



HAL
open science

Rôle du cytosquelette de septines dans les infections bronchiques à *Pseudomonas aeruginosa* dans le contexte de la mucoviscidose

Sylvain Brax

► **To cite this version:**

Sylvain Brax. Rôle du cytosquelette de septines dans les infections bronchiques à *Pseudomonas aeruginosa* dans le contexte de la mucoviscidose. Génétique humaine. Sorbonne Université, 2024. Français. NNT : 2024SORUS309 . tel-04848489

HAL Id: tel-04848489

<https://theses.hal.science/tel-04848489v1>

Submitted on 19 Dec 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Sorbonne Université

Ecole doctorale 394

Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Laboratoire : Mucoviscidose, Physiopathologie et Phénogénomique

Centre de Recherche Saint-Antoine, UMRS_938

Rôle du cytosquelette de septines dans les infections bronchiques à *Pseudomonas aeruginosa* dans le contexte de la mucoviscidose

Thèse de doctorat

Présentée par

Sylvain Brax

Pour obtenir le grade de

Docteur en Sciences de Sorbonne Université

Soutenue le **25 octobre 2024**

Devant un jury composé de :

Professeure Isabelle Cremer
Docteure Delphine Descamps
Docteure Anne Blanc-Potard
Docteur Romé Voulhoux
Professeur Serge Mostowy
Docteur Loïc Guillot

Présidente du jury
Rapportrice
Rapportrice
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-TEXTE	1
LISTE DES FIGURES	2
TABLE DES TABLEAUX	5
TABLE DES ABRÉVIATIONS.....	6
AVANT-PROPOS	11
INTRODUCTION	14
Partie I La physiologie pulmonaire et la physiopathologie de la mucoviscidose	15
1- Système pulmonaire, l'interface avec l'environnement	15
a. Tractus respiratoire	15
b. Epithélium des voies aériennes, les composants cellulaires	18
c. Epithélium des voies aériennes, la fonction de barrière.....	22
d. Cellules immunitaires des voies aériennes	26
2- Mucoviscidose, vue d'ensemble	27
a. Historique et épidémiologie.....	27
b. Dépistage néonatal.....	29
c. Variants du gène <i>CFTR</i> et rôles de la protéine CFTR.....	30
3- Mucoviscidose, physiopathologie	33
a. Vue d'ensemble des atteintes multi-organes	33
b. L'atteinte pulmonaire : infections	37
c. L'atteinte pulmonaire : inflammation.....	40
d. Stratégies thérapeutiques pulmonaires et extra pulmonaires	42
e. Correcteurs et potentiateurs de la protéine CFTR	44
Partie II <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , carte d'identité	47
1- Généralités.....	47
a. Une bactérie à Gram négatif.....	47
b. Pathogénicité, incidence et différentes pathologies (épithélium).....	50

2- <i>Pseudomonas</i> , une bactérie pleine de ressources.....	51
a. Nombreux facteurs de virulence	51
b. Bactérie extracellulaire mais aussi intracellulaire	57
c. Persistance intracellulaire	59
d. <i>Pseudomonas</i> et cytosquelette cellulaire	62
3- Infections à <i>Pseudomonas</i> en contexte de mucoviscidose	65
a. Incidence	65
b. <i>P. aeruginosa</i> et la protéine CFTR	67
c. Traitements antibiotiques et résistance	69
d. Impact des traitements correcteurs et potentiateurs de CFTR	72
Partie III Le cytosquelette de septine (SEPT)	74
1- Les SEPT, quatrième famille du cytosquelette	74
a. Composition/structure des SEPT	74
b. Expression des SEPT	77
c. Assemblage palindromique et formation d'hétéro-oligomères.....	79
2- Les SEPT, activité physiologique.....	82
a. Des protéines impliquées dans de nombreux processus cellulaires	82
b. Des protéines avec des activités organe-dépendante.....	85
c. SEPT et autres membres du cytosquelette	89
3- Implication des SEPT dans des pathologies.....	91
a. Les SEPT dans l'atteinte des systèmes nerveux et reproducteurs	91
b. Les SEPT dans le développement de cancers.....	93
c. SEPT et cancer, modification d'expression et mutation des 13 SEPT	95
4- SEPT et infections bactériennes	97
a. Les SEPT lors de l'internalisation bactérienne	98
b. Les SEPT et la formation de cages	101
c. Devenir des bactéries compartimentées dans des cages de SEPT	105
d. SEPT et environnement épithélial lors de l'infection, des macrophages à la réparation....	106
OBJECTIF DE L'ÉTUDE	109
RÉSULTATS	111
I- Article de recherche publié	112

1- Résumé	112
2- Article	114
3- Figures supplémentaires.....	123
II- Résultats complémentaires	127
1- Etude de l'implication des SEPT2 et SEPT9 sur <i>P. aeruginosa</i> internalisées.....	127
a. Contexte et objectif	127
b. Résultats	128
c. Conclusion	130
2- Etude de l'implication de la SEPT2 sur la réponse cytokinique	131
a. Contexte et objectif	131
b. Résultats	131
c. Conclusion	132
3- Rôle des SEPT sur la persistance intracellulaire de <i>P. aeruginosa</i>	133
a. Contexte et objectif	133
b. Résultats	133
c. Conclusion	134
4- SEPT et réparation d'une plaie épithéliale	135
a. Contexte et objectif	135
b. Résultats	135
c. Conclusion	136
5- Modèle cellulaire 3D et localisation des SEPT par immunofluorescence	137
a. Contexte et objectif	137
b. Résultats	137
c. Conclusion	138
DISCUSSION.....	140
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	156
ANNEXES	182
I- Liste des publications et communications	183
1- Publication	183
2- Communications orales	183

3- Communications affichées (poster)	184
II- Extrait plan de formation.....	185
ABSTRACT.....	187
RÉSUMÉ	188

AVANT-TEXTE

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique du tractus respiratoire.

Figure 2 : Spirogramme type, un outil pour l'exploration fonctionnelle respiratoire.

Figure 3 : Composition de l'épithélium des voies aériennes inférieures selon la position dans l'arbre trachéo-bronchique.

Figure 4 : Illustration des défenses antibactériennes bronchiques.

Figure 5 : Evolution du nombre de patients CF depuis 1992.

Figure 6 : Les différentes classes de mutations du gène *CFTR*.

Figure 7 : L'affection multi-organe de la mucoviscidose.

Figure 8 : Agents bactériens les plus fréquemment retrouvés au niveau pulmonaire dans la population CF, par classe d'âge.

Figure 9 : Illustration de l'espérance de vie des patients CF en lien avec les stratégies thérapeutiques depuis 1930.

Figure 10 : Schéma illustrant le mode d'action de la thérapie Kaftrio.

Figure 11 : Observation de *P. aeruginosa* au microscope électronique.

Figure 12 : Représentation du génome de *P. aeruginosa*.

Figure 13 : Représentation schématique de la bactérie *P. aeruginosa* et de ses nombreux facteurs de virulence.

Figure 14 : Observation d'un biofilm de *P. aeruginosa* en microscopie électronique.

Figure 15 : Systèmes de sécrétion de type 2 (T2SS), type 3 (T3SS) et type 6 (T6SS) de *P. aeruginosa*.

Figure 16 : Observation en microscopie électronique de *P. aeruginosa* au sein d'une cellule de lignée A549.

Figure 17 : Représentation schématique de l'action des exotoxines du T3SS sur le cytosquelette d'actine.

Figure 18 : Représentation schématique de l'évolution de l'infection bronchique par *P. aeruginosa* chez les patients CF.

Figure 19 : Représentation schématique de trois mécanismes de résistance intrinsèque aux antibiotiques.

Figure 20 : Schéma montrant trois mécanismes d'acquisition de gènes de résistance par transfert horizontal de gènes.

Figure 21 : Premières observations au microscope de structures de SEPT.

Figure 22 : Représentation schématique des domaines des SEPT.

Figure 23 : Division des SEPT en quatre sous-groupes.

Figure 24 : Représentation schématique des hexamères palindromiques de SEPT.

Figure 25 : Reconstitution informatique d'un hexamère de SEPT.

Figure 26 : Représentation schématique des octamères palindromiques de SEPT.

Figure 27 : Les différentes conformations possibles des polymères de SEPT.

Figure 28 : L'interaction entre les SEPT et la membrane plasmique.

Figure 29 : Immunomarquages de protéines de SEPT dans des cellules ciliées primaires des voies respiratoires humaines.

Figure 30 : Immunomarquages de la SEPT2 lors de phases de stress de l'épithélium.

Figure 31 : Les SEPT2, 7 et 9 et leurs activités pro et anti-tumorales.

Figure 32 : Répartition des mutations des SEPT dans les cancers humains.

Figure 33 : Internalisation bactérienne et cytosquelette cellulaire.

Figure 34 : Internalisation de *P. aeruginosa* et rôle du cytosquelette de SEPT.

Figure 35 : Observation au microscope de *P. aeruginosa* intracellulaire entourée par une structure de cage de SEPT7.

Figure 36 : Mobilisation des cytosquelettes d'actine et de SEPT par *S. flexneri* et *L. monocytogenes* intracellulaires.

Figure bilan : Comparaison du rôle du cytosquelette de SEPT dans les infections bronchiques par *P. aeruginosa* entre contexte non-CF et CF.

TABLE DES TABLEAUX

Table 1 : Evolution de caractéristiques d'âge chez les patients CF depuis 2012

Table 2 : Anomalies fonctionnelles des organes chez les patients CF en fonction de l'âge.

Table 3 : Détection d'espèces fongiques et virales dans les prélèvements pulmonaires de patients CF.

Table 4 : Activités infectieuses de *P. aeruginosa* et facteurs de virulence associés.

Table 5 : Activités physiologiques et implications pathologiques des SEPT dans le corps humain.

TABLE DES ABRÉVIATIONS

A

ADN Acide désoxyribonucléique

ANOVA *Analysis of variance*

ARN Acide ribonucléique

ARP2/3 *Actin related protein 2/3*

Atg5 *Autophagy protein 5*

B

BPCO Broncho pneumopathie chronique obstructive

C

Cdc *Cell-division control*

CFTR *Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator*

CO₂ Dioxyde de carbone

CRF Capacité résiduelle fonctionnelle

CVF Capacité vitale forcée

CF *Mucoviscidose (Cystic Fibrosis)*

CF-hAEC *Cystic fibrosis human Airway epithelial cell*

CFU *Colony forming units*

CRCM Centre de ressources et de compétences de la mucoviscidose

CXCL8 Interleukine 8

CTL Control

D

DMSO Diméthylsulfoxyde

DNN Dépistage néonatal

E

ELISA *Enzyme-linked immuno assay*

ENaC *Epithelial sodium channel*

ERK *Extracellular signal-regulated kinase*

G

GAPDH Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

Gb3 Globotriaosylceramide

GDP Guanosine diphosphate

GTP Guanosine triphosphate

H

hAEC *Human airway epithelial cell*

hBD β -défensines humaines

HCO₃⁻ Hydrogénocarbonate

HIF-1 *Hypoxia inducible factor 1*

HSPA5 *Heat shock protein family A 5*

I

IL-1 β Interleukine 1 β

IL-6 Interleukine 6

IL-8 Interleukine 8

IL-10 Interleukine 10

J

JNK *Jun N-terminal kinase*

K

KO *Knock-out*

L

Las *Elastase*

Lec A *Lectine A*

LPS *Lipopolysaccharide*

M

MAPK *Mitogen-activated protein kinase*

MCP-1 *Monocyte chemoattractant protein-1*

MEK *Mitogen-activated protein kinase*

MLL *Mixed-lineage leukemia*

MOI *Multiplicity of infection*

MUC5AC *Mucine 5AC*

MUC5B *Mucine 5B*

N

NaCl *Chlorure de sodium*

NF- κ B *Nuclear factor-kappa B*

NO *Oxyde nitrique*

O

O₂ *Dioxygène*

P

PAMP *Pathogen-associated molecular pattern*

PBR *Polybasic region*

PBS *Phosphate-buffered saline*

PNEC Cellules neuroendocrines pulmonaires

PRR *Pattern recognition receptor*

Q

qPCR *Quantitative polymerase chain reaction*

S

SEPT Septine

siRNA *Small interfering RNA*

siSEPT siRNA spécifique de la SEPT

STAT3 *Signal transducer and activator of transcription 3*

SUE *Septin unique element*

T

TIR Trypsine immunoréactive

TLR *Toll like receptor*

TNF- α *Tumor necrosis factor α*

TSS Système de sécrétion

V

VC Volume courant

VR Volume résiduel

VEMS Volume expiré maximum en une seconde

Z

ZO Zonula occludens

AVANT-PROPOS

Apparues il y a quelques milliards d'années, les bactéries comptent parmi les premiers systèmes biologiques à avoir colonisé la Terre. Elles ont dès lors pu bénéficier de temps pour évoluer et se diversifier tout en s'adaptant aux modifications géologiques et climatiques de notre planète. Du fait de l'omniprésence des microorganismes bactériens, l'espèce humaine a toujours entretenu une relation, tantôt bénéfique, tantôt délétère, avec eux durant son évolution. Parfois supposée, souvent niée, l'existence des bactéries n'a été prouvée qu'au XIX^{ème} siècle. Permettant ainsi le développement de recherches visant à mieux comprendre leur fonctionnement et menant au développement de moyens de lutte contre les bactéries pathogènes.

Parmi la multitude de bactéries pathogènes existantes aujourd'hui, certaines ont été catégorisées en 2017 par l'Organisation Mondiale de la Santé comme présentant un danger pour l'espèce humaine dans les prochaines années et pour lesquels de nouveaux moyens de lutte doivent être développés. Au sein de cette liste on retrouve notamment *Pseudomonas aeruginosa*, source de résistances aux traitements antibiotiques. Cette bactérie est étudiée depuis plus de 100 ans mais la grande adaptabilité, notamment au mode de vie intracellulaire, présente encore des parts d'ombre.

Les immunités innées et adaptatives sont autant de moyens de lutte du corps humain contre ces pathogènes. Toutefois, il est aujourd'hui admis que les cellules épithéliales, en tant que première barrière face aux agressions environnementales, possèdent une immunité cellulaire qui leur est propre. Divers éléments y prennent part parmi lesquels on retrouve le cytosquelette de septines. Bien que leur implication dans les relations hôte-pathogène soit prouvée, de plus amples études doivent être menées afin de saisir toute la complexité fonctionnelle et organisationnelle du monde des septines.

Le développement récent de thérapies modulatrices de la protéine CFTR a permis d'améliorer grandement les capacités respiratoires et la survie des patients atteints de mucoviscidose. Toutefois la pathologie possède encore un volet infectieux délétère notamment dû à *Pseudomonas aeruginosa*. Il est donc aujourd'hui crucial d'étudier le fonctionnement de l'immunité cellulaire dépendante du cytosquelette de SEPT dans cette pathologie.

INTRODUCTION

Partie I

La physiologie pulmonaire et la physiopathologie de la mucoviscidose

1- Système pulmonaire, l'interface avec l'environnement

a. Tractus respiratoire

Le tractus respiratoire est une structure physiologique qui permet l'échange de gaz entre l'environnement et l'organisme. Il s'étend des cavités nasales et buccales jusqu'aux poumons. On peut distinguer deux sous-structures du tractus respiratoire : les voies aériennes supérieures et inférieures (**Figure 1.A**). Les voies supérieures sont composées de la bouche, du nez et du pharynx. Leur rôle est de faire rentrer l'air inspiré, le réchauffer, l'humidifier et de l'épurer de particules atmosphériques et microorganismes potentiellement pathogènes.

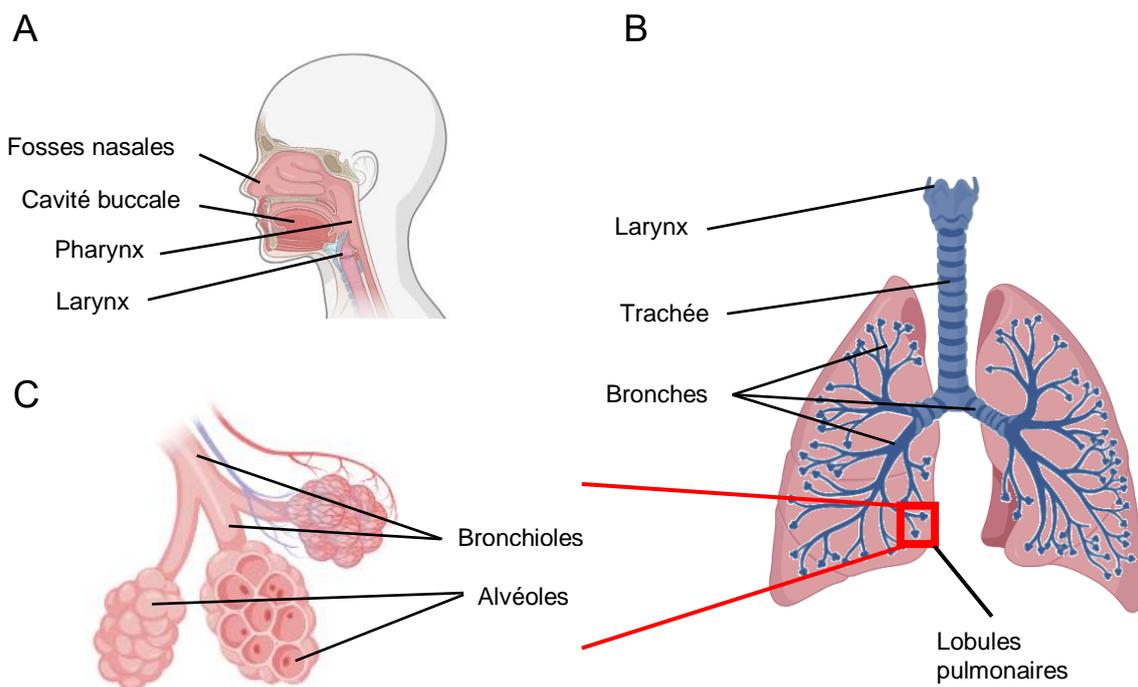


Figure 1 : Représentation schématique du tractus respiratoire.

A) Schéma des voies aériennes supérieures. **B)** Schéma des voies aériennes inférieures (arbre trachéo-bronchique). **C)** Schéma des lobules pulmonaires.

Après le pharynx, l'air inspiré poursuit ensuite son trajet dans les voies aériennes inférieures (**Figure 1.B**), aussi appelées arbre trachéo-bronchique. Elles débutent avec la trachée puis se

séparent en deux pour desservir les deux poumons, droit et gauche. Plus les voies aériennes progressent dans les poumons plus elles se ramifient et rétrécissent. On retrouve ainsi plusieurs sous-divisions de bronches successives : souches, lobaires, segmentaires et enfin sus-lobulaire. On arrive ensuite aux lobules pulmonaires, les plus petites unités anatomiques du poumon (**Figure 1.C**). Ceux-ci sont composés des bronchioles terminales et respiratoires débouchant sur des canaux alvéolaires et enfin sur les alvéoles pulmonaires.

Les premières ramifications de l'arbre trachéo-bronchique sont des voies de conduction et ont pour but, comme pour les voies supérieures, de réchauffer, humifier et purifier l'air inspiré. A partir des bronchioles respiratoires, les voies les plus basses sont quant à elles chargées des échanges respiratoires entre la lumière des tissus et les capillaires sanguins.

Le système respiratoire a pour principale fonction l'hématose, à savoir les échanges gazeux entre le sang et l'atmosphère au niveau de la barrière alvéolo-capillaire. Le sang est alors déchargé de son CO₂ (déchet produit par l'organisme lors de la respiration cellulaire) et chargé en O₂ (oxygénation). Les processus d'inspiration et d'expiration (la mécanique ventilatoire), permettent de remplacer l'air alvéolaire par l'air atmosphérique. L'air inspiré est composé de près de 79% d'azote, 21% d'O₂ et l'air expulsé de 79% d'azote, 5% de CO₂ et 16% d'O₂.

Pour que les échanges gazeux soient possibles, il doit toujours y avoir une différence de pression entre les environnements atmosphérique et pulmonaire. L'inspiration nécessite une pression plus élevée à l'extérieur et inversement lors de l'expiration. En plus de cela, la mécanique ventilatoire est rendue possible par un système musculaire étendu.

Enfin, l'efficacité de la respiration est aussi dépendante de l'écoulement des gaz au sein des voies pulmonaires. Pour cela, le débit d'air entre l'entrée et la sortie d'une voie ne doit que peu varier. Or chaque ramification de l'arbre trachéo-bronchique va exercer une résistance à l'écoulement des gaz. Plusieurs éléments sont responsables de cela, plus l'air progresse dans les voies aériennes inférieures, plus le diamètre de celles-ci diminue. De plus, les phases ventilatoires (inspiration et expiration) vont modifier constamment le diamètre des voies respiratoires(1) permettant ainsi pendant l'inspiration, la dilatation des conduits afin de réduire leur résistance. Enfin, au niveau alvéolaire le volume est maintenu grâce au surfactant, une substance composée de 90% de lipides et 10% de protéines(2) et qui permet de diminuer la tension de surface de l'interface alvéolaire lors de l'inspiration. Cela prévient également du collapsus alvéolaire lors de l'expiration. Lorsque les résistances des voies

aériennes deviennent trop importantes, on assiste alors au développement de maladies pulmonaires obstructives parmi lesquelles on retrouve notamment l'asthme. Une pathologie qui affecte près de 5 à 10% de la population européenne(3). L'asthme est caractérisée par une inflammation chronique des bronches et bronchioles qui entraîne une hypertrophie du muscle lisse des voies respiratoires(4).

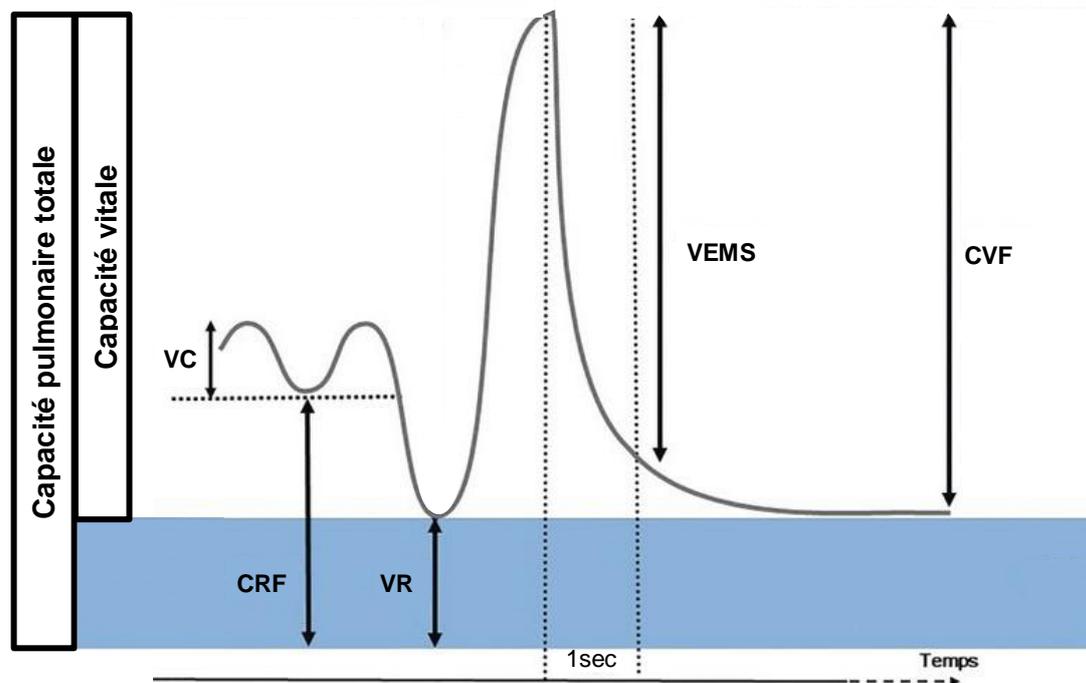


Figure 2 : Spirogramme type, un outil pour l'exploration fonctionnelle respiratoire. Représentation de la capacité vitale (zone blanche) et de la capacité pulmonaire totale (zones blanche et bleue). VC : Volume Courant; CRF : Capacité Résiduelle Fonctionnelle; VR : Volume résiduel; VEMS : Volume Expiré Maximum en une Seconde; CVF : Capacité Vitale Forcée. Adapté d'après Hayes *et al.*, 2009 (5).

Les échanges gazeux passant par les poumons peuvent être mesurés par l'exploration fonctionnelle respiratoire, la spirométrie(5) (**Figure 2**). Elle permet de mesurer différents volumes de gaz lors des phases d'inspiration et d'expiration. Ceux-ci peuvent ensuite être analysés au regard de valeurs normatives préétablies(6). Il est ainsi possible d'obtenir des données importantes telles que le volume courant, les volumes de réserve inspiratoires et expiratoires. La somme des trois donne ce qui est nommée capacité vitale. La spirométrie permet également d'obtenir le volume expiré maximum en une seconde (VEMS) qui est une valeur de référence(7) hautement informative lorsqu'il s'agit des patients atteints de pathologies pulmonaires obstructives.

b. Épithélium des voies aériennes, les composants cellulaires

L'épithélium des voies aériennes supérieures et inférieures est complexe, étendu et fragile. La structure et la composition de celui-ci évoluent et s'adaptent en fonction des contraintes physiques et des activités physiologiques (voies aériennes de conduction ou de respiration). Structurellement, au niveau nasal, on retrouve un épithélium pluristratifié, squameux et kératinisé. Au niveau trachéal et bronchique, l'épithélium est dit pseudostratifié et cartilagineux, à savoir que toutes les cellules forment une couche en contact avec la lame basale mais le fait que les noyaux cellulaires ne soient pas alignés semble montrer la présence de plusieurs couches. Enfin, au niveau des bronchioles terminales et des alvéoles, on retrouve un épithélium pavimenteux cuboïde monostratifié et non-cartilagineux ne comportant qu'une seule couche de cellules aplaties.

La composition cellulaire des épithélia quant à elle se modifie au fil de la progression proximo-distale, notamment dans les voies aériennes inférieures (**Figure 3**). En effet, la présence/absence ainsi que la proportion des différents types cellulaires vont varier selon les différents besoins physiologiques. Le tissu pulmonaire est composé de nombreux types cellulaires différents, dont certains ont même été identifiés récemment. Dans les voies aériennes de conduction on va retrouver majoritairement des cellules ciliées, caliciformes, basales et séreuses ainsi que d'autres types cellulaires en plus petit nombre : les cellules club, les ionocytes et les neuroendocrines.

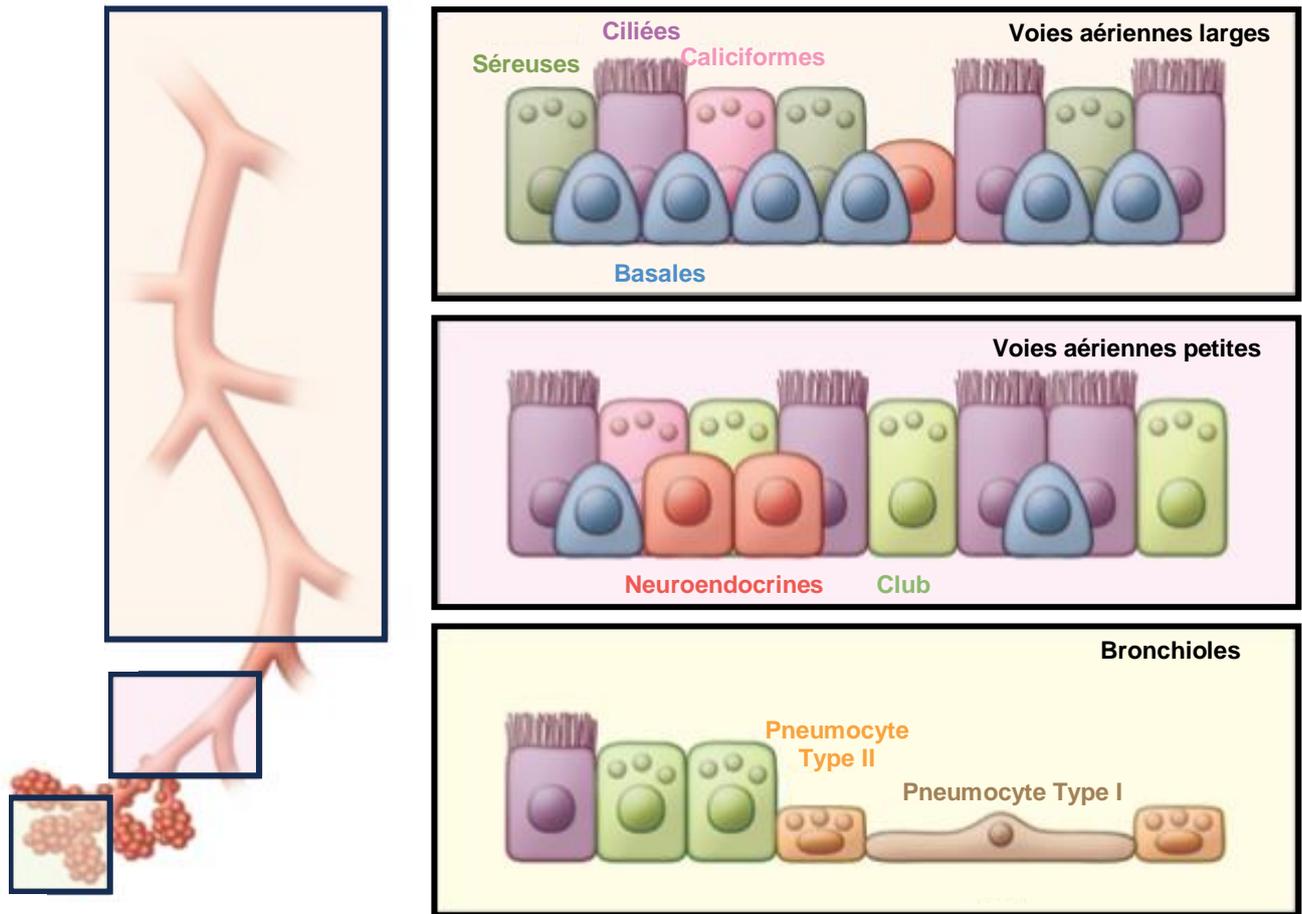


Figure 3 : Composition de l'épithélium des voies aériennes inférieures selon la position dans l'arbre trachéo-bronchique.

Le nom de chaque type cellulaire est indiqué dans la couleur correspondante. Adapté d'après Rackley *et al.*, 2012 (14).

Cellules ciliées

Les cellules ciliées ont une importance primordiale pour l'épithélium pulmonaire. Elles représenteraient en moyenne près de 50% du total des cellules(8) : 47% au niveau trachéal et jusqu'à 73% au niveau bronchique(9). Il existe plusieurs populations différentes de cellules ciliées en fonction de leur localisation(10). Chaque cellule possède environ 300 cils de 4 à 7 μm de longueur(11). Ceux-ci vont, grâce à la présence importante de mitochondries, pouvoir battre de manière synchrone et ainsi permettre le processus de clairance mucociliaire.

Cellules caliciformes ou *goblet cells*

Les cellules caliciformes ou *goblet cells* sont majoritairement situées dans les parties hautes de l'arbre trachéo-bronchique(12). Elles sont responsables de la synthèse et de la sécrétion du mucus dans les voies aériennes. Elles sont caractérisées par la présence importante de granules remplis de mucines acides et hydrophobes entrant dans la composition du mucus. Mais les cellules caliciformes sont également capables d'une part de s'auto-renouveler et d'autre part de donner des cellules ciliées via leur transdifférenciation(13).

Cellules basales

Les cellules basales sont une population de cellules relativement indifférenciées(14) en contact avec la lame basale mais pas avec la lumière des voies. Elles ont une distribution qui évolue au fil des voies aériennes, dans les voies larges elles représentent 51% des cellules contre seulement 6% dans les petites voies(15). Elles ont des propriétés de cellules souches (*stem-cell-like*) et sont ainsi capables de régénérer des cellules sécrétrices ou ciliées suite à une altération(16,17).

Cellules séreuses

Les cellules séreuses ressemblent aux cellules à mucus mais celles-ci sont majoritairement situées au niveau des glandes sécrétrices/sous muqueuses(18). Les cellules séreuses sécrètent plusieurs composés du mucus qui permettent *in fine* de maintenir son l'équilibre hydrique(19).

Cellules club

Les cellules club (anciennement cellules de Clara) sont majoritairement retrouvées dans les voies distales, au niveau des bronchioles(20). Elles sont capables de synthétiser du surfactant alvéolaire(21). Elles sembleraient également pouvoir se transdifférencier en cellules ciliées ou sécrétrices(16).

Ionocytes

Les ionocytes sont le type cellulaire découvert le plus récemment grâce à un séquençage d'ARN en cellule unique de cellules bronchiques humaines et trachéales de souris(22,23). Considérées comme des cellules épithéliales pulmonaires rares, l'expression des ionocytes décroît au fil des ramifications pulmonaires(24). De manière intéressante, les ionocytes ont une expression importante de la protéine *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator* (CFTR), mutée dans le contexte de la mucoviscidose. Il n'y a toutefois pas de différence d'expression de ce type cellulaire entre patient mucoviscidosique et sujet sain(24). Ces cellules pourraient représenter un axe de recherche intéressant pour le traitement de la maladie(25,26).

Cellules neuroendocrines

Les cellules neuroendocrines pulmonaires (PNEC) représentent seulement 1% des cellules épithéliales pulmonaires(27). Elles possèdent de nombreux rôles dont celui de chimiorécepteur des voies aériennes lié à une sécrétion de substances bioactives(28). Elles ont également été montrées dans le poumon adulte comme pouvant déclencher des réponses immunitaires(29). Les PNEC présentent aussi des compétences de cellules pluripotentes capables de donner des cellules club ou ciliées après une lésion tissulaire.

Pneumocytes

Les pneumocytes de type I et II sont les principaux composants de l'épithélium alvéolaire. C'est à ce niveau terminal de l'arbre trachéo-bronchique qu'est réalisée la diffusion des gaz entre le sang et la lumière des voies aériennes. Présents de manière quantitativement comparable, les pneumocytes I représentent toutefois 94% de la surface alvéolaire et les pneumocytes II seulement 4%(30). Les pneumocytes I sont des cellules plates et allongées qui permettent l'échange de gaz. Les pneumocytes II disposent quant à eux de nombreuses fonctions allant de la synthèse du surfactant alvéolaire permettant de maintenir la tension de surface alvéolaire(31), la coordination de la réponse immunitaire ou encore le rôle de progéniteur des pneumocytes I(32,33).

L'évolution de la composition cellulaire au fil de l'arbre trachéo-bronchique a un impact sur les capacités de régénération et de réparation de l'épithélium local. Certaines études ont évoqué, à tort, la possibilité du recrutement de cellules multipotentes depuis la moelle osseuse jusqu'au site de lésion pulmonaire(34). D'autres études sur modèle animal(35) ont finalement lié ces processus de réparation avec l'action de cellules épithéliales progénitrices endogènes des voies aériennes. Le renouvellement cellulaire survient suite au vieillissement ou à une lésion. Ceci est fréquent dans les voies aériennes antérieures et beaucoup moins fréquent dans les parties terminales moins confrontées aux agressions extérieures(36). Peu d'études permettent de déterminer la durée de vie moyenne des différents types cellulaires pulmonaire en condition basale. Mais des expérimentations réalisées sur la souris montrent que les cellules épithéliales ciliées pulmonaires ont une demi-vie moyenne de 17 mois(37). Que ce soit en condition basale ou lésionnelle, plusieurs types cellulaires jouent ce rôle de progéniteurs cellulaires locaux. Outre les cellules rares, neuroendocrines et ionocytes(38), des études de marquages cellulaires *in vivo* et de différenciation *in vitro* ont révélé les importantes capacités progénitrices des cellules basales et club. Au regard de leur expression, les cellules basales représentent la majeure partie de la régénération dans les premières ramifications de l'arbre trachéo-bronchique(14,15).Elles possèdent une forte capacité de prolifération et de différenciation, ce qui leur permet de renouveler l'épithélium bronchique(39). Quant aux parties terminales de l'arbre, la présence importante de cellules club dans les bronchioles terminales et respiratoires(20) fait d'elles les principales sources de régénération de cette zone. En effet elles ont été montrées dans des processus de prolifération et de renouvellement de l'épithélium bronchiolaire(14,40,41).

c. Epithélium des voies aériennes, la fonction de barrière

Le poumon est, avec la peau, le seul organe qui est en contact direct avec l'environnement. Les volumes d'échanges gazeux conséquents et la fréquence de ceux-ci augmentent la possibilité de contact avec des particules et microorganismes pathogènes inhalés (stress environnemental). Cela implique d'avoir des mécanismes efficaces de lutte contre ces agressions environnementales. L'épithélium des voies aériennes permet, en plus

de réchauffer et d'humidifier l'air inspiré, de le nettoyer. En effet, il permet via 3 moyens différents de protéger l'espace sous-épithélial : les jonctions intercellulaires, la sécrétion de molécules antimicrobiennes et le processus de clairance mucociliaire. Un défaut de ces mécanismes de défense peut être associé à une répétition des infections par des agents pathogènes suivie d'une altération de l'épithélium. C'est notamment le cas dans des pathologies telles que la mucoviscidose, la BronchoPneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) ou encore la dyskinésie ciliaire.

Les jonctions intercellulaires sont des structures situées à la membrane plasmique qui permettent de lier deux cellules adjacentes et d'assurer la cohésion de l'épithélium. Au niveau de l'épithélium des voies aériennes, on peut en distinguer trois types différents : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes (toutes deux situées au niveau des membranes apico-latérales(42)) et les desmosomes.

Les jonctions intercellulaires diffèrent par leur composition. Les jonctions serrées sont composées de diverses protéines transmembranaires parmi lesquelles on retrouve l'occludine, la claudine ainsi que des protéines d'échafaudage zonula occludens (ZO)(43). Les jonctions adhérentes sont quant à elles composées de E-cadhérine et de caténine(44). Enfin, les desmosomes ont une composition proche des jonctions adhérentes puisque composées de cadhérine desmosomale (desmoglein et desmocollin)(45). Du point de vue fonctionnel, les jonctions serrées régulent le transport paracellulaire d'ions et de solutés(46). Les jonctions adhérentes permettent l'adhésion entre cellules adjacentes mais elles stimulent aussi la formation de jonctions serrées(46). L'action de jonction de ces structures est étroitement liée avec le cytosquelette. En effet, les jonctions serrées et adhérentes ancrées dans les membranes plasmiques vont se lier au cytosquelette d'actine(43) ce qui entraîne sa réorganisation et influence aussi la forme des cellules(47). Les desmosomes quant à eux, se lient aux filaments intermédiaires et participent ainsi à la résistance aux contraintes mécaniques(48). Ensemble les jonctions intercellulaires permettent également de maintenir la polarité cellulaire de l'épithélium(49).

Les jonctions cellulaires des voies aériennes forment donc une structure dynamique qui s'adapte au stress mécanique induit par la respiration(50), au stress environnement mais également au passage de solutés et d'ions(51). Tout cela dans le but de maintenir la fonction de barrière.

Les cellules épithéliales de voies aériennes forment également une barrière biochimique à l'encontre des microorganismes pathogènes (**Figure 4.A**). Elles sécrètent un grand nombre de molécules antimicrobiennes dans la lumière des voies aériennes : des enzymes, des inhibiteurs de protéases, des peptides antimicrobiens et des oxydants. On y retrouve notamment le lysozyme, une enzyme particulièrement importante puisqu'elle perturbe les enveloppes des bactéries Gram-positif et négatif(52). La lactoferrine, une protéine aux propriétés antibactériennes(53) et antivirales(54). La sécrétion d'inhibiteurs de protéases tels que l'élastase permet de maintenir un équilibre avec les protéases sécrétées par des agents pathogènes et des cellules immunitaires(55) dans les voies aériennes. Parmi les nombreux peptides antimicrobiens que l'on retrouve dans la lumière des voies aériennes, il y a les β -défensines humaines (hBD)(56). L'une d'elles, hBD2 est notamment sécrétée lorsqu'un facteur de virulence (le lipopolysaccharide) de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* est détecté(57). Enfin, les cellules épithéliales sont également capables de synthétiser des molécules oxydantes telles que l'oxyde nitrique (NO), connu pour avoir une action antivirale(58).

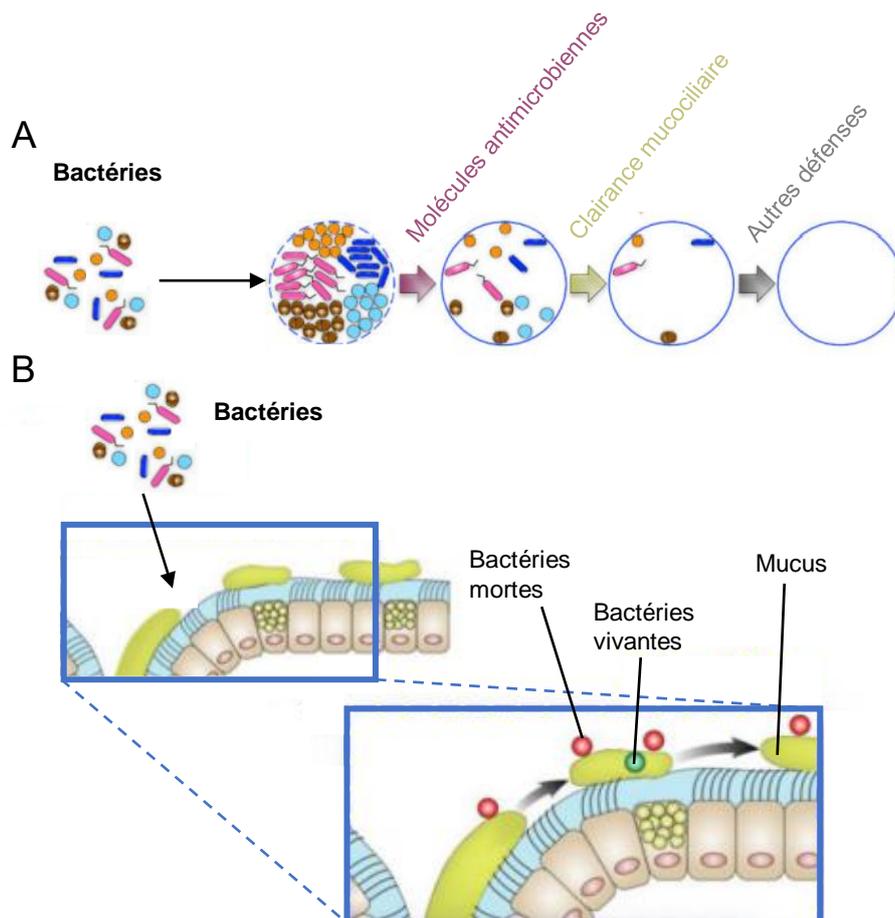


Figure 4 : Illustration des défenses antibactériennes bronchiques.

A) Schéma représentant l'impact des mécanismes antibactériens sur la charge bactérienne bronchique. **B)** Représentation du processus de clairance mucociliaire. Les bactéries vivantes (vert) ou tuées au préalable par les molécules antibiotiques (rouge) sont amenées hors des poumons grâce au mouvement du mucus. Adapté d'après Stoltz et al., 2015 (DOI: 10.1056/NEJMra1300109).

Enfin, le troisième élément permettant de protéger les voies aériennes du stress environnemental est le processus de clairance mucociliaire (**Figure 4.B**). Il s'agit d'un mécanisme complexe nécessitant le bon fonctionnement de plusieurs variables afin d'être efficace. Ce processus prend majoritairement place au niveau bronchique et s'appuie sur la présence d'un mucus tapissant la lumière des voies(59). Ce mucus va piéger les microorganismes et particules inhalées. Puis les cils des cellules ciliées vont alors battre de manière coordonnée afin de faire remonter le mucus chargé de pathogènes vers le pharynx et ainsi l'éliminer de l'arbre trachéo-bronchique via ingestion ou expectoration. Concernant le mucus, celui-ci est composé de près de 200 protéines parmi lesquelles on retrouve les mucines, des macroglycoprotéines qui permettent de structurer le mucus et de lui donner ses propriétés rhéologiques(60). Il existe différents types de mucines mais deux prédominent(61) : MUC5AC (produite par les cellules caliciformes(62)) et MUC5B (produites par les cellules séreuses(63)). L'hydratation du mucus est un paramètre qui doit être maintenu via un équilibre ionique de Chlorure Cl⁻ et de Sodium Na⁺(64) réalisé grâce à divers canaux présents sur les membranes apicales de cellules de voies aériennes. Cela permet d'obtenir un équilibre hydrique entre l'épithélium et le mucus qui le surplombe et ainsi des propriétés physico-chimiques optimales pour le mucus.

