la Luciférase dont la séquence codante est interrompue par la séquence intronique CFTR à étudier. La protéine luciférase ne sera ainsi exprimée qu'à condition d'un épissage normal de l'intron à évaluer. Ces plasmides permettront un screening plus rapide des séquences nucléotidiques que nous concevons afin de les optimiser pour chaque mutation intronique étudiée.

### Discussion et conclusions

La conception d'oligonucléotides bloqueurs est une stratégie qui semble efficace pour une large majorité de mutations introniques profondes.

### Références

*Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose*



**FOUBERT Maëlle**

## IDENTIFICATION DES MECANISMES DE RESISTANCE AUX MYCOBACTERIOPHAGES

Foubert Maëlle, /  
IRIM, CNRS de Montpellier

### Objectifs

A l'heure de la résistance aux antibiotiques, de nouvelles cibles thérapeutiques sont à envisager. C'est le cas de la phagothérapie qui a été utilisée à titre compassionnel chez des patients atteints de la mucoviscidose, et infectés par *M. abscessus* et dont le traitement antibiotique ne fonctionnait pas. Cependant, il existe également une résistance aux mycobactériophages, dont les mécanismes ne sont pas encore tous connus.

Il a été montré par Wetzel et al., 2023 que les Tréhaloses Polyphléates (TPP), des lipides présents chez les mycobactéries, sont impliqués dans le mécanisme de résistance de *M. abscessus* vis-à-vis des mycobactériophages d'intérêt thérapeutique BPs et Muddy. En effet, les souches devenant résistantes à BPs ou Muddy cessent de produire les TPP, rendant le phage inefficace, suggérant que les TPP agissent comme récepteur du phage à la surface de la bactérie. Pourtant, certaines souches exprimant toujours les TPP sont également résistantes aux phages, ce qui suggère que la voie des TPP n'est pas la seule voie impliquée dans la résistance aux phages.

Un premier objectif est donc d'identifier les mécanismes de résistance des mycobactéries, autre que la voie des TPP, vis-à-vis de mycobactériophages, présentant un intérêt thérapeutique. L'étude est réalisée dans un premier temps sur *M. smegmatis*, puis les gènes identifiés comme impliqués dans la résistance de *M. smegmatis* seront testés chez *M. abscessus*. En parallèle, un autre objectif serait d'élargir le répertoire de phage à intérêt thérapeutique contre *M. abscessus*.

### Matériels et méthodes

Identification des mécanismes de résistance : à partir d'une banque transpositionnelle chez *M. smegmatis*, une sélection de mutants résistants au phage BPs et exprimant les TPP est réalisée. Puis s'en suit une identification des gènes dans lequel le transposon s'est inséré par analyse bio-informatique, ensuite confirmé par PCR. Puis, des complémentations sont prévues pour confirmer le rôle du gène identifié dans la résistance au phage.

### Résultats

Les premiers résultats nous ont permis de montrer que le transposon s'est inséré dans le gène *mshC* de *M. smegmatis*, qui est impliqué dans la synthèse du mycothiol. C'est une cible intéressante car d'après l'étude de Xu et al., 2011, les mutations dans la voie de synthèse du mycothiol engendrent une augmentation de la résistance à certains antibiotiques. D'autres gènes ont été identifiés et sont toujours à l'étude.

### Discussion et conclusions

Les perspectives envisagées sont dans un premier temps de confirmer le phénotype de résistance aux antibiotiques de *mc<sup>2</sup>155(Tn:mshC)*, puis de réaliser un mutant de délétion de *mshC*, et tenter de comprendre les mécanismes impliqués qui permettent la résistance à BPs. Ensuite, il faudra évaluer si ce gène est également impliqué dans la résistance à BP chez *M. abscessus*.

En parallèle, continuer l'étude de la banque transpositionnelle pour continuer d'identifier les gènes pouvant être responsables de la résistance aux phages.

### Références

*Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose*

HAMON Laurine

## L'ADIPOSITE DE LA MOELLE OSSEUSE POURRAIT JOUER UN ROLE CLE DANS LA PATHOLOGIE OSSEUSE LIEE A LA MUCOVISCIDOSE

Dumortier C1-2, Hamon L1, Sergheraert J1-3, Ouhamou M1, Piot O4, Buache E4, Goffin N4, Chauveau C5, Gangloff S1, Al Alam D2, Marie-Laure Jourdain1-3, Velard F1

1 – Université de Reims Champagne-Ardenne, EA 4691 BIOS « Biomatériaux et Inflammation en site Osseux », Reims, France

2 – The Lundquist Institute, Harbor-UCLA Medical Center, Torrance, CA, USA

3 – CHU de Reims, Service de Médecine Bucco-Dentaire, Hôpital Maison Blanche, Reims, France

4 – Université de Reims Champagne-Ardenne EA 7506 BioSpeCT, Reims, France

5 – Université du Littoral Côte d'Opale, ULR 4490 MabLab, Boulogne-sur-mer, France

### Objectifs

La maladie osseuse liée à la mucoviscidose concerne 50% des patients atteints de mucoviscidose (CF), chez qui une altération de la formation et de la maturation osseuse a été mise en évidence, mais reste mal comprise (Velard, 2014). Les ostéoblastes obtenus à partir de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) de patients présentent un phénotype altéré par rapport aux cellules dérivées de donneurs sains, couplé à un niveau plus élevé de PPARG (facteur adipogénique). Dans de nombreuses pathologies érosives osseuses, il existe une relation inverse entre une faible densité minérale osseuse et un taux accru d'adiposité médullaire (Rozman, 1989 ; Verma, 2002 ; Zhou, 2008 ; Piccinin, 2014).

L'hypothèse émise serait donc que les mutations du gène CFTR mèneraient à une orientation préférentielle des cellules souches squelettiques de moelle osseuse (CSSMO) vers une différenciation adipocytaire, au détriment de l'ostéoblastogenèse. Aujourd'hui, la question de l'adiposité médullaire impliquant un déséquilibre de l'homéostasie osseuse chez les patients atteints par la mucoviscidose n'a pas encore été étudiée.

L'objectif de ce travail est d'investiguer l'impact d'un défaut de fonction du canal CFTR dans le processus de différenciation adipogénique.

### Matériels et méthodes

Les CSSMO de patients non CF ont été différenciées pendant 21 jours en adipocytes avec ou sans inhibiteurs pharmacologiques de CFTR (INH172 et BPO27). Des colorations (Oil Red O, Bodipy) et immunomarquages en fluorescence (Perilipine, FABP4 et PPARG) ont été effectués. La microspectroscopie RAMAN a été utilisée afin d'évaluer la teneur en lipides. Des analyses MicroCT de souris F508delCFTR âgées de 10 semaines ont été réalisées pour mettre en évidence le niveau d'adiposité médullaire et la microarchitecture tibiale des animaux.

### Résultats

Tout d'abord, nous avons observé l'accumulation de vésicules lipidiques et l'expression des protéines marqueurs de l'adipogénèse dans les CSSMO traitées avec l'inhibiteur de CFTR : INH172, à l'instar du BPO27. Les vésicules lipidiques retrouvées lors de l'ajout d'INH172 étaient 50% plus grosses par rapport au milieu sans inhibiteur (n=6 donneurs, p<0,05). FABP4, transporteur lipidique présent dans les adipocytes, a été localisé préférentiellement à la membrane cellulaire sous l'effet des inhibiteurs de CFTR. De plus, lors de la différenciation adipocytaire des CSSMO traitées à l'INH172, les analyses RAMAN indiquent un degré de saturation élevé du contenu lipidique.

Enfin, chez les souris F508delCFTR (n=4), le pourcentage d'adiposité médullaire dans le tibia est supérieur comparé aux souris sauvages et la microarchitecture de l'os est altérée avec une fraction minérale osseuse diminuée chez les souris CF.

### Discussion et conclusions

Ces données indiquent qu'il y aurait bien une corrélation potentielle entre la perte de fonction de CFTR et le métabolisme lipidique, et que ce dernier pourrait jouer un rôle dans le trouble de l'homéostasie osseuse chez les patients atteints de mucoviscidose.

In fine, comprendre la formation et le rôle des adipocytes dans le maintien de l'homéostasie osseuse permettrait de trouver de potentielles stratégies thérapeutiques restaurant un statut osseux satisfaisant chez les patients, mais pourrait également s'élargir à un éventail de personnes souffrant de diverses pathologies érosives osseuses.

### **Références**

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

Rozman C, et al. Age-related variations of fat tissue fraction in normal human bone marrow depend both on size and number of adipocytes: a stereological study. *Exp Hematol*. 1989, 17(1):34-7.

Velard F, et al. Cystic fibrosis and bone disease: defective osteoblast maturation with the F508del mutation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014, 189(6):746-8.

Verma S, et al. Adipocytic proportion of bone marrow is inversely related to bone formation in osteoporosis. *J Clin Pathol*. 2002 Sep;55(9):693-8.

Zhou S, et al. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell*. 2008, 7(3):335-43.

***Ce projet est financé par : Région Grand-Est et Grand-Reims***

LYKO Camille

**PROFILE INFLAMMATOIRE DES CELLULES EPITHELIALES BRONCHIQUES HUMAINES MUCOVISCIDOSIQUES EN REPONSE A LA CORRECTION DE LA FONCTION DU CFTR : CORRECTEURS VERSUS EXPRESSION GENIQUE**

Camille LYKO, Amal Kouadri, Johanna Cormenier, Nadia Alfaïdy, et Mohamed Benharouga  
Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), IRIG-Biosanté INSERM U1292, Grenoble, France.  
Université Grenoble-Alpes (UGA), Grenoble, France.

**Objectifs**

Comparer la réponse inflammatoire des cellules humaines bronchiques homozygotes pour la mutation delF508 après correction pharmacologique ou après expression du CFTR sauvage.

**Matériels et méthodes**

Nous avons utilisé trois lignées cellulaires bronchiques humaines (HBE). Normales (HBE), homozygotes pour delF508 (CFBE) et CFBE corrigées par la surexpression de la protéine CFTR sauvage (CFBE-WT). Pour tester l'effet de la correction pharmacologique, nous avons sélectionné six molécules: le curcumin, la génistéine, le 4-phenylbutyrate de sodium (4-PBA), VX809 et le miglustat. Les réponses inflammatoires (IL1 $\beta$ , IL6, IL8, IL10, IL17A, E, F, et TNF $\alpha$ ) ont été mesurées par les tests ELISA dans le milieu de culture et dans les extraits protéiques.

**Résultats**

Nous avons démontré que seule la molécule Miglustat et la surexpression du CFTR sauvage, stratégie utilisée pour restaurer la sécrétion des ions Cl<sup>-</sup>, corrigent de façon partielle le degré d'inflammation des cellules CFBE.

**Discussion et conclusions**

Nos résultats suggèrent que les défauts d'adressage de la protéine CFTR pourraient contribuer à l'inflammation associée à la maladie, mais n'en seraient pas la cause unique. D'autres études sont nécessaires pour mieux décrypter le mécanisme de l'inflammation associée à la mucoviscidose

**Références**

*Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose*

## MARTIN-SERRANO ORTIZ Ángela

### UNE APPROCHE DEUX-EN-UN POUR LUTTER CONTRE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Ángela Martín-Serrano Ortiz, Olivier Renaudet

1. Département de Chimie Moléculaire (DCM), Université Grenoble-Alpes (UGA), Grenoble

#### Objectifs

Cette étude vise à développer des stratégies alternatives aux antibiotiques pour lutter contre l'infection par des souches de *Pseudomonas aeruginosa* multirésistantes en utilisant une approche "deux-en-un" basée sur des molécules hybrides capables d'induire : (i) un effet antiadhésif pour inhiber l'interaction de la bactérie avec les cellules hôtes épithéliales et la formation de biofilms et ainsi éviter les infections ; et (ii) un effet stimulant le système immunitaire via les anticorps présents naturellement dans le sérum humain pour favoriser la clairance bactérienne à médiation immunologique.