Le battement coordonné des cils des cellules ciliées permet donc de « pousser » le mucus. La vitesse de battement est alors un élément important pour permettre le mouvement du mucus(65). Afin d'effectuer leur oscillation de la manière la plus optimale, les cils sont entourés d'un liquide dit periciliaire moins visqueux que le mucus. Il est épais d'environ 7µm soit la longueur moyenne des cils et il agit comme couche lubrifiante(65).

d. Cellules immunitaires des voies aériennes

Afin d'assurer la protection du microenvironnement pulmonaire face aux agressions extérieures, l'épithélium bronchique est, en plus des fonctions de barrière, capable d'orchestrer la réponse immunitaire innée. Les cellules épithéliales jouent un rôle de cellules sentinelles de l'immunité. Elles sont capables de détecter un grand nombre de microorganismes pathogènes via leurs *Pattern Recognition Receptors* (PRR), un groupe de récepteurs spécifiques membranaires, cytosoliques ou endosomaux. Ces PRR sont capables de reconnaître un grand nombre de motifs associés à des pathogènes ou *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMP)(66) ainsi que des signaux de danger cellulaire. La reconnaissance des PAMP par les PRR peut-être due à un contact direct entre le récepteur cellulaire et le microorganisme pathogène ou un produit sécrété par ceux-ci. On retrouve notamment parmi les PRR, les *Toll-Like Receptor* (TLR). Au nombre de dix (TLR1-TLR10) ceux-ci sont très conservés chez les vertébrés(67). Dans le cas d'une infection par la bactérie à Gram-négatif *Pseudomonas aeruginosa*, ce sont les TLR4 et TLR5 membranaires qui sont responsables de la reconnaissance des facteurs de virulence de cette bactérie. Ils reconnaissent respectivement le Lipopolysaccharide (LPS)(68) et la flagelline(69). La reconnaissance des pathogènes par les cellules épithéliales leur permet de produire des chimiokines et cytokines (IL-6, CXCL8, IL-1 β , MCP-1 ...) entraînant le recrutement de cellules phagocytaires sur le site de l'infection(70). Au niveau bronchique on peut retrouver des monocytes(71) ou encore des polynucléaires neutrophiles(72).

Un récent séquençage d'ARN sur cellules isolées provenant de l'ensemble des voies aériennes (supérieures et inférieures)(73) montre un ratio intéressant quant aux différents types cellulaires présents : 89% de cellules épithéliales et 6.2% de cellules immunitaires. Au sein de ces cellules immunitaires ont été retrouvées des cellules de type myéloïde telles que des monocytes et des macrophages, majoritairement dans les prélèvements des voies inférieures. Ont également été trouvées des cellules dendritiques dans les prélèvements des voies supérieures et inférieures. Concernant ces cellules dendritiques, il a été montré qu'après leur production dans la moelle osseuse, celles-ci migraient dans divers organes et notamment le poumon pour y devenir résidentes au niveau de la muqueuse des voies aériennes(74). Une fois matures, les cellules dendritiques présentent de nombreux récepteurs et peuvent jouer leur rôle de cellules présentatrices d'antigènes.

2- Mucoviscidose, vue d'ensemble

a. Historique et épidémiologie

La mucoviscidose ou *Cystic Fibrosis* (CF) en anglais est la maladie génétique rare mortelle (à transmission autosomique récessive) la plus fréquente dans les populations d'Europe, d'Amérique du Nord et d'Australie(75). Dans les années 50, les travaux du généticien espagnol Xavier Estivill ont estimé l'apparition de plusieurs des mutations responsables de la mucoviscidose à, il y a environ, 30 à 50 000 ans(76) (77).

Mais c'est à partir du XVème siècle que l'on retrouve les premières traces écrites évoquant la maladie. Une description présumée de la pathologie a été réalisée en 1595 par Pieter Pauw, un professeur d'anatomie des Pays-Bas ayant réalisé l'autopsie d'un enfant de 8 ans durant laquelle il rapporte l'observation d'un pancréas cirrhotique. Au cours des siècles suivants plusieurs rapports d'autopsies évoquent une affection pancréatique similaire chez de jeunes enfants décédés. En plus de cette atteinte, sont également évoqués des retards de croissance, des cas de malnutrition et des diarrhées. Un premier cas d'iléus méconial est décrit en 1838 par le pathologiste Carl Von Rokistansky.

C'est en 1936 que pour la première fois le terme de *zystischer Pankreasfibromatose*, ou fibrose kystique du pancréas, est utilisé par le pédiatre suisse Guido Fanconi von Grebel, pour décrire cette pathologie infantile. Puis en 1938 est publié par Dorothy Andersen un article de référence(78). Elle y décrit dans une vaste étude clinique menée sur 49 enfants les symptômes de la maladie (obstruction intestinale et complications respiratoires notamment) ainsi que les conséquences histologiques sur le pancréas. Elle permet ainsi de faire évoluer cette affection aux symptômes multiples vers une pathologie reconnue, la mucoviscidose.

En 1989, trois publications simultanées évoquent l'identification du gène muté responsable de la mucoviscidose(79–81). Il s'agit du gène situé sur le bras long du chromosome 7 (7q31) et codant pour la protéine membranaire *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator* (CFTR). Les auteurs montrent également que chez 70% des patients échantillonnés, est retrouvée une délétion de trois paires de bases entraînant une délétion d'une phénylalanine en position 508 (F508Del).

Aujourd’hui, la mucoviscidose est considérée comme une maladie rare puisque l’on estime son incidence à 1 naissance sur 3500 à 5000(82). Sa prévalence varie selon les régions du monde et les ethnies, la majorité des cas se trouve dans les pays occidentaux (Europe, Amérique du Nord, Australie). On estime aujourd’hui qu’il y aurait entre 70 000(83) et 105 000 patients (American Cystic Fibrosis Foundation) atteint de mucoviscidose dans le monde. Toutefois, la théorie selon laquelle la mucoviscidose serait une pathologie presque exclusivement retrouvée chez des individus d’origine européenne évolue. En effet, malgré un faible nombre de cas détectés en Asie, celui-ci est tout de même suffisant pour nécessiter l’ouverture de centres de soins spécifiques de la mucoviscidose dans des pays tels que l’Inde(84).

En France, le registre français de la mucoviscidose 2022 publié par l’association Vaincre la Mucoviscidose nous permet de disposer de nombreuses données sur l’évolution de la pathologie et des patients depuis les années 1990. On observe qu’il y a à ce jour 7743 patients qui ont été recensés. Et ce nombre ne cesse de croître au fil des années, notamment grâce au recul de l’âge au décès et à l’augmentation subséquente de la proportion de patients adultes dans la population mucoviscidosique. Ils représentaient 17.8% de la population en 1992 contre 62.5% aujourd’hui (**Figure 5**). Ainsi l’âge médian au décès a été considérablement décalé en passant de 27.8 ans en 1992 à 40.8 ans en 2022 (**Table 1**).

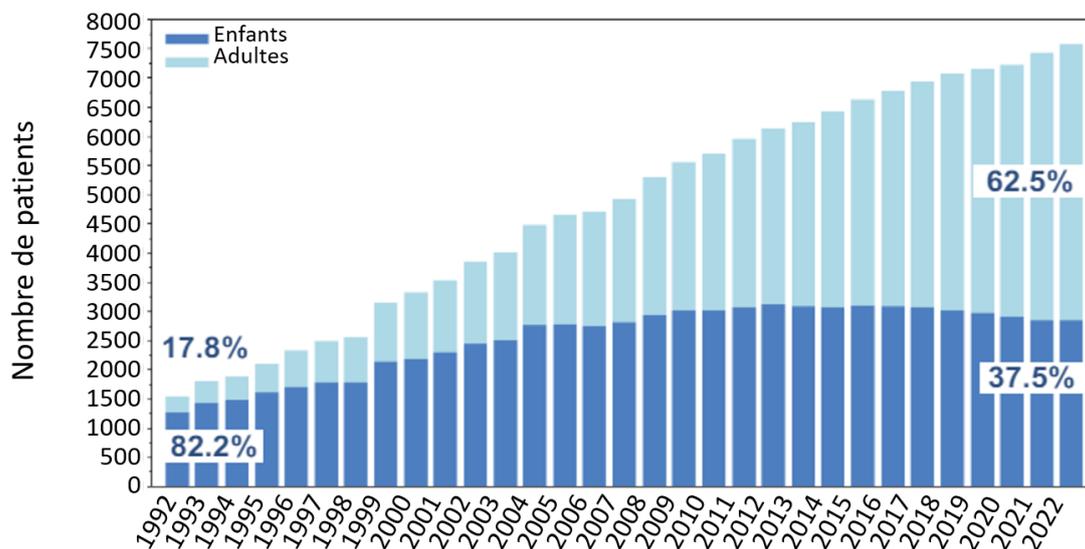


Figure 5 : Evolution du nombre de patients CF depuis 1992. Bleu clair : proportion d’adultes; Bleu foncé : proportion d’enfants dans la population CF. Extrait du registre français de la mucoviscidose, bilan des données 2022.

	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Nombre de décédés	55	59	73	47	57	60	62	43	47	46	56
Taux brut de mortalité (pour 1000)	9.1	9.5	11.5	7.2	8.5	8.8	8.9	6.0	6.5	6.3	7.5
Âge moyen	32.2	35.6	29.5	35.5	32.4	35.8	34.8	35.6	37.0	42.5	44.2
Âge médian	27.8	32.2	27.4	32.5	28.2	33.8	31.7	35.9	33.0	39.1	40.8
Âge minimum	2.2	1.1	0.1	9.0	1.6	6.0	7.3	0.4	0.3	12.8	21.5
Âge maximum	88.4	82.5	71.2	83.2	81.7	74.3	80.9	65.9	85.8	82.2	82.2

Table 1 Evolution de caractéristiques d'âge chez les patients CF depuis 2012
Adapté d'après du registre français de la mucoviscidose, bilan des données 2022.

b. Dépistage néonatal

En France, avant 2002 il n'existait pas de dépistage systématique de la mucoviscidose. Le diagnostic était posé après une période plus ou moins longue d'apparition des symptômes. On retrouvait parmi les différents signes cliniques : l'iléus méconial, des diarrhées graisseuses et des infections répétées des voies respiratoires. Le constat de ces symptômes menait ensuite à la réalisation d'un test de la sueur qui, s'il était positif était suivi d'une recherche de variants du gène *CFTR*.

A partir de 2002, un dépistage néonatal (DNN) systématique sur l'ensemble du territoire français a été mis en place. Celui-ci a permis une réduction drastique du temps avant la prise en charge des nouveaux patients. Ce DNN comporte plusieurs étapes clairement établies et permet ainsi de détecter la quasi-totalité des nouveaux patients. Il débute par un dosage sanguin de la trypsine immunoréactive (TIR), une enzyme pancréatique qui, si elle présente des taux élevés peut être un signe d'anomalie pancréatique fœtale ou post-natale. Ce dosage est insuffisant pour établir le diagnostic de mucoviscidose mais il permet tout de même de détecter près de 95% des nouveau-nés atteints de la pathologie. Il faut ensuite réaliser une analyse moléculaire de *CFTR* pour la recherche de variants. Il faut noter que ces tests sont optimisés pour éviter au maximum les faux-négatifs et permettent d'identifier plus de 96% des variants(85). Si deux variants sont identifiés alors le diagnostic est confirmé avec un examen clinique du nouveau-né et un test de la sueur. Le nouveau-né atteint et les parents seront alors redirigés vers un Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose (CRCM). Créées en 2002, ces structures hospitalières sont au nombre de 45 en France et ont de multiples objectifs. Ils permettent de délivrer aux parents et aux malades des informations

claires sur le diagnostic et les stratégies thérapeutiques. Ces centres proposent également des consultations de spécialistes pluridisciplinaires permettant ainsi de prendre en charge les atteintes multi-organes de la pathologie. Enfin ces centres tiennent des activités de recherche permettant de suivre les patients et de centraliser les données recueillies.

Il existe deux autres cas de diagnostic prénatal de la mucoviscidose. Ceux-ci interviennent d'une part lors d'une fécondation *in vitro* et après conseil génétique. Il peut alors être réalisé une analyse génétique afin de sélectionner un embryon sain. Ou d'autre part, lors de la grossesse après un conseil génétique ou une anomalie échographique, il est possible de réaliser une amniocentèse afin de procéder à une analyse génétique de l'embryon.

c. Variants du gène *CFTR* et rôles de la protéine CFTR

Depuis la découverte du gène *CFTR* responsable de la mucoviscidose en 1989, plus de 2000 variants ont été répertoriés et parmi lesquels on en retrouve plus de 700 considérés comme pathogènes. Ce gène est composé de 230kb et possède une région codante composée de 27 exons(86). La protéine du même nom est un canal transmembranaire de 1480 acides aminés retrouvé au niveau de la muqueuse de différents organes(87) : poumons, intestins, foie, pancréas, ... Elle fait partie de la famille des *ATP Binding Cassette (ABC) proteins*, des transporteurs de différents substrats au moyen de l'hydrolyse de l'ATP. L'activité principale de la protéine CFTR est d'agir comme un canal pour les ions chlorures (Cl⁻). Elle est également responsable de la régulation d'autres canaux ioniques tels que ENaC(88), un canal membranaire épithélial pour les ions sodium (Na⁺). La protéine CFTR a aussi un rôle dans diverses régulations cellulaires : transport du bicarbonate (HCO₃⁻)(89), métabolisme des lipides. La fonction de CFTR se révèle donc cruciale pour maintenir l'équilibre osmotique et par extension l'équilibre hydrique entre l'épithélium et le mucus qui le surplombe (comme par exemple au niveau bronchique). Cet équilibre permet de maintenir l'hydratation et la viscosité du mucus.

Parmi les 2000 variants du gène *CFTR* qui ont été décrits, un certain nombre ont un impact sur la production de la protéine ou l'altération de sa synthèse, de sa fonction ou encore de sa stabilité membranaire. Une classification en sept groupes (classe I à VII) a été proposée (**Figure 6**) selon le type de mutation et l'impact sur la protéine produite(90).

Les mutations de classe I regroupent un ensemble de variants induisant un codon stop ou un décalage du cadre de lecture terminant prématurément la transcription de *CFTR*. Cela entraîne une production nulle ou fortement réduite de la protéine. Le variant de classe I le plus représenté en France est G542X, retrouvé chez 5.5% des patients.

Les mutations de classe II mènent à un repliement aberrant de la protéine CFTR ce qui induit un arrêt prématuré de sa maturation par la machinerie cellulaire avant d'être dégradée par le protéasome. La quantité de protéine CFTR à la membrane apicale des cellules se retrouve alors fortement diminuée. Dans cette classe on retrouve le variant F508Del, une mutation fortement retrouvée dans la population mucoviscidose française puisque présente chez 83.2% des patients.

Les mutations de classe III permettent d'obtenir des quantités acceptables de CFTR à la membrane toutefois la régulation de l'ouverture du canal est altérée ce qui impacte fortement les échanges ioniques. On y retrouve le variant G551D qui touche 1.8% des patients français.

Les mutations de classe IV altèrent quant à elles la conductance du canal CFTR entraînant une diminution des flux d'ions à travers la membrane. Par exemple, le variant R117H qui touche 1.8% des patients français.

Les mutations de classe V regroupent plusieurs types de variants entraînant une réduction de la production de protéine fonctionnelle à cause d'anomalies de transcription ou d'épissage alternatif. C'est le cas pour le variant A455E qui touche 0.7% des patients français.

Les mutations de classe VI touchent à la stabilité de la protéine. En effet, celle-ci est produite, maturée et menée à la membrane mais elle sera rapidement dégradée par l'activité lysosomale cellulaire réduisant ainsi fortement les échanges ioniques.

Enfin, plus récemment une classe VII des mutations de CFTR a été créée. Sa définition est liée à l'utilisation des récents traitements administrés aux patients, les modulateurs de CFTR. Cette classe inclut les variants des délétions ou des décalages de cadre de lecture trop importantes qui empêchent la production d'ARNm, annihilant donc l'efficacité de ces traitements.

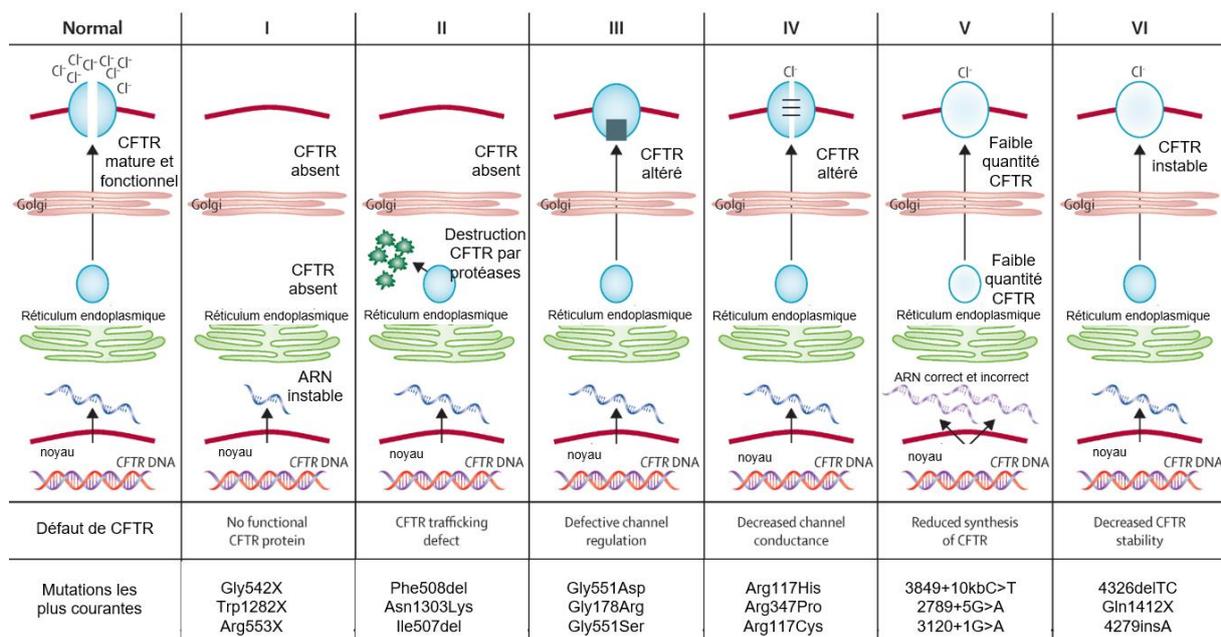


Figure 6 : Les différentes classes de mutations du gène *CFTR*.

Adapté d'après Elborn *et al.*, 2016 (90).

Cette classification est utile puisqu'elle permet de grouper les nombreux variants qui existent selon des critères fonctionnels et/ou expressionnels. Mais elle présente des limites importantes. En effet certains variants dont F508Del, la mutation la plus représentée dans la population mondiale de patients, appartient à la classe II mais elle pourrait également être placée dans les classes III et IV puisque cette mutation induit des altérations à plusieurs niveaux.

Ces sept classes peuvent elles-mêmes être regroupées en deux types de mutations, les classes IV et V sont dites des mutations de fonction résiduelle(90). Les patients ayant au moins une de ces mutations présentent des symptômes amoindris de la mucoviscidose et/ou un développement plus tardif(91,92) ; déclin plus lent de la fonction respiratoire, infections par *P. aeruginosa* moins fréquentes, taux de chlorure diminués dans la sudation. *A contrario*, les classes de mutation I à III, VI et VII qui sont qualifiées de mutations à fonction minimales et pour lesquelles la fonction de CFTR est nulle ou quasi nulle.

3- Mucoviscidose, physiopathologie

a. Vue d'ensemble des atteintes multi-organes

Comme nous l'avons vu précédemment, la protéine CFTR est exprimée dans les muqueuses épithéliales de divers organes du corps. En tant que protéine canal, elle permet le passage d'ions chlorure qui participent au maintien de l'homéostasie ionique entre les épithélia où elle est située et la lumière les surplombant. Son altération peut avoir des impacts divers en fonction des organes (voies respiratoires, tractus gastro-intestinal, glandes sudoripares, appareil reproducteur, ...) (**Figure 7**). Aujourd'hui la principale cause de morbidité et de la mortalité de la mucoviscidose est l'affection pulmonaire. Près de 80% des décès (Rapport annuel CFF 2011) peuvent être imputés à des développements pulmonaires obstructifs.

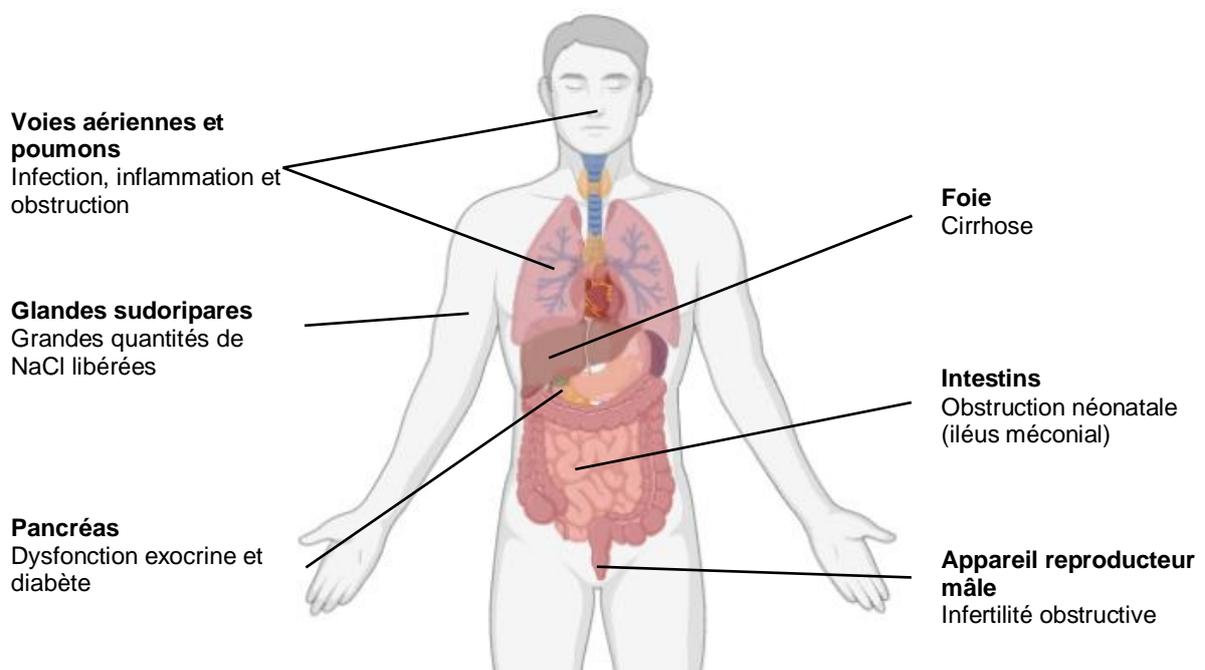


Figure 7 : L'affection multi-organe de la mucoviscidose.
Adapté d'après Grasemann *et al.*, 2023 (82).

Au niveau épithélial, la protéine-canal CFTR est présente sur la face apicale des cellules. De manière générale, le transport ionique et fluide à travers un épithélium peut se réaliser de deux manières : par voie paracellulaire ou transcellulaire(93). La voie paracellulaire est un processus passif régi par des gradients électrochimiques transépithéliaux et par la sélectivité des jonctions cellulaires. La voie transcellulaire quant à elle fait intervenir diverses protéines

canal. Il est communément admis qu'en condition physiologique il existe un équilibre entre l'absorption d'ion Na^+ , majoritairement réalisée par le canal ENaC et la sécrétion de Cl^- et de bicarbonates HCO_3^- par plusieurs canaux mais dont le principal est le canal CFTR. La sécrétion de solutés, dont Cl^- , à la face apicale des épithélia crée une force osmotique permettant une sécrétion d'eau para ou transcellulaire via les aquaporines(94). *A contrario*, l'influx d'ions Na^+ va inverser le gradient osmotique et induire une absorption d'eau.

L'établissement de ces gradients ioniques permet donc d'induire des flux hydriques et ainsi, dans le cas du poumon, de réguler l'équilibre ionico-hydrique du mucus(95) qui tapisse les voies respiratoires.

Dans le cas de la mucoviscidose, au niveau pulmonaire l'absence ou la fonction réduite de la protéine CFTR induit une diminution de la sécrétion de Cl^- et de bicarbonates HCO_3^- dans la lumière des voies aériennes ce qui modifie le gradient osmotique. Il n'y a alors plus de sécrétion d'eau mais au contraire une réabsorption de la part de l'épithélium(93). La principale conséquence est la déshydratation du mucus bronchique nécessitant pourtant une fine régulation afin d'opérer le processus de clairance mucociliaire. Ce déséquilibre ionico-hydrique au niveau bronchique est problématique puisque le mucus déshydraté va être mal évacué par le battement des cils menant à son accumulation dans la lumière. Il va alors se créer d'une part, un micro-environnement local pro-inflammatoire délétère à long terme pour l'épithélium bronchique(96) et d'autre part favoriser les infections par des microorganismes pathogènes qui ne sont plus dirigés vers le système digestif. L'alternance de ces phases d'infection et d'inflammation va mener à l'altération de l'épithélium bronchique et au final au développement de bronchectasie. Cela peut survenir tôt chez les patients puisqu'on estime qu'à l'âge de 3 ans, un tiers des patients présente déjà des signes de bronchectasie(97). Elles sont causées par l'action délétère directe des pathogènes tels que les bactéries qui vont coloniser ce microenvironnement. Mais la réponse immunitaire subséquente est également délétère. En effet, il est relevé une présence accrue de neutrophiles au niveau bronchique, or ils produisent des protéases telles que des élastases, cathepsine S ou métalloprotéases qui peuvent s'attaquer à la barrière épithéliale et mener au développement de bronchectasies(98–100).

Ainsi au niveau bronchique, cet enchaînement d'obstruction, infection et inflammation mène

à l'altération de l'épithélium bronchique, au déclin progressif de la fonction respiratoire et *in fine* à une insuffisance respiratoire mortelle.

L'affection pulmonaire revêt une importance primordiale dans le contexte de la mucoviscidose mais le bilan clinique des patients montre également de nombreuses affections extra pulmonaires. On en note notamment plusieurs au niveau du système digestif.

En contexte physiologique, le pancréas exocrine sécrète environ 2L(93) de ce qui est appelé le suc pancréatique, composé de bicarbonates HCO_3^- et d'enzymes digestives. Ce suc est ensuite mené à l'intestin pour prendre part au processus de la digestion. Or dans le contexte de la mucoviscidose, l'altération de la protéine CFTR induit une diminution de la sécrétion de Cl^- et de HCO_3^- dans les canaux pancréatiques modifiant ainsi les flux hydriques, de manière comparable à la situation bronchique. Cela entraîne une obstruction des canaux pancréatiques (pancréatite obstructive chronique), une séquestration des proenzymes digestives menant à une malabsorption des nutriments pour le patient ainsi qu'une dégradation du pancréas exocrine. L'obstruction peut même survenir dès la naissance(101). Ce mécanisme mène chez 80% des patients à une insuffisance pancréatique(102). De manière intéressante, on peut discriminer parmi les patients, deux populations : les patients qui sont insuffisants pancréatique (classes de mutations de CFTR I, II, III et VII), 80% des patients français et ceux qui sont suffisants pancréatiques (classes de mutation de CFTR IV, V et VI) qui peuvent développer une insuffisance pancréatique plus tardivement. Passée la première décennie de vie des patients, il peut se développer un type de diabète propre à la mucoviscidose. Il touche près de 22% des patients français. Ce diabète présente des caractéristiques du diabète de type 1 : une diminution de la sécrétion d'insuline(103) suite à la destruction des îlots de Langerhans. Et d'un diabète de type 2 : développement d'une résistance à l'insuline(104).

Concernant le système hépato-biliaire, de manière comparable au mucus pulmonaire, la bile produite dans la vésicule biliaire se retrouve déshydratée et ne peut plus être correctement acheminée(105) vers le système digestif. De plus, les pathologies hépatiques (18% des patients français) peuvent évoluer en cirrhose (4% des patients) pouvant être couplée à une hypertension portale (2%). Cette affection va nécessiter, dans certains cas, une transplantation hépatique.

Les glandes sudoripares sont elles aussi affectées. En contexte physiologique, elles permettent de maintenir la température du corps. Cela se fait grâce à la sécrétion de sueur composée d'eau et de minéraux, dont majoritairement du NaCl. Dans le contexte de la mucoviscidose, la réabsorption du NaCl libéré avec la transpiration est altérée. Cela en induit des quantités très importantes dans la sueur(93). Cette altération ne représente pas un problème clinique grave mais peut, dans un contexte de climat chaud, induire une perte importante de sel et d'eau pour les patients.

Enfin, le système reproducteur des patients peut être altéré. On estime que près de 98% des patients mâles sont stériles(105). La spermatogénèse est normale mais l'aspermie est causée par l'obstruction des canaux déférents. Les femmes (dans une moindre mesure que les hommes) peuvent également avoir une fertilité réduite causée notamment par une déshydratation de la glaire cervicale.

La mucoviscidose a donc une composante multi-organe qui est importante à prendre en compte pour la prise en charge des patients. Elle nécessite des consultations par des équipes multidisciplinaires et des traitements adaptés. En plus de cela, les anomalies de fonction par organe peuvent se développer à des âges très différents de la vie des patients (**Table 2**) ce qui induit la nécessité d'avoir un suivi permanent.

	0 à 10 ans	10 à 20 ans	20 à 35 ans	>35 ans
Voies aériennes	Colmatage mucineux précoce	Bronchectasie établie	Bronchectasie avec hémoptysie / pneumothorax	Insuffisance respiratoire / greffe pulmonaire
Infections	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i> / <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i> / autre Gram-négatifs	///
Pancréas	Insuffisance exocrine	///	Diabète CF	///
Foie	Tests de fonction anormaux	Cirrhose	Hypertension portale	Greffe du foie
Intestin	Ileus méconial	///	Syndrome d'obstruction intestinale	///

Table 2 : Anomalies fonctionnelles des organes chez les patients CF en fonction de l'âge. Adapté d'après Elborn et al., 2016 (90).

b. L'atteinte pulmonaire : infections

Comme nous l'avons vu précédemment, l'affection pulmonaire au travers de la diminution de la fonction respiratoire représente la principale cause de mortalité de la population mucoviscidosique. Ce déclin respiratoire est lié aux variants de CFTR puisqu'ils induisent une déshydratation du mucus menant à l'obstruction bronchique d'une part et à une altération du processus de clairance mucociliaire d'autre part. Au sein de ce micro-environnement, la défaillance des défenses contre les pathogènes en fait un environnement propice à de nombreux pathogènes qui vont coloniser la lumière des voies aériennes. La colonisation des bronches par des microorganismes est progressive, elle débute par une primo infection par un pathogène(106), à savoir la première infection pathogénique qui est détectée dans les prélèvements. Puis les infections deviennent récurrentes avant de devenir chroniques. Cette présence de pathogènes au niveau pulmonaire et plus particulièrement bronchique induit de la part de l'épithélium une réponse inflammatoire. Se met alors en place un cercle vicieux d'alternances de phases d'infections et d'inflammations qui se révèlent irréversiblement délétères pour le micro-environnement bronchique(107).

Les infections bronchiques de la mucoviscidose sont causées par une large variété de pathogènes aujourd'hui relativement bien catalogués. On trouve en premier lieu les agents bactériens, pour lesquels plusieurs espèces sont retrouvées. On note également une évolution de la proportion de ces espèces en fonction de l'âge des patients (**Figure 8**). De manière intéressante, lorsque l'on se penche sur la prévalence des différentes espèces bactériennes pathogènes en fonction de l'âge, on retrouve des similitudes d'espèces et de proportions entre deux cohortes françaises et américaines(108). Ainsi durant les premières années de vie des patients on retrouve notamment dans leurs expectorations(109) la bactérie *Staphylococcus aureus* dite méticilline sensible. Puis, à des âges plus avancés, c'est *Pseudomonas aeruginosa* qui voit sa proportion augmenter. Il s'agit des deux espèces bactériennes les plus représentées au cours de la vie. *S. aureus* est retrouvée chez près de 70% des enfants et des adolescents et *P. aeruginosa* chez près de 50% des patients adultes.

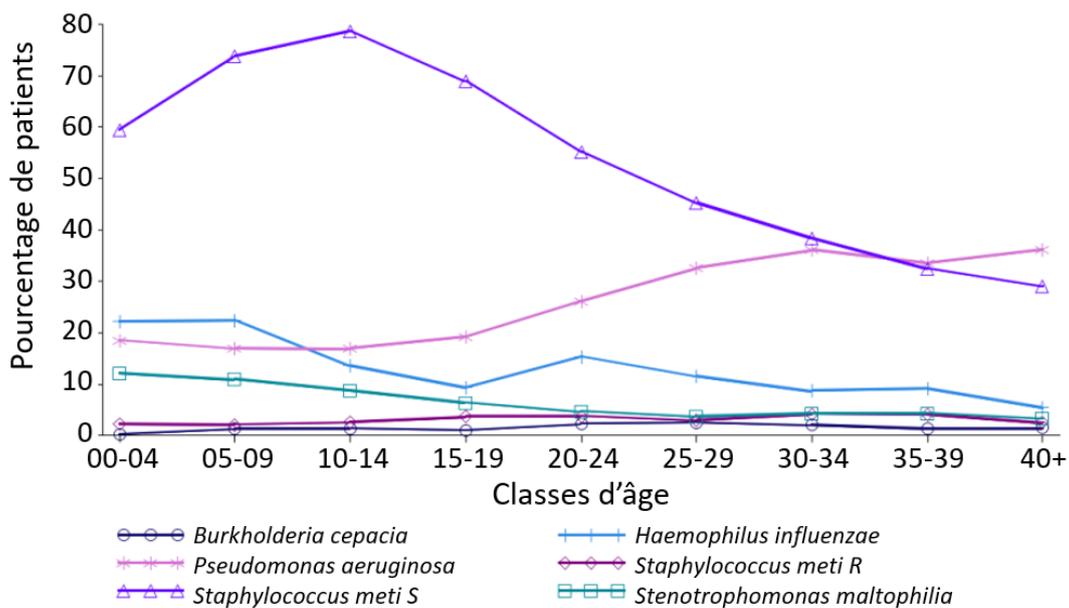


Figure 8 : Agents bactériens les plus fréquemment retrouvés au niveau pulmonaire dans la population CF, par classe d'âge.
Extrait du registre français de la mucoviscidose, bilan des données 2022.

S. aureus est une bactérie de type coque à Gram positif. Elle est aérobie et anaérobie facultatif(110). La population bactérienne de *S. aureus* peut être divisée en deux groupes en fonction de leur sensibilité à la méticilline (un antibiotique du groupe des β -lactamines) : les souches sensibles (MSSA) ou résistantes (SARM). La pathogénicité des souches MSSA est remise en question mais une étude a tout de même montré que lorsqu'elle co-infectait avec *P. aeruginosa* dans un contexte de mucoviscidose(111), cela résultait en une aggravation de l'état clinique des patients. D'autre part les infections par des souches SARM se révèlent être plus problématiques. Sa détection dans les voies respiratoires est associée à une survie plus faible des patients(112). Les SARM ont également été associées avec plusieurs paramètres de mauvais pronostics : déclin accéléré de la fonction respiratoire(113) et augmentation des hospitalisations(114).

P. aeruginosa est une bactérie bien connue et elle sera décrite plus en détail dans la prochaine partie du manuscrit. Il s'agit d'un bacille à Gram négatif opportuniste. Elle ne colonise que rarement les bronches de sujets sains mais dans le contexte de la mucoviscidose elle représente un des principaux pathogènes. Sa détection dans les expectorations de patients est synonyme d'un tournant dans la maladie puisqu'elle est associée à un déclin rapide et

significatif de la fonction respiratoire ainsi qu'un décès prématuré(115). C'est au regard de sa pathogénicité qu'ont été mis au point des programmes de traitements antibiotiques visant à éradiquer la bactérie(116). Cette stratégie explique la diminution de sa prévalence dans les populations américaine et française (~45% des patients en 2012 contre ~30% en 2022). Mais elle pourrait également induire le développement de souches multirésistantes aux traitements(117).

Outre ces deux espèces bactériennes majoritaires, on peut en noter certaines autres d'importance : les espèces du complexe *Burkholderia cepacia*. Il s'agit d'un groupe de plus de 20 espèces à Gram négatif. Ces espèces présentent un intérêt particulier puisqu'elles ont été associées à un déclin de la fonction respiratoire des patients mucoviscidosiques(118). Elles s'avèrent également être source de préoccupation dans un contexte de transplantation pulmonaire(119). L'autre espèce bactérienne est *Stenotrophomonas maltophilia*, une bactérie à Gram négatif. Il a été montré que l'utilisation de traitements antibiotiques visant *P. aeruginosa* favorisait son développement(120). Elle s'avère poser des problèmes de mortalité lors des processus de transplantation pulmonaire(121).

Outre les agents bactériens, les patients mucoviscidosiques se révèlent également sensibles aux infections fongiques et virales (**Table 3**). Les espèces fongiques les plus fréquemment isolées d'expectorations chez les patients sont du type *Aspergillus*(122). Les infections par ce type fongique et notamment par *Aspergillus fumigatus* se révèlent souvent être asymptomatiques. Toutefois l'infection chronique par ce pathogène a été associé avec le développement d'exacerbations pulmonaires(123) (phases durant lesquelles il y a une augmentation des signes d'infections pulmonaires tels que la toux ou les expectorations). Il a également été montré que les co-infections avec *P. aeruginosa* induisaient une réduction de la fonction respiratoire(124).

	Total	%
Effectif total	7572	
Aspergillus fumigatus	921	12.2
Autre aspergillus	215	2.8
Recherche de virus	1924	25.4
- Coronavirus	1002	13.2
- Grippe A	221	2.9
- Grippe B	11	0.1

Table 3 : Détection d'espèces fongiques et virales dans les prélèvements pulmonaires de patients CF. Adapté d'après le registre français de la mucoviscidose, bilan des données 2022.

Enfin, le développement récent de tests rapides de détections permet de rendre compte du rôle des virus dans la mucoviscidose. Détectés chez près de 25% des patients en France, on estime que les virus les plus représentés sont le virus respiratoire syncytial (VRS), le rhinovirus et les virus grippaux type A et B(125). Les infections virales sont associées à un risque élevé d'exacerbations pulmonaires et à une réponse inflammatoire plus élevée. Il a également été montré des cas de co-infection virus/bactéries (*P. aeruginosa* ou *S. aureus*)(126,127).

Il a été démontré que la transmission inter-patients des microorganismes pathogènes évoqués ci-avant a été importante(128). Cela a donc nécessité la mise en place de protocoles dans les structures hospitalières visant à sécuriser les contacts entre patients afin de limiter la propagation des souches bactériennes pathogènes.

Enfin, la susceptibilité à l'infection par des pathogènes dont *P. aeruginosa* a été montrée comme modulée en partie par des facteurs génétiques. Une étude portant sur des jumeaux(129) a prouvé qu'il existait des modificateurs génétiques modulants l'infection par *P. aeruginosa* et notamment l'âge de la primo-infection.

c. L'atteinte pulmonaire : inflammation

L'autre composante importante de l'atteinte pulmonaire en contexte de mucoviscidose est l'inflammation. En effet, une des caractéristiques de l'épithélium bronchique dans ce contexte est le développement d'une inflammation chronique non résolutive(98). Un débat existe aujourd'hui afin de déterminer si l'inflammation est intrinsèquement présente dans les poumons des patients mucoviscidosiques ou si celle-ci nécessite une phase d'infection par des agents bactériens, fongiques ou viraux. En effet, certaines études ont montré à partir d'autopsies de nourrissons que le tissu pulmonaire ne présentait pas de signes d'inflammation(130). Mais d'autres études ont retrouvé des signes de processus inflammatoire chez des nourrissons de 4 semaines(131). Si l'inflammation précoce et intrinsèque au tissu bronchique se vérifie, la composition altérée du mucus et sa stagnation(132) ainsi qu'une conséquence directe des variants de CFTR(133) pourraient être autant d'explications quant à la genèse d'un état inflammatoire. Le débat reste à ce jour ouvert.

Quoi qu'il en soit, la répétition des infections et le fait qu'elles deviennent chroniques induit le développement d'un micro-environnement bronchique pro-inflammatoire chronique caractéristique de la mucoviscidose. Celui-ci est caractérisé par une production permanente de certaines cytokines. Ces molécules ont des actions diverses et variées allant du recrutement de cellules immunitaires à leur activation ou encore la stimulation de la réparation tissulaire(134). Des lavages broncoalvéolaires réalisés sur des patients mucoviscidosiques ont révélés des taux élevés de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-6, CXCL8 et IL-1 β . Et *a contrario* une diminution des taux de cytokine anti-inflammatoire IL-10(135). CXCL8 (ou IL-8) revêt un intérêt tout particulier dans le contexte pulmonaire puisqu'elle est un chimioattractant pour les neutrophiles et permet leur dégranulation, libérant ainsi leurs protéases(134).

La réponse de l'immunité innée ainsi que le maintien de l'état inflammatoire est majoritairement dû aux polynucléaires neutrophiles. Ce sont les premières et les principales cellules à migrer vers le système pulmonaire. Les neutrophiles sont considérés comme responsables de la chronicité de l'inflammation dans les bronches. En effet, ces cellules ne parviennent pas à éliminer les agents pathogènes et participent au contraire à la dégradation structurelle de l'épithélium du patient. Les neutrophiles sont, en contexte non-mucoviscidose efficace en tant que cellules immunitaires pour lutter contre les pathogènes (tels que *Pseudomonas aeruginosa* ou *Aspergillus Fumigatus*(98)) toutefois leur trop grand nombre ainsi que leurs sécrétions se révèlent délétères. Leur action est médiée par la libération de plusieurs composants dont l'élastase et les oxydants(136) qui sont les plus importants. Mais on retrouve également d'autres protéases telles que la cathepsine S et les métalloprotéases matricielles. La détection de ces molécules dans des lavages bronchoalvéolaires de patients a été associée avec des cas de bronchectasies précoces(137). Ensembles, ces molécules vont dépasser les capacités de la réponse anti-protéase locale(138). Elles vont ainsi dégrader la barrière épithéliale en s'attaquant notamment à la matrice extracellulaire(134) ou encore en clivant des récepteurs immunitaires (des lymphocytes T ou du complément). Ces lésions structurelles de l'épithélium bronchique vont mener au fil des cycles d'infection/inflammation à des bronchectasies et potentiellement à des insuffisances respiratoires.

d. Stratégies thérapeutiques pulmonaires et extra pulmonaires

Dès la première description documentée de la pathologie, le caractère multi-organe de la mucoviscidose a représenté un challenge pour la prise en charge des patients. En effet, la défaillance de plusieurs systèmes physiologiques en simultané implique la multiplicité des traitements et des prises en charge par des professionnels de santé. L'amélioration des protocoles de soins et l'utilisation de nouvelles molécules a permis de faire progresser l'espérance de vie des patient atteints de mucoviscidose de manière spectaculaire (**Figure 9**). Passant de 7 ans en 1965 à plus de 40 ans aujourd'hui.

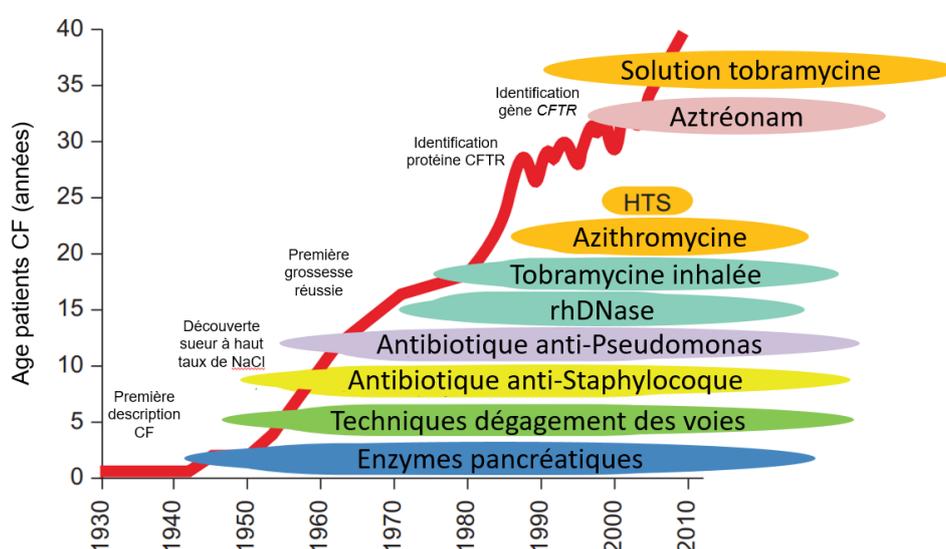


Figure 9 : Illustration de l'espérance de vie des patients CF en lien avec les stratégies thérapeutiques depuis 1930.

La courbe rouge représente l'espérance de vie des patients. A gauche les découvertes liées à la pathologie. A droite les stratégies thérapeutiques. Adapté d'après De Boeck *et al.*, 2020 (139).

Au cours du XXème siècle, ce sont d'abord les problèmes du tractus digestif qui ont été pris en charge. Les enfants malades insuffisants pancréatiques mourraient jeunes de problèmes de malnutrition(139) dus à un défaut d'assimilation des nutriments subséquent à l'insuffisance pancréatique. Il a donc été développé un traitement visant à les supplémenter en enzymes pancréatiques(140). Cela s'est ensuite accompagné du développement d'un régime riche en calories et en graisses qui a amélioré plus encore l'état nutritionnel des patients.

Il a ensuite fallu traiter l'affection du système respiratoire. La prise en charge est alors symptomatique et a un triple objectif : lutte contre l'infection, l'inflammation et dégagement

des voies aériennes. Le dégagement des voies aériennes est enseigné dès le plus jeune âge au moyen d'un ensemble de techniques actives ou passives visant à favoriser l'expectoration. Il y a toutefois aujourd'hui un débat sur la réelle efficacité de ces techniques(141). A cela il faut ajouter l'inhalation de molécules mucolytiques (tel que la dornase alpha(142)) et d'une solution saline hypertonique. Ces deux traitements inhalés ont fait leurs preuves en permettant la réduction des exacerbations pulmonaires ainsi que l'amélioration de la fonction respiratoire.

Il est également important de réguler l'état inflammatoire du micro-environnement bronchique afin de trouver un équilibre entre une inflammation exacerbée délétère pour l'épithélium et une inflammation insuffisante qui favoriserait l'infection pathogénique. A date, en terme de traitement uniquement anti-inflammatoire, seul l'ibuprofène a forte dose a été montré comme capable de limiter le déclin de la fonction respiratoire(143). Il existe à l'heure actuelle un grand nombre d'études et d'essais cliniques qui visent à développer de nouvelles molécules anti-inflammatoires s'axant sur l'activité antiprotéase ou antioxydante dans le contexte de la mucoviscidose(98).

Enfin, le contrôle de l'infection par des pathogènes notamment bactériens est un des axes de lutte principal. Cela passe par des traitements préventifs et curatifs d'antibiotiques. Les principales molécules sont l'azythromycine, la tobramycine, l'aztréonam et la lévofloxacine(144) qui sont dispensés localement (sous forme inhalées) et/ou systémiquement. Bien que l'utilisation à haute dose et fréquence de molécules antibiotiques améliore la survie des patients(145), cela induit également une pression de sélection sur les espèces bactériennes permettant ainsi le développement de souches multirésistantes dont des souches de *P. aeruginosa*(146,147). Le problème d'antibiorésistance se pose alors rendant les pathogènes plus difficiles à éradiquer.

Enfin, lorsque la capacité respiratoire des patients est trop dégradée, ils peuvent subir une transplantation pulmonaire bilatérale. Il faut pour cela que les patients aient une diminution de la fonction respiratoire, une augmentation des exacerbations pulmonaires et un Volume Expiratoire Maximal par Seconde (VEMS) inférieur à 40%. La transplantation pulmonaire présente des taux de survie de 60 à 70% à 5 ans(148). Toutefois, le recours à la transplantation pulmonaire a drastiquement chuté en France passant de 102 en 2012 à 15 en 2022. Cela est

notamment dû à l'avènement d'une nouvelle génération de molécules pour les patients mucoviscidosique : les modulateurs de CFTR.

e. Correcteurs et potentiateurs de la protéine CFTR

La décennie 2010 a représenté un réel tournant dans la thérapeutique des patients atteints de mucoviscidose. En effet, précédemment les traitements prodigués étaient uniquement tournés vers la symptomatique de la pathologie. Mais depuis plus de 10 ans une nouvelle catégorie de molécules a fait son apparition, les modulateurs de la protéine CFTR. Ceux-ci ciblent directement CFTR et dans le cas de la mucoviscidose, les protéines CFTR dysfonctionnelles. La majorité des patients (plus de 80%) est éligible pour ces traitements notamment ceux qui possèdent au moins une copie du variant F508Del de *CFTR*. Ces molécules ont été identifiées via un criblage à haut débit qui a permis de déterminer l'efficacité des composants chimiques à interagir avec la protéine CFTR(149). Il existe deux classes de modulateurs de la protéine CFTR : les potentiateurs et les correcteurs. Les potentiateurs sont des molécules qui se lient à la protéine CFTR déjà présente à la membrane et qui vont stimuler son activité en augmentant sa fréquence d'ouverture et sa conductance ionique(150). Les correcteurs quant à eux sont des molécules qui vont cibler les défauts de repliement et plus largement de maturation de la protéine CFTR(150). Parmi ces molécules ou combinaisons de molécules de nouvelle génération on peut en distinguer deux qui ont été commercialisées et qui ont fait leurs preuves. L'Ivacaftor est la première à avoir reçu une autorisation de mise sur le marché en 2012. Il s'agit d'une molécule potentiatrice de CFTR. Elle permet de diminuer les quantités de Cl⁻ dans la sueur, d'améliorer le VEMS de 10% et de mener à un gain de poids(151). La qualité de vie des patient a également été améliorée avec une diminution notable de la récurrence des exacerbations pulmonaires(152). Toutefois, l'Ivacaftor ne concerne que peu de patients et notamment pas les patients F508Del. Il a donc été développé le Kaftrio, une trithérapie alliant un potentiateur (l'Ivacaftor) et deux correcteurs (l'Elexacaftor et le Tezacaftor) (**Figure 10**). Il a reçu une autorisation de mise sur le marché récente (2019 aux Etats-Unis et 2020 en Union Européenne). En plus de concerner un plus grand nombre de patient (incluant les patients F508Del), le Kaftrio a montré des améliorations notables de la fonction respiratoire, du gain de poids et une diminution des exacerbations pulmonaires(151).

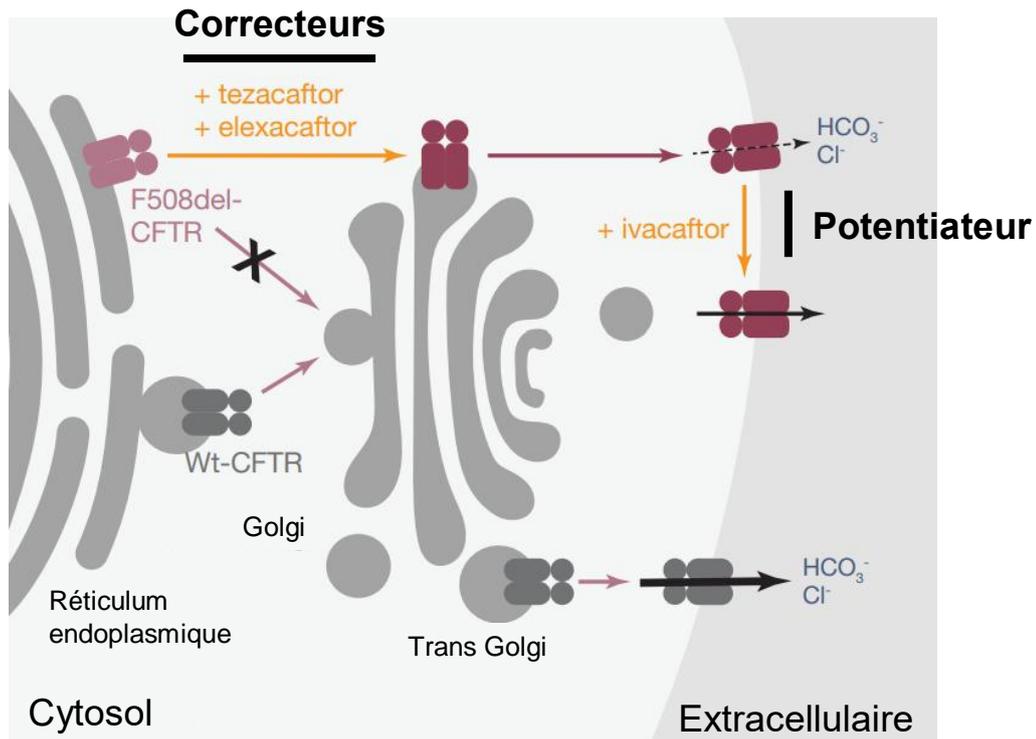


Figure 10 : Schéma illustrant le mode d'action de la thérapie Kaftrio.
Adapté d'après Bear *et al.*, 2020 (DOI: 10.1016/j.cell.2019.12.032).

Les modulateurs de CFTR se révèlent très efficaces sur la fonction pulmonaire des patients. Toutefois il est encore trop tôt pour déterminer si ces traitements ont un effet bénéfique sur l'aspect infectieux de la pathologie chez les patients. Certaines études portées sur l'ivacaftor ont montré que le microenvironnement bactérien semblait évoluer suite à ce traitement(153). Mais d'autres études ont montré que, à long terme, la charge bactérienne notamment de *P. aeruginosa*, ne semblait pas diminuer par rapport aux charges pré-traitements(154). Concernant le Kaftrio, de plus amples investigations doivent être menées. Malgré une potentielle diminution de la présence bactérienne montrée par certaines études, les microorganismes pathogènes seraient les mêmes qu'avant le traitement(155). Une étude *in vitro* a tout de même montré que la trithérapie était capable de stimuler les mécanismes antimicrobiens des neutrophiles

Partie II

Pseudomonas aeruginosa, carte d'identité

1- Généralités

a. Une bactérie à Gram négatif

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) anciennement dénommée bacille pyocyanique est une bactérie à Gram négatif du genre *Pseudomonas* classée dans la famille des *Pseudomonadaceae*. Cette famille bactérienne est aujourd'hui particulièrement étudiée du fait de l'implication de certains de ses membres dans des problématiques écologico-sanitaires. Le genre *Pseudomonas*, étymologiquement *Pseudo* pour faux et *Monas* pour unité unique en grec, a été décrit pour la première fois en 1894 par le botaniste allemand Walter Migula. Il s'agit d'un des genres bactériens le plus représenté autour du globe (156). Plusieurs de ces bactéries ont pu être isolées dans des niches environnementales très diverses allant de climats tropicaux aux climats polaires. Le genre *Pseudomonas* possède 3 espèces pathogènes majoritaires : *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* et *P. putida*.

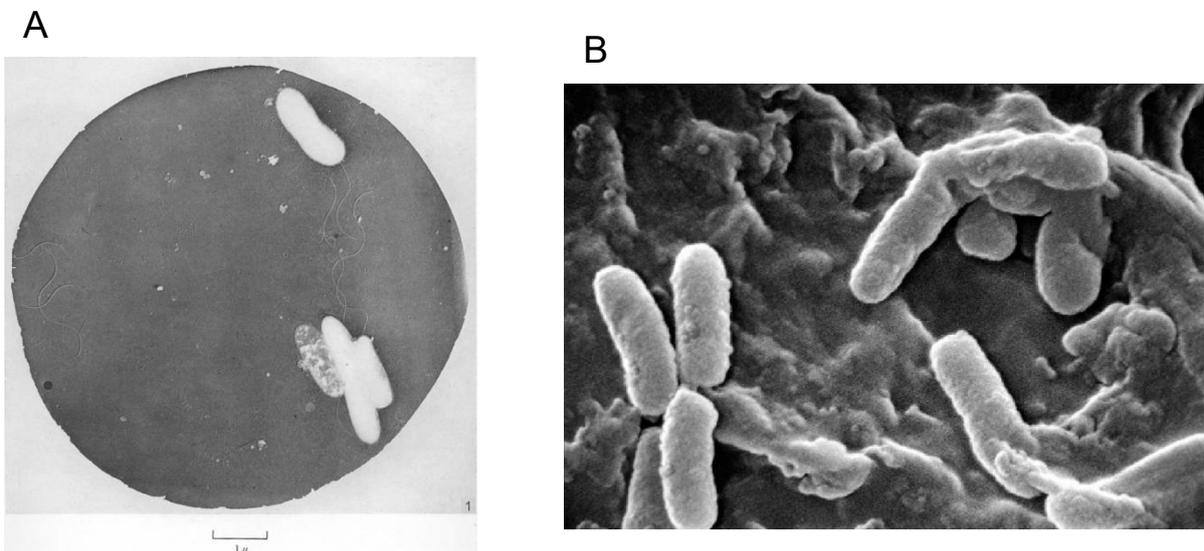


Figure 11 : Observation de *P. aeruginosa* au microscope électronique. Extrait de Ende *et al.*, 1952 (DOI: 10.1017/s0022172400019392). **B**) Observation de *P. aeruginosa* au microscope électronique. Extrait de Krzeslak *et al.*, 2007 (DOI: 10.1007/978-1-4020-6097-7_15).

Concernant *P. aeruginosa* (**Figure 11**), elle a été décrite pour la première fois en 1882 par Carle Gessard, un pharmacien français dans « Sur la coloration bleue et verte des bandages ». Il observe alors que la culture de cette bactérie présente une caractéristique bien particulière, une coloration bleu-verte. Il s'agit de la pyocyanine, un dérivé de la phénazine, produite par la bactérie et qui lui donnera son nom : *aeruginosa* provenant du latin *aerugo* pour cuivre rouillé ou bleu verdâtre (157). Comme nous l'avons évoqué précédemment, *P. aeruginosa* est une bactérie pathogène opportuniste à Gram négatif, mobile et non sporulé mesurant 1 à 5µm de long pour 0.1 à 1µm de large. Elle est capable de se développer de façon aérobie mais est également anaérobie via le catabolisme de l'arginine, ce qui en fait d'elle une bactérie anaérobie facultative. Du fait de sa capacité à pouvoir utiliser de multiples types de molécules organiques pour ses apports en énergie, *P. aeruginosa* peut se développer au sein de milieux de croissance minimaux (157). Son optimum de température se situe aux alentours de 37°C mais elle peut résister à des températures allant de 4°C à plus de 40°C (157). Pris ensemble, ces diverses caractéristiques de *P. aeruginosa* font qu'elle est métaboliquement polyvalente (158). Cela explique également qu'elle puisse être retrouvée dans un grand nombre de niches environnementales proches des humains : sols humides, végétation ou encore réserves d'eau stagnante.

La pathogénicité de cette bactérie, sur laquelle nous reviendrons plus en détail par la suite, a été démontrée dès 1889 (159) mais sa présence importante dans les pathologies dites nosocomiales ont uniquement été notées à partir de la seconde moitié du XX^e siècle. Elle est aujourd'hui considérée comme l'une des trois principales causes d'infections opportunistes nosocomiales. La relative facilité à la cultiver et à l'identifier permettent de supputer qu'avant cette période, sa non-détection dans les pathologies nosocomiales était due à une moins grande prévalence des infections par cette bactérie.

Les années 2000 et la démocratisation des technologies d'analyse génomique ont permis en 2000 le premier séquençage du génome de *P. aeruginosa* (160) (**Figure 12**). La souche ayant été utilisée à l'époque est PAO1, une souche provenant d'un prélèvement d'infection cutanée dans les années 1950. Elle est aujourd'hui utilisée comme souche dite de laboratoire dans le monde entier. Avec 6.3 millions de paires de bases, ce fut à l'époque l'un des plus grands génomes bactériens séquencé. Il est alors conjecturé que la grande taille du génome de *P. aeruginosa* soit liée à une adaptation évolutive, lui permettant d'acquérir les

capacités de tolérances environnementales qu'on lui connaît. Ce séquençage révèle une grande présence de gènes régulateurs notamment concernant des mécanismes de catabolisme, d'efflux de molécules organiques (enzymes ou antibiotiques) ou encore des systèmes de chimiotaxie (adaptation de la motilité en fonction de molécules présentes dans l'environnement) dont un impliqué dans la formation de biofilm. Ce sont autant de caractéristiques pouvant expliquer la capacité de cette bactérie à développer des résistances face à des molécules antibactériennes.

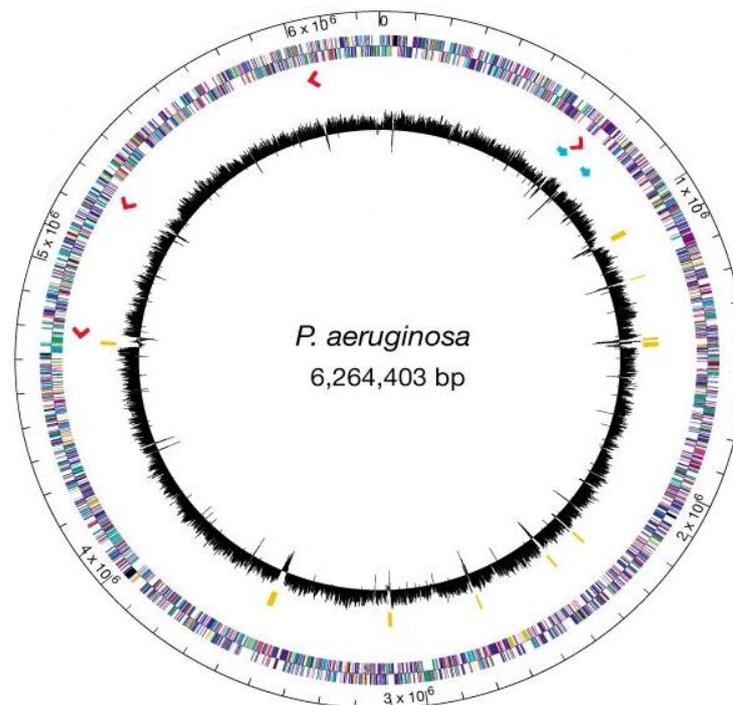


Figure 12 : Représentation du génome de *P. aeruginosa*.

Le cercle le plus extérieur montre la position chromosomique en paires de bases, une coche correspond à 100 kb. Les cases sont colorées selon la catégorie fonctionnelle des gènes. Adapté d'après Stover *et al.*, 2000 (160).

Plus récemment, la multiplication des séquençages de souches de *P. aeruginosa* couplée à un traitement bio-informatique a rendu possible une analyse pan-génomique (161). Elle représente l'ensemble des gènes d'une espèce/d'un clade bactérien. Le but d'une telle démarche est de permettre une étude en profondeur d'une population au regard de sa répartition géographique, ses phases évolutives ainsi que sa pathogénicité. Une analyse sur plus de 1000 génomes de souches de *P. aeruginosa* de laboratoires et cliniques montre un

total de 54 272 gènes. Parmi lesquels seulement 665 sont communs et forment ainsi le génome central. Il ressort de cette étude une ségrégation de la population bactérienne en 5 groupes entre lesquels la génomique liée à la résistance aux antibactériens et à la virulence diffèrent. Enfin, il y a été démontré le rôle important joué par le transfert horizontal de gène, plus de 3000 plasmides de gènes de résistance et de virulence ont pu être identifiés.

b. Pathogénicité, incidence et différentes pathologies (épithélium)

P. aeruginosa est considérée, depuis le début du XX^e siècle, comme un agent bactérien présent de manière quasi constitutive d'un grand nombre d'entités écologiques (sols, eaux, végétaux). Toutefois de récentes études visent à revoir cette omniprésence de la bactérie (162). Le bacille pyocyanique est en effet retrouvé dans ces nombreux milieux « naturels », toutefois dans des proportions moindres que dans des milieux anthropisés. Des prélèvements de divers milieux réalisés sur trois continents (Europe, Amérique du Nord et du Sud) révèlent une présence bien plus importante de *P. aeruginosa* dans des échantillons considérés comme en contact avec une activité humaine accrue. Par exemple l'étude d'échantillons d'eau montre une occurrence de près de 70% de *P. aeruginosa* dans un contexte d'activité humaine intense contre seulement 19% d'occurrence dans les échantillons sans activité humaine.

P. aeruginosa est un agent pathogène opportuniste multirésistant. En plus de cela, sa forte capacité à pouvoir s'adapter à divers milieux environnementaux lui confère la possibilité de provoquer un large spectre d'infections avec une gravité qui peut être variable. Puisque pathogène opportuniste, *P. aeruginosa* va infecter majoritairement certaines catégories de patients (163) parmi lesquels on retrouve des patients immunodéprimés, atteints du VIH ou ayant développé une neutropénie suite à une chimiothérapie ou encore des patients avec une lésion cutanée importante (grands brûlés). Les infections à *P. aeruginosa* peuvent affecter un certain nombre d'organes différents mais parmi les pathologies les plus fréquemment rapportées on retrouve l'endophtalmie, l'endocardite, la méningite, la pneumonie ou encore la septicémie (164). La probabilité de guérison de ces infections opportunistes varie selon la pathologie initiale du patient.

En plus de ces types d'infections, les infections à *P. aeruginosa* jouent également un rôle primordial dans la physiopathologie de la mucoviscidose, discutées par la suite.

Selon un rapport de 2015 (165) réalisé par le Pr Jean-Christophe Lucet pour l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), près de 5% des patients séjournant à l'hôpital contractent une maladie nosocomiale. Soit près de 750 000 patients par an. La moitié sont d'origine bactérienne et dues principalement à trois pathogènes : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. De plus, une étude multicentrique réalisée sur plusieurs continents (166) dont l'Europe et qui avait pour but la surveillance des infections nosocomiales révèle que *P. aeruginosa* représente un problème de santé mondial. En effet, le pathogène représente une part non négligeable des infections notamment dans les services de soins intensifs. L'origine de ces infections est reliée soit à des infections secondaires suite à des brûlures soit à des interventions médico-chirurgicales invasives. Dans les services de soins intensifs, on retrouve trois types d'infections majoritaires : les infections du système sanguin (bactériémie), urinaire ou respiratoire suite à la pose de cathéters centraux ou urinaires ou suite à la mise en place de la ventilation mécanique ou autre matériel attractant à la ventilation/inhalation (167).

2- *Pseudomonas*, une bactérie pleine de ressources

a. Nombreux facteurs de virulence

La pathogénicité de *P. aeruginosa* repose notamment sur sa capacité à pouvoir s'adapter à de nouveaux environnements. Ainsi, lorsqu'elle débute la colonisation d'un nouveau milieu, tel qu'un tissu humain, elle va s'aider de ses facteurs de virulence (**Figure 13**). Ce sont des structures fixes ou des molécules sécrétées ayant pour but de faciliter la colonisation du micro-environnement local en fragilisant les cellules hôtes d'une part et de permettre d'échapper à la machinerie immunitaire d'autre part.

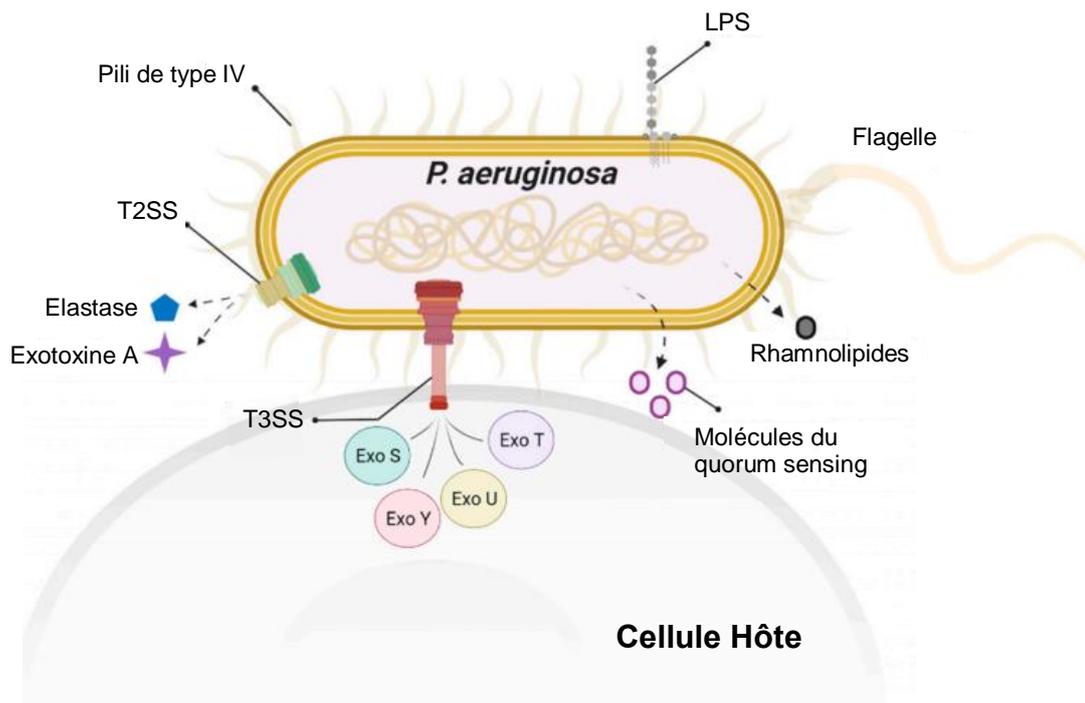


Figure 13 : Représentation schématique de la bactérie *P. aeruginosa* et de certains de ses facteurs de virulence.

Les facteurs de virulence représentés seront développés par la suite mais ne tiennent pas compte de l'ensemble des facteurs de virulence de la bactérie. Adapté d'après Wagener *et al.*, 2021 (214).

P. aeruginosa possède un très large éventail de facteurs de virulence couvrant ses différents besoins lors d'un processus d'infection (168) (**Table 4**). Toutefois leur production et leur activation sont dépendantes du mécanisme de communication interbactérienne, le *quorum sensing* (169). Il est aujourd'hui supposé que le *quorum sensing* régulerait jusqu'à 10% des gènes de *P. aeruginosa* (157). La communication interbactérienne forme un réel réseau de signalisation complexe avec plusieurs composantes. Réalisée chez plusieurs espèces, elle est aujourd'hui très étudiée chez *P. aeruginosa* (170). Le *quorum sensing* y est composé de quatre systèmes : Las, Rhl, Pqs et Iqs capables de s'influencer et où le système Las joue le rôle de régulateur (171). Parmi les quatre systèmes qui existent, Las et Rhl sont les plus étudiés à ce jour et ont un fonctionnement comparable. Ces ensembles sont composés d'un autoinducteur synthase (LasI ou RhlI) permettant la synthèse de la molécule auto inductrice de chaque voie HSL (3-oxo-C12-homosérine lactone ou C12HSL) pour la voie Las et BHL (N-butrylhomosérine lactone ou C4-HSL) pour le système Rhl (172). Ces molécules sont ensuite menées dans l'espace extracellulaire via une pompe à efflux ou par diffusion simple avec d'être captées/re-

captées. Elles sont ensuite fixées par l'activateur transcriptionnel du système (LasR ou RhIR) et qui va mener à la production de divers exoproduits et métabolites en réponse au signal détecté (lectine A ou l'élastase A et B par exemple).

Mobilité	Mode de vie biofilm	Echappement immunitaire	Résistance aux antibiotiques	Cytotoxicité
- Flagelle - Pili de type IV	- Alginate - Rhamnolipides	- Elastase - Protéases	- Pompes à efflux - Enzymes	- T3SS - LPS - Exotoxine A - Pyocyanine

Table 4 : Activités infectieuses de *P. aeruginosa* et facteurs de virulence associés. Adapté d'après Lee *et al.*, 2015 (171).

Ce mécanisme de communication interbactériennes permet notamment d'établir une réponse coordonnée au sein d'une population bactérienne dont des modifications du mode de vie bactérien. Cela est particulièrement important dans les premiers stades de l'infection en permettant la mise en place d'agrégats bactériens, ou biofilms, à la surface d'un épithélium. L'ancrage d'une communauté bactérienne multi-cellulaire permet l'évolution d'une infection aiguë en une infection chronique. Pour *P. aeruginosa*, le passage d'un mode de vie mobile (planctonique) à un mode vie fixé (biofilm) (**Figure 14**) apporte des avantages cruciaux à la colonisation : formation d'une barrière de protection face aux traitements antibiotiques ainsi qu'aux réponses immunitaires de l'hôte, facilitation du transfert horizontal de gènes (173). Le regroupement de bactéries en vue de la formation d'un biofilm s'accompagne de la synthèse d'une matrice robuste nommée substance polymère extracellulaire. Celle-ci est composée d'exopolysaccharides (alginate, Psl, Pel), de protéines et d'ADN extracellulaire (174).

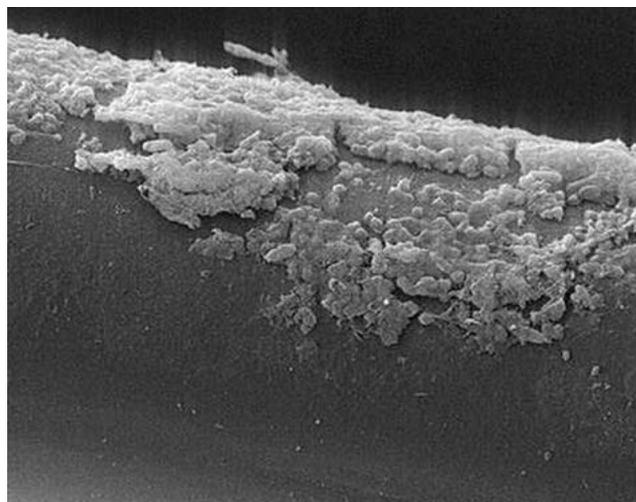


Figure 14 : Observation d'un biofilm de *P. aeruginosa* en microscopie électronique.
Extrait de De Kievit *et al.*, 2009 (173).

La fine régulation des communications interbactériennes permet au pathogène d'activer différents facteurs de virulence en fonction du stress environnemental détecté. *P. aeruginosa* en possède un grand nombre chacun ayant un objectif (favoriser l'adhésion, la motilité, l'invasion ou encore inhiber les défenses immunitaires de l'hôte) mais dont le but global est de permettre à la bactérie de coloniser le milieu.

Parmi ces facteurs, on trouve des molécules membranaires dont le lipopolysaccharide (LPS). C'est une molécule retrouvée chez la plupart des bactéries à Gram négatif et qui est un composant habituel de la membrane externe de ces bactéries. Dans un contexte infectieux, le LPS est responsable d'une partie des interactions entre la bactérie et l'hôte (175) et pouvant avoir un effet délétère sur l'épithélium. En effet, le LPS peut être reconnu par les TLR des cellules de l'hôte ce qui mène à l'activation de l'inflammasome et à la production de cytokines pro-inflammatoires (176) TNF- α , IL-1 β et IL-8 créant ainsi un micro-environnement inflammatoire propice à l'apparition de lésions épithéliales. Le LPS est capable de stimuler la production d'espèces réactives de l'oxygène ainsi que la surproduction de mucines de l'hôte ce qui s'avère délétère (177). Il est également capable d'augmenter la perméabilité paracellulaire d'un épithélium (178), aggravant alors le processus de colonisation bactérienne. *P. aeruginosa* possède un flagelle unique composée d'une structure de flagelline polymérisée. Celui-ci s'ancre dans les membranes internes et externes et a une partie extrabactérienne. Le flagelle est reconnu comme facteur de virulence d'importance (179) puisqu'il confère de la motilité à la bactérie et permet ainsi son installation dans des micro-environnement propices à son établissement. Cet élément joue également un rôle primordial pour le biofilm. Il permet initialement aux pathogènes de se réunir afin d'établir l'agrégat puis il permet par la suite la dispersion bactérienne lorsque cet agrégat se dissout (179).

Les pili dits de type IV sont des appendices filamenteux rétractables ancrés dans la double membrane bactérienne et sont situés sur l'ensemble de la bactérie. Ils sont composés d'un assemblage de monomères de pilines majeures et mineures couplés à une machinerie située à la base de ceux-ci. La fonction des pili est double, ils confèrent motilité et adhérence au pathogène. La machinerie motrice des pili leur permet l'alternance de cycles de rétractation

et d'extension (180) créant ainsi une force qui permet à la bactérie de se mouvoir. D'autre part les pili sont également impliqués dans la reconnaissance et l'attachement à des récepteurs situés sur la face apicale de cellules épithéliales (181).

Enfin, *P. aeruginosa* exprime un groupe de facteurs de virulence aussi complexe qu'hétérogène : les systèmes de sécrétion (TSS). Ceux-ci sont capables de sécréter des molécules vers le milieu extracellulaire ou directement dans le cytosol des cellules hôtes adjacentes (182). Aujourd'hui, il a été décrit chez *P. aeruginosa* pas moins de six systèmes de sécrétion (176) : système de sécrétion de type I à VI (T1SS à T6SS) ayant tous pour but l'interaction avec les cellules hôtes environnantes dans l'optique de faciliter la colonisation bactérienne (183). Le mode d'action des TSS passe toujours par la libération de molécules depuis le cytosol bactérien. Toutefois on peut distinguer deux groupes : les sécrétions directes (T1SS, T3SS, T4SS et T6SS) et les sécrétions nécessitant une étape périplasmique (T2SS et T5SS).

Parmi les six TSS, trois ont une importance toute particulière. Le premier d'entre eux, le T2SS (**Figure 15**) est considéré comme une voie de sécrétion générale vers le milieu extracellulaire puisqu'il est polyvalent en permettant la sécrétion d'un important nombre d'exoprotéines. On y retrouve des enzymes avec des activités diverses, notamment l'élastase LasB, une protéase extracellulaire montrée comme ayant un impact sur l'élasticité du tissu pulmonaire (182). On retrouve également des métalloprotéases ou des enzymes ciblant le métabolisme des lipides membranaires de l'hôte. Ensemble, les enzymes sécrétées par le T2SS participent au développement de lésions tissulaires.

Le T3SS quant à lui est comparable à une « seringue moléculaire » (**Figure 15**) puisqu'il permet d'injecter directement des toxines bactériennes dans le cytosol de la cellule ciblée. Il s'agit d'un facteur de virulence particulièrement important dans les infections par des bactéries à Gram négatif. Quatre toxines bactériennes connues sont sécrétées par le T3SS : ExoS, ExoT, ExoY et ExoU. Une étude menée sur des souches cliniquement isolées de *P. aeruginosa* (184) révèle que l'expression de ces toxines peut être mutuellement exclusive et qu'elles ne sont donc pas toutes sécrétées par les souches bactériennes. ExoU, injectée dans les cellules épithéliales, va favoriser l'apparition d'un micro-environnement inflammatoire délétère pour les cellules au travers du recrutement de neutrophiles via l'IL-8. Cette toxine est également capable, au moyen de son activité de phospholipase, de dégrader la membrane cellulaire,

menant à la mortalité cellulaire (176). ExoY, dont l'activité n'est pas encore totalement claire, semble se lier aux filaments d'actine et ainsi modifier l'organisation de ce cytosquelette. Il a aussi été montré qu'elle avait, contrairement à ExoU une action inhibant la production de cytokines pro-inflammatoires (185). ExoT, la toxine la plus répandue dans la population bactérienne a un rôle de GTPase ayant pour but d'empêcher la phagocytose et d'altérer la barrière épithéliale (186). Enfin, ExoS est associée à des souches ayant de mauvais résultats cliniques. Elle a été montrée comme impliquée dans des processus menant à la perturbation du cytosquelette d'actine, l'inhibition de la synthèse d'ADN et *in fine* la mortalité cellulaire (168,186).

Le T6SS (**Figure 15**), découvert plus récemment semble être doté de fonctions aussi diverses qu'essentielles parmi lesquelles la virulence, l'interaction entre bactéries ou encore la compétition avec d'autres micro-organismes (176). La sécrétion via le T6SS nécessite souvent le concours de molécules bactériennes cytoplasmiques. Une récente étude a montré que le T6SS pourrait être impliqué dans la formation initiale du biofilm de *P. aeruginosa* (187).

De manière intéressante, *P. aeruginosa* est à même de modifier l'expression des T3SS et T6SS afin de s'adapter au mieux à son environnement. Ainsi les bactéries mobiles possèdent fréquemment un T3SS actif alors que les bactéries en mode biofilm présentent un T6SS actif (188).

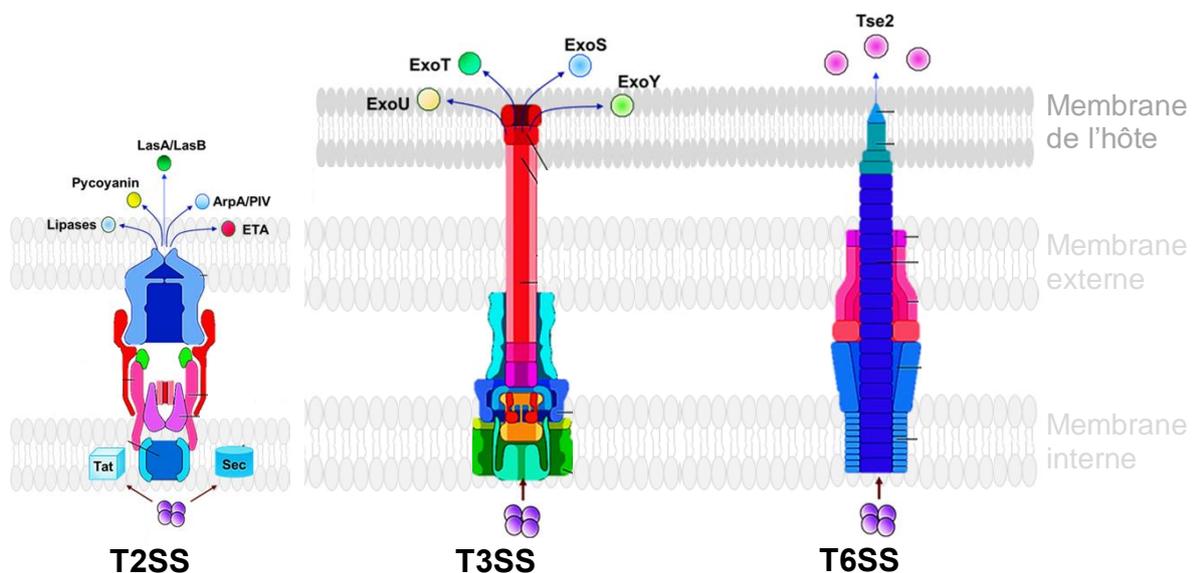


Figure 15 : Systèmes de sécrétion de type 2 (T2SS), type 3 (T3SS) et type 6 (T6SS) de *P. aeruginosa*.

Les trois TSS sont des structures transmembranaires. Les T3SS et T6SS entrent en contact avec la membrane de la cellule hôte. Adapté d'après Qui *et al.*, 2022 (176).

b. Bactérie extracellulaire mais aussi intracellulaire

A sa découverte et durant la majorité du XX^e siècle, *P. aeruginosa* a été considérée comme un pathogène majoritairement extracellulaire. L'étude clinique d'épithélia infectés par ce pathogène tels que la cornée, la peau ou les voies aériennes a d'abord montré l'importance de l'adhésion de la bactérie aux épithélia puis de la colonisation des milieux afin de déclencher une phase d'infection (189). De plus, l'étude approfondie des facteurs de virulence et notamment du système de sécrétion de type 3 (T3SS) montre qu'il possède une activité anti-internalisation, à propos de laquelle nous reviendrons par la suite. Ce sont autant d'éléments qui ont pendant longtemps obliéré la capacité de *P. aeruginosa* à pouvoir s'internaliser dans des cellules non phagocytaires.

L'une des premières observations de *P. aeruginosa* intracellulaire date de 1985 (190). Il s'agit d'une étude d'un épithélium de cornée de lapin infecté par le pathogène. Les auteurs ont alors observé grâce à la microscopie électronique à transmission (MET) la présence non anecdotique de *P. aeruginosa* à l'intérieur des cellules. Puis en 1991, il est montré avec la MET que la bactérie peut également être retrouvée de manière intracellulaire dans des cellules de l'épithélium alvéolaire (lignée A549) (191) et qu'elles sont contenues dans des structures vésiculaires endocytaires. Les auteurs montrent également que ces bactéries intracellulaires sont viables. Ce dernier point se révèle essentiel à l'étude des infections par *P. aeruginosa*. Le fait que ce pathogène soit capable de s'internaliser et d'adapter son mode de vie pour survivre au sein de cellules épithéliales pourrait ainsi lui permettre de jouir d'une protection contre le système immunitaire de l'hôte et les traitements antibiotiques. Cette capacité adaptative de la bactérie pourrait donc être à prendre en compte dans la compréhension de la chronicité ainsi que de la difficulté à traiter les infections.

La caractérisation d'un panel de souches de *P. aeruginosa*, notamment des souches cliniquement isolées chez des patients, a permis de mettre en évidence une corrélation inverse entre le potentiel cytotoxique de souches et leur potentiel à s'internaliser dans des cellules épithéliales (192). Il est ainsi démontré qu'en fonction de la souche étudiée, la pathogène aura soit une activité cytotoxique délétère pour l'épithélium menant à la mortalité des cellules hôtes. Soit une activité de pénétration des cellules épithéliales reposant sur le maintien en vie des hôtes eucaryotes. L'orientation vers l'un ou l'autre mode de vie bactérien

est en partie due aux niveaux de sécrétion de l'ExoS (193) et des exo protéines PepB et PepD (194) issues du facteur de virulence T3SS.

Plusieurs types d'interactions hôte-pathogène impliquées dans les phases d'adhésion et d'internalisation de *P. aeruginosa* ont été observées au sein de divers modèles cellulaires. L'importance ou même la survenue de chacun de ces types pourrait donc varier en fonction de l'épithélium étudié ainsi que de la souche bactérienne utilisée. L'interaction hôte-pathogène représente la première étape de l'internalisation de la bactérie. Il a été montré que la composition lipidique de la membrane des cellules hôtes jouait un rôle important dans les interactions avec *P. aeruginosa* ce qui a un impact sur le processus d'internalisation. La littérature souligne l'importance des phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PIP 3) (195) et des glycosphingolipides puisque leur absence au niveau membranaire limite fortement l'internalisation de *P. aeruginosa* (196). Plusieurs facteurs de virulence sont alors capables de reconnaître et de se fixer aux glycosphingolipides eucaryotes : les pili de type IV (197) et la lectine A de surface bactérienne (LecA) (198) dans l'optique de l'internalisation.

Du côté de la cellule hôte eucaryote, il a été démontré l'importance du remodelage du cytosquelette d'actine des cellules eucaryotes hôte pour l'internalisation de *P. aeruginosa*. En effet, l'utilisation de cytochalasine D, un inhibiteur de la polymérisation du cytosquelette d'actine montre une diminution de l'invasion intracellulaire par la bactérie (199). Le détournement de l'actine eucaryote par la bactérie serait en partie rendu possible par l'utilisation des voies de signalisation MEK et ERK (200).

La phase d'invasion intracellulaire à proprement parler de cellules non phagocytaires par *P. aeruginosa* est montrée comme reposant sur l'activité de ses facteurs de virulence. Le T6SS a notamment été montré comme jouant un rôle majeur dans cette phase. De plus, la phase d'invasion est connue pour être médiée par un réarrangement du cytosquelette d'actine mais plusieurs études ont également démontré l'importance du cytosquelette de microtubules.

Le T6SS et ses trois sous types (H1 à H3-T6SS) forme un système de sécrétion capable d'injecter dans la cellule hôte un large éventail de toxines effectrices dont le rôle n'est à ce jour pas précisément décrypté pour toutes (201). Toutefois parmi l'ensemble des effecteurs

sécrétés on peut en distinguer certains dont VgrG2b issu du H2-T6SS et dont la principale cible est le complexe annulaire γ -tubuline (γ TuRC) qui permet d'influer sur la polymérisation des microtubules (202). On trouve également les enzymes PldA et PldB issues du H3-T6SS montrées comme liées au processus d'internalisation (203).

Enfin, le T3SS a aussi été montré comme impliqué dans les processus d'internalisation de *P. aeruginosa*. Mais son implication est plus complexe puisqu'il a été montré que cela dépendait des exotoxines sécrétées. En effet, deux d'entre elles sont capables de réduire l'invasion intracellulaire de la bactérie de 94.4% pour ExoT et de 96% pour ExoS (204). Suggérant ainsi que le T3SS favoriserait la cytotoxicité des souches qui l'exprime et plus précisément en fonction des exotoxines sécrétées (ExoS ou ExoU). Mais la complexité du T3SS réside dans le fait que certaines souches caractérisées comme invasives ont été rapportées comme exprimant ExoS (205). La sécrétion d'ExoS ne serait donc pas suffisante à inhiber l'internalisation. Une des théories actuelles veut que le potentiel inhibiteur d'ExoS dépendrait du type cellulaire visé (205).

La grande majorité des études menées sur l'internalisation de *P. aeruginosa* depuis 1980 a été menée *in vitro* sur des lignées cellulaires ce qui pourrait remettre en cause l'importance voire même la survenue de ce phénomène *in vivo*. Mais une étude récente réalisée sur des explants pulmonaires de patients atteints de la mucoviscidose a permis de détecter la présence intracellulaire de la bactérie (206). Soutenant ainsi la théorie selon laquelle cette internalisation pourrait servir à la bactérie de réservoir à l'écart des stress environnementaux et permettant ainsi la chronicité des infections. Enfin, une étude réalisée *in vitro* mais avec des cellules de l'épithélium respiratoire différenciées révèle que l'internalisation T6SS-dépendante privilégierait l'invasion d'un type de cellules en particulier : les cellules caliciformes (207).

c. Persistance intracellulaire

Depuis son identification jusqu'aux années 1980-1990, l'étude de la pathogénicité de la bactérie était majoritairement axée sur son adhérence aux divers épithélia qu'elle colonise (majoritairement les épithélia bronchique et cornéal). Toutefois, la découverte de son caractère intracellulaire couplée à l'utilisation de la microscopie électronique a permis

d'étudier la persistance de la bactérie à l'intérieur de la cellule hôte (**Figure 16**). Plusieurs études réalisées sur des cellules de cornée visant à comprendre le but de la présence intracellulaire de la bactérie ont été publiées. Elles ont donné lieu à une opposition de résultats entre les partisans d'une présence intracellulaire non délétère pour l'épithélium (208) et ceux qui, au contraire, ont observé une altération de l'épithélium suite à cette infection (190).

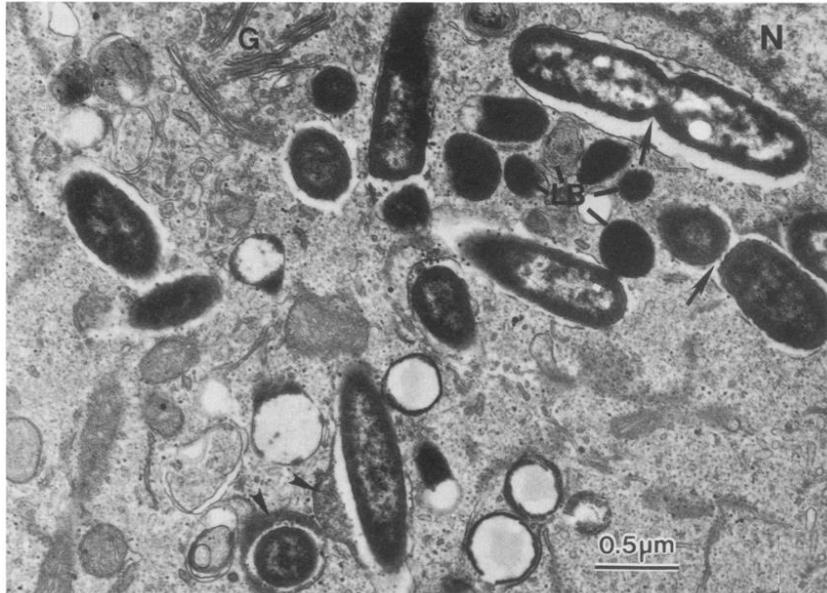


Figure 16 : Observation en microscopie électronique de *P. aeruginosa* au sein de cellule de lignée A549. *P. aeruginosa* intracellulaire (flèche noire) après 3h d'incubation. Divers composant cellulaires observable : le noyau (N), l'appareil de Golgi (G) et les corps lamellaires (LB). Extrait de Chi *et al.*, 1991 (191).