#### Matériels et méthodes

Nous synthétiserons des molécules bifonctionnelles (ARG) combinant deux parties : (i) une partie ciblant les lectines LecA et LecB de *Pseudomonas aeruginosa* (TBT) pour éviter l'infection des cellules hôtes et la formation de biofilms, et (ii) une partie redirigeant les anticorps naturels contre le *Pseudomonas aeruginosa* (ABT), pour prévenir simultanément l'adhésion hôte-pathogène et favoriser la clairance bactérienne par activation du système immunitaire.

#### Résultats

On attend démontrer in vitro l'interaction des TBTs avec *Pseudomonas aeruginosa* et des ABTs sur les anticorps; démontrer la capacité des TBTs à inhiber la formation de biofilms et l'interaction de la bactérie avec les cellules hôtes et la capacité des ABTs à recruter des anticorps naturels; et démontrer l'activation de la réponse immunitaire conduisant à la mort bactérienne et identifier le mécanisme impliqué.

#### Discussion et conclusions

Les résultats attendus ne concernent pas seulement *Pseudomonas aeruginosa*, notre approche pourrait en effet être étendue à d'autres pathogènes affectant également les patients atteints de mucoviscidose. Nos composés pourraient contribuer à réduire la nécessité d'administrer des antibiotiques, soit en les remplaçant, soit en les associant, et ainsi aider à combattre l'émergence de résistances antimicrobiennes chez ces patients. Ils pourraient également être administrés en combinaison avec d'autres thérapies antimicrobiennes non conventionnelles afin d'augmenter leur efficacité.

#### Références

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

## MIENZANZAMBI Stecy

### MUCOVISCIDOSE: RECHERCHE DE TRAITEMENTS POUR UNE MUTATION NON-SENS (CFTR\_Y122X) ET EVALUATION DE L'IMPACT DE LA POLLUTION ATMOSPHERIQUE

S. Mienanzambi 1,2, B. Simonneau 1,2, S. Lanone 1,2, P. Fanen 1,2,3, B. Duriez 1,2

1 IMRB – INSERM-U955, Créteil, France

2 Université Paris-Est Créteil, Créteil, France

3 Service de génétique – Département génétique médicale, AP-HP, CHU - H. Mondor, Créteil, France

#### Objectifs

En France, 80% des patients atteints de mucoviscidose portent la mutation F508del (classe II/III) du gène CFTR et bénéficient depuis quelques années d'un traitement révolutionnaire, le Kaftrio®. Les autres patients (20%) portent des mutations pour lesquelles aucun traitement n'est disponible à ce jour. Le consortium DI-T-CAP, ClassFirstTheraRead étudie 4 mutations illustratives de la classe I, dont la mutation Y122X portée par 25% des patients de l'île de la Réunion (Classe Ia, mutation non-sens).

Les objectifs sont (1) d'introduire par la méthode de CRISPR/Cas-9 la mutation Y122X dans la lignée contrôle d'iPSC PCi-CAU2 ; (2) de caractériser et comparer les épithéliums bronchiques dérivés des iPSC normales et mutées cultivés à l'interface air-liquide (ALI); (3) de tester les molécules de translecture et de stabilisation des ARNm sélectionnées par criblage haut-débit par nos partenaires; (4) d'évaluer l'impact de la pollution de l'île de la Réunion sur nos cultures d'épithéliums bronchiques traités ou non.

#### Matériels et méthodes

1- Construction de la lignée PCi-CAU2 CFTR-Y122X

2- Différenciation des lignées PCi-CAU2 CFTR-WT et -Y122X en épithéliums bronchiques.

3- Caractérisation des types cellulaires composants l'épithélium en immunofluorescence (cellules ciliées, basales, sécrétrices, ionocytes et club), et évaluation des paramètres électrophysiologiques de la résistance (TEER) et du courant spécifique de CFTR (chambre de Ussing).

4- Evaluation de l'effet des molécules de translecture/stabilisation des ARNm par la mesure (1) de la quantité des transcrits ARNm de CFTR-Y122X (GeneScan), (2) de la fonction de CFTR-Y122X (chambre de Ussing et Forskolin Induce Swelling assay) et (3) de son expression (immunofluorescence et western-blots).

5- Evaluation de l'impact de la pollution de l'île de la Réunion (PolluRisk) avec et sans traitement aux molécules modulatrices avec les mêmes méthodes que précédemment, mais aussi par la mesure des cytokines inflammatoires (luminex®) et la modification du profil d'expression génique (RNAseq).

#### Résultats

La différenciation de la lignée PCi-CAU2 CFTR-WT s'est correctement déroulée : 80% des cellules se sont différenciées en endoderme définitif (Ckit+/CXCR4+). Le 1er tri en cytométrie a montré que 9,6% des cellules sont des progéniteurs pulmonaires (CD47<sup>high</sup>/CD26<sup>low</sup>). Le 2d tri a montré que 23,6% des cellules sont des cellules basales bronchiques (NGFR+/EpCAM+). Ces cellules ont formé un épithélium bronchique pseudo-stratifié en culture ALI. La TEER est non-différente de celle de culture de cellules souches adultes telles que les CENH CFTR-WT. L'évaluation par histologie montre la formation d'un tapis pseudo-stratifié polarisé présentant des cils. Les marquages en immunofluorescence révèlent la présence de cellules ciliées (acétyl-tubuline+), sécrétrices (MUC5AC+) et basales (KRT 5+).

#### Discussion et conclusions

Nos résultats démontrent que la lignée d'iPSC PCi-CAU2 peut se différencier en un épithélium bronchique qui possède une morphologie et des caractéristiques électro-physiologiques comparables à celles d'un épithélium dérivé de CENH. La construction de la lignée iPSC porteuse de la mutation CFTR-Y122X est en cours de réalisation en collaboration avec une équipe d'I-stem.