A l'heure actuelle, l'internalisation et la réplication de *P. aeruginosa* a été montrée au sein de plusieurs types d'épithélia (dont l'épithélium bronchique) via l'utilisation de différentes lignées cellulaires (205,209). Les études réalisées ont été aussi bien qualitative : utilisation de la microscopie permettant de déterminer l'emplacement intracellulaire de la bactérie, que quantitative : dénombrement des Unités Formant des Colonies (CFU) intracellulaires pour rendre compte de la quantité et de la réplication bactérienne intracellulaire.

L'imagerie a permis de montrer qu'après son internalisation, *P. aeruginosa* se trouvait séparée du milieu cytosolique en se retrouvant soit dans une vacuole périnucléaire soit dans une *membrane bleb* (ou bulle membranaire) (210) (205). La rétention de la bactérie dans une vacuole périnucléaire va rapidement être associée à des marqueurs du lysosome ou à une

acidification de celle-ci. La conséquence est délétère pour le pathogène puisque la réplication va être limitée et le pathogène va, *in fine*, être dégradé par la machinerie cellulaire (210). L'alternative pour ces bactéries internalisées est la formation des bulles membranaires. Celles-ci forment de réelles niches bactériennes intracellulaires où, en plus d'être séparées physiquement du matériel cytoplasmique (dont le lysosome), les bactéries vont pouvoir proliférer mais également se mouvoir au sein même de la cellule (209). La mise en lumière de ces structures intracellulaires forge la théorie selon laquelle l'intracellularité de *P. aeruginosa* lui sert de réservoir lors d'une infection (205).

De nombreuses études ont visé à comprendre les mécanismes sous-jacents à cette orientation binaire de *P. aeruginosa*. Elle a été montrée comme dépendante du T3SS et plus particulièrement de la toxine ExoS (211). ExoS est connue comme ayant un rôle crucial dans la survie intracellulaire de la bactérie. Ce qui est tout à fait paradoxal au vu de son activité anti-internalisation évoquée précédemment. De manière intéressante, cette toxine réalise des activités diverses selon que la bactérie soit extra ou intracellulaire. Lorsque *P. aeruginosa* traverse la membrane plasmique cellulaire, l'activité ADP-ribosyltransférase d'ExoS permet la formation des bulles membranaires autour de la bactérie. Des expériences menées avec des souches de *P. aeruginosa* possédant un T3SS fonctionnel (avec sécrétion des exotoxines) ou un T3SS absent/non fonctionnel montrent que lorsqu'il est présent, les bactéries sont majoritairement retrouvées dans des bulles membranaires contrairement aux mutants délétés qui sont alors majoritairement retrouvés dans des vacuoles acidifiées (212). A l'heure actuelle il n'est toutefois pas encore clair si la toxine ExoS inhibe directement l'acidification du compartiment bactérien ou bien si elle oriente directement la bactérie vers des compartiments de type bulles membranaires.

Du point de vue quantitatif, peu d'études ont été réalisées au niveau de l'épithélium pulmonaire. Une première étude de 1991 a été menée sur une lignée cellulaire de l'épithélium alvéolaire : les A549 (191). Les auteurs montrent alors que les pathogènes internalisés restent viables au moins jusqu'à 4h post-infection suggérant que les bactéries sont capables de persister au sein des cellules ou que tout du moins elles ne sont pas éliminées dès leur internalisation.

Plus récemment, en 2022 une autre étude menée cette fois sur une lignée cellulaire bronchique, les BEAS-2B, révèle que *P. aeruginosa* peut s'y internaliser et y persister pour des

temps jugés expérimentalement long puisque allant jusqu'à 120h (213). Dans cette étude ont été utilisées une souche de laboratoire (PAO1) et des souches isolées cliniquement. De manière intéressante, la survie et la réplication intracellulaire des bactéries mais aussi la cytotoxicité envers les cellules épithéliales varient de manière importante entre les différentes souches. De telles différences de cinétiques d'infection suggèrent une grande hétérogénéité dans la population de *P. aeruginosa* montrant l'existence de souches mieux adaptées au mode de vie intracellulaire.

Aujourd'hui *P. aeruginosa* n'est plus considérée comme un pathogène exclusivement extracellulaire. Toutefois son intracellularité partielle pousse à se questionner sur son importance dans le processus d'infection de *P. aeruginosa*. Bien qu'elle ait été retrouvée *in vitro* dans de nombreux types cellulaires différents et *in vivo* dans quelques études, il n'est à l'heure actuellement pas clairement compris si le pathogène s'internalise de manière déterminée et à dessein (multiplication et/ou échappement des traitement et systèmes immunitaires) ou bien si cette internalisation est provoquée par une pression environnementale.

d. *Pseudomonas* et cytosquelette cellulaire

Le cytosquelette cellulaire est un ensemble de protéines cytosoliques capables de s'associer afin de former des filaments (polymérisation) et de les décomposer (dépolymérisation). Le cytosquelette est subdivisé en quatre groupes : actine, microtubules, filaments intermédiaires et septines. Cette entité est impliquée dans un grand nombre d'étapes clés de la vie de la cellule : division, structure, migration des organites, ... Mais les protéines du cytosquelette ont également été montrées comme jouant un rôle dans les interactions entre l'hôte et le pathogène et notamment avec *P. aeruginosa*. Ce lien entre le pathogène et le cytosquelette a été montré dans la littérature au travers de l'internalisation de la bactérie ainsi que dans la modulation de la fonction de barrière d'un épithélium. Ayant un rôle central dans la vie cellulaire, la compréhension des interactions entre *P. aeruginosa* et le cytosquelette est essentielle afin d'appréhender les conséquences des infections. Nous

évoquerons ici uniquement les cytosquelettes d'actine, de microtubules et de filaments intermédiaires, le cytosquelette de septines sera traité dans la partie suivante.

A l'heure actuelle, une grande partie des publications traitant du lien entre les infections à *P. aeruginosa* et le cytosquelette concerne l'actine. Plusieurs facteurs de virulence ont été directement ou indirectement causalement liés à une déstabilisation ou à une réorganisation du cytosquelette d'actine. Ces modifications induites par la bactérie ont, pour beaucoup, un impact sur la fonction de barrière de l'épithélium. En effet, un épithélium tel que celui des voies respiratoires forme une barrière physique contre les pathogènes extérieurs. Cette imperméabilité épithéliale permet d'empêcher le passage paracellulaire d'éléments indésirables et elle est finement orchestrée par le cytosquelette d'actine qui va physiquement et fonctionnellement moduler les protéines de jonction intercellulaire (214).

Parmi les différents facteurs de virulence de *P. aeruginosa* ayant un impact sur le cytosquelette d'actine, on retrouve le T3SS (**Figure 17**). Et plus précisément ExoS, ExoT, ExoU et ExoY, les quatre exotoxines sécrétées dans la cellule eucaryote lorsque la bactérie est dans le milieu extracellulaire. Elles vont cibler le cytosquelette d'actine et ainsi perturber les complexes jonctionnels associés ce qui va *in fine* diminuer la fonction de barrière de l'épithélium.

ExoS et ExoT ont des activités bifonctionnelles similaires. D'une part, elles ont une activité de Rho GTPase et imite les Rho GTPase eucaryote empêchant ainsi leur activation (215). Cette activité commune des deux exotoxines est montrée comme induisant une réorganisation des fibres de stress d'actine modifiant la morphologie cellulaire et les jonctions intercellulaires (216). D'autre part elles possèdent une activité ADP-ribosyltransférase qui, appliquée aux protéines Ras et Rab eucaryote, va induire une perturbation du cytosquelette d'actine (214). ExoU a été montrée comme ayant une forte affinité avec le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂), un phosphoinositide présent sur les membranes eucaryotes. Elle va être capable de le cibler et de l'hydrolyser, entraînant une altération de l'intégrité de la membrane et est montré comme menant à un effondrement du cytosquelette d'actine (217). Quant à ExoY, elle se révèle particulièrement intéressante puisqu'elle est sécrétée dans la cellule hôte sous forme inactive, son activation nécessitant une liaison avec son co-activateur

eucaryote : l'actine filamenteuse (218). ExoY va entrainer la réorganisation du cytosquelette d'actine en provoquant le regroupement des filaments (219).

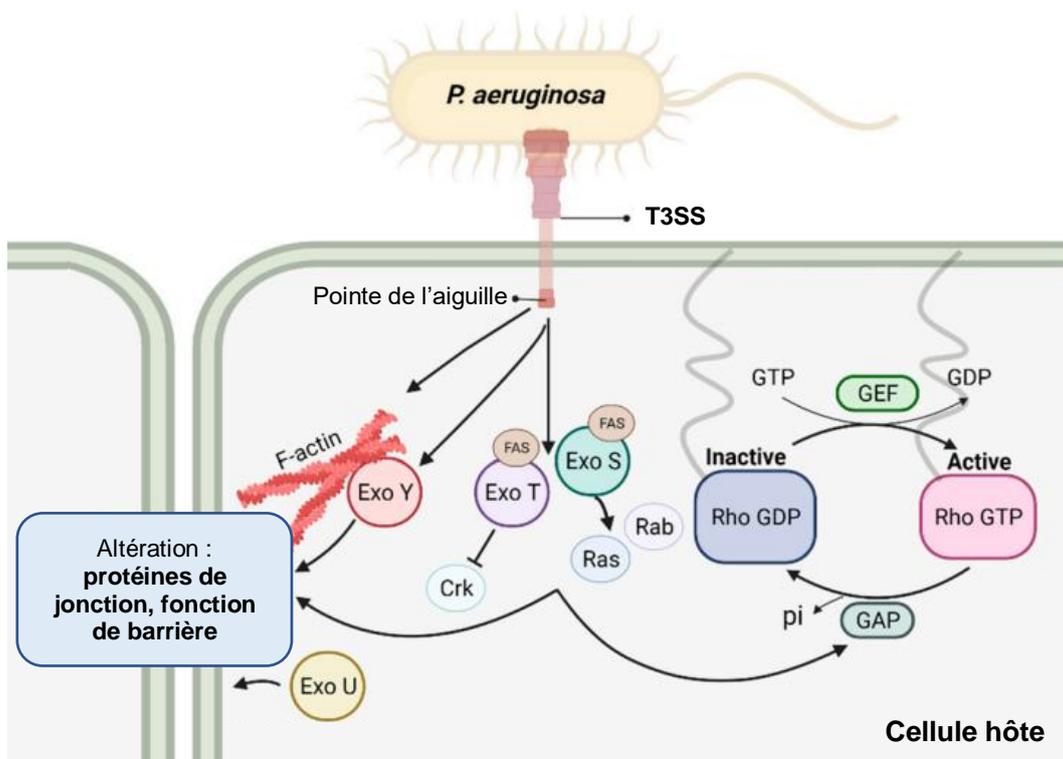


Figure 17 : Représentation schématique de l'action des exotoxines du T3SS sur le cytosquelette d'actine.

Adapté d'après Wagener *et al.*, 2021 (214).

Concernant les autres facteurs de virulence de *P. aeruginosa*, des études réalisées avec du surnageant de culture de la bactérie ont montré un ralentissement de la vitesse de migration de cellules épithéliales lésées. Cela a été lié à une altération de la polymérisation du cytosquelette d'actine. Au sein de ce surnageant sécrété de manière extracellulaire on retrouve notamment deux molécules : l'élastase, une métalloprotéase (220) et l'exotoxine A (221). Enfin, on retrouve le LPS présent à la surface bactérienne. Le LPS est un médiateur pro-inflammatoire important dans les infections par *P. aeruginosa*. La détection de celui-ci par les cellules mène à une réorganisation du cytosquelette d'actine (222).

En ce qui concerne l'étude de l'interaction de *P. aeruginosa* avec le cytosquelette de microtubules, moins d'études ont été publiées. On retrouve les sécrétions des H2-T6SS et H3-T6SS évoquées précédemment et impliquées dans l'internalisation de la bactérie. Nous avons abordé le fait que l'effecteur bactérien VgrG2b interagissait avec le complexe γ TuRC

(permettant la polymérisation des microtubules) et menant à une réorganisation de ce cytosquelette.

Plus récemment, une étude a montré que l'ExoY du T3SS induisait une dépolymérisation des microtubules suite à une hyperphosphorylation de la protéine Tau faisant partie des *microtubule-associated proteins* (MAP).

Enfin, deux publications des années 1980 se sont intéressées à *P. aeruginosa* et au cytosquelette de filaments intermédiaires. La première ne montre pas d'influence d'une infection par *P. aeruginosa* sur l'organisation et la structure des filaments intermédiaires (223). La seconde quant à elle montre que l'ExoS est capable d'ADP-ribosyler la vimentine (protéine constitutive des filaments intermédiaires) désassemblée mais pas celle sous forme filamenteuse (224).

3- Infections à *Pseudomonas* en contexte de mucoviscidose

a. Incidence

Avant les années 1960 et les débuts de la prise en charge des atteintes digestives de la mucoviscidose, l'espérance de vie des patients ne dépassait guère les 10 ans et l'atteinte pulmonaire ne représentait que peu d'importance. Toutefois, l'augmentation de l'espérance de vie a entraîné le développement de problèmes pulmonaires dépendants des variants de la protéine CFTR et qui représentent aujourd'hui près de 90% des causes de mortalité de la pathologie. Cette atteinte pulmonaire est, comme nous l'avons vu, causée par une altération du processus de clairance mucociliaire menant à une colonisation bactérienne importante des bronches des patients. Au sein de cette communauté bactérienne infectieuse, *P. aeruginosa* est aujourd'hui reconnu comme un élément pathogène central dans la détérioration des capacités respiratoires des patients CF. Sa prévalence dans la population CF est importante, on note en France une présence de la bactérie chez près de 40 à 50% des patients adultes. Sa détection au niveau pulmonaire est associée à un tournant évolutif défavorable de la pathologie (225) en étant associée à une diminution significative de la fonction respiratoire.

Depuis près de 60 ans, le corps médical a noté le développement d'infections chroniques des voies respiratoires par *P. aeruginosa* (226) ce qui a nécessité l'adaptation de la prise en charge. Le contact entre le patient CF et *P. aeruginosa* débute le plus souvent précocement, lors de l'enfance. On note une primo-colonisation par la bactérie (**Figure 18**), c'est-à-dire sa première détection dans des prélèvements des voies aériennes sans symptômes infectieux. Puis peut se mettre en place une primo-infection par *P. aeruginosa*, altérant les données cliniques des patients et notamment caractérisée par une augmentation des marqueurs de l'inflammation au niveau pulmonaire. Ces phases précoces d'infection vont être traitées par antibiotiques et le plus souvent mener à l'amélioration des données cliniques du patient : une diminution de la charge bactérienne et de l'inflammation (106). Suite à cela, il peut être noté des colonisations périodiques par la bactérie avant son élimination par antibiotiques jusqu'à une colonisation des bronches qualifiée de chronique. Celle-ci est actée lorsque *P. aeruginosa* est détectée durant au moins six mois et en se basant sur au moins trois cultures positives. La chronicité est notamment rendue possible par le développement de résistances face aux traitements antibiotiques qui, une fois rendus inefficaces, n'empêche plus la colonisation bactérienne. S'installe alors des cycles physiopathologiques délétères pour l'épithélium bronchique. La colonisation bactérienne non contenue va induire une réponse inflammatoire dite exacerbée chez l'hôte caractérisée par un recrutement massif de cellules immunitaires (notamment des polynucléaires neutrophiles). Cette importante présence immunitaire va léser le tissu épithélial favorisant ainsi à son tour la colonisation bactérienne.

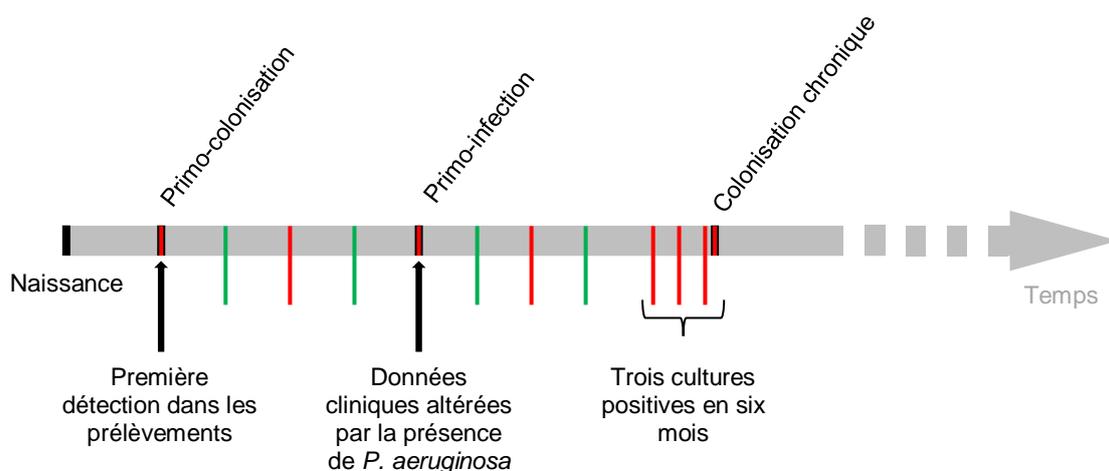


Figure 18 : Représentation schématique de l'évolution de l'infection bronchique par *P. aeruginosa* chez les patients CF.

Les coches représentent des cultures de prélèvements des voies aériennes positives (rouge) ou négatives (verte).

Au sein de ces cycles d'infection/inflammation, l'induction de la réponse inflammatoire exacerbée par *P. aeruginosa* révèle une activité pro-inflammatoire intéressante de la bactérie. En favorisant l'impact d'une réaction immunitaire importante délétère sur les cellules de l'hôte, son action va *in fine* favoriser sa persistance au niveau bronchique. La détection de la bactérie va induire un recrutement de cellules immunitaires (macrophages et neutrophiles) en vue de réaliser une clairance phagocytaire (227). Ce recrutement est dépendant de la production de médiateurs pro-inflammatoires or la chronicité de la colonisation par *P. aeruginosa* induit une expression prolongée et soutenue de ces médiateurs menant à une accumulation importante de cellules phagocytaires au niveau bronchique (167). La détection de facteurs de virulence telle que la flagelline par la cellule hôte (228) ou la formation de biofilms vont induire la sécrétion importante des médiateurs pro-inflammatoires : IL-1, IL-6, IL-8 et diminuer la sécrétion de l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire (167). Ainsi cette activation importante et prolongée du système immunitaire va entraîner au fil des infections la destruction progressive de l'épithélium bronchique et mener au déclin de la fonction respiratoire des patients.

b. *P. aeruginosa* et la protéine CFTR

L'infection mucoviscidique des voies aériennes par des pathogènes est subséquente aux modifications ioniques et hydriques causées par des variants de la protéine CFTR. Toutefois du fait de la détection importante de *P. aeruginosa* chez les patients CF, il convient de se demander s'il n'y aurait pas une interaction directe entre la protéine CFTR et la bactérie *P. aeruginosa*. De plus, au vu de la littérature évoquée précédemment, il semble intéressant de se questionner sur l'importance potentielle du mode de vie intracellulaire de *P. aeruginosa* dans son processus d'infection en contexte mucoviscidique.

La réponse à ces questionnements s'avère complexe. En effet, entre la fin des années 1990 et début des années 2000 est développée l'hypothèse selon laquelle l'internalisation de *P. aeruginosa* au niveau bronchique était déterminée par l'hôte et correspondait à une immunité innée de la part des cellules épithéliales dans un tissu pulmonaire non mucoviscidique (229). Cette théorie est soutenue par la découverte du rôle de récepteur du LPS de *P. aeruginosa* de

la protéine CFTR (230). Cette détection conduirait à, d'une part une internalisation de la bactérie et, d'autre part, au déclenchement de la voie NF- κ B impliquée dans la réponse cellulaire au stress. La protéine CFTR permettrait donc de réaliser une clairance de *P. aeruginosa* en l'internalisant pour l'éliminer. Il a également été démontré expérimentalement que l'absence ou la mutation de la protéine CFTR à la membrane cellulaire induisait une diminution de l'internalisation bactérienne ce qui cohérait avec la théorie (231). La diminution du processus d'élimination intracellulaire de *P. aeruginosa* causée par les variants de CFTR entraînerait une augmentation de la charge bactérienne dans la lumière des voies aériennes expliquant ainsi la prédominance de la bactérie chez les patients CF (205).

Cependant d'autres études publiées ont remis en question tout ou partie de ce mécanisme antibactérien dépendant de la protéine CFTR. Ainsi, il a été montré que l'internalisation de *P. aeruginosa* dépendait de la polarisation des cellules elle-même corrélée à la localisation de la protéine CFTR mais ne montrant pas de corrélation directe entre la protéine et l'internalisation bactérienne (232). De manière intéressante, d'autres études se sont penchées sur la comparaison quantitative de l'infection intracellulaire entre cellules CF et non-CF. Il en résulte que l'une montre une diminution de l'internalisation lorsque CFTR est mutée, ainsi en accord avec la théorie précédente (209). Toutefois les auteurs montrent une multiplication bactérienne intracellulaire augmentée dans ces conditions. Enfin, allant à l'encontre de la théorie, une étude de 2004 montre que des cellules possédant le variant CFTR Δ F508 présentaient plus d'internalisation de *P. aeruginosa* que des cellules avec une protéine CFTR WT (233).

Ainsi, à l'heure actuelle il n'est pas encore clairement élucidé le rôle de la protéine CFTR dans le processus d'internalisation bactérienne. Il n'est pas non plus clairement établi si l'internalisation de *P. aeruginosa* est bénéficiaire pour la cellule hôte (élimination) ou pour le pathogène (réplication et protection) (205) dans un contexte CF.

Le second aspect intéressant de la relation entre *P. aeruginosa* et la protéine CFTR est le contrôle fonctionnel et expressionnel possible du pathogène sur la protéine. Il a été montré que l'infection par *P. aeruginosa* entraînait une diminution de la sécrétion d'ions chlorure par des cellules portant une protéine WT ou CFTR Δ F508 restaurée par Orkambi (traitement correcteur et potentiateur de CFTR). Il a alors été montré que *P. aeruginosa* était capable de délivrer aux cellules hôte, via des vésicules extracellulaires, des facteurs de virulence dont le

Cif (*CFTR inhibitory factor*) (234). Celui-ci a pour but de perturber le trafic intracellulaire de la protéine CFTR menant in fine à la dégradation lysosomale de la protéine.

c. Traitements antibiotiques et résistance

Nous avons évoqué précédemment que le traitement des infections chroniques de *P. aeruginosa* dans le contexte de la mucoviscidose était rendu difficile. En cause, les importantes capacités de la bactérie à pouvoir développer des formes de résistance diverses et variées aux traitements antibiotiques la rendant multirésistante. La compréhension de ces mécanismes est un point clé de l'étude de *P. aeruginosa* et du traitement de ses infections dans des pathologies telles que la mucoviscidose. En 2017, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a publié une liste de pathogènes multirésistants représentant une menace pour l'espèce humaine et pour lequel de nouvelles molécules thérapeutiques devaient être développées (235). D'après cette classification, *P. aeruginosa* est considérée comme pathogène critique puisque capable de résister aux traitements contre les bactéries multirésistantes (carbapénèmes et céphalosporines de troisième génération).

Dans le traitement des infections bronchiques de la mucoviscidose, le principal problème causé par *P. aeruginosa* est le développement de souches multirésistantes. Elles sont considérées comme telles lorsqu'elles présentent des formes de résistance face à au moins deux des groupes de molécules antibiotiques utilisées en routine : aminoglycosides, fluoroquinolones et β -lactamines (236). Il est aujourd'hui communément admis que le développement de résistances par *P. aeruginosa* peut s'opérer de trois manières : les résistances intrinsèques, acquises ou adaptatives (237,238).

La résistance intrinsèque de *P. aeruginosa* aux molécules antibiotiques correspond aux capacités innées de la bactérie de diminuer l'exposition ou l'efficacité avec des molécules antibiotiques grâce à des caractéristiques inhérentes (**Figure 19**).

On y retrouve notamment la perméabilité restreinte de la membrane bactérienne. En effet, certaines molécules doivent être intracellulaires afin d'acquérir leur fonction antibactérienne. Or la perméabilité membranaire de *P. aeruginosa* se trouve être 12 à 100 fois plus faible que

celle d'*E. coli* (238). Cela est notamment du aux porines, des canaux protéiques qui jalonnent la membrane externe. OprF, la porine la plus représentée se trouve être très peu perméante aux molécules antibiotiques (239). Seconde forme de résistance intrinsèque, le système de pompe à efflux. Ces systèmes, composés de transporteurs transmembranaires permettant de réguler l'environnement intracellulaire de la bactérie et ainsi d'externaliser les molécules nocives/antibactériennes. Parmi les cinq familles de pompes à efflux, on retrouve les pompes RND (*resistance-nodulation, division*) qui en comptent quatre ayant été montrées comme impliquées dans la sortie de molécules antibiotiques (240). Enfin, *P. aeruginosa* est également capable de synthétiser des enzymes inactivant les molécules antibiotiques. Ces enzymes telles que des hydrolases vont modifier chimiquement les molécules antibiotiques, empêchant ainsi leur fonction.

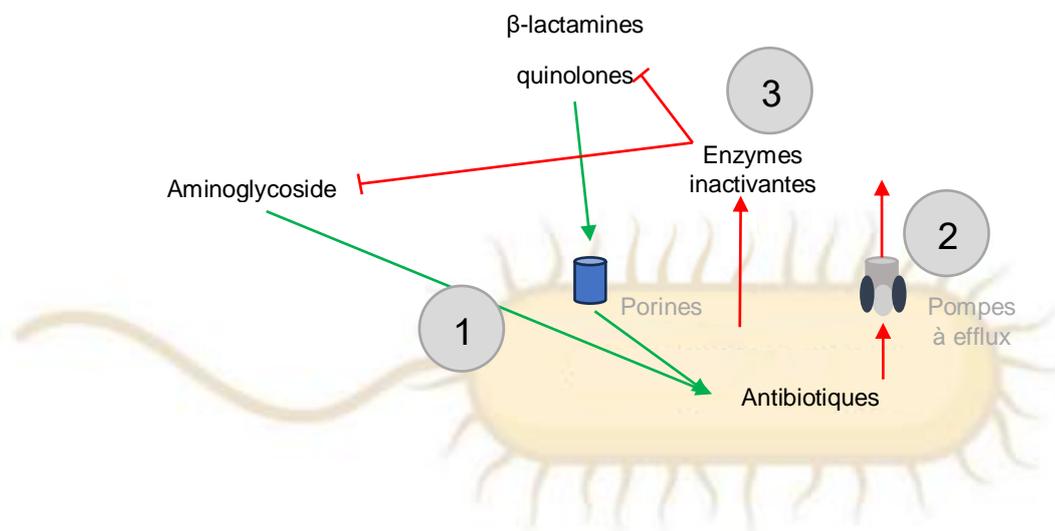


Figure 19 : Représentation schématique de trois mécanismes de résistance intrinsèque aux antibiotiques.

1) Perméabilité membranaire aux molécules antibiotiques réduite. **2)** Pompes à efflux permettant l'externalisation des molécules antibiotiques. **3)** Production d'enzymes inactivant les molécules antibiotiques. Les flèches vertes indiquent les voies d'internalisation nécessaires à l'action des molécules. Les flèches et traits rouges montrent des mécanismes bactériens altérant l'action des antibiotiques. Adapté d'après Pang *et al.*, 2019 (238).

Seconde type de mécanisme de *P. aeruginosa*, la résistance acquise. Il s'agit de capacités contrant les antibiotiques développées via l'apparition de mutations au sein de la bactérie ou suite à un transfert horizontal de gène (241). Ces formes de résistances peuvent concerner un grand nombre de molécules antibiotiques différentes du fait de la multiplicité des conséquences mutationnelles et parmi lesquelles on retrouve : stimulation de l'expression des

pompes à efflux, modification des cibles, diminution de la perméabilité membranaire, ... L'acquisition de gènes de résistance par transfert horizontal (**Figure 20**) peut se réaliser entre bactéries de la même espèce ou d'espèces différentes. Le matériel génétique (plasmide ou transposon) peut être transféré de trois manières : conjugaison, le contact entre les deux cellules permet le passage du matériel génétique. Transduction, qui nécessite l'intervention d'un bactériophage. Ou transformation, la bactérie capte des fragments d'ADN libres dans l'environnement avant de l'intégrer au génome (238).

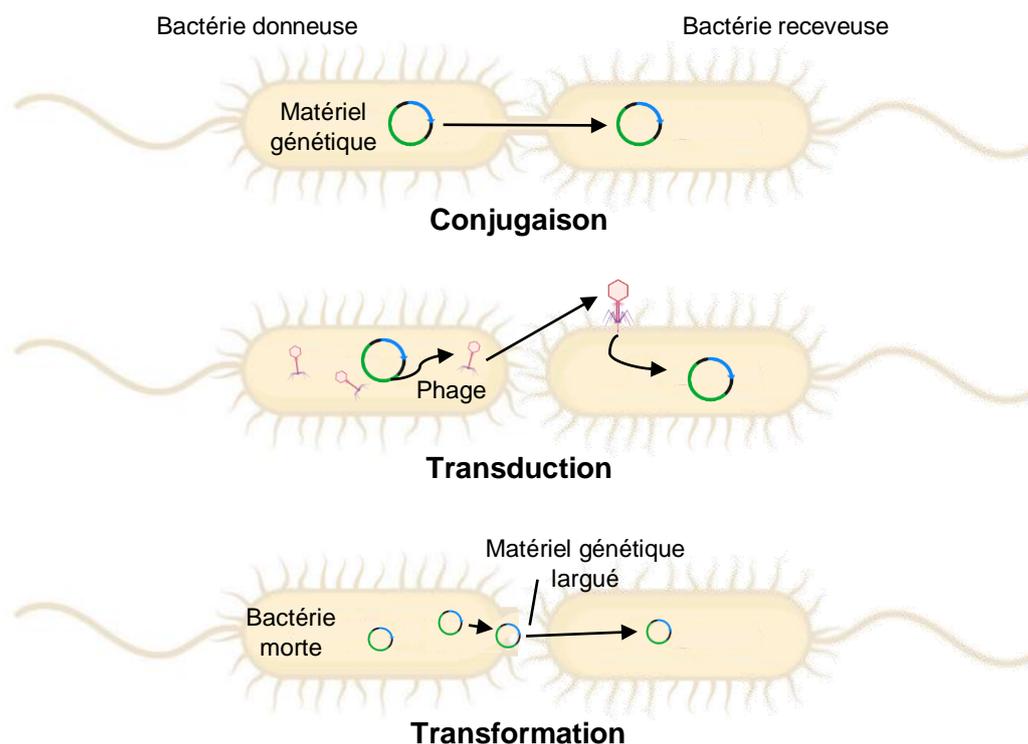


Figure 20 : Schéma montrant trois mécanismes d'acquisition de gènes de résistance par transfert horizontal de gènes.
Adapté d'après Pang *et al.*, 2019 (238).

Enfin, on retrouve la résistance adaptative de *P. aeruginosa*. Elle fait référence à la capacité d'adaptation de la bactérie qui est inductible par la présence de molécules antibiotiques et/ou par un stress environnemental. Ceci est lié à la grande capacité d'adaptation de *P. aeruginosa* à son environnement. Elle lui permet de survivre à une phase de présence d'antibiotique mais les mécanismes mis en œuvre dans ce but sont réversibles lorsque le stress est enlevé.

On retrouve dans ces formes de résistance la formation de biofilm, cet agrégat de bactéries qui va permettre de modifier le microenvironnement local et ainsi diminuer le stress

environnemental et les concentrations d'antibiotiques au centre de cette structure. Pouvant être liées aux biofilms, on trouve également les bactéries persistantes. Celles-ci ne sont pas génétiquement résistantes aux traitements biocides mais sont tolérantes à des doses élevées (238).

La grande capacité de *P. aeruginosa* à développer des résistances aux traitements antibiotiques ajoutée au recours important et fréquent à ces traitements rend aujourd'hui son éradication complexe. La thérapeutique prodiguée est basée sur l'utilisation d'une combinaison de différentes molécules antibiotiques. Toutefois de nouvelles thérapies doivent être développées à l'avenir. Diverses pistes sont aujourd'hui explorées, parmi lesquelles l'inhibition du *quorum sensing*, le développement de nanoparticules à haute pénétrabilité membranaire ou encore une stratégie vaccinale.

d. Impact des traitements correcteurs et potentiateurs de CFTR

L'avènement de l'ère des modulateurs de CFTR et notamment la mise sur le marché de la trithérapie Kaftrio au début des années 2020 en Europe est en train d'améliorer durablement les paramètres cliniques pulmonaires de la majorité des patients CF et d'augmenter leur espérance de vie. Le registre français de la mucoviscidose nous apprend que depuis 20 ans, l'augmentation moyenne du VEMS s'élève à près de 18%. Toutefois concernant l'aspect infectieux de la pathologie, il est encore trop tôt pour pouvoir conclure sur l'effet des modulateurs de CFTR sur les paramètres de colonisation/infection par *P. aeruginosa*.

Des études menées ces dernières années ont montré que la trithérapie pourrait permettre de diminuer la charge pulmonaire de *P. aeruginosa* (242). Toutefois deux études récentes effectuées sur des cohortes montrent que malgré la diminution de la charge bactérienne observée dans les expectorations de patients CF traités à la trithérapie, ceux-ci restaient durablement colonisés par les mêmes souches de *P. aeruginosa* qu'il possédaient avant le début du traitement (243,244). Il fut supputé qu'il pourrait y avoir une synergie entre les modulateurs de CFTR et les traitements antibiotiques toutefois à l'heure actuelle il n'a pas encore été montré de cas de patients CF ayant éradiqué *P. aeruginosa* de ses voies aériennes après traitement. De fait, il n'existe aujourd'hui pas de preuves formelles qui induiraient

l'arrêt des traitements antibiotiques chez les patients traités à la trithérapie. La persistance bactérienne de *P. aeruginosa* dans les voies aériennes pourrait servir de réservoir nécessaire à une future exacerbation pulmonaire. Il est donc nécessaire de continuer les traitements antibiotiques lorsque *P. aeruginosa* est détectée chez le patient (245).

Partie III

Le cytosquelette de septine (SEPT)

1- Les SEPT, quatrième famille du cytosquelette

a. Composition/structure des SEPT

Les protéines de septine (SEPT) ont été découvertes au début des années 1970 par Leland Harvell, décoré du prix Nobel de médecine en 2001. Ses travaux portaient sur le contrôle génétique du cycle cellulaire chez la levure bourgeonnante *Saccharomyces cerevisiae*. En 1971, il étudie des souches de levures mutées présentant des défauts de division cellulaire et plus particulièrement de cytokinèse (la séparation physique du cytoplasme d'une cellule mère afin d'obtenir deux cellules filles) (246). L'identification des gènes mutés permet de mettre en lumière quatre gènes du cycle de division cellulaire (cdc) : cdc3, cdc10, cdc11 et cdc12.

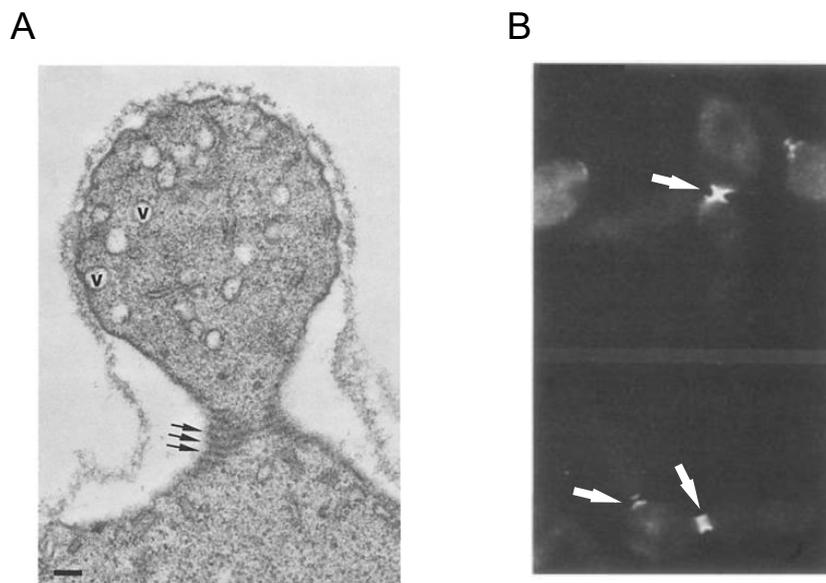


Figure 21 : Premières observations au microscope de structures de SEPT.

A) Anneaux associés aux SEPT au niveau du col d'une levure *Saccharomyces cerevisiae* bourgeonnante, microscopie électronique, adapté d'après Byers *et al.*, 1976 (247). **B)** Immunomarquage de cdc12 chez *Saccharomyces cerevisiae* bourgeonnante. Adapté d'après Haarer *et al.*, 1987 (248).

Dans les années qui suivent, l'utilisation de la microscopie électronique (247) (**Figure 21.A**) et optique couplée à de l'immunofluorescence (248) (**Figure 21.B**) a mis en évidence la présence

de structures filamenteuses de 10nm au niveau du col des bourgeons formés par la cellule mère. Les levures mutantes pour les cdc précédemment évoquées ne présentant pas ces structures, cela a conforté les observations de Harvell *et al.* selon lesquelles ces protéines ont un rôle primordial dans le processus de division cellulaire. L'implication de ces protéines dans la formation d'un septum, ou cloison, au niveau des bourgeons sera, quelques années plus tard, à l'origine de leur dénomination : les septines.

Depuis leur découverte chez *Saccharomyces cerevisiae*, des protéines aux séquences homologues ont été identifiées chez la majorité des membres de la famille des eucaryotes à l'exception des plantes dites supérieures. Le nombre de gènes codant pour les septines peut être très variable d'un organisme à l'autre. En effet, on sait que chez les organismes invertébrés ou unicellulaires leur nombre est faible (249), à l'image de *Saccharomyces cerevisiae* qui en exprime uniquement sept. *A contrario*, les organismes vertébrés en possèdent un nombre plus important, par exemple, les humains qui en comptent 13 : SEPT1 à SEPT12 et SEPT14. La SEPT13 est absente de cette nomenclature. Elle a en effet d'abord été catégorisée avant d'être considérée comme un pseudogène apparenté à la SEPT7 (250). En plus de ces 13 SEPT, il a été rapporté que les processus d'épissages alternatifs de celles-ci induisaient la synthèse d'isoformes de SEPT parmi lesquels plusieurs associés à la SEPT9 (251).

Les septines sont une famille de protéines dont les poids moléculaires sont compris entre 30 et 65kDa (252). Elles sont des protéines de liaison au GTP appartenant au groupe des NTPases à boucle de liaison au phosphate (P-loop) (253). Outre l'existence de sous-groupes dépendants de diverses homologies de séquences, les 13 SEPT humaines possèdent toutes un domaine central de liaison au GTP (domaine G) (250). Les SEPT semblent avoir une activité GTPase différente des GTPase « classiques ». En effet, si celles-ci alternent entre un état actif ou inactif en fonction de liaison au GTP ou au GDP, des expérimentations menées *in vitro* ont montré que la liaison du GTP et son hydrolyse subséquente par les SEPT entraîneraient des changements de conformation des monomères de SEPT (254). Cela aurait pour principale conséquence de moduler les interactions entre monomères de SEPT et ainsi réguler la formation de polymères de SEPT (255). De manière intéressante, il a été montré que pour cinq SEPT communément associées au sous-groupe SEPT6 (SEPT6/8/10/11/14), il y avait une absence d'un résidu de thréonine (Thr78) ce qui rendait impossible l'hydrolyse du GTP en GDP.

Induisant ainsi une liaison constitutive de ces protéines au GTP. Il est supposé que cette interaction particulière pourrait permettre la stabilisation des polymères de SEPT (254).

Les monomères de SEPT sont capables de s'associer pour former des structures hétéro-oligomériques comprenant notamment des filaments isolés ou en faisceaux ainsi que diverses formes complexes qui seront discutées par la suite. Ces protéines ont été montrées comme impliquées dans un grand nombre de processus cellulaires cytosoliques. On les retrouve par exemple en contact avec les phospholipides membranaires, leur conférant un rôle de protéine d'échafaudage et de régulation de la forme de la cellule. Mais elles jouent également un rôle dans la division cellulaire lors de la cytokinèse par exemple. Enfin, il a été montré que les SEPT étaient capables d'interagir avec d'autres membres du cytosquelette (actine et microtubules) (250) (252). Nous n'avons abordé ici que quelques exemples des activités cellulaires des SEPT. En effet, ces dernières décennies, de nombreuses publications ont montré le rôle joué par les SEPT dans divers processus. Au regard de la pluralité d'activités cellulaires des SEPT, il a été proposé de les cataloguer en tant que protéines du cytosquelette cellulaire au même titre que l'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires (250). De fait, avec sa structure et ses actions, le cytosquelette de SEPT semble correspondre à ce que l'on peut définir comme le cytosquelette : une structure protéique polymérisée en filaments cytoplasmiques et ayant de nombreuses activités clés pour la cellule parmi lesquelles on retrouve, entre autres, le maintien de la morphologie, la régulation de la mobilité cellulaire, le transport intracellulaire, ...

La dénomination de cytosquelette aujourd'hui associée aux protéines de SEPT revêt un intérêt tout particulier. Outre l'aspect sémantique, elle permet d'améliorer la considération pour ces protéines. La reconnaissance de leur rôle parfois clé, parfois crucial pour un grand nombre de processus cellulaires a permis la réalisation de nombreuses études à leur égard. Bien qu'elles aient été jusqu'à aujourd'hui moins étudiées que les autres protéines cytosquelettiques, la tendance semble se modifier. Obtenir une meilleure compréhension de la biologie des SEPT permet aujourd'hui de mieux appréhender leurs implications physiologiques mais également pathologiques.

b. Expression des SEPT

Parmi les 13 protéines de SEPT existantes chez l'homme, toutes n'ont pas les mêmes profils d'expression (252). On peut ainsi discriminer trois groupes : les SEPT avec une expression ubiquitaire (SEPT2/7/9), les SEPT avec des niveaux d'expression dépendants des tissus (SEPT4/8/10/11) et les SEPT dont l'expression est uniquement tissu spécifique (SEPT1/3/12/14) (256). De manière intéressante, la SEPT3 est presque exclusivement retrouvée dans les cellules du système nerveux et les SEPT12 et SEPT14 sont quant à elle majoritairement présentes au niveau du système reproducteur mâle, dans les spermatozoïdes.

Les 13 monomères de SEPT ont une structure globale commune (**Figure 22**). Ils sont composés de trois parties distinctes. D'abord une partie centrale composée du domaine de liaison au GTP (domaine G) de type Ras comprenant trois motifs hautement conservés de liaison au GTP : G1, G3 et G4 (257). Le domaine G est entouré par un domaine polybasique -du côté N-terminal- permettant la liaison aux lipides (258) et un domaine nommé élément unique des septines -du côté C-terminal- d'une cinquantaine d'acides aminés et de fonction aujourd'hui inconnue. Mais c'est un élément caractéristique propre à ces protéines qui les différencie des autres protéines de liaison au GTP (257). D'autre part, les monomères de SEPT possèdent des parties N- et C-terminales (domaines N et C) de longueur variable et dont le rôle n'est pas clairement établi. Toutefois on sait aujourd'hui que le domaine N est riche en proline et qu'il permettrait l'interaction avec les cytosquelettes d'actine et de microtubules (259) (260). Le domaine C quant à lui est rapporté comme riche en hélice enroulée et participerait aux interactions protéines-protéines (258).

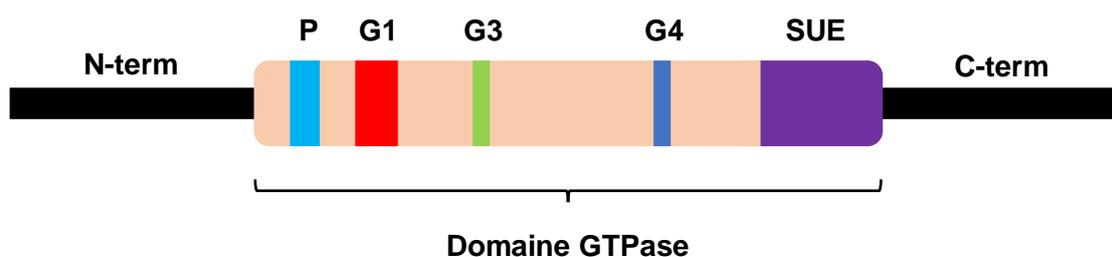


Figure 22 : Représentation schématique des domaines des SEPT.