## Références

Hawkins et al.,2021

***Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose***

ROCHARD Camille

## ETUDE DE L'EFFET ANTIFONGIQUE DE ETD151 UN PEPTIDE ANTIMICROBIEN SUR ASPERGILLUS FUMIGATUS

C. ROCHARD1, J. BIGOT1,2, V. BALLOY1, C. HENNEQUIN1,2, J. GUITARD1,2

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

2 AP-HP, Inserm, Hôpital Saint-Antoine, Service de Parasitologie-Mycologie

### Objectifs

*Aspergillus fumigatus* (Af) est l'espèce fongique prédominante à l'origine d'aspergilloses pulmonaires. Les aspergilloses pulmonaires chroniques (APC) surviennent chez des patients ayant une pathologie pulmonaire sous-jacente (mucoviscidose...) et sont associées à une réduction des performances respiratoires ainsi qu'une mortalité élevée en l'absence de traitement. L'arsenal anti-aspergillaire est limité avec des molécules présentant des effets secondaires sévères ou des interactions médicamenteuses importantes. Par ailleurs, l'émergence récente de souches d'Af résistantes aux azolés est préoccupante. Dans ce contexte, les peptides antimicrobiens (PAM) apparaissent comme une approche thérapeutique prometteuse et une alternative aux antifongiques (ATF) conventionnels.

ETD151, un PAM, analogue d'une l'héliomicine de lépidoptère, a montré une activité ATF vis-à-vis du phytopathogène *Botrytis cinerea*, un champignon filamenteux comme Af, ciblant le glucosylcéramide (Glycer) de sa membrane. Notre objectif principal est de déterminer l'activité antifongique de ETD151 seul ou en synergie avec d'autres ATF vis-à-vis de souches cliniques d'Af sensibles et résistantes aux azolés, ainsi que son effet immunomodulateur sur des cellules épithéliales bronchiques (CEB).

### Matériels et méthodes

Des souches cliniques sensibles et résistantes (n=8) d'Af issues de patients présentant des APC ont été sélectionnées. Les activités antifongiques de ETD151 et des combinaisons ATF itraconazole ou caspofungine avec le peptide ont été évaluées par mesure de l'activité métabolique des spores grâce à un test à la résazurine. Des études de compétition avec des Glycer ont été réalisées afin de déterminer la cible de ETD151 chez Af. L'impact du peptide sur la morphologie des filaments d'Af a été observé en vidéomicroscopie. Enfin, des dosages d'IL8, IL10 et de LDH ont été réalisés afin d'évaluer l'action immunomodulatrice et la cytotoxicité de ETD151 sur des CEB BEAS-2B.

### Résultats

Le traitement des souches cliniques d'Af avec 1.25  $\mu\text{M}$  d'ETD151 a permis d'inhiber de 60% leur activité métabolique. Cette activité était rétablie en présence de Glycer. Aucun effet synergique entre les ATF testés et ETD151 n'a été observé. Grâce à la vidéomicroscopie, un changement de morphologie des souches d'Af a été observé dès l'ajout de 0.156  $\mu\text{M}$  de ETD151, les filaments observés étaient raccourcis et hyperramifiés, certains d'entre eux présentaient également une lyse au niveau de leur extrémité. Enfin, aucune libération d'IL10, IL8 ou LDH par les Beas-2B infectées par Af n'a été observée en réponse aux traitements par 1.25  $\mu\text{M}$  et 2.5  $\mu\text{M}$  de ETD151.

### Discussion et conclusions

Ainsi, nos résultats montrent un effet ATF du peptide ETD151 sur des souches d'Af sensibles et résistantes aux azolés, même si aucun effet synergique n'a pu être observé avec les ATF testés. Nos résultats de compétition suggèrent que les Glycer seraient impliqués dans l'action de ETD151 sur Af comme décrit pour *B. cinerea*. La construction d'une souche d'Af déletée pour un gène de synthèse des glucosylcéramides (*bar1*) est en cours afin de conforter notre hypothèse. Une analyse transcriptomique de Af, traité ou non par ETD151 à des concentrations sub-inhibitrices et à différents temps devrait permettre de mieux comprendre l'impact du peptide sur le champignon. Il sera important également de vérifier que les souches n'acquiescent pas de résistance vis-à-vis de ETD151.

### Références



***Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose***

## SIMONNEAU Benjamin

### MODULATION PHARMACOLOGIQUE DE COMMD1 : EFFET STABILISATEUR DE CFTR-F508DEL DANS LE CONTEXTE DE LA MUCOVISCIDOSE ?

B. Simonneau<sup>1,2</sup>, S. Simon<sup>1,2</sup>, F. Becq<sup>3</sup>, M.G. Vallespi<sup>4</sup>, B. Duriez<sup>1,2</sup>, P. Fanen<sup>1,2</sup>, A. Aissat<sup>1,2</sup>

1. INSERM, U955, IMRB, Créteil, France.
2. Université Paris-Est, Créteil, France.
3. CNRS-ER L7003 - TIME, Université de Poitiers, Poitiers, France.
4. Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CIGB), La Havane, Cuba.

#### Objectifs

COMMD1 a été identifié comme un partenaire protéique de CFTR et dont la surexpression stabilise CFTR à la surface des épithéliums (1) et exerce un potentiel anti-inflammatoire dans le contexte de la mucoviscidose (2). Une équipe cubaine a développé un peptide (CIGB-552) permettant à la fois de surexprimer COMMD1 (3) et de réduire la réponse inflammatoire dans différents modèles humains et murins (4). L'objectif de ce projet est d'utiliser le CIGB-552 dans des modèles de mucoviscidose afin d'évaluer la maturation, la demi-vie et l'activité de CFTR.

#### Matériels et méthodes

- Modèles cellulaires : CFBE-WT et -F508del en immersion ou en interface air-liquide (ALI), HEK-WT et F508del exprimant HS-YFP
- Cytotoxicité du peptide évalué par la mesure du LDH relargué.
- Pénétration du peptide CIGB-552 déterminée à l'aide d'une version FITC (cytométrie de flux) et imagerie
- Expression de COMMD1 et CFTR quantifiée par immunoblot.
- Fonction de CFTR par YFP sensible à l'iode et chambre de Ussing

#### Résultats

Le peptide CIGB-552 (FITC) est détecté dans les CFBE proportionnellement à sa concentration, montrant une bonne capacité de pénétration, avec une absence de cytotoxicité. Nous avons observé que COMMD1 est très exprimé de façon endogène, et que le CIGB-552 ne modifie pas la quantité de protéine COMMD1. En revanche, le CIGB-552 provoque une augmentation significative de COMMD1 dans les cultures primaires de CENH contrôles à la concentration de 40µM. La fonction de CFTR-F508del évaluée par la méthode HS-YFP montre un gain d'activité lorsque le CIGB-552 est combiné au traitement Vx-445/Vx-661/Vx-770. Cela se confirme sur les cultures de CFBE cultivées en ALI par une augmentation de la différence de potentiel comparé au Vx-445/661/770 seuls. Ce gain de fonction ne s'explique pas par une augmentation de la quantité de bandes C de CFTR.

#### Discussion et conclusions

Nos résultats montrent que le peptide CIGB-552 est capable de pénétrer dans différents modèles cellulaires et différentes conditions de culture (CENH ou lignées, monocultures ou ALI). La combinaison du CIGB-552 avec les traitements actuels améliore encore plus la fonction de CFTR. Ce gain de fonction passerait par la capacité du CIGB-552 à stabiliser, ou à favoriser la localisation membranaire de CFTR.

Mon prochain objectif est de tester l'hypothèse que le CIGB-552 potentialise l'effet du Vx-445/661/770, en augmentant la densité membranaire de CFTR-F508del.

#### Références

- (1) Drévillon et al, 2011 (PMID 21483833)

- (2) de Becdelièvre et al, 2013 (PMID 23892095)
- (3) Fernandez Masso, et al, 2013 (PMID 23401744)
- (4) Vallespi et al. 2020 (PMID 33396282)

***Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose***

## SUIRE Bastien

### IMPACT DU TRAITEMENT KAFTRIO SUR L'INFECTION PAR M. ABSCESSUS CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE.

Bastien Suire<sup>1</sup>, Stephen Adonai Leon-Icaza<sup>1</sup>, Céline Cougoule<sup>1</sup>

1. Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), Université de Toulouse, CNRS, Université Toulouse III–Paul Sabatier (UPS), Toulouse, France

#### Objectifs

Les infections respiratoires, notamment par les mycobactéries atypiques, restent un challenge thérapeutique chez les patients atteints de mucoviscidose, et semblent diminuées grâce au traitement Kaftrio. Toutefois, les mécanismes par lesquels le Kaftrio améliore les fonctions respiratoires et la colonisation microbienne restent peu connus à ce jour. Nous avons développé au laboratoire une collection d'organoïdes de poumons obtenus à partir de résections pulmonaires prélevées sur les poumons de patients bénéficiant d'une transplantation. Ces organoïdes constituent un modèle de choix pour la modélisation de la mucoviscidose car ils conservent les caractéristiques génétiques et fonctionnelles spécifiques à chaque patient. Ainsi, ces organoïdes sont le seul modèle disponible à ce jour pour évaluer les effets du Kaftrio sur la fonction du CFTR et la réponse aux infections.

L'objectif de mon projet de thèse est d'évaluer l'impact du traitement par le Kaftrio sur le contrôle de l'infection par *Mycobacterium abscessus*, une mycobactérie atypique dont le traitement constitue toujours un challenge pour les cliniciens dû à sa résistance aux antibiotiques. Ainsi en restaurant la fonctionnalité du CFTR, notre hypothèse est que le Kaftrio améliore la fonction pulmonaire, et pourrait ainsi restructurer les niches microbiennes. Le projet s'axe en 3 parties :

1. Effets des modulateurs du CFTR sur les organoïdes dérivés de patients atteints de mucoviscidose
2. Impact des modulateurs du CFTR sur les infections à *Mycobacterium abscessus* nouvelles et déjà établies dans les organoïdes pathologiques
3. Efficacité des combinaisons des modulateurs du CFTR avec des Antioxydants, Antibiofilms, et Antibiotiques sur les infections à *Mycobacterium abscessus* dans les organoïdes pathologiques

#### Matériels et méthodes

Mon laboratoire a été pionnier dans l'utilisation des organoïdes pulmonaires dérivés de patients atteints de mucoviscidose pour l'étude des infections respiratoires. Par des approches de microbiologie, imagerie et biochimie/biologie moléculaire, nous évaluerons l'effet du Kaftrio sur i) le phénotype des organoïdes de patients, ii) l'infection par *Mabs*, iii) la réponse à différents traitements, dont les antibiotiques.

Les techniques utilisées sont :

-Traitement au Kaftrio des organoïdes dérivés de patients atteints de mucoviscidose : le Kaftrio est ajouté au milieu de culture des organoïdes et est rafraîchi après deux jours afin de maintenir un traitement efficace. Les expériences sont réalisées après 4 jours de traitement. Les organoïdes de tissu sain ne sont pas traités. Des organoïdes sains et des organoïdes pathologiques non traités sont aussi utilisés en tant que contrôles à chaque expérience et comparés aux mêmes organoïdes traités au Kaftrio.

-Marquage MitoSOX et PI : les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les cellules mortes sont marquées avec les marqueurs fluorescents MitoSOX et iodure de propidium respectivement. Par quantification du signal de fluorescence dans les organoïdes, le stress oxydatif et la mort cellulaire est quantifiée.