P : promoteur; G1, G3, G4 : domaines de liaison au GTP; SUE : élément unique des SEPT. Adapté d'après Valadares *et al.*, 2017 (257).

Des études phylogénétiques et structurales des protéines de SEPT ont permis la mise en place d'une classification. Les 13 protéines ont été subdivisées en quatre sous-groupes en fonction de leurs homologies de séquence. Il est ainsi admis à l'heure actuelle la classification suivante : sous-groupe SEPT2 (SEPT1/2/4/5), sous-groupe SEPT3 (SEPT3/9/12), sous-groupe SEPT6 (SEPT6/8/10/11/14) et sous-groupe SEPT7 (SEPT7) (250) (**Figure 23.A**). Ces quatre entités sont retrouvées chez la majorité des vertébrés mais de telles subdivisions ne peuvent être appliquées aux organismes invertébrés.

Du point de vue structural, les domaines N, G et C ont une longueur variable d'une SEPT à une autre toutefois elles sont comparables entre SEPT d'un même sous-groupe (**Figure 23.B**). Il est par exemple à noter qu'au sein de chaque groupe, les SEPT partagent 50 à 60% de similitude de séquence du domaine C (250). Les SEPT des sous-groupes SEPT6 et SEPT7 présentent des domaines C long, de plus de 100 acides aminés. Les SEPT du sous-groupe SEPT2 ont un domaine C plus court alors que celles du sous-groupe SEPT3 ont un domaine C extrêmement réduit. Il n'est toutefois pas encore compris dans quelle mesure les différences structurales entre SEPT modifient leurs fonctions.

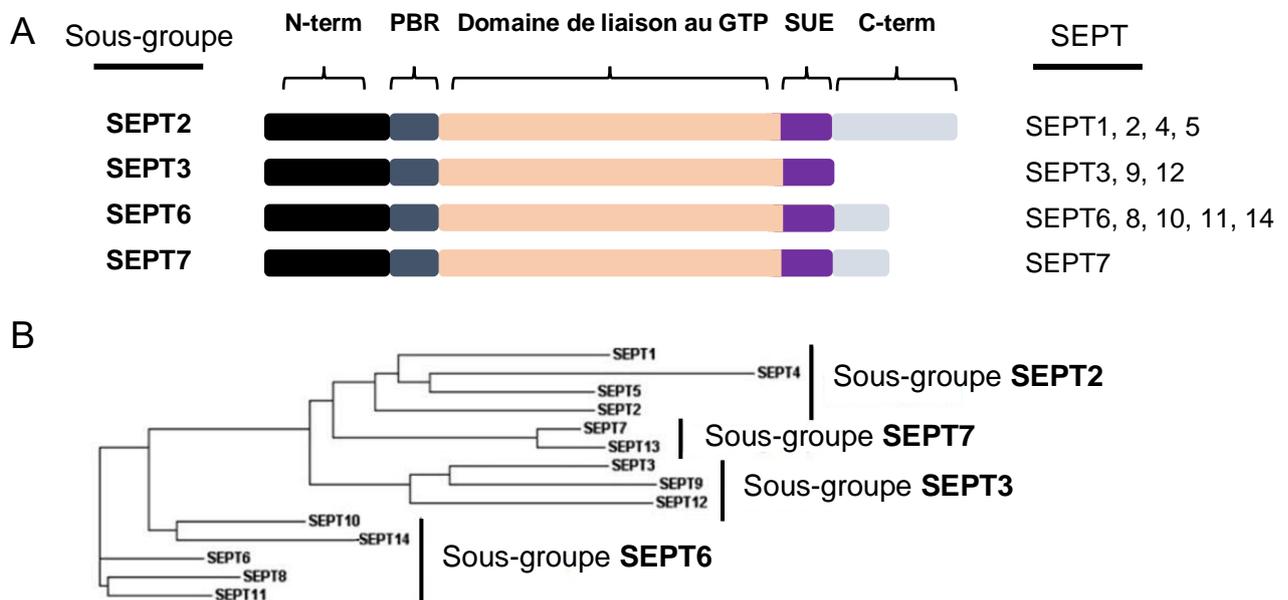


Figure 23 : Division des SEPT en quatre sous-groupes.

A) Représentation schématique des sous-groupes de SEPT, de leurs domaines et des SEPT qui les composent. SUE : élément unique des SEPT; PBR : région polybasique. Adapté d'après Gönczi *et al.*, 2021 (252) **B)** Arbre phylogénétique des SEPT humaines. Adapté d'après Peterson, Petty *et al.*, 2010 (doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01392.x).

c. Assemblage palindromique et formation d'hétéro-oligomères

Nous avons évoqué précédemment que les monomères de SEPT étaient capables d'interagir entre eux afin de former des polymères. La structure polymérique de SEPT la plus simple -et qui est une des caractéristiques qui lui vaut d'être considéré comme du cytosquelette- est le filament non polaire (250). D'après la littérature, l'hypothèse retenue est que chacun des filaments de SEPT est composé par une répétition d'un motif palindromique de base. C'est-à-dire une succession de monomères de SEPT répétés et dont l'enchaînement est identique que l'on parte d'un côté ou de l'autre du motif. La liaison entre deux monomères de SEPT va être soumise, d'une part, à une affinité préférentielle des SEPT pour certaines SEPT et d'autre part à la disponibilité de celles-ci (261). Deux motifs palindromiques de base ont été identifiés par étude cristallographique, le premier d'entre eux est l'hexamère de SEPT (262) (**Figure 24**). D'une longueur de 25nm, il est constitué de trois SEPT selon l'ordre suivant : SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7.



Figure 24 : Représentation schématique des hexamères palindromiques de SEPT. Chaque bulle chiffrée représente un monomère de SEPT.

De manière intéressante les interactions entre ces différents monomères ne vont pas dépendre des mêmes domaines des SEPT. Les interactions SEPT2-SEPT2 et SEPT6-SEPT7 se font via les domaines N et C alors que les interactions SEPT2-SEPT6 et SEPT7-SEPT7 se font via les domaines G (**Figure 25**).

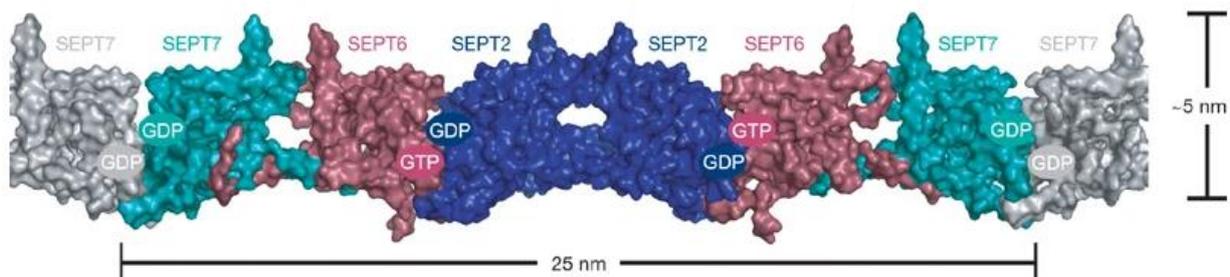


Figure 25 : Reconstitution informatique d'un hexamère de SEPT. GTP et GDP montrent les interactions SEPT-SEPT dépendantes des domaines G. Extrait de Sirajuddin *et al.*, 2007 (262)

Postérieurement à ces travaux, une étude a montré l'existence d'une seconde unité palindromique de base : l'octamère de SEPT (263) (**Figure 26**). Il est en ceci différent des hexamères qu'il y est adjoit un monomère du sous-groupe SEPT3 tel que la SEPT9 ou la SEPT12 (264). La structure octamérique reste palindromique : SEPT9-SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9.



Figure 26 : Représentation schématique des octamères palindromiques de SEPT. Chaque bulle chiffrée représente un monomère de SEPT.

L'enchaînement des monomères de SEPT au sein de ces structures palindromiques est aujourd'hui reconnue pour être régie par une règle nommée par certains auteurs la « règle de Kinoshita » (261) (257). Selon cette hypothèse relayée, chaque monomère composant d'un hexamère ou d'un octamère de SEPT pourrait être substitué par une autre SEPT appartenant au même sous-groupe (**Figure 27.A**). Ainsi d'après cette hypothèse, un grand nombre de combinaisons de SEPT seraient alors possibles dans la formation de l'unité de base. Toutefois il existe deux limites à cette interchangeabilité des SEPT, la disponibilité de chaque SEPT en fonction du tissu mais également une affinité SEPT-dépendante différente. Cela limiterait donc le nombre de combinaisons possibles. Quoi qu'il en soit, il a été rapporté dans la littérature plusieurs combinaisons suivant cette « règle » : à la place de l'hexamère SEPT2-SEPT6-SEPT7, des structures composées de SEPT3-SEPT5-SEPT7 par exemple (251).

Enfin, bien que l'hypothèse de l'association hexamérique ou octamérique soit rapportée de nombreuses fois dans la littérature, plusieurs publications ont également révélé l'existence d'unités de bases ne se conformant pas à ces arrangements classiques dits canoniques (**Figure 27.B**). Ils sont alors nommés non-canoniques et peuvent être composés d'un enchaînement de SEPT appartenant au même sous-groupe (265) (251). La composition hexa ou octamérique des filaments semble être liée à l'activité du cytosquelette de SEPT. Il a, par exemple, été

montré que l'absence d'octamère dans la composition des filaments avait un impact sur la rigidité membranaire, mais pas l'absence d'hexamère (266).

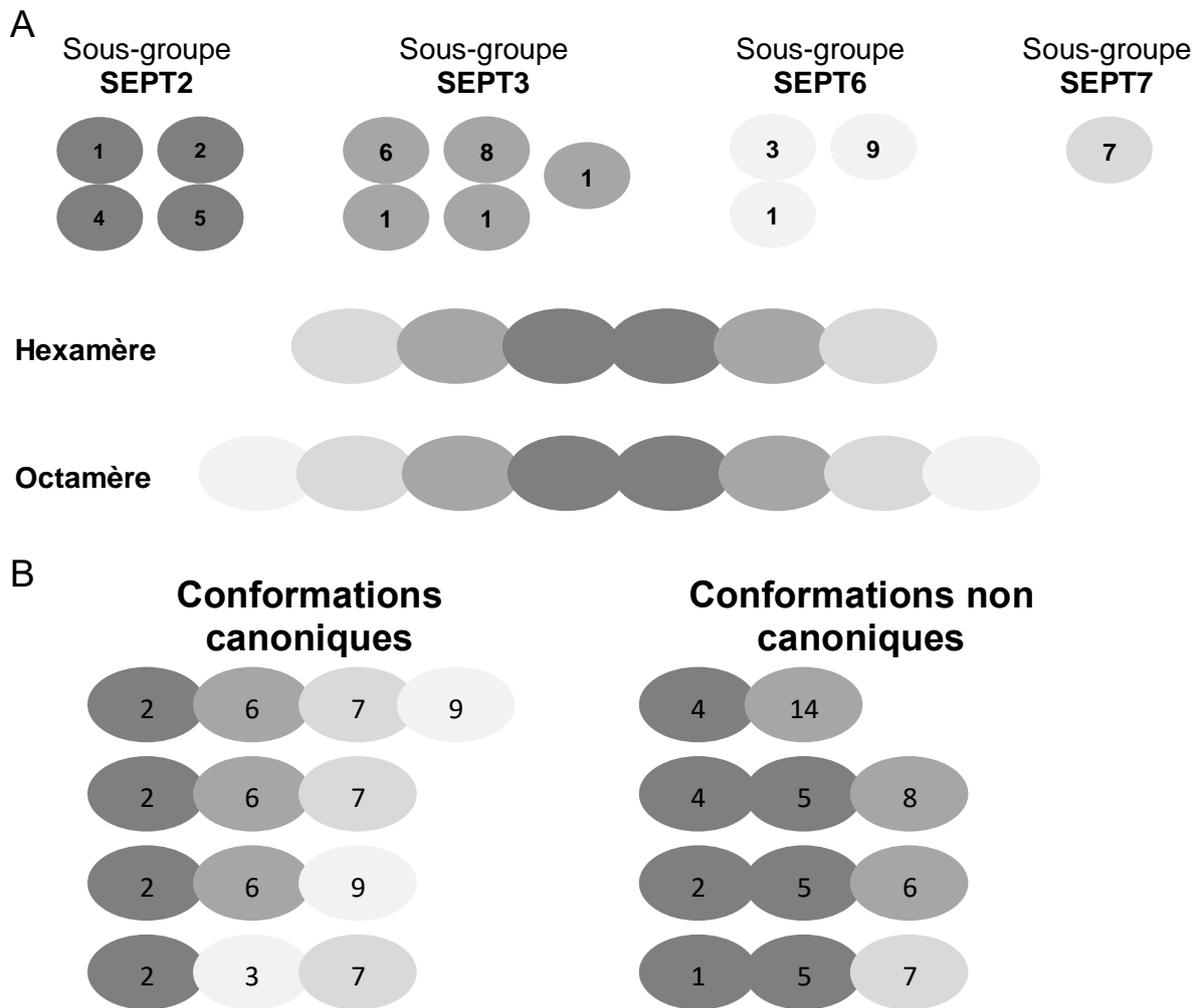


Figure 27 : Les différentes conformations possibles des polymères de SEPT.

A) Schéma illustrant la « règle de Kinoshita ». Chaque monomère de SEPT est interchangeable au sein du même sous-groupe. Adapté d'après Güler *et al.*, 2023 (266). **B)** Représentation des différentes conformations de polymères de SEPT observées. Certaines sont considérées classiques (canoniques) et d'autres rares (non canoniques). Adapté d'après Dolat *et al.*, 2014 (251).

Une des SEPT revêt un intérêt tout à fait particulier dans la polymérisation des filaments : la SEPT7. En effet, elle est seule membre de son sous-groupe et ne peut donc pas être remplacée par une autre protéine. Elle semble être incluse de manière constitutive aux structures palindromiques de base. Son absence mène à la diminution de l'expression des autres protéines de SEPT. Cela suggère que la SEPT7 serait donc indispensable à la formation de filaments de SEPT (252).

La polymérisation des filaments de SEPT ainsi que la formation de structures plus complexes est régie par au moins trois éléments : l'hydrolyse du GTP, l'interaction avec des molécules intracellulaires et des modifications post-traductionnelles.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'hydrolyse du GTP va induire une modification de conformation des SEPT permettant de favoriser l'interaction SEPT-SEPT.

D'autre part, le contact entre les SEPT et les phospholipides membranaires favoriseraient la polymérisation de filaments (267) et de structures plus complexes (268). Les cytosquelettes d'actine et de microtubules sont également capable de stimuler ou tout du moins de soutenir l'arrangement polymérique des SEPT (269). Il a aussi été montré l'importance de certaines molécules dans la régulation de la polymérisation du cytosquelette de SEPT. On retrouve notamment le complexe GTPase Cdc42 et son effecteur Borg3. L'effecteur a un effet inhibiteur sur la polymérisation des filaments lorsque Cdc42 est absent (270).

Enfin, plusieurs types de modifications post-traductionnelles ont été montrées comme capables de moduler la polymérisation des SEPT, parmi lesquelles : la phosphorylation, la sumoylation, l'acétylation et l'ubiquitylation (271).

2- Les SEPT, activité physiologique

Depuis son identification dans les années 1970, de nombreux travaux publiés ont montré que le cytosquelette de SEPT initiait ou était impliqué dans de très nombreux processus biologiques cellulaires. Nous allons maintenant développer quelques-uns de ces processus septine-dépendants, pertinents dans notre contexte. Tout d'abord au niveau cellulaire puis à l'échelle d'un système biologique (organe). Enfin nous explorerons les relations qui existent entre le cytosquelette de SEPT et ceux d'actine et de microtubules.

a. Des protéines impliquées dans de nombreux processus cellulaires

Les protéines de SEPT ont notamment été montrées dans des processus attrayant au trafic vésiculaire cellulaire. Les vésicules sont des organites pouvant circuler dans le cytosol

cellulaire et/ou permettre l'échange de composés avec le milieu extracellulaire. Elles se révèlent indispensables pour la régulation du métabolisme cellulaire. Les SEPT interviennent tout d'abord au niveau membranaire en permettant la macropinocytose, un type d'endocytose de liquide et de matériel extracellulaire via les replis de la membrane plasmique qui passe *in fine* par la fusion avec le lysosome (272). Il s'avère que dans la lignée cellulaire épithéliale MDCK, la SEPT2 est mobilisée à la membrane via le phospholipide PI(3,5)P2 afin de s'associer avec des macropinosomes en formation. Cette relocalisation va alors permettre de favoriser l'endocytose des macropinosomes et permettre leur fusion avec le lysosome (273). Une seconde étude réalisée dans des cellules épithéliales de lignée HeLa montre que les SEPT6 et SEPT7 régulent cette fois-ci le trafic et le traitement intracellulaire des vésicules endocytées. Elles interviennent lors du tri effectué par les corps multivésiculaires. Cela passe par une liaison avec le complexe protéique AP-3 (274). Ces protéines sont aussi impliquées dans un processus d'exocytose de vésicules. La SEPT2 ainsi que la polymérisation de filaments de SEPT se révèlent indispensables au bon fonctionnement des protéines exocytaires et assurent ainsi le maintien de ce processus (275) (276).

L'ensemble de ces données montrent que les SEPT sont impliquées dans l'ensemble des événements vésiculaires cellulaires, de leur internalisation à leur largage en passant par leur sélection.

Le cytosquelette a été montré comme ayant un rôle important dans la régulation de voies de signalisations cellulaires. Ces voies peuvent être mobilisées dans un contexte infectieux ou inflammatoire notamment lors de la transduction d'un signal issu de la captation par la cellule de cytokines pro ou anti-inflammatoire depuis le milieu extérieur. De fait, la SEPT4 est identifiée comme pouvant se lier au facteur de transcription STAT3 (notamment activé après détection par la cellule d'IL-6) (277). Cette fixation va stimuler l'interaction entre STAT3 et la désacétylase SIRT1 inhibant la voie de signalisation dépendant de STAT3.

A contrario, la SEPT9 est montrée comme capable de stimuler la voie *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) des *Mitogen-activated protein* (MAP) Kinases. Le contact entre ces deux éléments va protéger JNK en retardant sa dégradation et permettre ainsi l'activation de son transcriptome dans une lignée de cellules mammaires (278). La SEPT9 possède une action similaire concernant le facteur inductible par l'hypoxie (HIF-1) dans la lignée cellulaire humaine PC-3.

L'interaction entre les deux va également protéger HIF-1 contre la dégradation et ainsi lui permettre d'avoir son activité transcriptionnelle (279).

Principale zone d'interaction entre la cellule et l'environnement extérieur, la membrane et sa régulation forme une composante cellulaire vitale pour la cellule. Il a été montré que les SEPT, en tant que protéines dites échafaudages jouaient un rôle dans la régulation de la rigidité de la membrane plasmique. Les SEPT sont capables de se fixer aux membranes directement via les phospholipides PIP2 et PIP3 et vont y former un réseau dense (**Figure 28**) dans la lignée cellulaire de fibroblastes de souris NIH-3T3. Prenant l'apparence d'un corset interne, les SEPT vont permettre à la cellule de résister face aux tensions intra et extracellulaires (280). Pour supporter cela, l'utilisation de la microscopie à force atomique dans la lignée cellulaire HeLa a permis de déterminer que les SEPT2 et SEPT11 régulaient les états de rigidité et d'élasticité de la membrane plasmique (281).

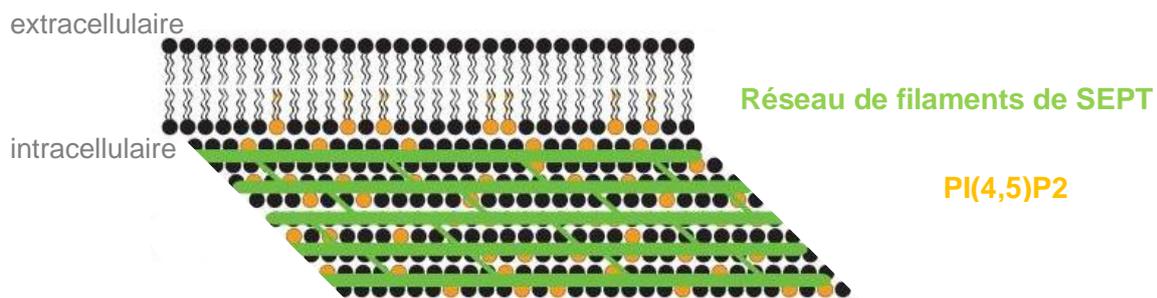


Figure 28 : L'interaction entre les SEPT et la membrane plasmique. Schéma représentant les réseaux de filaments de SEPT (vert) au contact des phospholipides membranaires (jaunes). Adapté d'après Gildea, Krummel *et al.*, 2010 (280).

Le calcium est un élément indispensable à la cellule. En fonction du type cellulaire, cet élément va être nécessaire au bon fonctionnement de la conduction nerveuse, de la contraction des muscles ou bien encore de l'activation d'enzymes. Il se trouve que plusieurs études réalisées sur la drosophile et sur des cellules de lignée HeLa ont montré la centralité du cytosquelette de SEPT dans le stockage du calcium au sein du réticulum endoplasmique. Il s'avère que les SEPT2, SEPT4, SEPT5 mais aussi la présence de filaments de SEPT polymérisés sont des éléments nécessaires à l'activité du mécanisme STIM1/Orai du réticulum endoplasmique. En effet, le capteur calcique STIM1 et le pore calcique Orai permettent le maintien de la signalisation calcium-dépendante lorsqu'ils fonctionnent de concert. Or l'activation de ce

système STIM1/Orai est dépendante d'une présence hautement localisée des SEPT (282) (252).

b. Des protéines avec des activités organe-dépendante

Outre les processus cellulaires généraux, le cytosquelette de SEPT prend également part à des processus propres à certains types cellulaires ou organes du corps humain. Nous allons aborder dans cette partie les rôles spécifiques aujourd'hui connus d'une ou de plusieurs SEPT au sein de différents systèmes physiologiques (**Table 5**).

Implications des SEPT

Système	Physiologiques	Pathologiques
Nerveux	Développement cortex (SEPT7) Activité synaptique (SEPT2/5) Arborisation axonale (SEPT) Protubérances dendritiques (SEPT7)	Alzheimer (SEPT3) Parkinson (SEPT4) Trouble bipolaire (SEPT5/6/11) Schizophrénie (SEPT5/6/11) Syndrome de Down (SEPT4/6/7)
Cardio-vasculaire	Sécrétion de plaquettes (SEPT5) Différenciation des cardiomyocytes (SEPT2/6/7/9)	Leucémies (SEPT) Syndrome de Bernard-Soulier (SEPT5)
Immunitaire	Maturation (SEPT4/9) et migration des cellules T (SEPT6/7) Défenses cellulaires contre les bactéries (SEPT2/7/9/11)	Lymphome de Hodgkin (SEPT)
Reproducteur	Morphologie des spermatozoïdes (SEPT7/12)	Infertilité masculine (SEPT7/12/14) Cancers des testicules (SEPT14) Cancers des ovaires (SEPT9)
Respiratoire	Perméabilité épithéliale (SEPT2)	Cancers des poumons (SEPT)
Digestif	///	Cancer colorectal (SEPT4/9) Cancer du foie (SEPT9)

Table 5 : Activités physiologiques et implications pathologiques des SEPT dans le corps humain. Adapté d'après Dolat *et al.*, 2014 (251)

Le cytosquelette de SEPT est, avec un profil d'expression spécifique, abondamment présent dans le système nerveux humain. Il y joue un rôle essentiel à plusieurs niveaux tout d'abord lors du développement avec une action clé sur la migration neuronale ainsi que l'arborisation axonale (251). La SEPT7 modulerait la morphologie des protubérances dendritiques

neuronales (283). Mais les SEPT prennent également part à l'activité du système nerveux lors du processus de neurotransmission au niveau des synapses neuronales. A l'image de la SEPT2 qui a été montrée comme impliquée dans l'absorption d'un neurotransmetteur important, le glutamate (284). La SEPT5 quant à elle régule la localisation des vésicules de neurotransmetteurs au niveau pré-synaptique en lien avec des canaux calciques (285). Les SEPT sont également impliquées dans la connectivité du système nerveux. Au sein du compartiment pré-synaptique, six SEPT (SEPT3/4/5/6/7/11) réguleraient la localisation et la concentration de canaux ioniques et des vésicules et donc les flux de neurotransmetteurs (286).

Au niveau du système reproducteur, bien peu d'éléments reliant les SEPT et le système reproducteur féminin sont connus. Toutefois, plusieurs études ont porté sur le système reproducteur masculin et plus particulièrement sur les spermatozoïdes et le lien avec l'expression et la localisation des SEPT. Fait intéressant, on sait notamment que la SEPT12 est uniquement exprimée dans les gamètes et appareils reproducteurs mâles. Les SEPT4, SEPT7 et SEPT12 sont retrouvées dans la composition de l'anneau du flagelle du spermatozoïde (287). La SEPT7 est également retrouvée au niveau de la tête du gamète. Enfin, les SEPT7 et SEPT12 sont cruciales pour l'obtention d'un spermatozoïde mature, leur absence étant associée à des morphologies anormales (288) (289).

Concernant les systèmes excréteur et gastro-intestinal, ceux-ci peuvent réaliser leurs activités grâce à un épithélium de surface possédant des cellules biochimiquement différenciées. Elles présentent alors une face apicale et une face basale - il en va de même pour l'épithélium des voies respiratoires. L'acquisition de la polarisation cellulaire passe, entre autres, par un transport de protéines membranaires adéquates depuis l'appareil de Golgi vers la membrane. Il s'avère que la SEPT2 est essentielle au transport de vésicules entre ces deux entités et serait donc impliquée dans la genèse d'épithélia polarisés (290). Son défaut entraîne l'accumulation dans le cytosol des protéines membranaires apicales et basales.

Au niveau rénal, le cil primaire (un organe des cellules épithéliales) permet de détecter les flux dans la lumière du néphron, il est donc essentiel à l'activité de cet organe. Les SEPT sont une composante importante de ces cils primaires. Notamment les SEPT2, SEPT7 et SEPT9 qui peuvent contrôler la longueur de ceux-ci (291) et permettre la continuité de la signalisation entre le cil et le reste de la cellule (292).

Concernant plus spécifiquement les voies aériennes, peu de publications se sont concentrées sur une étude restreinte de cet épithélium et du cytosquelette de SEPT en condition physiologique. Toutefois il a été rapporté que ces protéines avaient une ségrégation SEPT-dépendante dans les cellules ciliées bronchiques (**Figure 29**). L'imagerie par immunofluorescence nous apprend que les SEPT2/4/6/7 sont retrouvées en grande quantité au niveau apical de ces cellules (293). L'étude se porte ensuite plus précisément sur l'étude des cils et cette même combinaison de quatre SEPT est également en grande quantité au niveau des bases ciliaires. L'axonème (partie axiale et motrice du cil) est quant à lui enrichi en SEPT2/7/9/11 et l'on note enfin la présence des SEPT8 et SEPT9 dans des sous-compartiments ciliaires. Pris ensemble ces données suggèrent que certaines SEPT pourraient être impliquées dans des processus attrayant au développement et/ou au fonctionnement des cils.

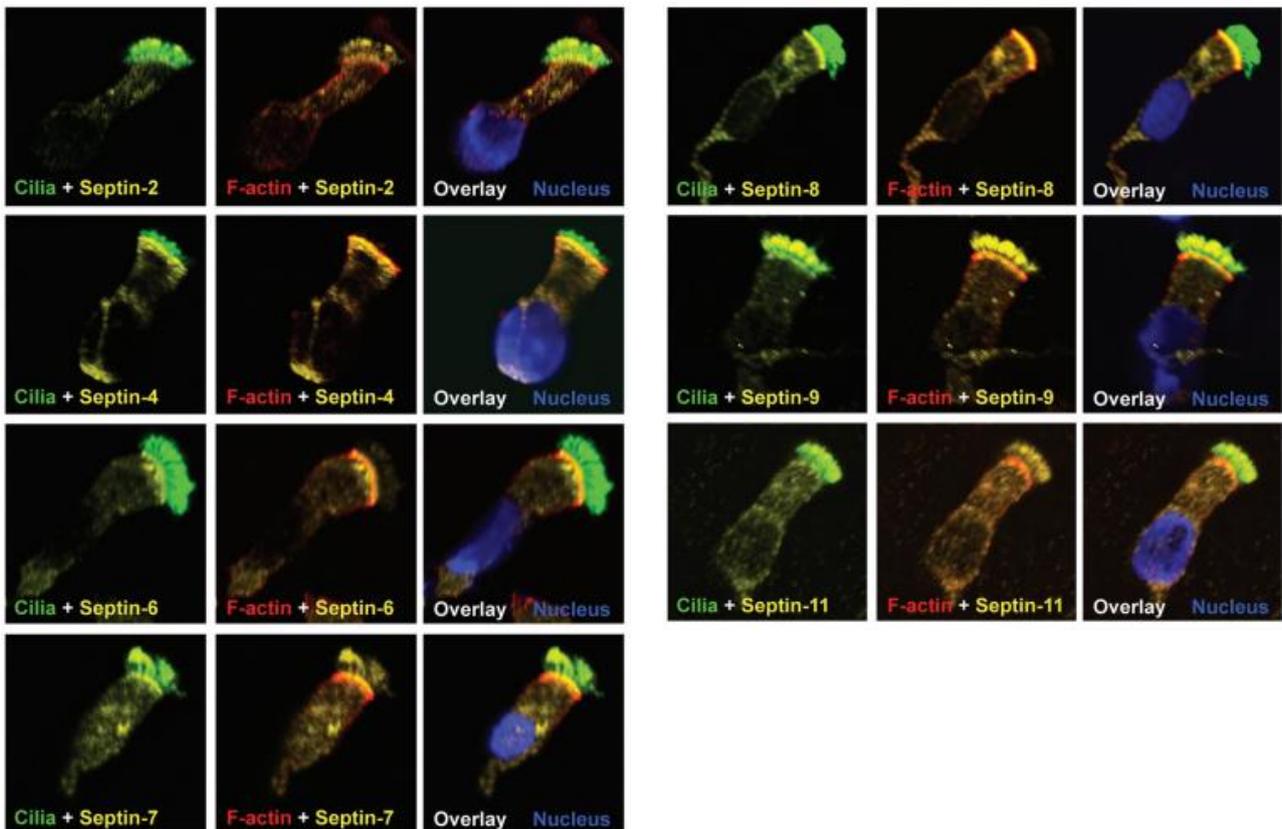


Figure 29 : Immunomarquages de protéines de SEPT dans des cellules ciliées primaires des voies respiratoires humaines.

Marquage des axonèmes/cils (vert), des SEPT (jaune), de la F-actine (rouge) et des noyaux (bleu). Extrait de Fliegauf *et al.*, 2014 (293).

D'autre part, une étude réalisée sur des cellules des voies aériennes supérieures montre l'importance de la SEPT2 dans les phases de stress de l'épithélium (294). Lors de ces épisodes, l'épithélium doit être capable de maintenir la fonction de barrière qu'elle remplit et cela passe notamment par la modulation de la perméabilité paracellulaire. Or la SEPT2 a été montrée comme se relocalisant au niveau des membranes cellulaires lors d'épisodes de stress physiologique (cisaillement) ou pathologique (particules) (**Figure 30**). Cette relocalisation est associée à une diminution de la perméabilité paracellulaire et donc un maintien de la fonction de barrière.

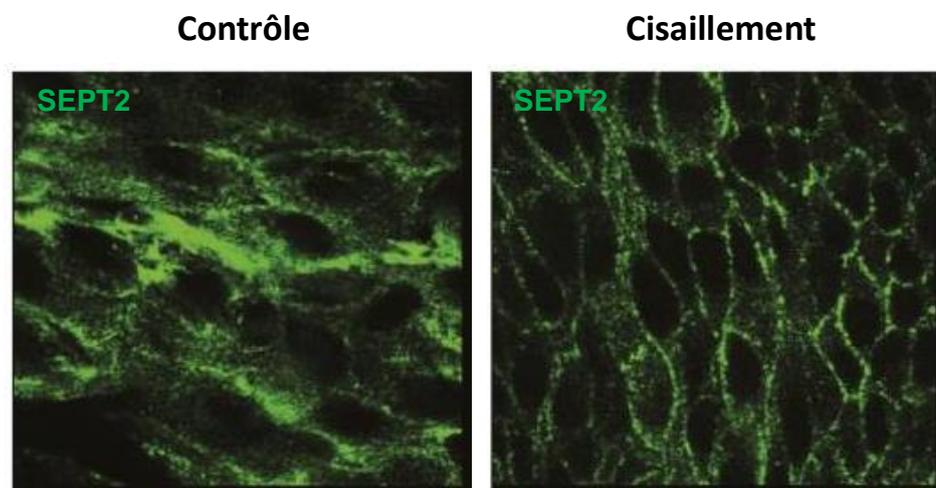


Figure 30 : Immunomarquage de la SEPT2 lors de phases de stress cisaillement de l'épithélium. La SEPT2 est immunomarkée (vert) dans des cellules primaires épithéliales bronchiques primaires. Deux conditions sont représentées : contrôle et après stress de cisaillement. Extrait de Sidhaye *et al.*, 2011 (294).

Enfin, concernant le lien entre système immunitaire et cytosquelette nous ne disposons aujourd'hui que de peu d'informations. Tout d'abord pour le système immunitaire adaptatif, la SEPT9 est indispensable au développement de lymphocytes T matures (295). Les SEPT6 et SEPT7 quant à elles jouent un rôle dans l'architecture membranaire ainsi que dans la capacité de migration des lymphocytes T (296). Leur absence donne lieu à d'importantes altérations morphologiques de ceux-ci.

D'autre part, au sein du système immunitaire inné il existe deux cellules d'intérêt : les cellules dendritiques et les macrophages. La SEPT10 est une protéine qui a été initialement identifiée au sein des cellules dendritiques où elle y est fortement exprimée (297). Son expression est diffuse dans ce type cellulaire mais fait intéressant, elle voit son expression augmenter lorsque

la cellule est stimulée par du LPS. Son rôle n'est toutefois pas encore clairement établi. Les macrophages ont des niveaux d'expression important de SEPT2/6/8/10/11 et parmi ces protéines, les SEPT2 et SEPT11 sortent du lot. En effet, ces deux SEPT s'accumulent au sein de structures sous-membranaires lors des stades initiaux de la phagocytose médiée par le récepteur FC γ (298). Les SEPT2 et SEPT11 sont alors montrées comme indispensables au processus de phagocytose FC γ -dépendant dans les macrophages.

c. SEPT et autres membres du cytosquelette

Le cytosquelette cellulaire qui est, pour rappel, constitué de l'actine, des microtubules et des filaments intermédiaires forme une entité essentielle à de nombreuses étapes clés de la vie d'une cellule. L'action de ces protéines est permise par la conjonction de leur architecture, de leur dynamique ainsi que de leur interaction avec d'autres molécules. Toutefois chaque membre du cytosquelette doit également avoir une fine régulation spatiale et temporelle. Plusieurs études ont montré que les SEPT permettaient cette régulation spatio-temporelle des cytosquelettes d'actine et de microtubules par contact direct ou via des intermédiaires cellulaires.

Evoquons dans un premier temps la relation entre les SEPT et l'actine. Plusieurs études de microscopie réalisées sur des échantillons biologiques *in vitro* ont permis de montrer une colocalisation entre les SEPT et les filaments d'actine (299) (300). Ces études montrent qu'une interaction directe entre les deux cytosquelettes implique, du côté des SEPT, les SEPT9 et le complexe SEPT2-SEPT6-SEPT7. Toutefois la fixation du complexe hexamérique est dépendante d'une protéine mitotique de liaison, l'aniline (267). Durant la phase de mitose cellulaire, la SEPT2 est également capable d'utiliser la myosine II comme protéine de liaison à l'actine (301). La SEPT9 quant à elle ne nécessite pas d'être polymérisée avec d'autres monomères de SEPT pour se lier avec l'actine. En effet, il a été montré que cette SEPT possédait une organisation N-terminale qui lui était propre. Lui permettant de pouvoir se fixer à l'actine de trois façons différentes et induisant une inhibition de la dépolymérisation des filaments d'actine via l'inhibition de la fixation de la cofiline et de la myosine (260). Enfin, la liaison entre ces deux types de molécules est également rendue possible grâce à l'intervention de petites GTPases

(Cdc42EP et Rhotekin) qui permettent et renforcent l'interaction SEPT-actine (302). Or il s'avère que ces deux GTPases sont également impliquées dans des voies régulant la polymérisation et/ou la contractilité des filaments d'actine (300).

Ainsi les protéines de SEPT sont capables de se fixer directement ou via des protéines de liaisons aux filaments d'actine. Et elles semblent également être impliquées dans des voies de signalisation contrôlant la polymérisation, le maintien et la contractilité de ces filaments d'actine. Le contact et les régulations entre ces deux cytosquelettes leur permet une activité conjointe dans certains processus cellulaires. Dans les cellules mitotiques par exemple, les SEPT citées précédemment sont indispensables au développement du réseau d'actomyosine permettant la division (303). Comme nous l'avons vu précédemment, les SEPT sont capables de se fixer aux phospholipides membranaires. Il s'avère que cette capacité couplée à la polymérisation d'octamères de SEPT vont alors permettre aux SEPT de servir de point d'ancrage à la membrane pour le cytosquelette d'actine (304). Enfin, la SEPT9 est capable d'interagir avec une cadhérine contenue dans les jonctions cellulaires ce qui va favoriser la réorganisation locale de l'actine filamenteuse (305).

Concernant le cytosquelette de microtubules, nous disposons aujourd'hui d'une littérature fournie qui permet de connaître ses interactions avec les SEPT. La colocalisation entre ces deux entités a été montrée dans divers types cellulaires dont les cellules épithéliales (299). Il est intéressant de noter que les SEPT peuvent influencer sur divers paramètres des microtubules : polymérisation, activité de transport, dynamique intracellulaire. Cela est rendu possible via des interactions avec les tubulines alpha et bêta (monomères constitutifs des microtubules) et avec les protéines associées aux microtubules (MAP). Il est à noter que les SEPT ne vont pas se fixer uniformément sur les filaments de microtubules mais au contraire vont être très localisés sur ceux-ci (300).

La SEPT9 est montrée dans une interaction directe avec les microtubules via sa partie N-terminale (259). Du point de vue régulateur, la SEPT9 est montrée dans la modulation dynamique de la polymérisation des microtubules. En effet, elle est capable de recruter de la tubuline non-polymérisée et de permettre son intégration aux filaments (306). *A contrario*, la SEPT7 va, via l'enzyme HDAC6 favoriser la désacétylation des dimères de tubuline, induisant ainsi une instabilité du filament de microtubule (307). De manière plus globale, les SEPT vont établir des contrôles sur les microtubules différents selon la concentration. A concentration

nanomolaire, les SEPT stimulent la polymérisation des microtubules. Alors qu'à concentration micromolaires, les SEPT vont stabiliser ces filaments (308).

Enfin, la SEPT9 est capable de moduler l'activité de transport des microtubules dépendante de la kinésine. La fixation de cette protéine améliore le trafic kinésine-3 dépendant et inhibe le trafic kinésine-1 dépendant (309). Cela a un impact certain sur le matériel cellulaire transporté au niveau neuronal.

Enfin, concernant la dernière famille du cytosquelette, les filaments intermédiaires, il n'y a l'heure actuelle que peu de littérature qui permet de montrer une quelconque interaction et/ou régulation entre ces deux éléments.

3- Implication des SEPT dans des pathologies

Nous avons vu précédemment que le cytosquelette de SEPT possédait beaucoup d'activités physiologiques. Aussi bien au niveau cellulaire que de manière organe-dépendant. Toutefois depuis un certain nombre d'années, on trouve également dans la littérature un nombre considérable de publications montrant l'implication des SEPT dans des pathologies humaines. Celles-ci sont associées à des aberrations d'expression : mutations ou modifications des niveaux d'expressions. L'ensemble des pathologies aujourd'hui imputées aux SEPT peut être divisé en trois groupes : maladies neurologiques (développementales ou dégénératives), cancers et infertilité (essentiellement masculine). Au vu du rôle central joué par les SEPT au niveau cellulaire et de leurs profils d'expression important chez l'humain, une meilleure compréhension de leurs implications pathologiques est indispensable pour permettre le développement de nouvelles thérapies.

a. Les SEPT dans l'atteinte des systèmes nerveux et reproducteurs

Le cytosquelette de SEPT est fortement exprimé dans le système nerveux. Il y participe à des régulations morphologiques développementales et fonctionnelles. Nonobstant leurs

activités physiologiques, plusieurs pathologies du système nerveux ont été liées aux SEPT. Une étude menée sur 17 patients atteints d'amyotrophie névralgique héréditaire, une maladie rare provoquant des douleurs dans les membres supérieurs, révèle qu'ils sont tous porteurs d'une mutation faux-sens dans la séquence du gène de la *SEPT9* (310). Cela pourrait être la source de la dégénérescence axonale et de la démyélinisation de nerfs observées dans la maladie.

Les SEPT semblent également être impliquées dans le développement de pathologies psychiatriques. En effet, un lien a été établi entre une augmentation des niveaux d'expression des *SEPT5*, *SEPT6* et *SEPT11* et des anomalies synaptiques ainsi que des dysfonctionnements métaboliques retrouvés dans des tissus de patients atteints de schizophrénie ou de trouble bipolaire (311).

La *SEPT4* est retrouvée dans des structures intracellulaires caractéristiques de la maladie de Parkinson (312). Elle pourrait potentiellement participer à la constitution de ces structures et ainsi à la genèse de la pathologie.

Enfin, le sujet des SEPT dans la maladie d'Alzheimer est très documenté. La présence de polymorphismes dans la séquence de la *SEPT3* pourrait en faire un facteur de risque potentiel de la pathologie (313). Cette maladie est notamment caractérisée par un dysfonctionnement des synapses. Or les SEPT sont des régulateurs importants de ces structures, il est donc indispensable d'étudier leur expression ainsi que leurs fonctions dans ce contexte (314). Enfin une étude récente réalisée sur modèle murin a montré les SEPT comme potentielles cibles thérapeutique de la maladie d'Alzheimer (315). Les auteurs ont pharmacologiquement modulé l'expression d'un composé cellulaire et par extension les niveaux de filamentation des SEPT afin d'améliorer l'homéostasie du calcium.

Concernant le système reproducteur masculin, on sait aujourd'hui que deux SEPT sont impliquées ou suspectées d'être liées à l'infertilité masculine. Il a été identifié chez des hommes infertiles deux types de mutations faux-sens dans la séquence de la *SEPT12* (316). Celles-ci mènent à une réduction voire à une abolition de l'activité d'hydrolyse du GTP menant à une altération de la formation de filaments contenant de la *SEPT12* dans les spermatozoïdes. Chez ces patients il a été noté des anomalies structurelles importantes concernant la queue du gamète. Il en va de même pour la *SEPT7*. Elle a en effet été montrée comme importante pour la compartimentation des spermatozoïdes et l'altération de l'expression de celle-ci

mènerait à des aberrations morphologiques (288).

D'autre part, une étude menée sur une cohorte de patients atteints d'azoospermie non obstructive montre une diminution d'expression de la SEPT14 dans les spermatozoïdes (317). La SEPT14 et plus précisément ses niveaux d'expression pourraient se révéler importants dans les processus de spermatogenèse.

b. Les SEPT dans le développement de cancers

Parmi les 13 SEPT existantes chez l'homme, un grand nombre d'entre elles ont été montrées comme responsables du développement de cancers, directement ou indirectement. Cette implication délétère des SEPT est fréquemment reliée soit à la présence de variants génétiques soit à une modification de leur niveau d'expression. Il est à noter que la majorité des variants génétiques des SEPT sont rapportés dans des cas de tumeurs du système digestif ou de la peau (318). Nous allons ici développer certains de ces cas en nous focalisant surtout sur les SEPT2, SEPT7 ainsi que sur la SEPT9 qui est l'une des protéines qui est très fréquemment retrouvée dans la physiopathologie tumorale (**Figure 31**).

De manière intéressante, la SEPT2 a été rapportée comme présentant une expression plus élevée dans différents cancers parmi lesquels on retrouve plusieurs types de cancers digestifs : pancréatique, des voies biliaires ou gastrique (319). On retrouve également cette protéine comme potentiellement responsable des capacités de migration et d'invasion de cellules cancéreuses provenant du sein. Elle agirait sur la voie de signalisation MEK/ERK (319). Une étude réalisée sur une cohorte de patients atteints de cancer colorectal montre des niveaux d'expression en ARNm et en protéine de la SEPT2 bien plus élevés dans les tissus cancéreux. Avec l'étude des métastases et de la survie des patients, les auteurs montrent que dans ce type de cancer, la SEPT2 est un facteur important influençant l'apparition, la progression de la tumeur et le pronostic des patients (319). Dans le cancer épithélial de l'ovaire, la SEPT2 est retrouvée surexprimée. *In vitro*, des expériences réalisées sur des cellules de ce type de cancer montrent que l'inhibition de la SEPT2 permet de revenir à des taux de prolifération cellulaire normaux (320).