-FIS : pour chaque condition (organoïdes sains, pathologiques et pathologiques traités au Kaftrio), les organoïdes sont stimulés à la forskoline et leur gonflement est suivi par microscopie pendant 2h. Leur aire est mesurée toute les 20 minutes.

-qPCR : Après traitement des organoïdes pathologiques, l'expression des gènes impliqués dans la détoxification des ROS, dans la ciliogénèse et dans la sécrétion du mucus est mesurée.

-Microinjection de Mabs : les bactéries sont microinjectées dans la lumière des organoïdes. Après 4 jours d'infection, les organoïdes sont lysés et les lysats sont étalés sur milieu gélosé afin de dénombrer les unités formant colonies (CFU) dans chaque organoïde.

## Résultats

Nos résultats récents montrent que les organoïdes de patients présentent une augmentation du stress oxydatif comparativement aux organoïdes de tissu sain. De plus, nous avons montré que ce stress oxydatif exacerbé contribue à la croissance de Mabs. En effet, nous avons montré que le traitement par des antioxydants diminuent le stress oxydatif et la croissance de Mabs. Premièrement, j'ai étudié l'effet du Kaftrio sur le stress oxydatif et la mort cellulaire, deux caractéristiques augmentées dans la mucoviscidose. J'ai observé que le stress oxydatif diminue de moitié après 1 jour de traitement, et que la mort cellulaire est réduite à partir de 3 jours de traitement. De plus, une observation phénotypique au microscope des organoïdes permet de voir un éclaircissement et une augmentation de la taille de la lumière des organoïdes pathologiques, ainsi qu'une réduction de l'épaisseur de l'épithélium avec un traitement de 4 jours. En conclusion, un traitement de 4 jours à au Kaftrio est une durée optimale pour diminuer les effets de la mucoviscidose et restaurer un phénotype intermédiaire dans les organoïdes pathologiques.

Une fois les conditions de traitement établies, j'ai évalué dans un second temps l'effet du Kaftrio sur la restauration de la fonctionnalité du CFTR dans les organoïdes pathologiques. Pour cela, j'ai traité des organoïdes de patients au Kaftrio, et j'ai mesuré la restauration de la fonctionnalité de leur canal CFTR grâce au test du « Forskolin-induced swelling ». Par mesure du pourcentage de gonflement des organoïdes stimulés par la forskoline, j'ai déterminé que le traitement au Kaftrio induit une augmentation de la taille des organoïdes de patients de 10-15% (contre 0-1% pour les organoïdes non traités, et 25% pour les organoïdes de sujets sains). Le traitement au Kaftrio restaure donc une partie de la fonctionnalité du CFTR dans les organoïdes de patients atteints de mucoviscidose.

Afin d'étudier l'impact du Kaftrio sur d'autres caractéristiques de la mucoviscidose, j'ai dans un troisième temps mesuré l'expression des gènes de la voie de détoxification des ROS, de la ciliogénèse (altéré dans la mucoviscidose) et des mucines (responsables de l'hypersécrétion de mucus) dans des organoïdes pathologiques traités au Kaftrio par PCR quantitative. Ces résultats seront présentés lors du congrès.

Enfin, une analyse ultrastructurale des organoïdes pathologiques traités au Kaftrio est prévue afin d'observer par microscopie électronique les modifications induites par le traitement sur les cellules de l'organoïde.

Le deuxième objectif consiste à mesurer l'impact du Kaftrio sur les infections à *Mycobacterium abscessus*.

J'ai commencé à étudier l'impact du traitement au Kaftrio sur l'infection par Mabs. Pour cela, j'ai traité des organoïdes pathologiques que j'ai ensuite infecté avec la souche S de Mabs (la plus abondamment retrouvée dans l'environnement). Les premières données indiquent que la charge bactérienne dans les organoïdes traités au Kaftrio est plus faible que dans les organoïdes pathologiques non traités. Le traitement au Kaftrio semble donc apporter un meilleur contrôle de l'infection par Mabs dans un contexte de mucoviscidose.

Le troisième objectif vise à combiner le traitement au Kaftrio à des antibiotiques, des antioxydants, et des antibiofilms afin de d'identifier une potentielle synergie entre ces traitements. Cette partie sera réalisée lorsque nous aurons davantage de données sur la partie précédente (objectif 2).

## Discussion et conclusions

Actuellement en début de deuxième année de thèse, je présenterai les premiers résultats qui caractérisent l'effet du Kaftrio dans le modèle organoïdes et les conséquences sur l'infection par Mabs.

## Références

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

TARIZZO Marine

## IDENTIFICATION DES RECEPTEURS IMPLIQUES DANS LA RECONNAISSANCE PAR LES CELLULES EPITHELIALES BRONCHIQUES DE LA LECTINE FONGIQUE FLEA D'ASPERGILLUS FUMIGATUS

A. Moreau, M. Tarizzo, V. Balloy, L. Marti, N. Richard, H. Corvol, C. Pionneau, S. Chardonnet, L. Guillot, A. Varrot, J. Bigot

1. Sorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche Saint Antoine, Paris, FR
2. Pneumologie Pédiatrique, Hôpital Trousseau, AP-HP, Paris, FR
3. Sorbonne Université, INSERM, Plateforme Post-génomique de la Pitié Salpêtrière (P3S), Paris, FR
4. Université Grenoble Alpes, CNRS, CERMAV, Grenoble, FR
5. Service de Parasitologie-Mycologie, Hôpital St Antoine, AP-HP, Paris, FR

### Objectifs

*Aspergillus fumigatus* (Af), un champignon filamenteux fréquemment isolé des expectorations des patients atteints de mucoviscidose, entraîne une détérioration de leur fonction respiratoire. Nous avons récemment montré que les cellules épithéliales bronchiques (CEB) étaient capables d'inhiber la filamentation des spores d'Af via la voie PI3 kinase et la reconnaissance de la lectine fongique FleA (Sci Rep. 2018, 8:15699). Notre objectif est maintenant de rechercher le récepteur cellulaire qui interagit avec FleA et qui participerait à l'activité antifongique des cellules épithéliales.

### Matériels et méthodes

L'isolement du récepteur de la lectine FleA a été réalisé par co-précipitation de la lectine biotinylée après contact avec des CEB (lignée BEAS-2B). Les protéines cellulaires co-précipitées ont été séparées par chromatographie et identifiées par spectrométrie de masse. Une étude complémentaire de mesure d'interaction (détection par interférométrie de bicouches) a été réalisée sur les protéines majoritaires. Les CEB ont été transfectées, pendant 48 heures, avec des siARN d'intérêt, puis infectées avec des spores d'Af (souche DAL) pendant 15 heures. La filamentation d'Af a été quantifiée par dosage du galactomannane, un sucre de paroi libéré au cours de la filamentation.

### Résultats

La co-précipitation de FleA biotinylée a permis l'identification de plusieurs protéines candidates, parmi lesquelles l'intégrine  $\beta 1$  (ITGB1) et le mannose récepteur de type 2 (MRC2). Des études complémentaires de mesure d'interaction ont montré une forte affinité d'interaction (32 nM) entre ITGB1 et la lectine FleA. Nous avons observé que l'inhibition de l'expression de ITGB1 induisait une augmentation de la production de galactomannane par Af et donc de sa filamentation, reflétant une diminution de l'activité antifongique des CEB.

### Discussion et conclusions

Nous avons mis en évidence un rôle de ITGB1 dans l'activité antifongique des CEB. ITGB1 semble également interagir avec la lectine fongique et pourrait s'associer à d'autres protéines co-précipitées pour former un cluster, dont l'activation induirait le déclenchement de l'activité antifongique. Nous allons maintenant nous intéresser à l'action antifongique de MRC2 et étudier l'interaction entre ITGB1, MRC2 et la lectine FleA, en étudiant notamment leur colocalisation par microscopie confocale.

### Références

*Ce projet est financé par :*

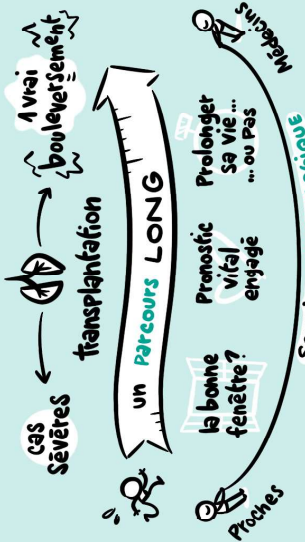
# Colloque Français des Jeunes Chercheurs



**CONFÉRENCE D'OUVERTURE**

Stéphane DEVORET

**Recherche en Transplantation Pulmonaire dans la Mucoviscidose**



après la greffe le travail continue!  
 la bonne fenêtre?  
 Vie normale  
 découverte  
**AUTRE maladie**

**REJET = PROCESSUS HÉTÉROGÈNE**  
 ENCORE beaucoup à FAIRE  
 aspects cliniques cellulaires ...  
 prédictive (m<sup>2</sup> biomarqueurs)  
 précision  
**ENJEU CENTRAL**  
 améliorer diagnostic nouvelles stratégies

la contonction biotech est BONNE!  
 la contonction biotech est BONNE!



**PSEUDOMONAS AERUGINOSA DANS TOUS SES ÉTATS**



MT 180

**Gabrielle Dupuis**  
 Opportuniste  
 50% patients adultes  
 facteurs de virulence  
 sécrétion Type III (T3SS)  
 ExoS ExoT ExoY ExoU  
 exprimée par 90% souches  
 pathogénicité globale sur <math>\downarrow</math> respiratoires

MT 180

**Lucas Dupuis**  
 agent anti-biofilm  
 système de virulence dont sécrétion  
 Système Tat (export protéine)  
 meilleure résistance au Cu<sup>2+</sup>  
 essentielle à PA  
 forte résistance si [G]<sup>+</sup>

**Éline Dubois**  
 visée anti-infectieuse  
 antibiotique patient CF  
 nuées essentielles  
 action aussi ANTAGONISTE  
 modifie Résistance de PA aux antibio  
 Structure des antibio  
 étude du CERVACROL  
 recommandations

**Lola Bosc**  
 immunité nutritionnelle  
 PA  
 zincophore  
 Voie Ont  
 Carence en MÉTAUX  
 PseudoReLine  
 rôle sur différents aspects de l'infection aigüe & chronique

**Julien Kowalewski**  
 malade  
 Résistance  
 grâce à APH(3)-IIb  
 inhibition  
 L44 composé identifié  
 amino glucosides  
 antibio  
 Permet ré-utilisation CONVENTIONNELLE

# Colloque Français des Jeunes Chercheurs



"POT-POURRI" (ÇA SENT SUPER BON!)

### Anna BARRERO

**AVANT**

niveau activité physique **RÉDUIT (MVPA)**

Patient CF

Mise en Place **KAFTRIO**

Eleacaftor Tezacaftor Vacaftor

**APRÈS**

c'est bien continué!

TPS MOYEN MVPA >30 min par jour

mais surtout **Accompagnement** **IMPORTANT** et **Soutien**

**KAFTRIO PAS SIGNIFICATIF**

### Clara BLOTAS

géné CFTR

MUCO

ABC? ?

Pancréatite

si altération dérégulation expression CFTR

intestin & Pancréas

épididymites

3 MODÈLES Cellulaires

Quels éléments? Quels facteurs? de Transcription?

CRISPR

----- ✂

----- **NEEDED!**

décrire & mettre en évidence le rôle des **CRE**

### Raphaëlle LADUNE

Activité Physique

thérapie efficace

bénéfices

NIVEAU < RECO

QUESTIONNAIRE

APPLI MOBILE

MEURER ET LEVER LES BARRIÈRES

Physique Psycho Environnement

Balance décisionnelle

résultats uniquement

résultats rapides + reco

chercheur patient

3 versions

médecin

### Khilian PASCAREL

"Normal" métabolisme aérobie

insuffisance respiratoire

Patient CF

HYPOXIE

MUCOVISCIDOSE Provoquée par Gène CFTR

QUEL IMPACT HYPOXIE SUR LES CANAUX?