La SEPT7 semble avoir un rôle plus complexe dans le développement tumoral. Elle est retrouvée dans différents types de cancers (thyroïde, foie) mais il semblerait que son action dans ce contexte puisse être soit positive ou soit négative pour les tumeurs (321). Cette opposition drastique d'action pourrait être associée à la localisation intracellulaire de la protéine ou à la survenue de modifications post-traductionnelles. Dans le cas du gliome, une tumeur cérébrale rare, la SEPT7 est connue pour inhiber la croissance de la masse tumorale en arrêtant le cycle cellulaire des cellules le composant (321). Cela a pour conséquence la limitation de la prolifération des cellules cancéreuses mais également la stimulation de l'induction de l'apoptose des cellules. La SEPT7 forme, dans ce contexte, une protéine suppressive de tumeur. *A contrario*, dans une autre entité physiologique, la SEPT7 semble être bénéfique pour le développement des structures cancéreuses. Dans le cas du cancer du sein, la SEPT7 (de manière identique à la SEPT2) favoriserait via la voie signalisation MEK/ERK les capacités de prolifération, de migration et d'invasion de ces cellules cancéreuses (322).

Enfin, arrêtons-nous un instant sur la SEPT9. Cette protéine est à part dans la physiopathologie cancéreuse dépendante des SEPT. Elle a été la première des 13 SEPT à avoir été identifiée dans des cas de cancer à la fin des années 1990 et au début des années 2000. Elle a d'abord été rapportée comme étant un partenaire de la *Mixed-Lineage Leukemia* (MLL). Formant ainsi une protéine de fusion à fort potentiel oncogène dans le contexte de la leucémie (323).

D'autre part, la SEPT9 est également extrêmement représentée dans la littérature lorsqu'il s'agit des SEPT dans les processus cancéreux. Elle est aujourd'hui considérée comme pouvant servir de marqueur de dépistage précoce de certaines tumeurs malignes et représente une potentielle piste pour de nouveaux traitement anticancéreux (324). On sait aujourd'hui que la SEPT9 peut avoir une action oncogène provenant de la modulation de son expression ou bien de l'isoforme de la SEPT9 exprimé. On sait par exemple que les isoformes SEPT9 v2, v4 et v5 ont été retrouvés à des niveaux plus élevés dans des cellules épithéliales cancéreuses (325). Etant donné ses activités physiologiques importantes dans la régulation de la prolifération cellulaire, la modification de l'expression ou l'expression de certains isoformes de la SEPT9 peuvent *in fine* favoriser le développement de tumeurs. On sait par exemple que la SEPT9 est capable de réguler l'activité des voies de signalisation HIF-1 (326) et JNK (278). Une surexpression de la SEPT9 pourrait alors favoriser l'activité de ces voies et ainsi favoriser la prolifération cellulaire tout en inhibant l'apoptose. Il en va de même pour ses activités lors de

la mitose ou de la méthylation de l'ADN (324).

On sait aujourd'hui que la SEPT9 est une protéine importante à prendre en compte dans le diagnostic et le pronostic de certaines formes de cancer telles que le cancer colorectal, le cancer du sein et plusieurs autres types de tumeurs malignes (324).

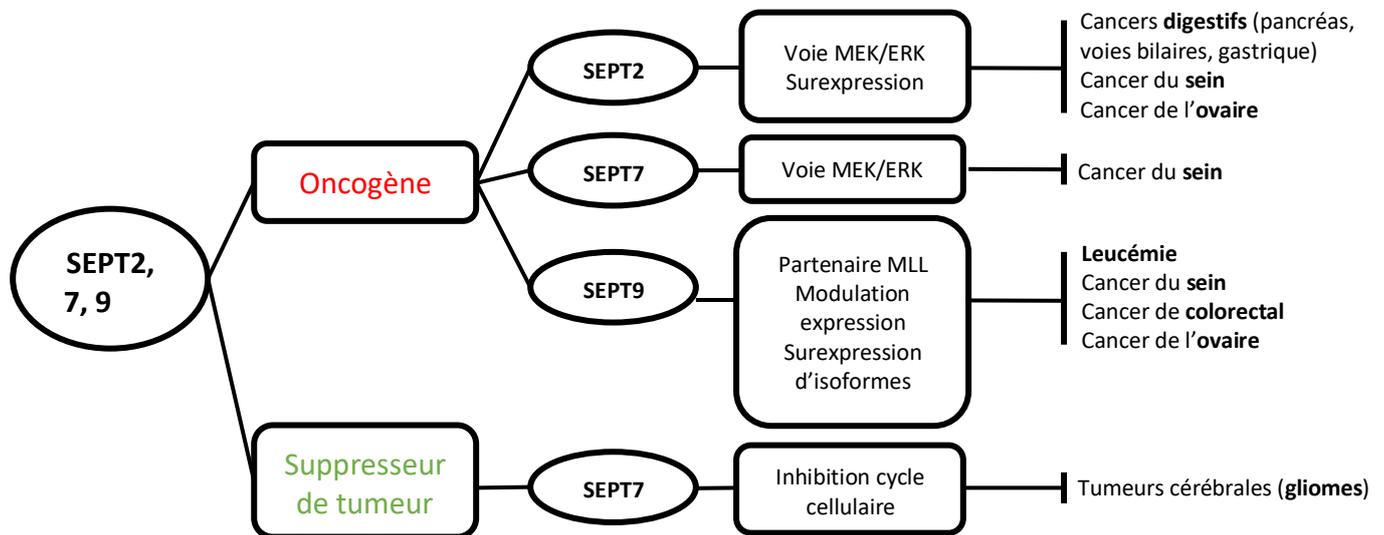


Figure 31 : Les SEPT2, 7 et 9 et leurs activités pro et anti-tumorales.

c. SEPT et cancer, modification d'expression et mutation des 13 SEPT

Plusieurs SEPT sont impliquées dans le développement de différentes formes de cancers. L'étude globale des SEPT en contexte cancéreux pousse aujourd'hui à supputer que ces protéines n'ont pas, la plupart du temps, une action classique oncogène ou anti-oncogène mais subséquente aux modifications de leur niveaux d'expression (318). La fréquence des mutations de SEPT est considérée comme faible puisqu'inférieures à 3% (318). Les mutations sont fréquemment retrouvées au niveau du domaine de liaison au GTP ou celui d'interaction entre SEPT.

Du point de vue des niveaux d'expression, une première étude réalisée à partir d'une base de données regroupant trente-cinq types de tumeurs, montre des tendances d'expression qui sont retrouvées dans plusieurs types de cancers en fonction de la SEPT. Les SEPT2/8/9/11 seraient sur-exprimées dans plusieurs cas alors qu'*a contrario* les SEPT4/10 seraient plus globalement sous-exprimées (327). Suggérant ainsi que les SEPT pourraient indépendamment les unes des autres, agir comme oncogène ou gène suppresseur de tumeur.

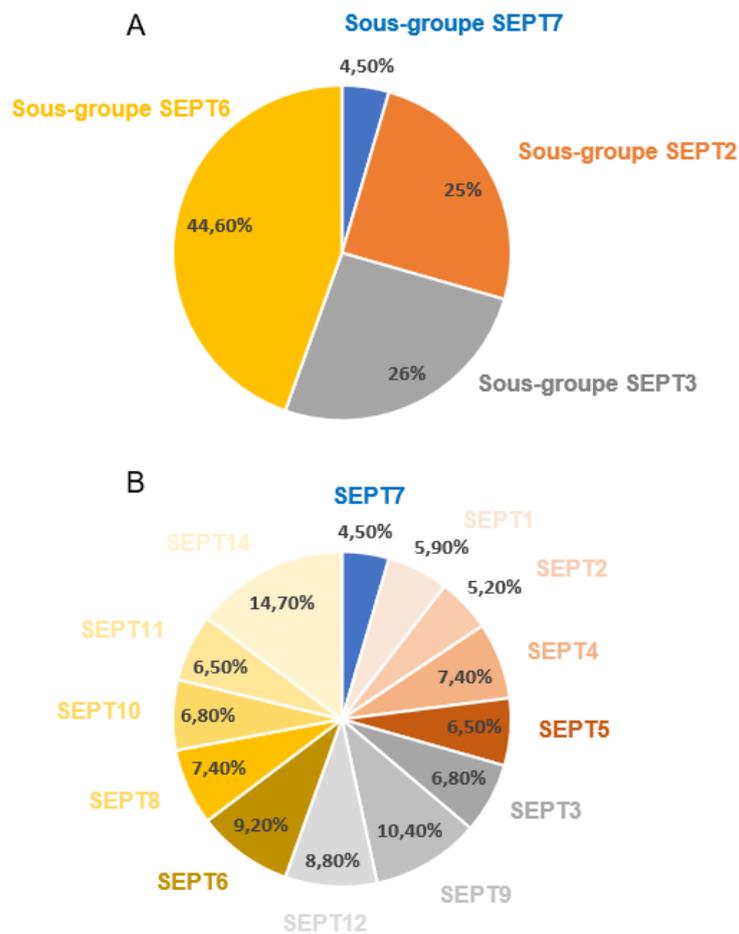


Figure 32 : Répartition des mutations des SEPT dans les cancers humains.

A) Représentation de la distribution des mutations par sous-groupe de SEPT, en %. **B)** Représentation de la distribution des mutations par SEPT, en %. Adapté d'après Angelis *et al.*, 2016 (318).

Du point de vue des mutations, une publication récente montre les caractéristiques des mutations faux-sens des SEPT dans le cadre du cancer. Les auteurs ont utilisé une base de données génomiques regroupant des informations de près d'un million de patients pour un total de quarante-deux types de tumeurs différentes (318). L'analyse montre que sur un total de 396 mutations faux-sens, 20% sont retrouvées dans des tumeurs du gros intestin, 15% des

tumeurs de la peau et 10% pour des tumeurs du poumon. Suggérant que les mutations faux-sens de SEPT ont une importance certaine dans certains types précis de cancers.

Les auteurs montrent également la répartition de ces mutations en fonction des 13 SEPT. Il se trouve que 44.6% d'entre elles sont portées par des SEPT du sous-groupe SEPT6 (**Figure 32.A**). Toutefois prises isolément, ce sont les SEPT9 et SEPT14 qui sont celles qui sont les plus fréquemment mutées dans cette base de données (**Figure 32.B**). Cela pourrait expliquer pourquoi la SEPT9 est si souvent retrouvée comme régulateur du développement cancéreux. Enfin, étonnement, malgré son expression ubiquitaire et son rôle central dans le cytosquelette de SEPT, la SEPT7 s'avère être la SEPT la moins sujette aux mutations.

Les auteurs soulignent que l'étude des mutations des SEPT notamment dans le contexte pathologique du cancer n'en n'est qu'à ses débuts. De plus amples investigations doivent être menées afin de mieux comprendre l'importance de celles-ci dans la modulation des niveaux d'expression protéique et donc le développement des cancers. Une meilleure caractérisation des mutations et de leurs conséquences pourrait à plus long terme permettre de mener au développement de nouvelles techniques de diagnostic et/ou de traitements thérapeutiques.

4- SEPT et infections bactériennes

Depuis leur découverte, les études réalisées sur les SEPT ont d'abord porté sur leurs rôles physiologiques dans la biologie cellulaire. Puis l'intérêt s'est ensuite porté sur leurs implications dans des processus pathologiques (maladies neuronales ou cancers). Mais à partir des années 2000, une nouvelle perspective d'étude du cytosquelette de SEPT a vu le jour. En effet, en 2002 est publiée une étude portant sur l'internalisation de la bactérie *Listeria monocytogenes* au sein de cellules non phagocytaires (328). Il est alors montré que les SEPT et plus particulièrement la SEPT9 joue un rôle important dans l'internalisation de cette bactérie. Durant les années suivantes, de nombreuses publications utilisant des pathogènes bactériens intracellulaires fréquents ou facultatifs ont permis de montrer le rôle important joué par le cytosquelette de SEPT dans les interactions hôte-pathogène entre bactéries et

cellules non-phagocytaires. Les SEPT sont aujourd'hui considérées comme des acteurs à part entière de l'immunité cellulaire autonome (329).

a. Les SEPT lors de l'internalisation bactérienne

De nombreux agents bactériens sont capables de s'internaliser au sein de cellules épithéliales non phagocytaires. L'intérêt d'une telle activité dépend du pathogène. Certains, tel que *Shigella flexneri*, sont des bactéries avec un mode de vie essentiellement intracellulaire lors duquel elles se multiplient et infectent les cellules adjacentes. Pour d'autres bactéries il pourrait s'agir d'un mode de vie leur permettant de fuir les cellules immunitaires (présentes dans la lumière des voies aériennes par exemple).

Quoi qu'il en soit, il est aujourd'hui admis que la pénétration cellulaire des bactéries peut passer par deux mécanismes selon le type de pathogène, mais tous deux manipulant des voies de signalisation cellulaire dans le but d'exploiter le cytosquelette au point d'entrée (330). Le premier mécanisme nommé *zippering* ou fermeture éclair (**Figure 33.A**) a été caractérisé pour *Listeria monocytogenes* et *Yersinia spp.*. Il est activé suite au contact direct entre les composants de la membrane bactérienne et des récepteurs de la cellule hôte. Dans le cas de *Listeria monocytogenes*, ce sont ses protéines de surface Internaline A et B (InIA et InIB) qui vont entrer en contact des protéines membranaires cellulaires E-cadhérine et Met (331) (281). Est alors activé par la cellule hôte un mécanisme phagocytaire au moyen notamment du réarrangement du cytosquelette d'actine via l'activation du complexe *Actin Related Protein 2/3* (ARP2/3). Plusieurs études sur l'internalisation de ce pathogène montrent que le cytosquelette de SEPT est mobilisé de manière significative lors de ce processus. En effet, on note d'abord que l'activation des voies par l'InIB qui mènent au *zippering* induisent une relocalisation de la SEPT9 au niveau du site de contact cellule-bactérie (328) suggérant ainsi son importance dans le processus. De plus, la réorganisation locale du réseau d'actine et la pénétration de la bactérie entraînent la formation d'anneaux (ou colliers) de SEPT entourant le pathogène et d'une largeur de 0.6µm (332). Ces anneaux de SEPT sont composés de SEPT2, SEPT9 et SEPT11. De manière surprenante, lorsque l'on étudie l'implication individuelle des SEPT2 et SEPT11 dans le processus d'internalisation, on observe qu'elles ont des activités

opposées. La déplétion de chacune des SEPT montre que la SEPT2 favoriserait l'internalisation de *Listeria monocytogenes* et *a contrario* la SEPT11 l'inhiberait (332).

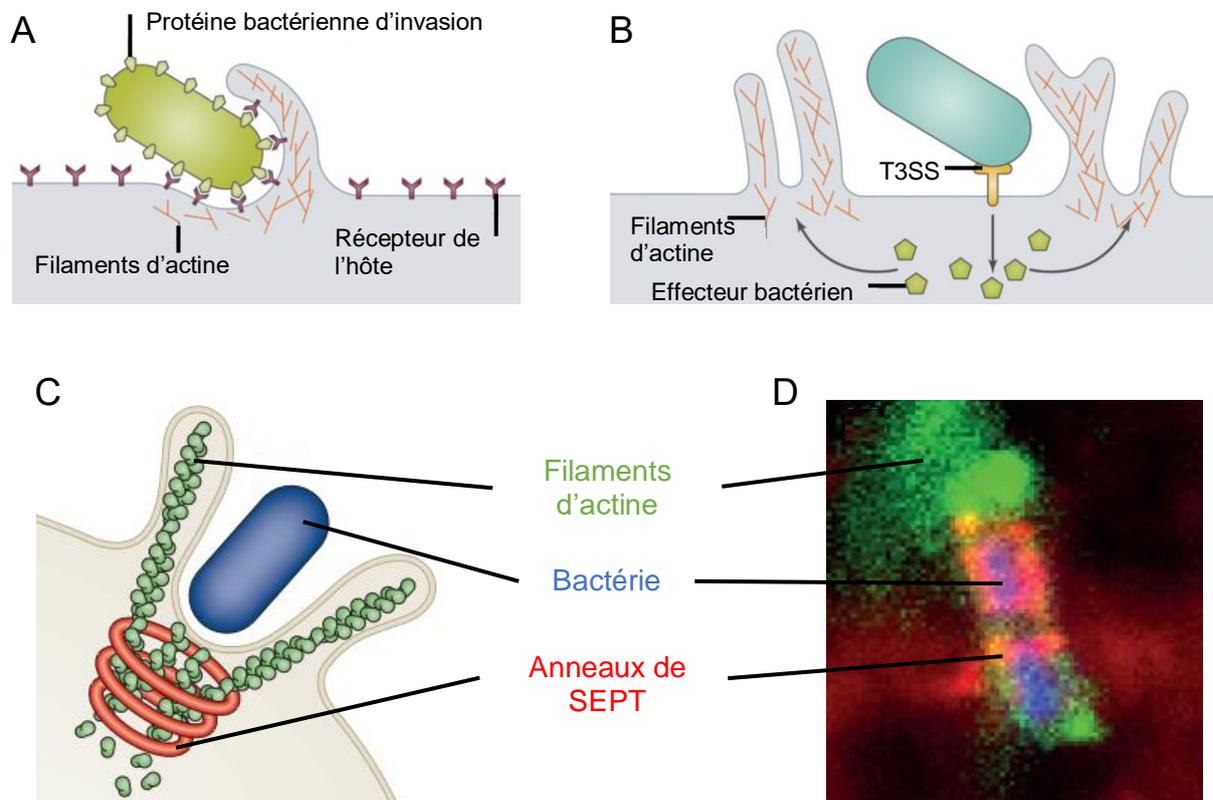


Figure 33 : Internalisation bactérienne et cytosquelette cellulaire.

A) Internalisation via le mécanisme de *zippering* ou fermeture éclair. Contact direct des membranes cellulaires et bactériennes. **B)** Internalisation via le mécanisme de déclenchement. Nécessite l'action du T3SS. **A) B)** Adapté d'après Haglund, Welch *et al.*, 2011 (333). **C)** Schéma illustrant la formation d'anneaux de SEPT autour d'une bactérie en internalisation. **D)** Immunofluorescence d'une bactérie (bleu) en internalisation, de structures d'actine (vert) et d'anneaux de SEPT (rouge). **C) D)** Adapté d'après Robertin *et al.*, 2020 (345).

Le second mécanisme de pénétration est dit mécanisme de déclenchement (**Figure 33.B**). Il a été caractérisé pour les bactéries *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (*Salmonella*) et *Shigella flexneri* (333). Ces pathogènes vont établir un contact avec la cellule hôte via leur facteur de virulence T3SS. L'injection de toxines bactériennes dans la cellule va entraîner la réorganisation du cytosquelette d'actine et ainsi induire une macropinocytose (une invagination de la membrane formant une poche capable de se refermer menant à une internalisation non sélective). Lors de ce processus, il a été retrouvé autour du pathogène *Shigella flexneri* des anneaux/colliers de SEPT de composition (**Figure 33.C et 33.D**) et de morphologie comparable à ceux retrouvés dans le processus précédemment décrit (332). De

manière intéressante, il est montré pour *Salmonella* que les SEPT2, SEPT7 et SEPT9 semblent favoriser une internalisation efficace de la bactérie (334). Prise ensemble, ces observations suggèrent donc que le cytosquelette de SEPT est, au moins en partie, impliqué dans la phase initiale de l'interaction cellule-bactérie. De plus, ces protéines ont une activité qui peut leur être propre, qu'elle soit bénéfique ou délétère pour l'internalisation du pathogène.

Concernant la bactérie à Gram négatif *P. aeruginosa*, nous avons vu qu'elle avait longtemps été considérée comme ayant un mode de vie extracellulaire. Toutefois depuis les années 2000, un certain nombre de publications ont montré et étudié son mode de vie intracellulaire, au sein de cellules épithéliales (335). L'intérêt de ce mode de vie pour *P. aeruginosa* n'est pas encore clairement compris toutefois elle pourrait utiliser les cellules épithéliales lors de l'infection de tissus, comme réservoirs bactériens lui permettant d'échapper aux mécanismes de défenses de l'hôte (cellules immunitaires et molécules antimicrobiennes) (336). L'internalisation de *P. aeruginosa* a été montrée comme dépendant de l'interaction entre la lectine LecA présente à sa surface et un récepteur de la membrane cellulaire, le glycosphingolipide Gb3 (198) (**Figure 34.A**).

Une étude récemment publiée a permis de mieux comprendre le rôle joué par le cytosquelette de SEPT dans les infections de cellules épithéliales pulmonaires par *P. aeruginosa* (336). Les auteurs montrent alors que l'invagination de la membrane causée par l'interaction LecA/Gb3 induit une relocalisation rapide des SEPT2 et SEPT7 au niveau du site de contact cellule/bactérie (**Figure 34.A**). Ils montrent également que les SEPT2 et SEPT7 participeraient à l'inhibition de l'internalisation de la bactérie puisque leur déplétion induit une augmentation de la charge bactérienne intracellulaire d'un facteur 2 (**Figure 34.B**). Cet effet observé va à l'encontre de ce qui a été décrit pour la bactérie *Listeria monocytogenes* et suggérerait que l'activité pro ou anti-internalisation de chaque SEPT dépendrait du type bactérien et ainsi de son processus d'internalisation. Enfin, les auteurs montrent que la relocalisation des SEPT précédemment évoquée au site d'interaction va induire un renforcement de l'actine corticale dans cette zone. L'utilisation de la microscopie à force atomique a permis de déterminer que la relocalisation LecA-dépendante de la SEPT entraînait une augmentation de la rigidité membranaire locale. Ainsi les auteurs suggèrent que le cytosquelette de SEPT régulerait un mécanisme de défense cellulaire lors des phases précoces d'infection par *P. aeruginosa*. Le

contact LecA/Gb3 entre le pathogène et son hôte et l'invagination membranaire qui s'en suit vont induire le recrutement des SEPT. L'augmentation de la rigidité membranaire subséquente à ce recrutement diminuerait la capacité de *P. aeruginosa* à s'internaliser.

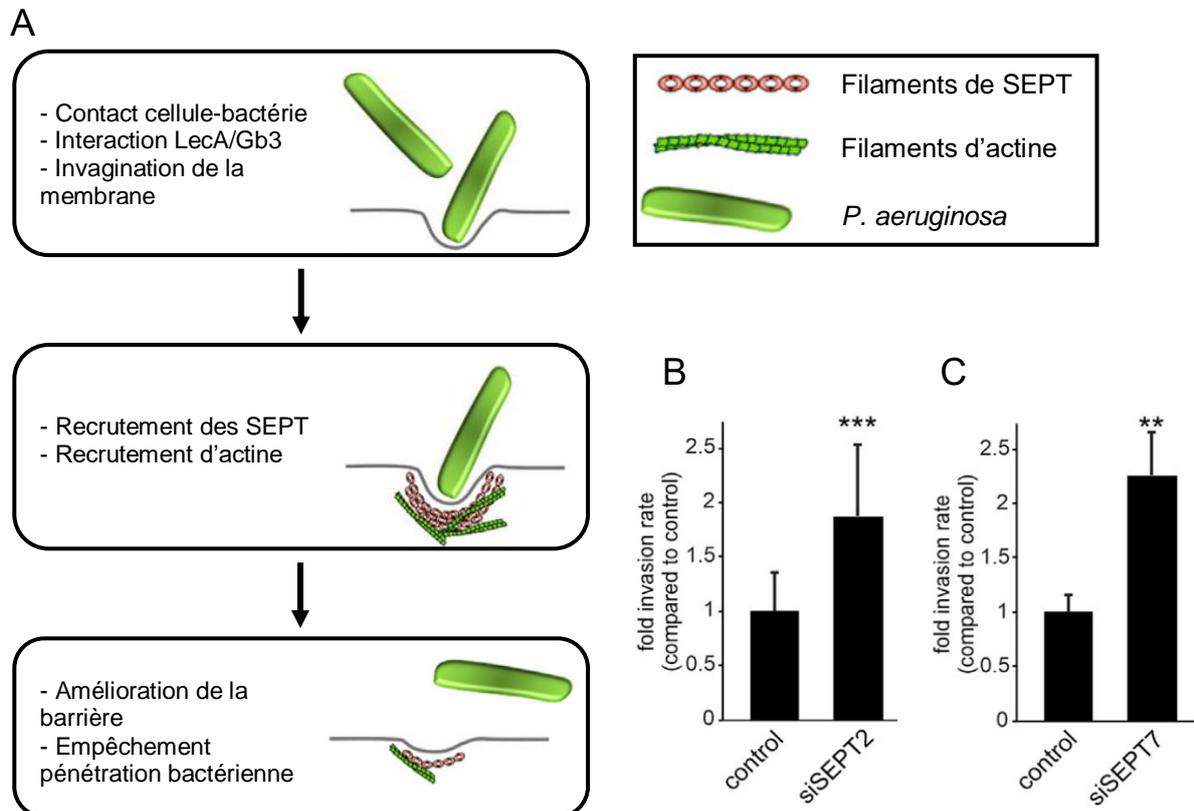


Figure 34 : Internalisation de *P. aeruginosa* et rôle du cytosquelette de SEPT.

A) Schéma représentant *P. aeruginosa* se fixant à la membrane cellulaire, induisant le recrutement des SEPT ce qui améliore la fonction de barrière de la membrane. **B) C)** Taux d'invasion intracellulaire de *P. aeruginosa* après transfection avec un siRNA spécifique SEPT2 (**B**) ou SEPT7 (**C**). Résultats normalisés par rapport à la condition contrôle. Adapté d'après Aigal *et al.*, 2022 (336).

b. Les SEPT et la formation de cages

Après leur internalisation, les agents bactériens vont devoir adapter leur mode de vie afin de survivre dans cet environnement cytosolique qui peut se révéler hostile. Pour se faire, les bactéries sont capables de détourner le cytosquelette cellulaire afin de le réorganiser et de l'exploiter à leur avantage. De nombreux articles ont porté sur l'utilisation du cytosquelette d'actine par les bactéries intracellulaire (337). L'étude du rôle du cytosquelette de SEPT dans le mode de vie intracellulaire bactérien a quant à lui été examiné à partir des années 2010.

Elle s'est, dans un premier temps, concentrée sur deux pathogènes : *L. monocytogenes* et *S. flexneri* (338).

Ces pathogènes sont capables, durant leur mode vie intracellulaire, de polymériser des structures de queue d'actine à leur contact. Cela leur confère une plus grande capacité à se mouvoir de manière intra et intercellulaire. IcsA, une adhésine de *S. flexneri* lui permet de recruter la protéine *N-Wiskott-Aldrich Syndrome Protein* (N-WASP) qui active elle-même le complexe Arp2/3 permettant la polymérisation des queues d'actine. Concernant *L. monocytogenes*, le processus est plus simple puisque ActA, une protéine de surface bactérienne permet d'activer directement le complexe Arp2/3, sans intermédiaire. De manière concomitante, il a été observé que lorsque ces pathogènes établissaient des queues d'actine, les SEPT2, SEPT9 et SEPT11 établissaient des structures en forme d'anneau autour de ces queues (338). Toutefois le rôle de ces anneaux n'est aujourd'hui pas clairement établi puisque l'inhibition des SEPT2 et SEPT9 n'a pas montré de modification de la vitesse de déplacement dépendant des queues d'actine.

Une autre voie que la mobilité via les queues d'actine est toutefois possible. En effet, la cellule est capable d'inhiber la mobilité bactérienne en compartimentant celle-ci dans une structure qualifiée de cage de SEPT. Cette structure est composée d'anneaux d'environ 1µm de diamètre entourant la bactérie sur toute sa longueur. Il a expérimentalement été décrit que 15 à 30% des bactéries *S. flexneri* intracellulaires étaient piégées dans des cages de SEPT. Lors de ce processus de compartimentation sont mobilisées les SEPT2, SEPT9 et SEPT11 (338) ainsi que la SEPT7 (339). Cette compartimentation a également été observée pour la bactérie *P. aeruginosa* (340) (**Figure 35**). De manière intéressante, l'inhibition de l'expression des SEPT2 et SEPT9 induit une diminution de l'encagement des bactéries par la SEPT et induit également une augmentation du nombre de bactéries pourvues de queue d'actine. Suggérant ainsi que ces deux devenir bactériens s'opposeraient.

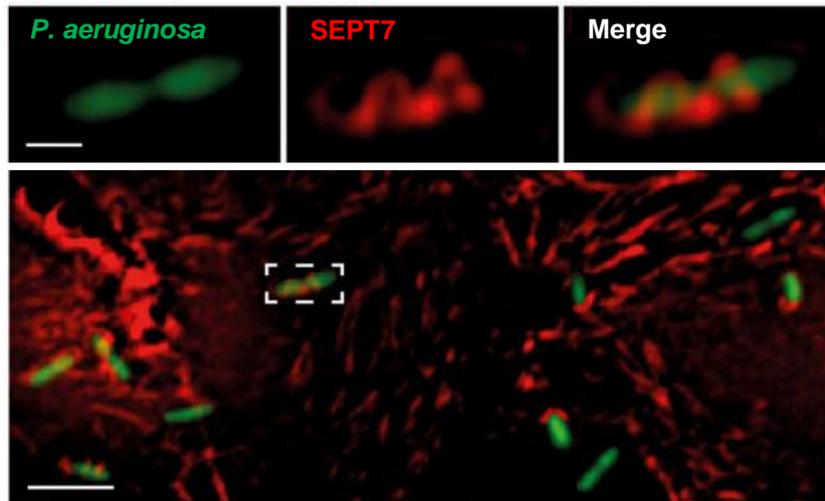


Figure 35 : Observation au microscope de *P. aeruginosa* intracellulaire entourée par une structure de cage de SEPT7.

La bactérie *P. aeruginosa* en vert et la SEPT7 immunomarquée en rouge. Extrait de Krokowski *et al.*, 2018 (340).

Le fait que la bactérie cytosolique induise une formation de cage de SEPT plutôt que des queues d'actine semble dépendre de plusieurs éléments. L'étude réalisée sur *S. flexneri* montre qu'au moins deux paramètres sont nécessaires (**Figure 36.A**). Tout d'abord le recrutement de protéines de l'autophagie. La protéine de surface IcsA peut se fixer à la protéine de l'autophagie Atg5 et ainsi mener à la mobilisation de l'autophagosome. En plus de cela, il semblerait que la polymérisation d'actine autour du pathogène soit le deuxième prérequis pour permettre la formation de la cage de SEPT. Toutefois, il a été observé un mécanisme permettant à la bactérie d'inhiber la formation de la cage. La protéine IcsB est capable de se fixer à IcsA de manière compétitive avec Atg5, empêchant ainsi la fixation de ce marqueur de l'autophagie et inhibant ainsi la compartimentation de la bactérie par la SEPT. De manière intéressante, pour la bactérie *L. monocytogenes*, il n'a pas été observé de formation de cage de SEPT (338) (**Figure 36.B**). Les auteurs supputent que ce serait lié au fait que sa protéine de membrane ActA utilisée pour la polymérisation d'actine ne se lie pas aux protéines de l'autophagie. Ainsi la non mobilisation de l'autophagosome ne permettrait pas la formation de la compartimentation SEPT-dépendante.

Une étude récente réalisée avec des structures de SEPT recombinantes purifiées et hors contexte cellulaire nous en apprend plus sur les phases précoces de la formation de la cage de

SEPT autour de *S. flexneri* (341). Les auteurs montrent alors que la SEPT6 joue un rôle primordial en reconnaissant au niveau micrométrique la courbure caractéristique des pôles de la bactérie. D'autre part, les auteurs montrent également que le LPS de *S. flexneri* permet en quelques sortes de masquer la surface bactérienne et ainsi empêcher le contact SEPT-bactérie et donc la formation de la cage. Or la protéine de surface IcsA perturbe cette couverture du LPS au niveau des pôles, endroits où la SEPT6 peut alors interagir avec la bactérie. En plus de cette fixation aux pôles de la bactérie, il a également été proposé que les cardiolipines, un phospholipide composant de la membrane bactérienne, serait un marqueur de la division bactérienne. Ils seraient alors condensés au niveau de courbures accentuées de la membrane (340). Ainsi, selon cet article, les cages de SEPT permettraient de compartimenter notamment des bactéries en cours de division et donc courbées.

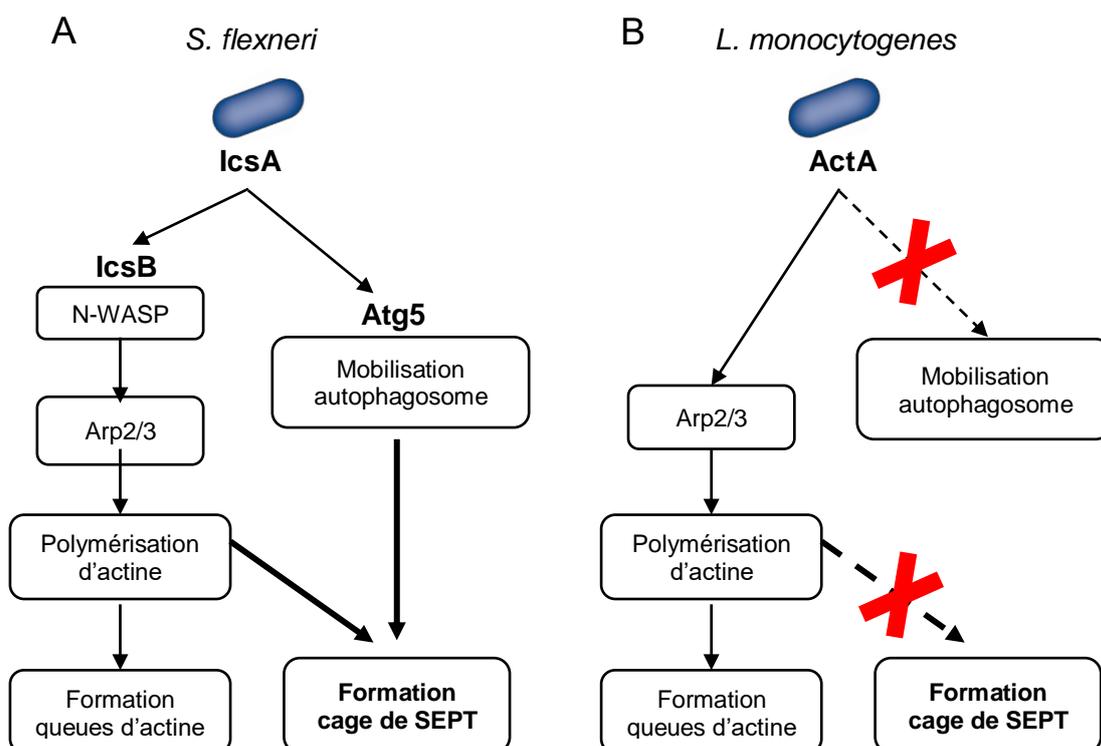


Figure 36 : Mobilisation des cytosquelettes d'actine et de SEPT par *S. flexneri* et *L. monocytogenes* intracellulaires.

A) *S. flexneri* intracellulaire peut induire la formation de queues d'actine ou de cages de SEPT selon que ce soit IcsB ou Atg5 qui se fixe sur la protéine IcsA de surface. **B)** *L. monocytogenes* peut induire la formation de queues d'actine via sa protéine de surface ActA mais n'active pas l'autophagosome ou la formation de cage de SEPT. Adapté d'après Mostowy *et al.*, 2010 (338).

Enfin, plusieurs facteurs cellulaires favorisant la formation de cages de SEPT ont été identifiés. Le TNF- α , une cytokine connue pour être sécrétée par les cellules lors d'infection par *Shigella*

flexneri est montrée comme favorisant la formation de cages de SEPT. En conditions expérimentales, un prétraitement par le TNF- α entraîne une multiplication par deux du nombre de cages autour de *S. flexneri* (338). Les mitochondries ont également été identifiées comme éléments cellulaires permettant la mise en place efficace de cages de SEPT autour de cette bactérie (339).

c. Devenir des bactéries compartimentées dans des cages de SEPT

Nous avons vu précédemment que la formation des cages de SEPT autour de *S. flexneri* était étroitement liée à la fixation de la protéine Atg5 sur la protéine IcsA bactérienne. Or Atg5 permet l'initiation de l'autophagosome, un organite à double membrane permettant le processus d'autophagie puisqu'il isole des composés intracellulaires et favorise leur dégradation au moyen de leur fusion avec le lysosome cellulaire. De manière frappante, l'inhibition de plusieurs marqueurs de l'autophagie tels que p62, AtG5, Atg6 et Atg7 entraîne une impossibilité pour les SEPT de former une cage (338). L'ensemble de ces éléments suggèrent donc que la machinerie d'autophagie cellulaire serait pour les SEPT à la fois un élément déclencheur permettant son organisation en cage mais également une finalité puisque l'autophagie s'avère importante dans l'élimination des bactéries intracellulaires (342). Il a en effet été montré que la machinerie d'autophagie des cellules eucaryotes permettait une élimination spécifique des bactéries intracellulaires. Des protéines telles que p62 et NDP52 permettent de favoriser l'envoi de *S. flexneri* vers une voie d'autophagie dépendante des SEPT (343). Prises ensemble, ces données reflètent d'une action antibactérienne interdépendante entre l'autophagie et les SEPT.

La formation des cages de SEPT autour de *S. flexneri* va inhiber la prolifération intracellulaire du pathogène. En effet, la formation d'une cage autour d'une bactérie en division induit un échec de la division de celle-ci dans plus de 90% des cas (340). En plus de l'impact sur la multiplication bactérienne, les cages de SEPT ont également un impact sur l'activité métabolique du pathogène. Il a été montré que parmi les bactéries piégées, 55.5% d'entre elles, soit près de la moitié, étaient métaboliquement inactives (339). Enfin concernant la finalité de cette compartimentation bactérienne, une étude vidéomicroscopique permettant

de suivre l'évolution des bactéries encagées a permis de dénombrer que 42% des structures étaient positives à des marqueurs du lysosome. Suggérant que la finalité d'une partie au moins des bactéries piégées est leur dégradation par le complexe d'autophagolysosome.

Toutefois quelques limites ont été émises quant à l'importance de l'élimination des bactéries intracellulaires par ce mécanisme. La réalisation d'expérimentations concernant le rôle joué par les mitochondries dans la formation des cages de SEPT montre des différences morphologiques importantes entre mitochondries à proximité de *S. flexneri* piégée par la SEPT ou libre dans le cytoplasme. Il est alors supputé que la bactérie serait capable de fragmenter les mitochondries afin d'empêcher l'initiation de la cage de SEPT (339).

D'autre part, il a été montré que les SEPT2 et SEPT7 ainsi que des protéines de l'autophagie telles que p62 contrôlerait des voies métaboliques dont celles de la glycolyse et pourrait ainsi favoriser indirectement la prolifération intracellulaire de *S. flexneri* non compartimentée dans des cages de SEPT (344).

Concernant l'implication du cytosquelette de SEPT dans la réponse inflammatoire subséquente à l'infection par des pathogènes intracellulaires, il n'existe aujourd'hui pas de littérature montrant un lien direct entre les deux. Toutefois il est aujourd'hui suspecté de jouer un rôle dans des troubles inflammatoires (272). Certaines études ont montré des liens indirects entre l'activité des SEPT et des réponses inflammatoires dérégulées (345). Mais de plus amples études doivent être menées afin de déterminer si le cytosquelette de SEPT possède une réelle activité sur la réponse inflammatoire.

d. SEPT et environnement épithélial lors de l'infection, des macrophages à la réparation

Nous avons détaillé les différentes implications des SEPT au sein de la réponse immunitaire propre aux cellules. Toutefois l'étude des réponses épithéliales face à une infection -notamment de l'épithélium des voies aériennes- nécessite d'avoir une vision plus globale de l'entité physiologique. C'est-à-dire qu'il faut prendre en compte l'ensemble des paramètres et types cellulaires qui composent le micro-environnement local. Ainsi, la

littérature évoque l'implication du cytosquelette de SEPT dans des mécanismes anti-infectieux ayant une portée plus large que l'intracellularité évoquée précédemment.

Nous avons évoqué plus tôt les connaissances actuelles sur le cytosquelette de SEPT dans les cellules immunitaires et notamment dans les cellules phagocytaires professionnelles (neutrophiles et monocytes/macrophages). Peu d'études ont porté sur ce sujet mais l'on sait tout de même que ces cellules présentent des expressions importantes de SEPT2/6/10/11 (298). Des expérimentations réalisées sur des lignées murines de macrophages et sur des neutrophiles humains ont montré l'importance des SEPT2 et SEPT11 dans le processus de phagocytose médié par le récepteur Fc γ de ces cellules. L'initiation de cette phagocytose par les macrophages et les neutrophiles entraîne une relocalisation transitoire des SEPT2 et SEPT11 au niveau de la cupule phagocytaire. Elles y forment alors des structures en forme d'anneau/collier semblables à celles décrites précédemment dans les cellules épithéliales. De plus, les SEPT2 et SEPT11 semblent être indispensables à une phagocytose efficace puisque leur inhibition réduit son efficacité de 50 à 70%.

De plus, une publication récente s'est intéressée à l'étude du cytosquelette de SEPT des macrophages de lignée humaine lors d'une infection par *Shigella flexneri* (346). Cette bactérie est capable d'induire la pyroptose des macrophages, une forme de mort cellulaire dépendante de l'inflammasome et caractérisée notamment par l'apparition de pores dans la membrane accompagnée d'une signalisation pro-inflammatoire. Il est ici montré que les SEPT2 et SEPT7 participent à l'activation du processus de pyroptose en favorisant le clivage du complexe GSDMD et l'expression de NINJ1 (deux composantes indispensables à la tenue de la pyroptose). Ces deux SEPT semblent donc avoir une importance capitale dans la régulation de la mortalité des macrophages lors d'une infection bactérienne.

Enfin, récemment, une étude a montré l'importance de la SEPT2 dans la régulation d'une voie de signalisation responsable de l'auto-activation pro-inflammatoire des macrophages (347). Les auteurs expliquent qu'au sein des macrophages, il existe une voie d'auto-activation indépendante de l'IFN- γ induisant la polarisation M1 de ceux-ci et s'accompagnant d'une libération de cytokine pro-inflammatoire. Il est montré que la déficience de SEPT2 entraîne une augmentation significative de la polarisation M1 et donc d'un micro-environnement plus inflammatoire. Il est alors proposé que la SEPT2 régule négativement cette auto-activation des macrophages en limitant le stress du réticulum endoplasmique via la stabilisation de la

protéine *heat shock protein family A* (HSPA5).

Ainsi cette étude nous apprend que la SEPT2 est capable de moduler la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires par les macrophages. Permettant de limiter l'état inflammatoire de micro-environnements et ainsi protéger les cellules adjacentes.

Second élément d'importance dans la réaction d'un épithélium à une phase d'infection (notamment bactérienne), il s'agit du maintien de la fonction de barrière des cellules épithéliales.

Une étude s'est portée sur le processus de réparation de la membrane plasmique cellulaire suite à des perforations chimiques ou mécaniques (348). On apprend que lors d'une lésion de la membrane plasmique, la SEPT et notamment la SEPT7 va être relocalisée à la membrane où elle va s'associer avec de l'actine filamenteuse et de la myosine de type II afin de former une structure sous-membranaire entremêlée. Cette structure prise dans son ensemble est montrée comme induisant la bonne réparation de la membrane. De plus, il est montré que la SEPT7 a un rôle essentiel à la formation de ce complexe puisque son inhibition empêche la relocalisation de l'actine et de la myosine au site de la lésion.

D'autre part, plusieurs publications ont ciblé l'étude du cytosquelette de SEPT au sein des processus de cicatrisation à l'échelle d'un épithélium. Des expérimentations d'observation en vidéomicroscopie de la fermeture d'une plaie effectuée sur un épithélium jointif nous apprend que la SEPT7 joue un rôle important. Son inhibition entraîne un ralentissement de la fermeture de la plaie (349). Les auteurs montrent que son action est portée sur le réarrangement du cytosquelette de microtubule permettant ainsi l'élongation cellulaire et *in fine* la réparation.

OBJECTIF DE L'ÉTUDE

L'épithélium des voies aériennes et plus précisément l'épithélium bronchique forme une barrière entre les pathogènes environnementaux aéroportés et l'organisme. Dans le contexte de la mucoviscidose, une élimination défaillante des pathogènes couplée aux résistances bactériennes envers les traitements antibiotiques éprouvent cette barrière. La répétition des cycles d'infection/inflammation mènent à une réorganisation aberrante de l'épithélium bronchique altérant ainsi sa fonction de barrière.

Il est aujourd'hui indéniable que *P. aeruginosa*, pathogène critique de la mucoviscidose, est capable de s'internaliser dans les épithéliales et d'y adopter un mode de vie intracellulaire. Il n'est toutefois pas clairement établi si ce mode de vie est bénéfique ou délétère pour le pathogène. Nonobstant ceci, il a été montré que les cellules possédaient une immunité envers les bactéries qui leur était propre. Le cytosquelette de SEPT semble jouer un rôle important dans les processus cellulaires antibactériens. Il a été rapporté dans des étapes clés : internalisation, reconnaissance du pathogène intracellulaire et piégeage.

Malgré certaines études montrant une localisation propre à chaque SEPT dans les cellules de voies aérienne. Il n'existe aujourd'hui que peu de littérature concernant le rôle des SEPT au sein de l'épithélium des voies aériennes et aucune dans un contexte infectieux et pathologique tel que la mucoviscidose.

L'objectif de ce travail de recherche a été de débiter par la caractérisation des niveaux d'expression des 13 SEPT au sein de modèles cellulaires représentatifs de l'épithélium bronchique. Au vu de ceux-ci et des informations présentes dans la littérature, nous avons ensuite sélectionné les SEPT2, SEPT7 et SEPT9 comme étant celles d'intérêt pour notre étude. Nous avons enfin examiné leurs implications durant les infections par *P. aeruginosa* de modèles cellulaires non-CF et CF.

RÉSULTATS

I- Article de recherche publié

1- Résumé

European Journal of Cell Biology, Volume 103, Issue 2, June 2024, 151416

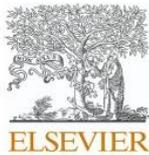
<https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2024.151416>

DOI: 10.1016/j.ejcb.2024.151416

Les mécanismes de défense dépendants de la septine contre *Pseudomonas aeruginosa* sont bloqués dans les cellules épithéliales bronchiques de la mucoviscidose

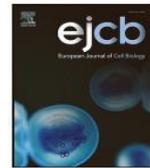
Les cellules épithéliales des voies respiratoires forment une barrière physique contre les agents pathogènes inhalés et coordonnent les réponses immunitaires innées dans les poumons. Les cellules bronchiques des personnes atteintes de mucoviscidose sont colonisées par *Pseudomonas aeruginosa* en raison de l'accumulation de mucus dans les voies aériennes inférieures et d'une réponse immunitaire altérée. Cela entraîne une inflammation chronique, des lésions du tissu pulmonaire et un déclin accéléré de la fonction pulmonaire. L'identification des facteurs moléculaires impliqués dans la réponse de l'hôte dans les voies aériennes est donc cruciale pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Le cytosquelette des septines (SEPT) est impliqué dans l'intégrité de la barrière tissulaire et dans les réponses anti-infectieuses. La SEPT7 est essentielle au maintien des complexes SEPT et à la détection des microorganismes pathogènes. Dans les poumons, SEPT7 peut être impliquée dans la résistance de la barrière épithéliale à l'infection ; cependant, son rôle dans l'infection à *P. aeruginosa* de la mucoviscidose (CF) n'est pas connu. Cette étude visait à étudier le rôle de SEPT7 dans le contrôle de l'infection à *P. aeruginosa* dans les cellules épithéliales bronchiques, en particulier dans la mucoviscidose. Les résultats de l'étude ont montré que SEPT7 encage *P. aeruginosa* dans les cellules épithéliales bronchiques et que son inhibition réduit l'expression d'autres SEPT. En outre, *P. aeruginosa* ne régule pas l'expression de la SEPT7. Enfin, nous avons constaté que l'inhibition de l'expression de SEPT7 dans les cellules épithéliales bronchiques (BEAS-2B, 16HBE14o- et cellules primaires) entraînait des

niveaux plus élevés de *P. aeruginosa* internalisée et une diminution de la production d'IL-6 pendant l'infection, ce qui suggère un rôle crucial de SEPT7 dans la réponse de l'hôte contre cette bactérie. Cependant, ces effets n'ont pas été observés dans les cellules CF (16HBE14o-/F508del et cellules primaires), ce qui pourrait expliquer la persistance de l'infection chez les pwCF. Les résultats de l'étude suggèrent que la modification de l'expression de SEPT7 est une approche potentielle pour le contrôle anti-infectieux de *P. aeruginosa*, en particulier dans la mucoviscidose.



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Cell Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejcb

Septin-dependent defense mechanisms against *Pseudomonas aeruginosa* are stalled in cystic fibrosis bronchial epithelial cells

Sylvain Brax^a, Clémence Gaudin^a, Claire Calmel^a, Pierre-Yves Boëlle^b, Harriet Corvol^{a,c}, Manon Ruffin^a, Loïc Guillot^{a,*}

^a Sorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche Saint Antoine, Paris F-75012, France

^b Sorbonne Université, INSERM, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique, IPLESP, Paris F-75012, France

^c AP-HP, Hôpital Trousseau, Service de Pneumologie Pédiatrique, Paris F-75012, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Cystic Fibrosis
Lung
Bronchial epithelium
septins
Pseudomonas aeruginosa

ABSTRACT

Airway epithelial cells form a physical barrier against inhaled pathogens and coordinate innate immune responses in the lungs. Bronchial cells in people with cystic fibrosis (pwCF) are colonized by *Pseudomonas aeruginosa* because of the accumulation of mucus in the lower airways and an altered immune response. This leads to chronic inflammation, lung tissue damage, and accelerated decline in lung function. Thus, identifying the molecular factors involved in the host response in the airways is crucial for developing new therapeutic strategies. The septin (SEPT) cytoskeleton is involved in tissue barrier integrity and anti-infective responses. SEPT7 is critical for maintaining SEPT complexes and for sensing pathogenic microbes. In the lungs, SEPT7 may be involved in the epithelial barrier resistance to infection; however, its role in cystic fibrosis (CF) *P. aeruginosa* infection is unknown. This study aimed to investigate the role of SEPT7 in controlling *P. aeruginosa* infection in bronchial epithelial cells, particularly in CF. The study findings showed that SEPT7 engages *P. aeruginosa* in bronchial epithelial cells and its inhibition downregulates the expression of other SEPTs. In addition, *P. aeruginosa* does not regulate SEPT7 expression. Finally, we found that inhibiting SEPT7 expression in bronchial epithelial cells (BEAS-2B 16HBE14o- and primary cells) resulted in higher levels of internalized *P. aeruginosa* and decreased IL-6 production during infection, suggesting a crucial role of SEPT7 in the host response against this bacterium. However, these effects were not observed in the CF cells (16HBE14o-/F508del and primary cells) which may explain the persistence of infection in pwCF. The study findings suggest the modification of SEPT7 expression as a potential approach for the anti-infective control of *P. aeruginosa*, particularly in CF.

1. Introduction

Airway epithelial cells form a tight physical barrier against inhaled pathogens. Moreover, they coordinate the lung immune response and pathogen elimination through mucociliary clearance and the production of host defence molecules and inflammatory mediators involved in immune cell recruitment to the infection site (Whitsett and Alenghat, 2015).

People with cystic fibrosis (pwCF), a genetic disease caused by

variants of the cystic fibrosis (CF) transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene, frequently experience lung infections caused by various microorganisms, particularly *Pseudomonas aeruginosa*, throughout the disease course (Shteinberg et al., 2021). Mucus accumulation in the lower airways and the altered immunity of pwCF favour *P. aeruginosa* infection, which persists in the lungs due to antibiotic resistance (Cohen and Prince, 2012). Associated with an exacerbated chronic inflammation and a massive neutrophil influx, this pro-inflammatory and infectious context favours lung tissue destruction

Abbreviations: CF, cystic fibrosis; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; CFU, colony-forming units; DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole; ETI, Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor; FCS, fetal calf serum; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GFP, green fluorescent protein; LPS, Lipopolysaccharide; PBS, phosphate buffered saline; PwCF, people with cystic fibrosis; QPCR, quantitative polymerase chain reaction; siRNA, small interfering RNA; SEPT, septin; TSA, tryptic soy agar; TSB, tryptic soy broth.

* Corresponding author at: Inserm UMR S 938, CRSA, Bât. Kourilsky, 34 Rue Crozatier, Paris 75012, France.

E-mail addresses: sylvain.brax@inserm.fr (S. Brax), clemence.gaudin@inserm.fr (C. Gaudin), claire.calmel@inserm.fr (C. Calmel), pierre-yves.boelle@iplesp.upmc.fr (P.-Y. Boëlle), harriet.corvol@aphp.fr (H. Corvol), manon.ruffin@inserm.fr (M. Ruffin), loic.guillot@inserm.fr (L. Guillot).

<https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2024.151416>

Received 29 May 2023; Received in revised form 27 March 2024; Accepted 13 April 2024

Available online 15 April 2024

0171-9335/© 2024 The Author(s).

Published by Elsevier GmbH. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

and accelerates a decline in lung function, thus increasing morbidity and mortality (Shteinberg et al., 2021). Thus, identifying the molecular factors involved in the host response to infection is crucial for developing alternative and complementary strategies to antibiotics for pwCF.

P. aeruginosa is an extracellular pathogen and, therefore, does not rely on intracellular proliferation. Nevertheless, *P. aeruginosa* can invade epithelial cells using their type 6 secretion system toxins (Sana et al., 2012). However, the consequences of this internalization, particularly at the pathophysiological level, remain unclear (Muggeo et al., 2023). The first study describing the presence of intracellular *P. aeruginosa* in CF airway epithelial cells in human lung tissue has recently been shown and may explain the maintenance of chronic infection in patients (Malet et al., 2024).

The septin (SEPT) cytoskeleton is expressed in all eukaryotic cells and is involved in many cellular processes, such as tissue barrier integrity and anti-infective responses to viruses and bacteria. In humans, 13 SEPTs (SEPT1–12 and SEPT14) interact to form hetero-oligomeric complexes, non-polar filaments, and more complex structures such as rings (Ivanov et al., 2020). SEPT7 plays a critical role in maintaining the stability and function of SEPT complexes, and the knockout of SEPT7 in mice induces embryonic lethality (Menon et al., 2014). SEPTs can also detect pathogenic microbes, including the gram-negative bacterium *Shigella flexneri* (Mostowy et al., 2010). They recognize the membrane curvature of dividing bacterial cells and mediate their entrapment and delivery to lysosomes (Krokowski et al., 2018). In addition, SEPTs such as SEPT2 and SEPT9 are involved in regulating bacterial invasion, attachment, proliferation, survival, and endocytosis (Ivanov et al., 2020).

In summary, these studies suggest that SEPTs are potential candidates for improving airway epithelial cell resistance to infection in pwCFs. However, to date, investigating the role of SEPTs in infection has been restricted to the cellular level and lacks translational aspects in pathology. Furthermore, modifications to SEPT organization during *P. aeruginosa* airway infection, particularly in the context of CF, remain unknown. Here, we hypothesized that SEPT7 is involved in controlling *P. aeruginosa* infection in CF bronchial epithelial cells.

2. Material and methods

2.1. Cell and bacterial culture

BEAS-2B cells (CRL-9482TM, Lot:59227035; American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) were cultured in F-12 medium (Invitrogen, Waltham, MA, USA) supplemented with 10 % foetal calf serum (FCS, Eurobio, Courtabouef, France), 10 mM HEPES (pH 7.2–7.5) and 1 % penicillin-streptomycin (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Pr Dieter Gruenert (originator) and Dr Beate Illek (provider) from the University of California San Francisco generously supplied 16HBE140-(16HBE) cells. The cells were cultured in minimum essential medium-Glutamax supplemented with 10 % FCS and 1 % antibiotics, as recommended by the manufacturer. Cells with the F508del *CFTR* variant (16HBE-CF) were obtained from the CF Foundation and cultured as recommended by the manufacturer (Valley et al., 2019). Primary human bronchial epithelial cells from healthy donors (non-CF1: batch 02AB839, age: 59, sex: male; non-CF2: batch 02AB0979, age: 36, sex: Male; non-CF3: batch 02AB68001, age: 71, sex: Female), and pwCF (CF1: batch CFAB064901, sex: female, Age: 37, F508del/1717-1 G>A; CF2: batch CFAB065301, sex: N/A, Age: N/A, F508del/c.2789+5 G>A) (Epithelix, Plan-les-Ouates, Switzerland) were cultured in a complete medium containing antibiotic (Epithelix). Cells were grown in 75 mL flasks (Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland) and maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5 % CO₂. Cellular infection experiments were performed in complete medium without antibiotics. The green fluorescent protein (GFP)-tagged *P. aeruginosa* PAK strain (PAK-GFP) (kindly provided by Pr Alain Filloux) was grown, as previously described (McCarthy et al., 2017). PAK-GFP was grown

16 h in tryptic soy agar (TSA) dishes (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) at 37 °C. A colony was then isolated and cultivated in 5 mL tryptic soy broth (TSB) (Sigma-Aldrich) at 37 °C for 16 h and shaken at 120 rpm. The bacterial broth was diluted 1:100 in TSB before a 2 h 15 min culture at 37 °C and shaken at 120 rpm. Further, the bacterial broth was pelleted, rinsed with phosphate buffered saline (PBS), and resuspended in a cell culture medium devoid of antibiotics. Bacterial concentration was determined at 600 nm (OD₆₀₀). Lipopolysaccharide (LPS) from *P. aeruginosa* (serotype 10) and Chloroquine were from Sigma-Aldrich. Elexacaftor, tezacaftor, ivacaftor were from Selleck Chemicals (Houston, Texas, USA).

2.2. Small interfering RNA transfection

LipofectamineTM RNAiMAX (Invitrogen) (BEAS-2B, 16HBE) or Lipofectamine 3000 (primary cells) were used for small interfering RNA (siRNA) transfection, according to the manufacturer's instructions. The cells were seeded in 12-well plates (Corning, Wiesbaden, Germany) to reach 80 % (50 % for primary cells) confluence in 24 h. They were then transfected for 72 h with 5 or 10 nM siRNA Control (CTL) (UGGUUUACAUGUUGUGUGA; Eurogentec, Seraing, Belgium), against SEPT7 (previously validated siRNA pool (Pfanztel et al., 2018)) (5'UUGCAGCUGUGACUUAUAA3';5'UGAAUUCACGCUUAUGGUA3';5'-UAUGAGAACUACAGAAGCA3'; and 5'GCUGAGGAGAGGAGCGUA3').

2.3. Internalization protocol

Bronchial epithelial cells were seeded in 12-well plates (Corning, Wiesbaden, Germany) and then transfected during 72 h with CTL or SEPT7 siRNA. Bacteria were then resuspended in the appropriate cell culture medium without antibiotics. The cells were then infected at various values of multiplicity of infection (MOI) for various times (see legends). After infection, the cells were washed thrice with PBS and incubated with 100 µg/mL tobramycin (Sigma-Aldrich) for 1 h, to kill all extracellular bacteria. The supernatants were stored and the cells were lysed with PBS containing 0.1 % Triton X-100. The supernatants and serial dilutions of cell lysates were plated on TSA and incubated overnight at 37 °C. Colony-forming units (CFU) were counted from cell lysate plates after verifying the complete removal of extracellular bacteria (supernatants).

2.4. Western blotting

Proteins were extracted using radioimmunoprecipitation assay buffer (Euromedex, Souffelweyersheim, France) supplemented with antiprotease-antiphosphatase (HaltTM Protease and Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail; Thermo Fisher Scientific). Proteins (10 µg) were reduced and size-separated on 4–15 % Mini-PROTEAN TGX stain-free precast gels (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and transferred onto nitrocellulose membranes using an iBlot2 device (Thermo Fisher Scientific). Membranes were blocked with TBS-Tween 0.1 % containing 5 % non-fat dry milk. Primary antibodies were incubated for 1 h at room temperature. The following SEPT antibodies have already been validated (Pfanztel et al., 2018): SEPT2 (60075-1, 1/20 000 Proteintech, Manchester, UK), SEPT6 (HPA005665, 1/1000, Atlas Antibody, Bromma, Sweden), SEPT7 (18991; 1/1000, IBL, Minneapolis, MN, USA), SEPT9 (A302-353A-M, 1/1000 Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas), and SEPT11 (A304-1761-M, 1/1000, Bethyl laboratories). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibodies were obtained from Millipore (MAB374, 1/2000, Burlington, Massachusetts, USA). Phospho-ERK1/2 (9101; 1/1000) and total-ERK1/2 (9102; 1/1000) and LC3B (3868, 1/1000) antibodies were from Cell Signaling Technology (Danvers, Massachusetts, USA). CFTR antibody 570 (1/1000) was from Cystic Fibrosis Foundation (<https://cfrantibodies.web.unc.edu>). We then used horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit (7074, 1/5000, Cell Signalling Technology) or anti-mouse (7076,

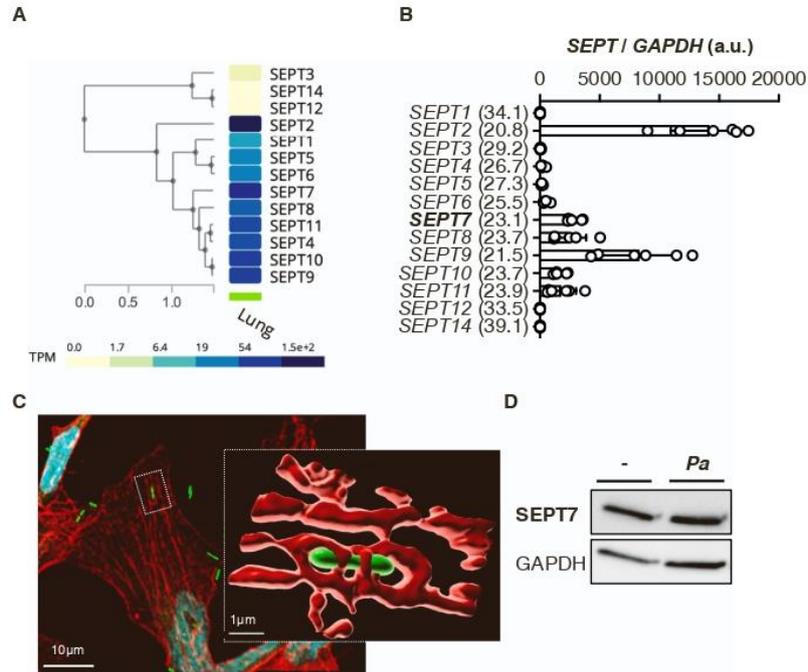


Fig. 1. (A) Septin (*SEPT*) transcript expressions using RNA sequencing ("RNAseq") in the lungs (public data extracted from GTEXportal.org, TPM: transcripts per million). (B) *SEPT* mRNA expression in BEAS-2B cells (n=6) using quantitative polymerase chain reaction (qPCR) (reference: *SEPT1*, Cycle threshold means given between brackets). (C) SEPT7 immunostaining (red) in BEAS-2B cells infected with *P. aeruginosa* for 3 h [multiplicity of infection (MOI) =20] (green). Nuclei are labelled with DAPI (cyan). (D) Western blot of SEPT7 and reference protein glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in BEAS-2B cells after infecting with PAK (MOI = 5) for 3 h or not infected (NI) (representative of n= 3 experiments).

1/5000, Cell Signaling Technology) secondary antibodies, depending on the primary antibody. Detection was performed using Clarity Chemiluminescent Substrate (Bio-Rad) and images were recorded using the LAS-3000 bioimaging system (Fujifilm, Bussy-Saint-Georges, France). Densitometric quantification was performed using the ImageJ Software (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

2.5. Reverse Transcription-quantitative polymerase chain reaction

RNA was extracted using the NucleoSpin RNA kit (Macherey Nagel, Düren, Germany), following the manufacturer's instructions. Reverse Transcription was performed using a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed using a QuantStudio 3 device (Applied Biosystems) and Sensifast Probe Lo-Rox Kit (Bio-technofix, Guibeville, France) and TaqMan probes (Applied Biosystems) for GAPDH (Hs02786624_g1), SEPT1 (Hs00364521_m1), SEPT2 (Hs01565417_m1), SEPT3 (Hs00251883_m1), SEPT4 (Hs00365352_m1), SEPT5 (Hs00954997_m1), SEPT6 (Hs00248408_m1), SEPT7 (Hs00987502_g1), SEPT8 (Hs00922332_m1), SEPT9 (Hs02246396_m1), SEPT10 (Hs00909247_g1), SEPT11 (Hs00217342_m1), SEPT12 (Hs00332566_m1), or SEPT14 (Hs01121472_m1). GAPDH was used to normalize the expression levels of the target genes. The relative expression of each gene was calculated using a reference group and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

2.6. Immunofluorescence and confocal microscopy

Cells were seeded in 24-well plates (Corning, Corning, NY, USA) using glass coverslips. Confluent cells were infected with PAK-GFP and rinsed with PBS. The cells were fixed with 4 % paraformaldehyde for 15 min, rinsed 3× with PBS, and permeabilized (PBS containing 0.1 %

Triton X-100, 10 min). Following this, the cells were incubated overnight with a blocking solution (PBS, 1 % bovine serum albumin). They were then incubated with primary SEPT7 antibody (1/100, blocking solution, 1 h at room temperature) and washed 3× with PBS. The cells were then incubated 1 h with Alexa Fluor 594 anti-rabbit secondary antibodies (Invitrogen A11012, 1/2000). The nuclei were stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen D1306, 1/1000, PBS). Mounting and sealing were performed using ProLong mounting medium (Thermo Fisher Scientific). Standard and confocal fluorescence microscopy were performed using Olympus BX61 and Olympus FV3000 (100× oil immersion objective), respectively. Images were processed with Imaris software V9.9 (Oxford instruments, Abingdon-on-Thames, UK).

2.7. Enzyme linked immunosorbent assay

Supernatants were collected, and the interleukin (IL)-6 and IL-8 concentrations were measured using Human IL-8/CXCL8 (DY208) and Human IL-6 ELISA kits ((DY206; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The substrate (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) was procured from Cell Signalling Technology. Absorbance was measured using a FLUOstar OPTIMA plate reader (BMG Labtech, Champigny-sur-Marne, France), and the results were analysed using MARS Data Analysis Software v3.01 R2 (BMG Labtech).

2.8. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 10 software. The groups were compared using the Mann-Whitney test (two groups) or ANOVA multi-comparison test with Bonferroni correction (> two groups). Statistical details, including the statistical tests and significance, have been specified in the figure legends.

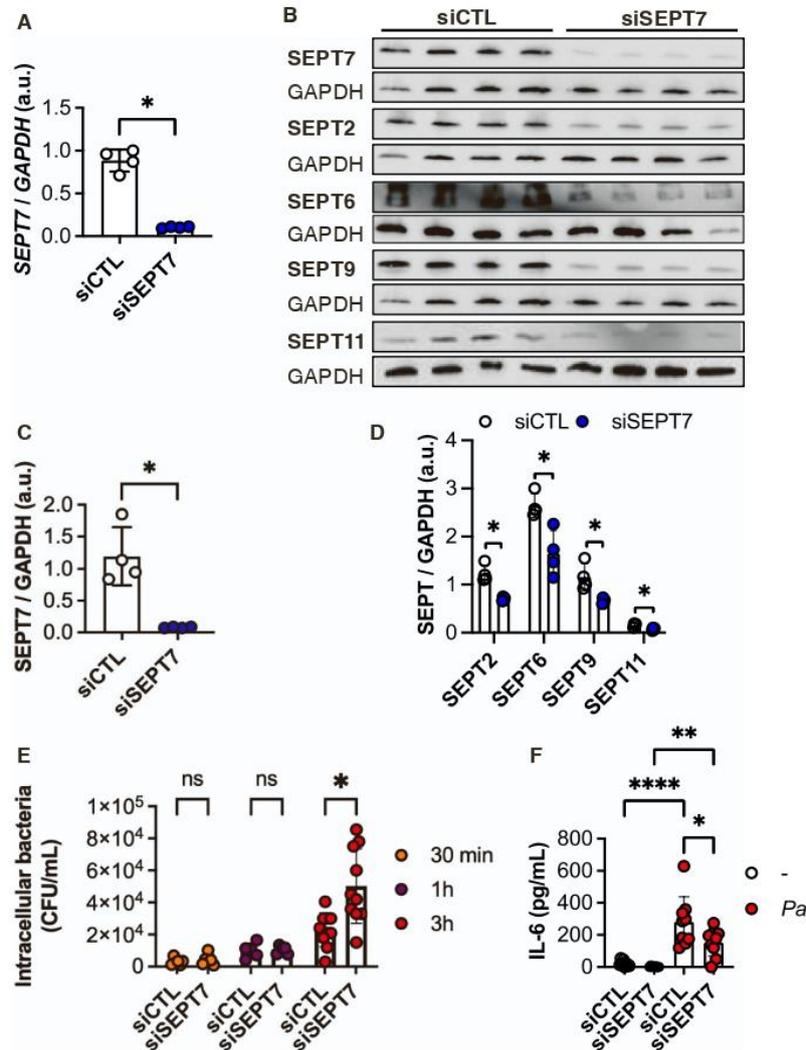


Fig. 2. *SEPT7* mRNA expression analysis using qPCR (A) and *SEPT7* (B, C), *SEPT2* (B, D), *SEPT6* (B, D), *SEPT9* (B, D), *SEPT11* (B, D) protein expression using western blot in BEAS-2B after 72 h transfection of 5 nM control siRNA (siCTL, white circles) or *SEPT7* siRNA (blue circles) ($n=4$, $*p<0.05$, Mann-Whitney test). (E) Amount of intracellular *P. aeruginosa* (*Pa*) (CFU/mL) in BEAS-2B cells transfected for 72 h with 5 nM of siCTL or *SEPT7* siRNA and then infected for 30 min (orange circles, $n=6$), 1 h (purple circles, $n=5$) and 3 h (red circles, $n=10$) with *Pa* (MOI=5) [$*p<0.05$, analysis of variance (ANOVA), Bonferroni correction)]. (F) IL-6 production by BEAS-2B cells transfected for 72 h with 5 nM of siCTL or *SEPT7* siRNA in the non-infected (-, white circles) condition and after 3 h of *Pa* (red circles) infection (MOI=5) [$n=9$; $*p<0.05$, $**p<0.01$, $****p<0.0001$ analysis of variance (ANOVA), Bonferroni correction)].

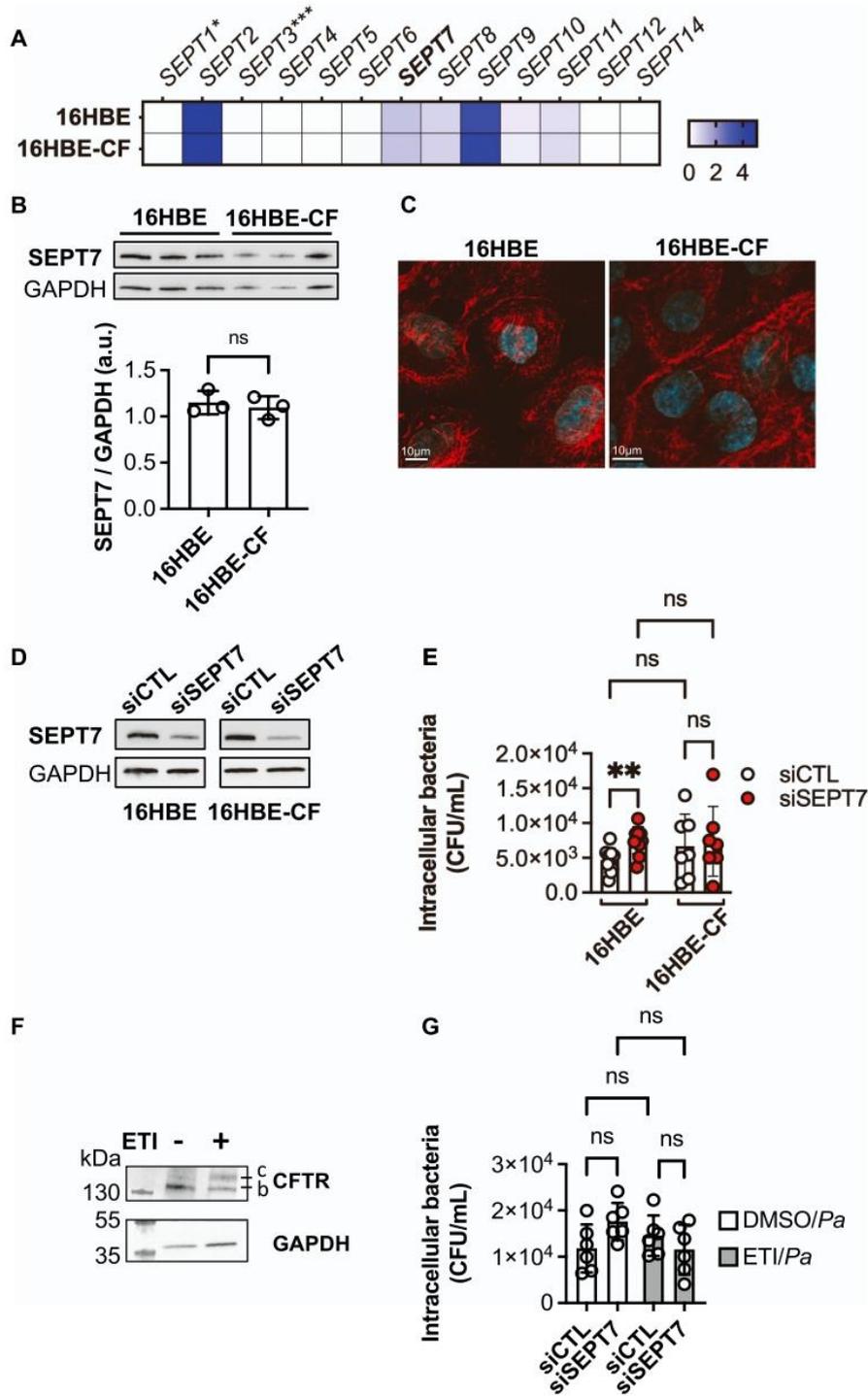
3. Results and discussion

To date, there are limited studies examining the specific role of SEPT in the lungs. In this study, we initially extracted the expression data of SEPT transcripts in lung tissues from a publicly available database (GTExportal.org). Among the 13 SEPTs expressed in humans, SEPT3, SEPT12, and SEPT14 were negligibly detected in the whole lung tissue (Fig. 1 A). SEPT1, SEPT5, and SEPT6 were weakly expressed, whereas SEPT4, SEPT8, SEPT9, SEPT10, and SEPT11 showed intermediate expression levels. SEPT2 showed the highest expression, followed by SEPT7. Similarly, SEPT3, 12 and 14 are weakly detected in BEAS-2B cells (high Cycle threshold values). Analysis of relative SEPT expression (SEPT1 is used as a reference) in BEAS-2B cells shows that SEPT2, 9 and 7 are the three most highly expressed (Fig. 1B).

Intracellular bacteria with intestinal tropism, such as *S. flexneri* are internalized by HeLa epithelial cells, with 15–30 % of them being trapped in cage-like SEPT7 structures (Mostowy et al., 2010). In context

of the innate immune host response, involving the key role of bronchial epithelial cells when exposed to potentially pathogenic microorganisms (Whitsett and Alenghat, 2015), we studied whether this phenomenon of engagement was also observed with a predominantly extracellular bacterium, *P. aeruginosa*, which particularly colonizes the cells of pwCF. We observed that *P. aeruginosa* was internalized in the bronchial epithelial cells of the non-cancerous BEAS-2B cell line and was found in SEPT7 structures comparable to the cages described in the literature (Fig. 1C). This result is consistent with recent observations in H1299 non-small cell lung cancer epithelial cells (Aigal et al., 2022). Furthermore, we did not observe any change in SEPT7 protein expression in cells infected with *P. aeruginosa* compared to uninfected cells (Fig. 1D).

To clarify the role of SEPT7 in the internalization of *P. aeruginosa*, we used an interfering RNA targeting *SEPT7* mRNA to downregulate its expression in BEAS-2B cells. This siRNA downregulated SEPT7 at, both, the mRNA (Fig. 2A) and protein levels (Figs. 2B and 2C). Consistent with several previous studies (Kinoshita et al., 2002; Lobato-Marquez et al.,



(caption on next page)

Fig. 3. (A) Heatmap of *SEPT* mRNA expression in 16HBE wild type (16HBE) or cystic fibrosis (16HBE-CF) cells [(n=3, *p<0.05, ***p<0.001, analysis of variance (ANOVA), Bonferroni correction)] using quantitative polymerase chain reaction (qPCR) (reference sample: 16HBE *SEPT7*). (B) *SEPT7* protein expression analysis using western blot respectively in 16HBE or 16HBE-CF cells (n=3; ns: non-significant, Mann–Whitney test). (C) *SEPT7* immunostaining (red) in 16HBE and 16HBE-CF cells. Nuclei are labelled with DAPI (cyan). (D) Western blot of *SEPT7* and reference protein GAPDH in 16HBE or 16HBE-CF cells after 72 h transfection with 5 nM siCTL or *SEPT7* siRNA (representative of n=4 experiments). (E) Amount of intracellular *P. aeruginosa* (*Pa*) (CFU/mL) in 16HBE (n=10) or 16HBE-CF (n=7) cells transfected for 72 h with 5 nM CTL or *SEPT7* siRNA and then infected for 4 h with *Pa* (red circles) (MOI=10) (**p<0.01; ns: non-significant, analysis of variance (ANOVA), Bonferroni correction). (F) CFTR and GAPDH expression using western blot in 16HBE-CF cells incubated 72 h with vehicle (-: DMSO) or Trikafta (ETI: elexacaftor (3 μM)-tezacaftor (3 μM)-ivacaftor (1 μM)). (G) Amount of intracellular *P. aeruginosa* (*Pa*) (CFU/mL) in 16HBE-CF cells incubated 72 h with DMSO or ETI, transfected (24 h after ETI adding) for 48 h with 5 nM of siCTL or *SEPT7* siRNA and then infected for 3 h with *Pa* (MOI=10) [(n=6; ns: not significant, analysis of variance (ANOVA), Bonferroni correction)].

2019; Pfanzer et al., 2018; Van Ngo et al., 2022), *SEPT7* inhibition reduced the protein expression of *SEPT2* (Figs. 2B and 2D), *SEPT6* (Figs. 2B and 2D), *SEPT9* (Figs. 2B and 2D), and *SEPT11* (Figs. 2B and 2D). However, this did not affect the expression of the corresponding mRNAs (Supplementary Figure 1A). These results confirmed that *SEPT7* plays a crucial role in maintaining the *SEPT* cytoskeleton (Menon et al., 2014).

After infecting BEAS-2B cells with *P. aeruginosa*, an increase in the number of intracellular bacteria in cells transfected with *SEPT7* siRNA was observed (Fig. 2E). Nevertheless, this effect is only observable 3 h post-infection and not at shorter times. This suggests that inhibition of *SEPT7* does not affect entry into the cell but rather its intracellular fate. It should also be noted that the internalization of *P. aeruginosa* was rare, accounting for approximately 2 % of the total bacteria incubated with the cells, which is consistent with data obtained from other cell lines, including MDCK (Bucior et al., 2010) and HeLa cells (Sana et al., 2012). This value reached approximately 5 % when *SEPT7* expression was inhibited.

To determine whether *SEPT7* inhibition altered the inflammatory response, we quantified the levels of cytokines IL-8 and IL-6, which are induced by *P. aeruginosa* in bronchial epithelial cells. No effect on IL-8 mRNA expression and protein secretion (Supplementary Figure 1B and 1C) was observed under either uninfected or infected conditions. In contrast, *SEPT7* inhibition significantly reduced IL-6 production following infection (Fig. 2F). No effect was observed on IL-6 mRNA levels indicating that the *SEPT7* inhibitory effect on IL-6 is not at the transcriptional level (Supplementary Figure 1D).

Interestingly, inhibition of IL-6 secretion was also observed on A549 lung epithelial cells in which septins dynamics were inhibited by forchlorfenuron and which were infected with influenza virus (Tokhtaeva et al., 2015). It has been shown that, by interacting with exocytic proteins such as soluble N ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) proteins, septins are required for exocytosis (Tokhtaeva et al., 2015). The difference that we observed in the effect of *SEPT7* inhibition on IL-8 and IL-6 secretion might be explained by their distinct secretion mechanisms (Stanley and Lacy, 2010). Indeed, IL-6 secretion involves the SNARE protein VAMP3 (Manderson et al., 2007), whereas IL-8 secretion involves the Rho GTPases Rac1 and CDC42 (Hobert et al., 2002). However, when LPS, a *P. aeruginosa* virulence factor, is used, this decrease in IL-6 is no longer observed (Supplementary Figure 1E) and IL-8 remains unchanged (Supplementary Figure 1F). The inhibition of *SEPT7* prevents the phosphorylation of ERK1/2 in the invasive breast cancer cell line, MDA-MB-231, but does not affect the p38, AKT, or JNK pathways (Zhang et al., 2016). In CF airway epithelial cells exposed to *P. aeruginosa* filtrates, IL-6 production is dependent on ERK1/2 activation (Berube et al., 2010). We did not observe that the inhibition of *SEPT7* in BEAS2-B (Supplementary Figure 2A) or 16HBE (Supplementary Figure 2E) cells modulates ERK1/2 phosphorylation. All these data suggest that the decrease of IL-6 secretion is likely due to the intracellular activity (production and secretion of numerous factors) of the live bacterium. IL-6 plays a prominent role in the anti-infective response of the lungs. It also promotes epithelial repair following *P. aeruginosa* infection both *in vitro* and *in vivo* (Saint-Criq et al., 2018). Moreover, in a mouse model of acute *P. aeruginosa* infection, the administration of alveolar macrophages

modified to overexpress IL-6 protected the mice from this infection and promoted lung repair (Kheir et al., 2022). Thus, reduced IL-6 levels observed *via* *SEPT7* inhibition may further promote the persistence of *P. aeruginosa* within the bronchial epithelium and impair epithelial repair, a critical process in CF (Ruffin and Brochiero, 2019).

To assess the role of *SEPT7* in CF, we used isogenic 16HBE and 16HBE with F508del *CFTR* variant (16HBE-F508del) cells. *SEPT* RNA expression profiles are similar (Fig. 3A) and *SEPT7* protein expression (Fig. 3B) and localization (Fig. 3C) are identical between the two cell lines. We confirmed that *SEPT7* siRNA efficiently decreased *SEPT7* protein expression in both these cell types (Fig. 3D). We also confirmed an increase in intracellular bacteria following *SEPT7* inhibition in the 16HBE bronchial cell line (Fig. 3E). However, this effect was not observed in 16HBE-CF cells (Fig. 3E). In cells expressing *SEPT7*, we observed a trend towards an increase in the number of intracellular bacteria in 16HBE-CF cells ($6.7 \times 10^3 \pm 4567$) compared with 16HBE cells ($4.6 \times 10^3 \pm 1704$), although without reaching significance (Fig. 3E). The variability observed in the CF group could be linked to the genomic instability of these cells and derived clones as recently demonstrated (Kerschner et al., 2023).

These results suggest an altered *SEPT7* function, specific to CF. Using Ellexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor, the current therapy used in the majority of pwCF to correct *CFTR* expression (Fig. 3F) and function, we did not observe any effect on the number of intracellular bacteria (Fig. 3G). Thus, the altered *SEPT7* function in CF cells does not seem to be directly linked to *CFTR* dysfunction. The *CFTR*-F508del mutant protein, through its interactions with numerous specific proteins (not interacting with wild-type *CFTR*), is associated with a wide range of cellular pathways (Lim et al., 2022; Pankow et al., 2015). Thus, the altered role of *SEPT7* in CF cells might be the consequence of a disturbed cellular environment.

Septin-cage-entrapped bacteria are targeted to autophagy and *SEPT7* plays a key role in eliminating bacteria, particularly *S. flexneri*, by directing them to lysosomes (Mostowy et al., 2010). Inhibition of autophagy in bronchial cells, notably by chloroquine, promotes intracellular survival of *P. aeruginosa* (Junkins et al., 2013). Furthermore, *CFTR*-mutated bronchial epithelial cells exhibit defective autophagy (Luciani et al., 2010), and ExoS, a major *P. aeruginosa* toxin, inhibits autophagy (Rao et al., 2021). These elements would favor the intracellular persistence of *P. aeruginosa* and the development of chronic colonization in patients (Flores-Vega et al., 2021). When we block autophagy with chloroquine in BEAS-2B cells, shown by induction of LC3B-II expression (Supplementary Figure 2B), we observed, as expected from a previous study (Junkins et al., 2013), an increase in the number of intracellular bacteria similar to that observed with inhibition of *SEPT7* (Supplementary Figure 2C). In contrast, we observe no differences with chloroquine when *SEPT7* is inhibited. Chloroquine is also able to decrease IL-6 in *SEPT7* sufficient cells (Supplementary Figure 2D). Finally, we observed no difference in the expression of the autophagy marker LC3B between 16HBE-WT and 16HBE-CF cells (Supplementary Figure 2E). Thus, our data suggest that the lack of increase in intracellular bacteria observed in 16HBE-CF cells after *SEPT7* inhibition is not due to a specific initial autophagic state. However, we cannot totally exclude an alteration of other specific elements of the autophagy machinery in CF cells and further work is therefore needed to understand septin-autophagy interactions during *P. aeruginosa* infection

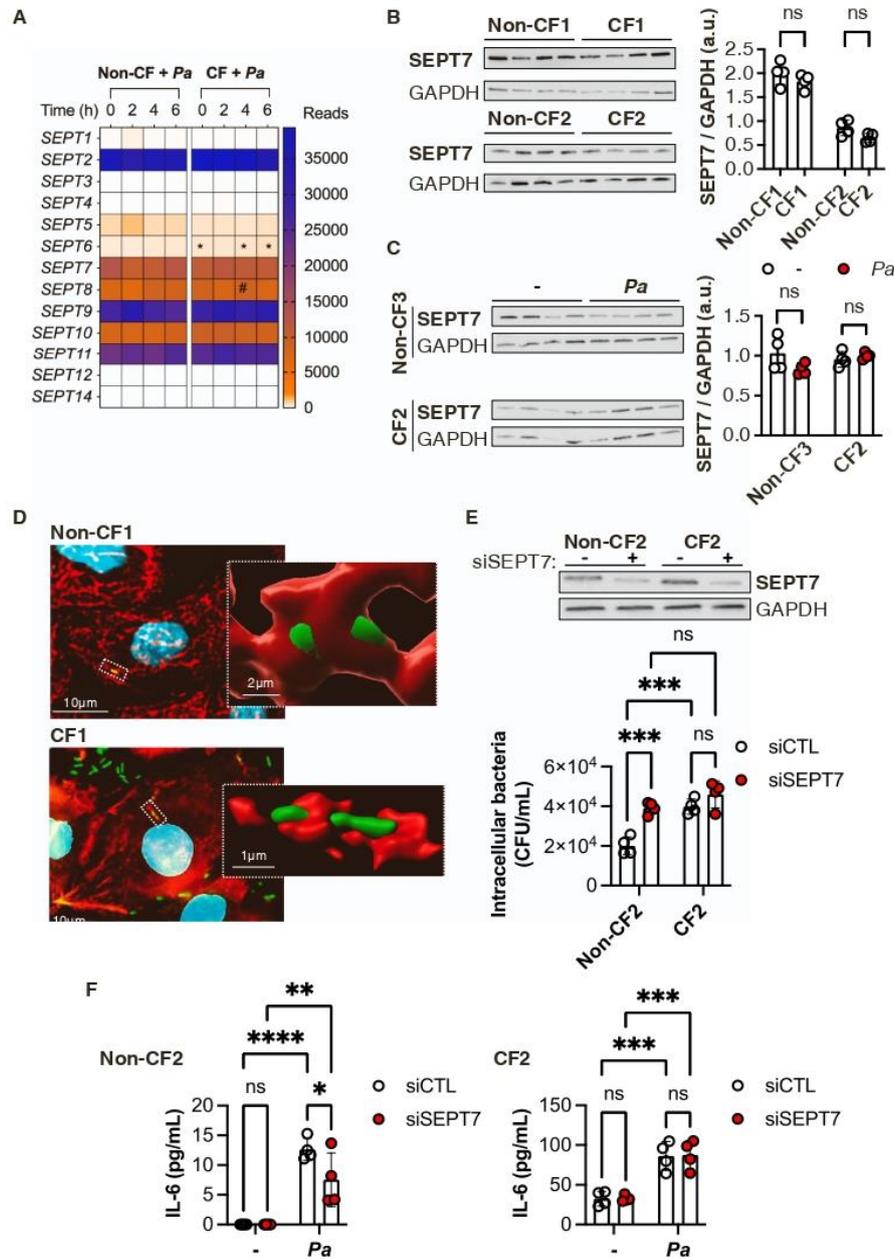


Fig. 4. (A) Kinetics of *SEPT* mRNA expression measured by RNAseq in primary bronchial epithelial cells from patients without CF (Non-CF, N = 4) or with CF (N = 4) and infected with *P. aeruginosa* (PAK strain, MOI 0.25) for 0, 2, 4, or 6 h (* $p < 0.05$: CF vs. non-CF; # $p < 0.05$: CF 4 h vs. CF 2 h, Benjamini and Hochberg corrected p-value) [data were extracted from (Balloy et al., 2015)]. (B) Western blot and quantification of SEPT7 and reference protein GAPDH expression in primary bronchial epithelial cells from non-CF donors (non-CF1, non-CF2) and CF patients (CF1, CF2) at baseline and (C) from non-CF3 and CF2 after 3 h of *Pa* infection (red circled) (MOI = 10) or non-infected (-; white circle) (n=4; ns: non-significant Mann-Whitney test). (D) Immunostaining of SEPT7 (red) in primary bronchial epithelial cells from non-CF1 and CF1 infected for 3 h with *Pa* (MOI=20) (green). Nuclei are labelled with DAPI (cyan). (E) Western blot of SEPT7 and reference protein GAPDH in Non-CF2 and CF2 cells after 96 h transfection with 10 nM siCTL or SEPT7 siRNA. Amount of intracellular *Pa* (CFU/mL) in primary non-CF2 and CF2 cells (n=6) transfected for 72 h with 10 nM CTL (white circle) or SEPT7 (red circles) siRNA and then infected for 4 h with *Pa* (MOI=10) (n=4; *** $p < 0.001$, ANOVA, Bonferroni correction). (F) Interleukin-6 (IL-6) production by non-CF2 and CF2 cells transfected for 72 h with 10 nM CTL (white circle) or SEPT7 (red circle) siRNA in non-infected and after 4 h of *Pa* infection (MOI=10) (n= 4; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ANOVA, Bonferroni correction).

and why SEPT7 fails to play its role in CF cells.