CFTR (CL-)

TRPA 1 (Ca<sup>2+</sup>)

→ Pas sur Q<sub>10</sub> de protéines CFTR et TRPA 1

→ après = activité calcique modulée

### Raphaël SANTINELLI

MUCOVISCIDOSE

Mutation Gène CFTR

Défaut REPLIEMENT de la protéine

inhibition expression

ATF6

si: RNA omé ATF6

restauration du canal

MÊMES EFFETS!

INFLAMMATION

PF-4239422 (omé. sérum protéase)

molécule thérapeutique potentielle [↑ synthèse CFTR]

### Claire DUMORTIER

50% adultes

faible densité

CEBO (molécule osseuse liée à la muco)

graisse

adiposité médullaire

CSM défaut activité CFTR

adipocytes

ostéoblastes

hvp.

MT 180

### Johan SERGHERAERT

Je m'en passerai bien...

tissu fracture

densité minérale ↓

Chez Porteurs Mutation CFTR-classe II

Précurseurs OSTÉOCYTIQUES

↑ Monocytes MAFK + NLRP3

↑ Capacité de différenciation

inhib. motif cytosquelette

allération ostéoclastogénèse

Potential accru

MT 180

MARDI 7 FÉVRIER 2023 - Institut Imagine, PARIS





# Colloque Français des Jeunes Chercheurs



**Adélaïde CHESNAY**

**TRI THÉRAPIE**  
"E + T + I"

**Bonne Tolérance et Efficacité**  
sur la fonction CFTR

merci! exacerbations ↓ Pulmonaires ↓ infections bactériennes ↓ utilisation antibio ↓ patient

**QUID E, T, I?**

- ↑ infections fongiques
- ↑ colonisations
- ↑ sensibilisation

**hypothèse d'étude** → Amélioration Rapide = ma clearance va mieux!

**Elias GERGES**

**MABS** → évolution morpho. → hyper virulent et inflammatoire

**MABS-R** → Résistance naturelle aux ANTIBIO

hyper virulent et inflammatoire

évolution morpho.

**LAZ2**

Conformation spatiale

régulation expression

patho-biologie

régule expression nombreux gènes

répertoire limité de gènes communs

distribution identique sur Chromosome MABS et R

**Morgane ILLOUZ**

Mab + antibio → "cocktail" Phagocytose

**Mécanisme d'Action Phage/Mab**

"COMMENT CA MARCHE?"

récepteur TPP

antibiotique

Mab

BPAs

TPP → rôle important

OPTIMISATION des COCKTAILS!

**Khadeeja Adam SY**

Poumons

Aspergillus f (spores-filaments)

↓ élimination Pathogène

↑ inflammation excessive

SPM (médiateurs lipidiques)

RÉSOLUTION DE L'INFLAMMATION

↓ QTE Réduite

↓ chromolite biosynthèse

CF

"STIMULATION" POUR RÉDUIRE LA CROISSANCE Ap. f.

Nouvelles Voies thérapeutiques grâce aux SPMs

**MT 180**

**Sandra KHAU**

déjà colonisé patient CF

Surinfection

Hypersecretion

Cytokine il-1β

activation

INFLAMMATION

aggravation dégradation

NLRP3 (≠ PAMPs impliqués)

**MT 180**

**Morgane SARRAZIN**

Mycobacterium Abscessus

Colonisation

Traitement LOURD!

Help!

Appet des CycL

Pour contrer Résistance induite aux MACROLIDES

Cyc + Macrolides = efficacité contre SOUCHES RÉSISTANTES

**PRIX Michel CHIGNARD 2023**

**Chloé DUPONT**

Transmission bactéries

↳ Environnement / Patient

étude "PATHOME"

13 CAMPAGNES

Siphons Cuisines

toilettes

Salles bains

liens avec Contamination Patients

QUI Contamine QUI?

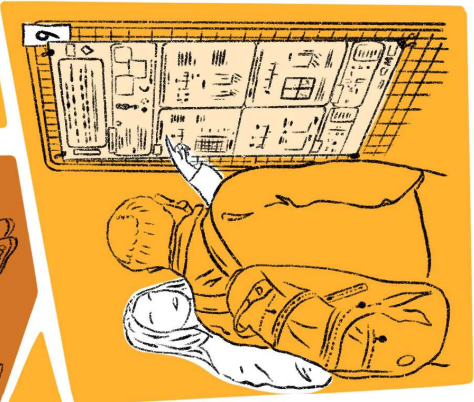
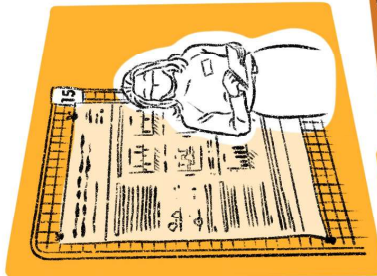
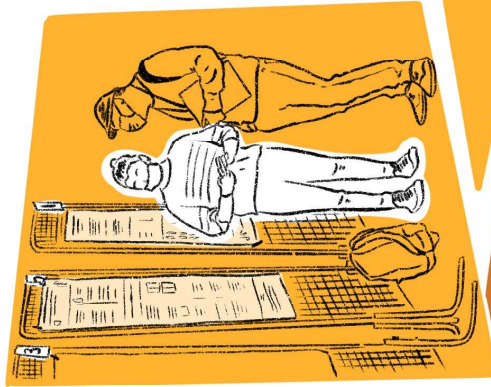
↳ Séquences "environnement"

↳ Comparer Séquences "patient"

RECOMMANDATIONS d'HYGIÈNE

# COLLOQUE FRANÇAIS DES JEUNES CHERCHEURS

## SESSIONS POSTERS



**Remerciements :**



A l'année prochaine !

**Organisation :**

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