Knowing the limitation of 16HBE14o- cells (Kerschner et al., 2023) evoked above, we then studied primary bronchial epithelial cells. Using previous transcriptomic data (Balloy et al., 2015), we observed that *SEPT1*, 3, 4, 12 and 14 are very weakly expressed (less than 100

reads). *SEPT5* and 6 are weakly expressed (300–1000 reads). *SEPT7*, 8 and 10 have an intermediary level of expression compared with *SEPT2*, 9 and 11, which are the most highly expressed. Overall, there were no major differences in *SEPT* expression between CF and non-CF cells. Only *SEPT6* was significantly increased in CF cells. *P. aeruginosa* infection had

little impact on the expression of the various SEPTs. A significant increase in SEPT8 was observed between 4 and 6 h of infection (Fig. 4A). We observed that SEPT7 protein is similarly expressed between primary non-CF and CF cells (Fig. 4B) and, as seen in BEAS-2B cells, is not regulated by *P. aeruginosa* infection (Fig. 4C). We also observed, both in non-CF and CF cells, bacterial engagement in SEPT7 structures comparable to those found in BEAS-2B cells (Fig. 4D and Supplementary Figure 3A). In non-CF cells, we observed, as in BEAS-2B and 16HBE cells, that inhibition of SEPT7 induces an increase of intracellular bacteria (Fig. 4E) associated with a decrease of IL-6 (Fig. 4F). Finally, similar to 16HBE-CF, SEPT7 depletion in CF primary bronchial cells did not affect the number of intracellular bacteria (Fig. 4E) and IL-6 level (Fig. 4F). IL-8 levels were not affected by SEPT7 inhibition (Supplementary Figure 3B). In CF cells, there are more intracellular bacteria in comparison to non-CF cells (Fig. 4E) and, as expected from previous data (Balloy et al., 2015), an increased inflammatory response (IL-8 and IL-6) induced by *P. aeruginosa* in CF cells than in non-CF cells (Fig. 4F and supplementary Figure 3B), which is perfectly in line with our previous results. We also observed a greater amount of IL-6 at baseline in CF cells, likely related to a constitutive activation of proinflammatory signaling directly linked to CFTR dysfunction (Cohen and Prince, 2012) (Fig. 4F).

Our results show that, although SEPT7 engages *P. aeruginosa* in CF primary cells, it does not function as expected and does not prevent the proliferation or persistence of bacteria at the intracellular level. It has recently been shown that, contrary to other bacteria, *P. aeruginosa* can be found intracellularly both in vacuoles and in the cytosol in bronchial epithelial cells (Kumar et al., 2022). Further work is required to know if this observation would be seen in CF primary bronchial epithelial cells and to understand how, in relation to SEPT7, *P. aeruginosa* could disrupt the host response according to its intracellular localization.

4. Conclusion

This study demonstrates the significance of SEPT7 in regulating *P. aeruginosa* infection and IL-6 production in bronchial epithelial cells. However, this major role was not observed in CFTR-deficient bronchial cells. To further elucidate CF pathology, additional investigations using differentiated primary epithelia at the air-liquid interface are required to evaluate the role of SEPT7 in *P. aeruginosa*-related pathogenicity. The study findings may potentially address whether manipulating SEPT7 expression can be considered a host-friendly strategy to promote the anti-infective control of this pathogen, particularly in the context of CF.

Funding

SB received a doctoral fellowship from the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation. LG received grants from the French cystic fibrosis non-profit organization Vaincre la mucoviscidose (RF20220503031), Association Gregory Lemarchal and ANR (SEPT-CF, 2022-2025) to conduct the research. The Olympus FV3000 was obtained with financial support from ITMO Cancer of Aviesan within the framework of the 2021–2030 Cancer Control Strategy, on funds administered by Inserm.

CRedit authorship contribution statement

Claire Calmel: Investigation. **Pierre-Yves Boëlle:** Writing – review & editing, Funding acquisition. **Harriet Corvol:** Writing – review & editing. **Manon Ruffin:** Writing – review & editing. **Sylvain Brax:** Writing – original draft, Visualization, Validation, Methodology, Investigation, Formal analysis, Conceptualization. **Clemence Gaudin:** Methodology, Investigation, Formal analysis. **Loïc Guillot:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Supervision, Project administration, Funding acquisition, Conceptualization.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data Availability

No data was used for the research described in the article.

Acknowledgements

We thank Romain Morichon and the Saint-Antoine imaging platform for his assistance with image processing.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.ejcb.2024.151416.

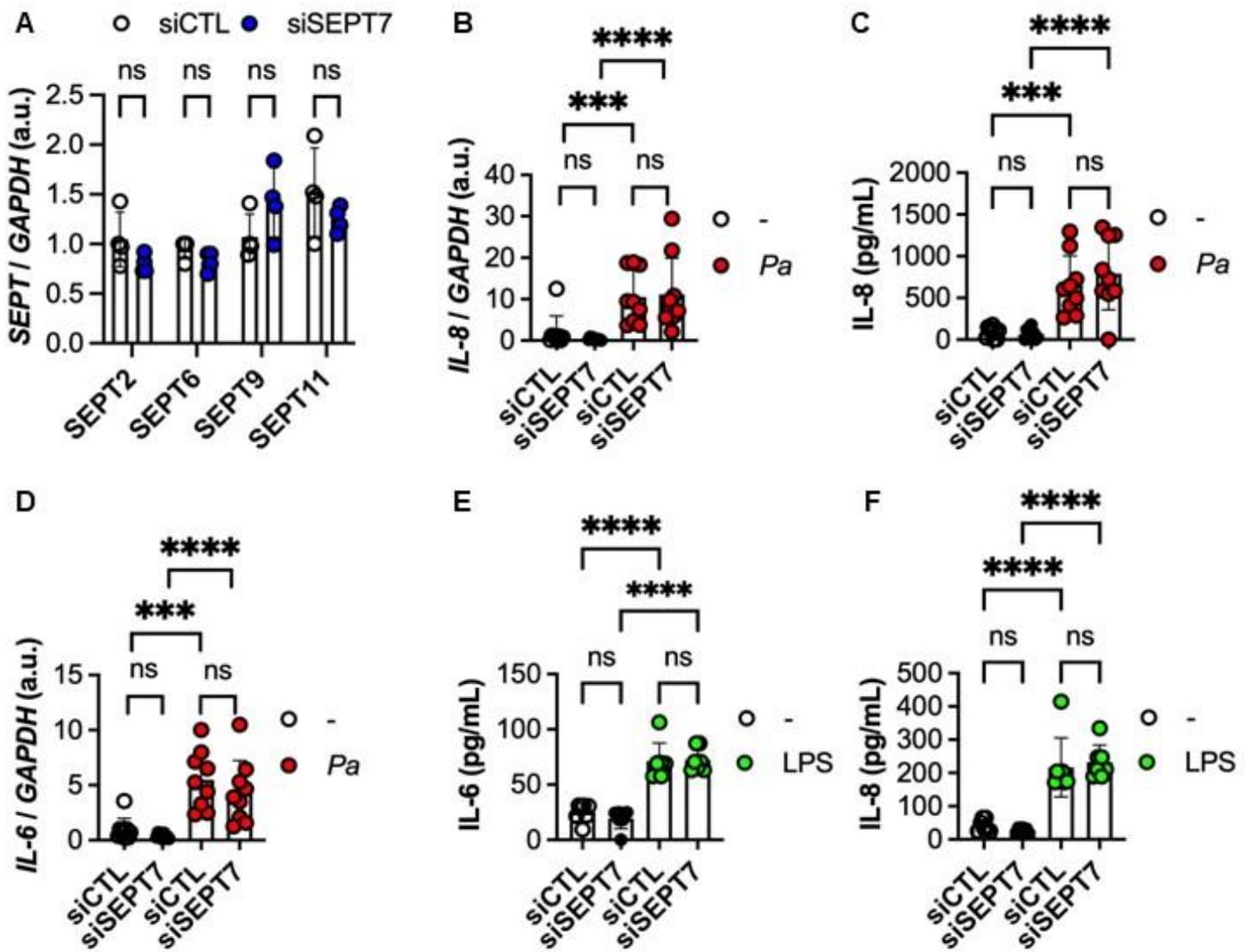
References

- Aigal, S., Omidvar, R., Stober, K., Ziegelbauer, J., Eierhoff, T., Schampera, J.N., Romer, W., Schwan, C., 2022. Septin barriers protect mammalian host cells against *Pseudomonas aeruginosa* invasion. *Cell Rep.* 41, 111510 <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111510>.
- Balloy, V., Varet, H., Dillies, M.A., Proux, C., Jagla, B., Coppee, J.Y., Tabary, O., Corvol, H., Chignard, M., Guillot, L., 2015. Normal and cystic fibrosis human bronchial epithelial cells infected with *Pseudomonas aeruginosa* exhibit distinct gene activation patterns. *PLoS One* 10, e0140979. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140979>.
- Berube, J., Roussel, L., Nattagh, L., Rousseau, S., 2010. Loss of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function enhances activation of p38 and ERK MAPKs, increasing interleukin-6 synthesis in airway epithelial cells exposed to *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 285, 22299–22307. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.098566>.
- Bucior, I., Mostov, K., Engel, J.N., 2010. *Pseudomonas aeruginosa*-mediated damage requires distinct receptors at the apical and basolateral surfaces of the polarized epithelium. *Infect. Immun.* 78, 939–953. <https://doi.org/10.1128/IAI.01215-09>.
- Cohen, T.S., Prince, A., 2012. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nat. Med.* 18, 509–519. <https://doi.org/10.1038/nm.2715>.
- Flores-Vega, V.R., Vargas-Roldan, S.Y., Lezana-Fernandez, J.L., Lascuain, R., Santos-Preciado, J.I., Rosales-Reyes, R., 2021. Bacterial subversion of autophagy in cystic fibrosis. *Front Cell Infect. Microbiol.* 11, 760922. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.760922>.
- Hobert, M.E., Sands, K.A., Mrsny, R.J., Madara, J.L., 2002. Cdc42 and Rac1 regulate late events in *Salmonella typhimurium*-induced interleukin-8 secretion from polarized epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 277, 51025–51032. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210466200>.
- Ivanov, A.I., Le, H.T., Naydenov, N.G., Rieder, F., 2020. Novel Functions of the Septin Cytoskeleton: Shaping Up Tissue Inflammation and Fibrosis. *Am J Pathol* 10.1016/j.ajpath.2020.09.007.
- Junkins, R.D., Shen, A., Rosen, K., McCormick, C., Lin, T.J., 2013. Autophagy enhances bacterial clearance during *P. aeruginosa* lung infection. *PLoS One* 8, e72263. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072263>.
- Kerschner, J.L., Paranjpye, A., Harris, A., 2023. Cellular heterogeneity in the 16HBE14o (-) airway epithelial line impacts biological readouts. *Physiol. Rep.* 11, e15700 <https://doi.org/10.14814/phy2.15700>.
- Kheir, S., Villeret, B., Garcia-Verdugo, I., Sallenave, J.M., 2022. IL-6-elafin genetically modified macrophages as a lung immunotherapeutic strategy against *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Mol. Ther.* 30, 355–369. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.08.007>.
- Kinoshita, M., Field, C.M., Coughlin, M.L., Straight, A.F., Mitchison, T.J., 2002. Self- and actin-templated assembly of mammalian septins. *Dev. Cell* 3, 791–802. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(02\)00366-0](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(02)00366-0).
- Krokowski, S., Lobato-Marquez, D., Chastanet, A., Pereira, P.M., Angelis, D., Galea, D., Larrouy-Maumus, G., Henriques, R., Spiliotis, E.T., Carballido-Lopez, R., Mostov, S., 2018. Septins recognize and entrap dividing bacterial cells for delivery to lysosomes. *e864 Cell Host Microbe* 24, 866–874. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.11.005>.
- Kumar, N.G., Nieto, V., Kroken, A.R., Jedel, E., Grosser, M.R., Hallsten, M.E., Mettruccio, M.M.E., Yahr, T.L., Evans, D.J., Fleiszig, S.M.J., 2022. *Pseudomonas aeruginosa* can diversify after host cell invasion to establish multiple intracellular niches. *mBio* 13, e0274222. <https://doi.org/10.1128/mbio.02742-22>.
- Lim, S.H., Snider, J., Birimberg-Schwartz, L., Ip, W., Serralha, J.C., Botelho, H.M., Lopes-Pacheco, M., Pinto, M.C., Moutaoufik, M.T., Zilocchi, M., Laselva, O., Esmaili, M., Kotlyar, M., Lyakishcheva, A., Tang, P., Lopez Vazquez, L., Akula, I., Aboualazadeh, F., Wong, V., Grozavu, I., Opacak-Bernardi, T., Yao, Z., Mendoza, M., Babu, M., Jurisica, I., Gonska, T., Bear, C.E., Amaral, M.D., Stagljar, I., 2022. CFTR interactome

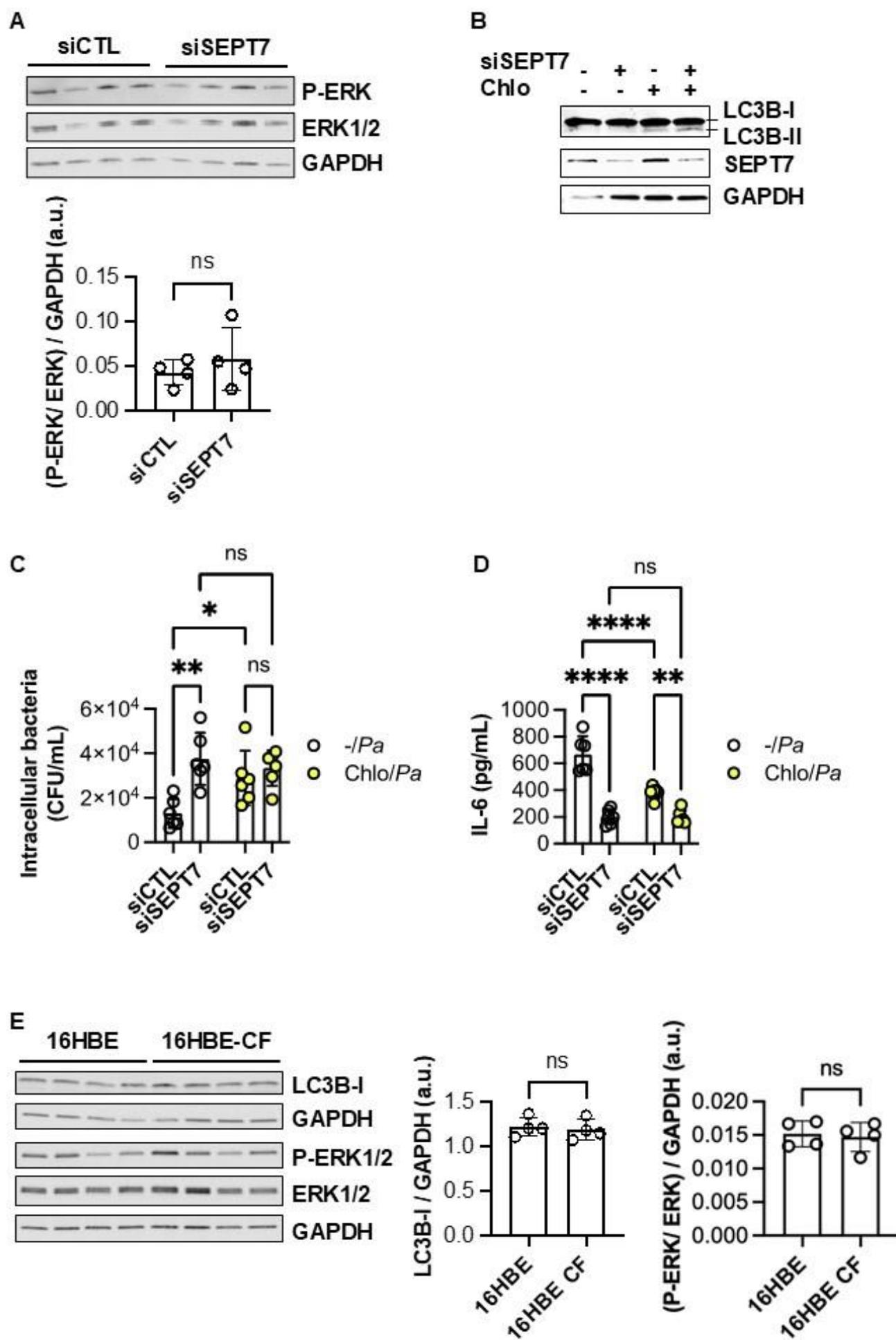
- mapping using the mammalian membrane two-hybrid high-throughput screening system. *Mol. Syst. Biol.* 18, e10629 <https://doi.org/10.15252/msb.202110629>.
- Lobato-Marquez, D., Krokowski, S., Sirianni, A., Larrouy-Maumus, G., Mostowy, S., 2019. A requirement for septins and the autophagy receptor p62 in the proliferation of intracellular Shigella. *Cytoskeleton (Hoboken)* 76, 163–172. <https://doi.org/10.1002/cm.21453>.
- Luciani, A., Vilella, V.R., Esposito, S., Brunetti-Pierri, N., Medina, D., Settembre, C., Gavina, M., Pulze, L., Giardino, I., Pettoello-Mantovani, M., D'Apolito, M., Guido, S., Masliah, E., Spencer, B., Quarantino, S., Raia, V., Ballabio, A., Maiuri, L., 2010. Defective CFTR induces aggresome formation and lung inflammation in cystic fibrosis through ROS-mediated autophagy inhibition. *Nat Cell Biol* 12, 863–875, 10.1038/ncb2090.
- Malet, K., Faure, E., Adam, D., Donner, J., Liu, L., Pilon, S.J., Fraser, R., Jorth, P., Newman, D.K., Brochiero, E., Rousseau, S., Nguyen, D., 2024. Intracellular *Pseudomonas aeruginosa* within the airway epithelium of cystic fibrosis lung tissues. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 10.1164/rccm.202308-1451OC.
- Manderson, A.P., Kay, J.G., Hammond, L.A., Brown, D.L., Stow, J.L., 2007. Subcompartments of the macrophage recycling endosome direct the differential secretion of IL-6 and TNF α . *J. Cell Biol.* 178, 57–69. <https://doi.org/10.1083/jcb.200612131>.
- McCarthy, R.R., Mazon-Moya, M.J., Moscoso, J.A., Hao, Y., Lam, J.S., Bordi, C., Mostowy, S., Filloux, A., 2017. Cyclic-di-GMP regulates lipopolysaccharide modification and contributes to *Pseudomonas aeruginosa* immune evasion. *Nat. Microbiol.* 2, 17027 <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.27>.
- Menon, M.B., Sawada, A., Chaturvedi, A., Mishra, P., Schuster-Gessler, K., Galla, M., Schambach, A., Gossler, A., Forster, R., Heuser, M., Kotlyarov, A., Kinoshita, M., Gaestel, M., 2014. Genetic deletion of SEPT7 reveals a cell type-specific role of septins in microtubule destabilization for the completion of cytokinesis. *PLoS Genet.* 10, e1004558 <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004558>.
- Mostowy, S., Bonazzi, M., Hamon, M.A., Tham, T.N., Mallet, A., Lelek, M., Gouin, E., Demangel, C., Brosch, R., Zimmer, C., Sartori, A., Kinoshita, M., Lecuit, M., Cossart, P., 2010. Entrapment of intracytosolic bacteria by septin cage-like structures. *Cell Host Microbe* 8, 433–444. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.10.009>.
- Muggeo, A., Coraux, C., Guillard, T., 2023. Current concepts on *Pseudomonas aeruginosa* interaction with human airway epithelium. *PLoS Pathog.* 19, e1011221 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011221>.
- Pankow, S., Bamberger, C., Calzolari, D., Martínez-Bartolome, S., Lavallee-Adam, M., Balch, W.E., Yates, J.R., 3rd, 2015. Δ F508 CFTR interactome remodelling promotes rescue of cystic fibrosis. *Nature* 528, 510–516, 10.1038/nature15729.
- Pfanzelter, J., Mostowy, S., Way, M., 2018. Septins suppress the release of vaccinia virus from infected cells. *J. Cell Biol.* 217, 2911–2929. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708091>.
- Rao, L., De La Rosa, I., Xu, Y., Sha, Y., Bhattacharya, A., Holtzman, M.J., Gilbert, B.E., Eissa, N.T., 2021. *Pseudomonas aeruginosa* survives in epithelia by ExoS-mediated inhibition of autophagy and mTOR. *EMBO Rep.* 22, e50613 <https://doi.org/10.15252/embr.202050613>.
- Ruffin, M., Brochiero, E., 2019. Repair process impairment by *Pseudomonas aeruginosa* in epithelial tissues: major features and potential therapeutic avenues. *Front Cell Infect. Microbiol* 9, 182. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00182>.
- Saint-Criq, V., Villeret, B., Bastaert, F., Kheir, S., Hatton, A., Cazes, A., Xing, Z., Sermet-Gaudelus, I., Garcia-Verdugo, I., Edelman, A., Sallenave, J.M., 2018. *Pseudomonas aeruginosa* LasB protease impairs innate immunity in mice and humans by targeting a lung epithelial cystic fibrosis transmembrane regulator-IL-6-antimicrobial-repair pathway. *Thorax* 73, 49–61. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2017-210298>.
- Sana, T.G., Hachani, A., Bucior, I., Soscia, C., Garvis, S., Termine, E., Engel, J., Filloux, A., Bleves, S., 2012. The second type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 is regulated by quorum sensing and Fur and modulates internalization in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 287, 27095–27105. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.376368>.
- Shteinberg, M., Haq, I.J., Polineni, D., Davies, J.C., 2021. Cystic fibrosis. *Lancet* 397, 2195–2211. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32542-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32542-3).
- Stanley, A.C., Lacy, P., 2010. Pathways for cytokine secretion. *Physiology (Bethesda)* 25, 218–229. <https://doi.org/10.1152/physiol.00017.2010>.
- Tokhtaeva, E., Capri, J., Marcus, E.A., Whitelegge, J.P., Khuzakmetova, V., Bukharaeva, E., Deiss-Yehiely, N., Dada, L.A., Sachs, G., Fernandez-Salas, E., Vagin, O., 2015. Septin dynamics are essential for exocytosis. *J. Biol. Chem.* 290, 5280–5297. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.616201>.
- Valley, H.C., Bukis, K.M., Bell, A., Cheng, Y., Wong, E., Jordan, N.J., Allaire, N.E., Sivachenko, A., Liang, F., Bihler, H., Thomas, P.J., Mahiou, J., Mense, M., 2019. Isogenic cell models of cystic fibrosis-causing variants in natively expressing pulmonary epithelial cells. *J. Cyst. Fibros.* 18, 476–483. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2018.12.001>.
- Van Ngo, H., Robertin, S., Brokatzky, D., Bielecka, M.K., Lobato-Marquez, D., Torraca, V., Mostowy, S., 2022. Septins promote caspase activity and coordinate mitochondrial apoptosis. *Cytoskeleton (Hoboken)*. <https://doi.org/10.1002/cm.21696>.
- Whitsett, J.A., Alenghat, T., 2015. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat. Immunol.* 16, 27–35. <https://doi.org/10.1038/ni.3045>.
- Zhang, N., Liu, L., Fan, N., Zhang, Q., Wang, W., Zheng, M., Ma, L., Li, Y., Shi, L., 2016. The requirement of SEPT2 and SEPT7 for migration and invasion in human breast cancer via MEK/ERK activation. *Oncotarget* 7, 61587–61600. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11402>.

3- Figures supplémentaires

Supplementary Figure 1

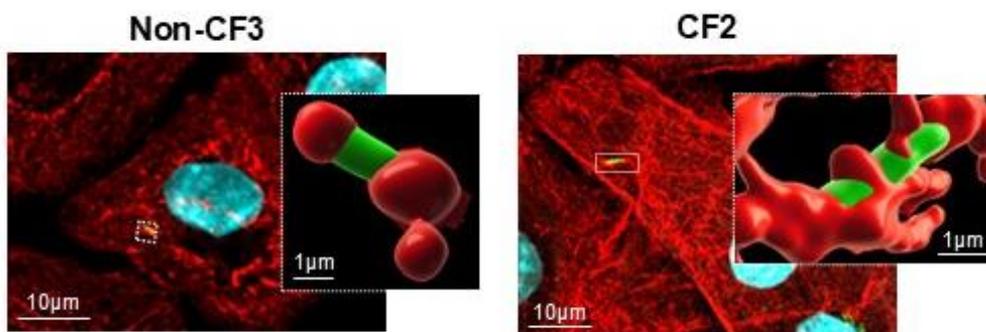


Supplementary Figure 2

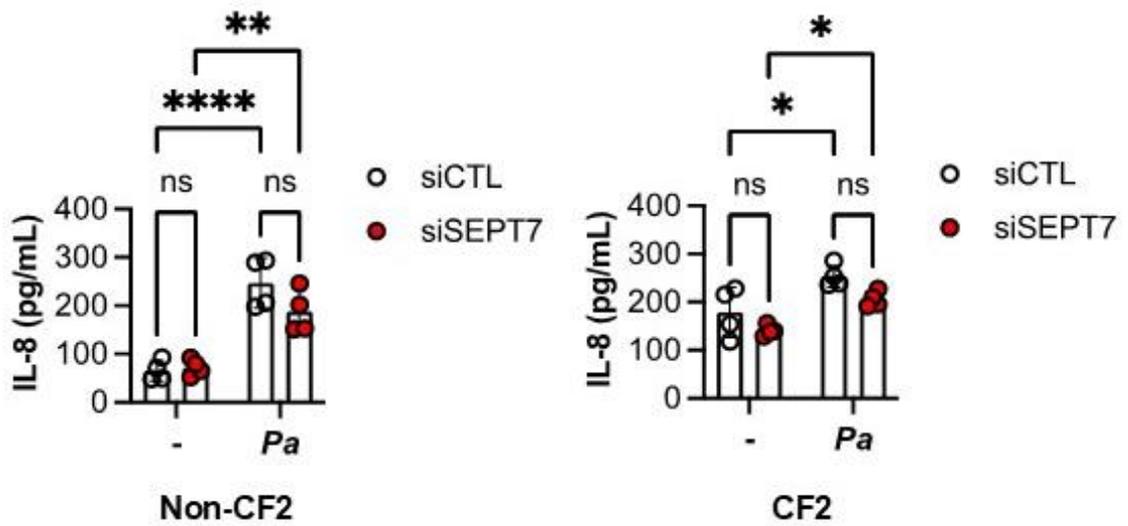


Supplementary Figure 3

A



B



Supplementary Figure 1. (A) *SEPT2*, *SEPT6*, *SEPT9*, *SEPT11* mRNA expression using qPCR in BEAS-2B after 72 h of transfection with 5 nM control siRNA (siCTL, white circles) or SEPT7 siRNA (blue circles) (n=4, ns: non-significant, Mann–Whitney test). (B) *IL-8* mRNA, (C) *IL-8* secreted protein and (D) *IL-6* mRNA expression in BEAS-2B cells transfected for 72 h with 5 nM of siCTL or SEPT7 siRNA in the non-infected (-, white circles) condition and after 3 h of *P. aeruginosa* infection (*Pa*, MOI=5, red circles) [(n= 10; ns: non-significant, ***p<0.001; ****p<0.0001 analysis of variance (ANOVA), Bonferroni correction)]. (E) *IL-6* and (F) *IL-8* protein secreted by BEAS-2B cells transfected for 72 h with 5 nM of siCTL or SEPT7 siRNA and stimulated for 3 h with 1µg/mL LPS [(n= 7; ns: non-significant, ****p<0.0001, analysis of variance (ANOVA), Bonferroni correction)].

Supplementary Figure 2. (A) Western blot of phospho-ERK1/2, ERK1/2 and reference protein GAPDH in BEAS-2B cells (n=4; ns: non-significant, Mann–Whitney test). (B) LC3B, SEPT7 and GAPDH protein expression in BEAS-2B cells incubated for 16 h with 10 µM chloroquine (Chlo). (C) Amount of intracellular *P. aeruginosa* (*Pa*) (CFU/mL) and (D) *IL-6* production by BEAS-2B cells transfected for 72 h with 5 nM of siCTL or SEPT7 siRNA, incubated for 16 h with 10 µM chloroquine (Chlo) (yellow circles) and then infected for 3 h (n=6) with *Pa* (MOI=5) [(ns: non-significant, *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001, analysis of variance (ANOVA) Bonferroni correction)]. (E) Western blot of LC3B, SEPT7 phospho-ERK1/2, ERK1/2 and reference protein GAPDH in 16HBE or 16HBE cystic fibrosis (16HBE-CF) cells (n=4; ns: non-significant, Mann–Whitney test).

Supplementary Figure 3. (A) Immunostaining of SEPT7 (red) in primary non-CF3 and CF2 bronchial epithelial cells infected for 3 h with *Pa* (MOI=20) (green). Nuclei are labelled with DAPI (cyan). (B) *IL-8* secreted by non-CF2 and CF2 cells transfected for 72 h with 10 nM CTL (white circle) or SEPT7 siRNA (red circles) in non-infected (-) and after 4 h of *Pa* infection (MOI=10) (n= 4; ns: non-significant, *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001, ANOVA, Bonferroni correction).

II- Résultats complémentaires

1- Etude de l'implication des SEPT2 et SEPT9 sur *P. aeruginosa* internalisées

a. Contexte et objectif

Nous avons précédemment montré l'importance du rôle joué par la SEPT7 sur la quantité de bactéries *P. aeruginosa* intracellulaires. Nous avons également observé que la comparaison des résultats obtenus sur des modèles cellulaires CF et non-CF était intéressante puisqu'elle montrait une différence de réaction face à l'infection. Fort de ces résultats et au regard de la littérature concernant les SEPT, nous avons ensuite voulu nous pencher sur l'étude d'autres SEPT. Les SEPT2 et SEPT9 se sont montrées d'intérêt autant par le fait qu'elles aient une expression ubiquitaire que par leurs importants niveaux d'expression dans nos modèles cellulaires.

Ainsi, afin d'étudier l'implication potentielle des SEPT2 et SEPT9 dans la régulation du nombre de *P. aeruginosa* intracellulaire, nous avons répété le protocole expérimental précédemment utilisé pour la SEPT7 (**Figure 1**). Nous avons utilisé des cellules épithéliales bronchiques de lignées BEAS-2B et primaires provenant de patients CF ou de sujets sains. Lors des transfections de *small interfering RNA* (siRNA), nous avons utilisé la même séquence de siRNA CTL que précédemment. Et nous avons utilisé deux nouvelles constructions de siRNA spécifiques de la SEPT2 (GCCUAUCCUAACUGAUCU, Ambion, Waltham, Massachusetts, États-Unis) et de la SEPT9 (5'GAGAAAGGCGUCCGGAUGA3'; 5'GGAGAUCACCAUCGUCAA3'; 5'CCAACGGCAUCGACGUGUA3'; 5'GGUAAAUCCACCUAAUCA3', Eurogentec, Belgium).

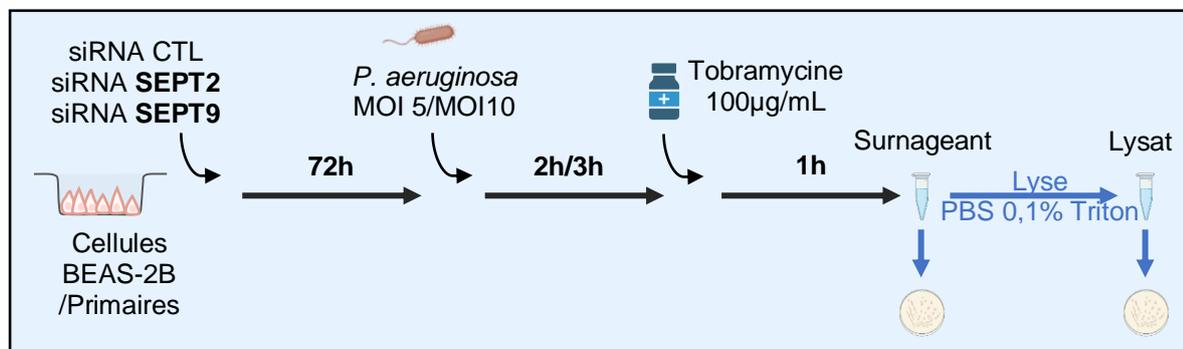


Figure 1 : Schéma du protocole utilisé pour le dénombrement des bactéries intracellulaires dans les cellules BEAS-2B et cellules primaires non-CF et CF.

b. Résultats

Nous avons débuté nos expérimentations en nous concentrant sur l'étude des niveaux d'expression des SEPT2 et SEPT9 au sein de nos cellules primaires bronchiques (hAEC) provenant de sujets sains (non-CF) ou de patients atteints de la mucoviscidose (CF). L'étude de leur expression en ARNm (**Figure 2.A**) ne montre pas de différence entre ces deux groupes. De plus, on retrouve ici bien le fait que ces deux SEPT soient, parmi les 13 SEPT, celles qui ont les plus forts niveaux d'expression. Du côté protéique (**Figure 2.B, 2.C**), on observe qu'il n'y a pas de différence significative d'expression non plus entre les cellules non-CF et CF.

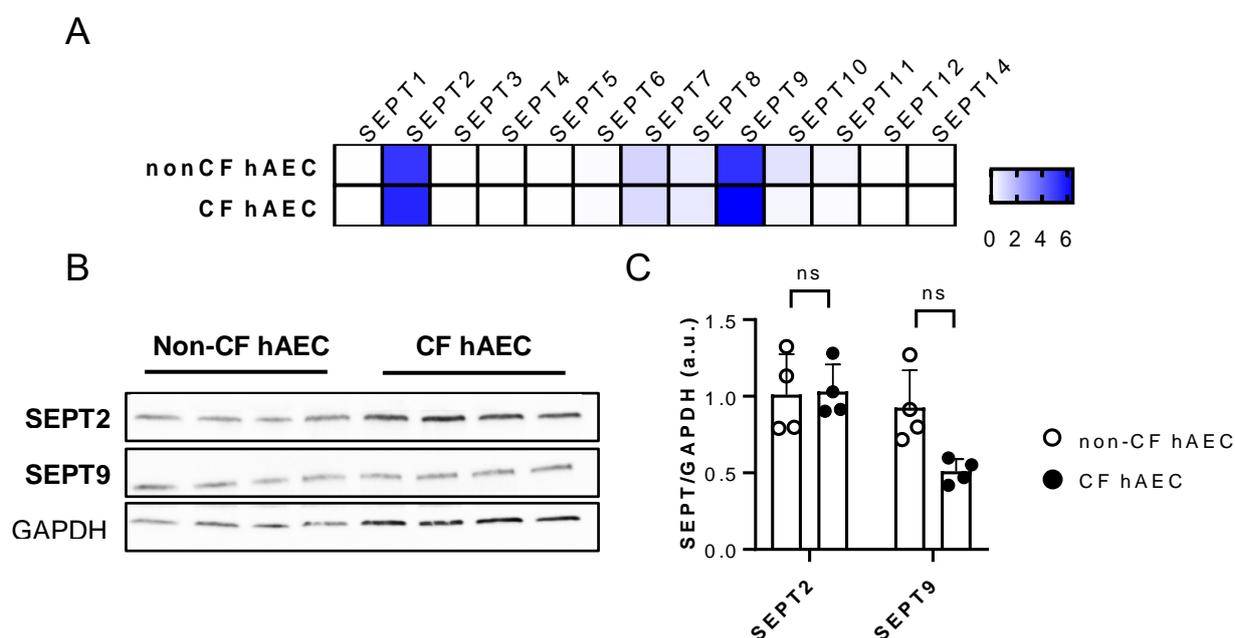


Figure 2 : Expression des SEPT dans les cellules bronchiques primaires non-CF et CF.

A) Heatmap réalisée à partir de *quantitative polymerase chain reaction* (qPCR), représentant l'expression en ARNm des 13 SEPT. nonCF hAEC : cellules primaires bronchiques non-CF; CF hAEC : cellules primaires bronchiques CF. **B)** Etude de l'expression protéique des SEPT2 et SEPT9 en Western Blot et **C)** quantification (n=3; ns : non significatif; analyse de variance (ANOVA), correction de Bonferroni).

Nous avons tout d'abord contrôlé l'efficacité de la transfection des deux nouveaux siRNA ainsi que leur spécificité en fonction de leur cible : SEPT2 ou SEPT9. L'étude de l'expression protéique (**Figure 3.A**) des SEPT à 72h post-transfection montre que chacun des siRNA est bien capable de diminuer significativement l'expression de sa cible.

Les expérimentations de dénombrement de bactéries *P. aeruginosa* intracellulaires montrent que dans la lignée de cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B (**Figure 3.B**), la déplétion par siRNA de la SEPT2 induit une augmentation significative du nombre de bactéries intracellulaires par rapport à la condition contrôle. Lorsque l'on utilise des cellules primaires (**Figure 3.C, 3.D**), on retrouve cet effet d'augmentation du nombre de bactéries intracellulaires dans les cellules non-CF suite à la déplétion des SEPT2 et SEPT9. Mais pour les cellules CF, on n'observe pas de différence quantitative selon que les SEPT soient déplétées ou non. De manière intéressante, on observe dans les conditions contrôles un nombre de bactéries intracellulaires plus important dans les cellules CF que dans les cellules non-CF. Cet effet est significativement retrouvé dans l'expérimentation de la SEPT2 (**Figure 3.C**) mais n'est qu'une tendance pour celle de la SEPT9 (**Figure 3.D**).

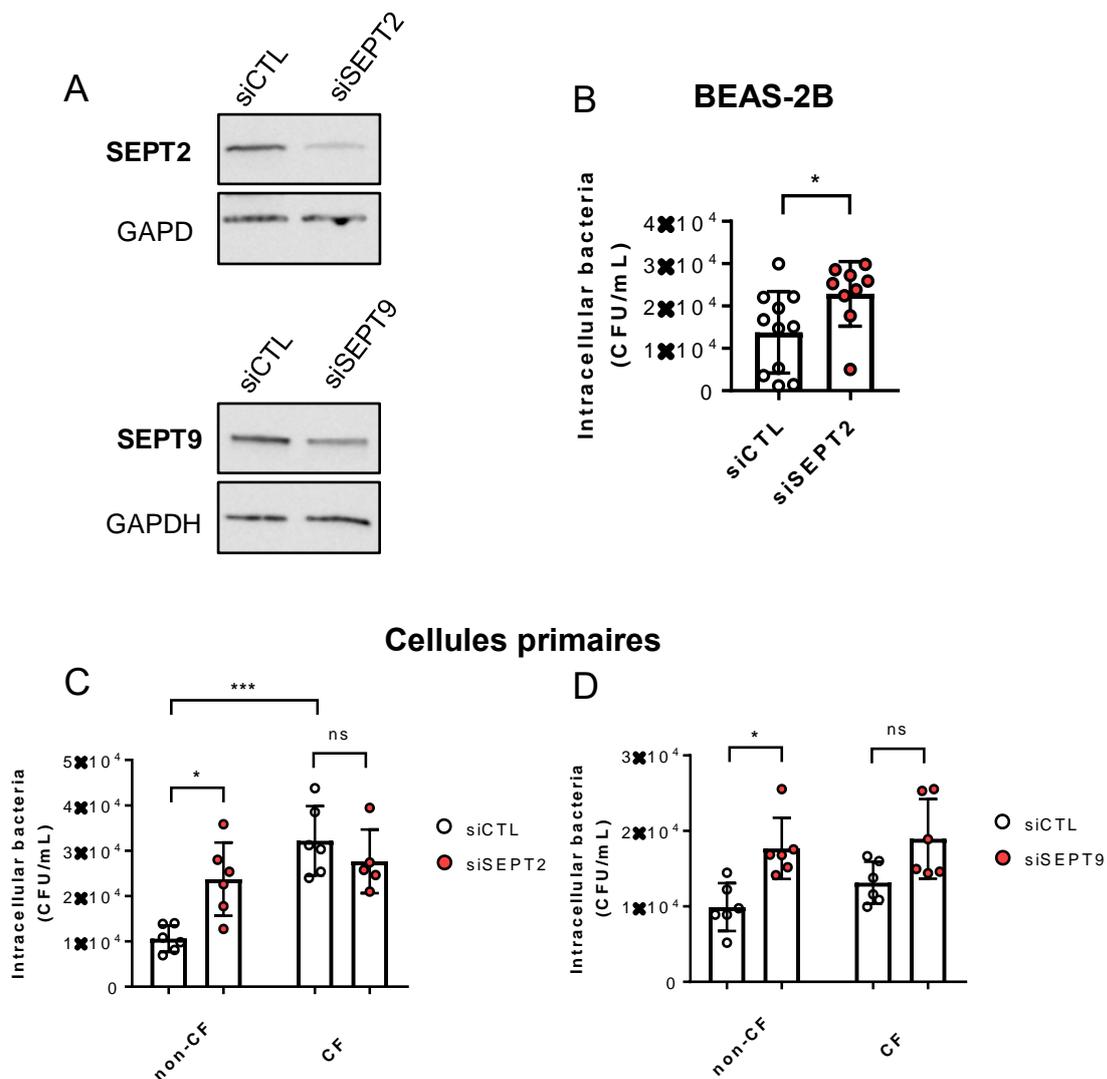


Figure 3 : Inhibition des SEPT2 et SEPT9 et concentration bactérienne intracellulaire.

A) Expression protéique des SEPT2 et SEPT9 en Western Blot, après 72h de transfection avec 5nM de siRNA SEPT2 ou SEPT9. **B)** Nombre de bactéries *P. aeruginosa* intracellulaires (CFU/mL) dans les cellules BEAS-2B après transfection de siRNA et 3h d'infection (n=9, *p<0,05, test Mann-Whitney). **C)D)** Nombre de bactéries *P. aeruginosa* intracellulaires (CFU/mL) dans les cellules primaires non-CF et CF après transfection de siRNA SEPT2 (**C**) ou SEPT9 (**D**) et 4h d'infection (n=6, *p<0,05, ***p<0,001 analyse de variance (ANOVA), correction de Bonferroni).

c. Conclusion

Nos résultats sont comparables à ceux obtenus au cours de l'étude de la SEPT7. A savoir une augmentation du nombre de bactéries intracellulaires subséquente à la déplétion par siRNA des SEPT2 et SEPT9 dans les modèles cellulaires non-CF. Cela suggère donc que les SEPT2 et SEPT9 pourraient également être impliquées dans des processus visant à limiter l'internalisation et/ou la survie intracellulaire de *P. aeruginosa*. Cet effet SEPT-dépendant étant perdu dans les cellules CF nous laisse penser que ces processus anti-infectieux seraient altérés dans un contexte mucoviscidosique. D'autre part, l'effet ou la tendance à retrouver une quantité plus importante de bactéries dans les cellules CF que non-CF avait été observé lors de l'étude de la SEPT7. Cela suggère que les cellules CF auraient une plus grande sensibilité aux infections. Pouvant provenir d'une moindre efficacité, par rapport aux cellules non-CF, de leurs processus de lutte antibactériens.

2- Etude de l'implication de la SEPT2 sur la réponse cytokinique

a. Contexte et objectif

L'étude du lien entre la SEPT2 et le nombre de bactéries intracellulaires s'étant révélé concluant, nous avons ensuite voulu étudier si, de manière comparable aux résultats obtenus pour la SEPT7, cette protéine avait un rôle à jouer dans la sécrétion des cytokines IL-6 et IL-8. Pour se faire, nous avons répété le même protocole et avons récolté les surnageants de culture ainsi que les cellules infectées ayant été préalablement transfectedes avec le siRNA spécifique de la SEPT2. Les surnageants de culture nous ont permis de doser les quantités de cytokines IL-6 et IL-8 par ELISA. Les tapis cellulaires quant à eux ont été utilisés pour une extraction d'ARNm permettant de quantifier par RT-qPCR les niveaux d'expression des gènes d'IL-6 et d'IL-8.

b. Résultats

Dans la lignée cellulaire BEAS-2B, l'étude de la quantité d'interleukines sécrétées dans le milieu extracellulaire (**Figure 4.A**) montre que la déplétion de la SEPT2 induit une diminution de la sécrétion d'IL-6 mais pas d'IL-8. Toutefois, on ne note pas de différence d'expression de l'IL-6 en ARNm dans ces mêmes condition (**Figure 4.B**).

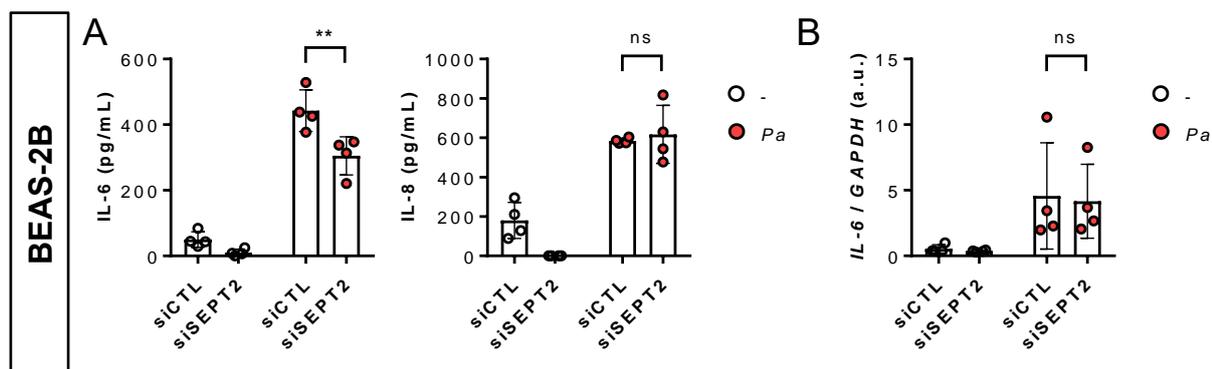


Figure 4 : Niveaux d'expression d'IL-6 et d'IL-8 après transfection et infection par *P. aeruginosa*. **A**) Quantification par ELISA de la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 (en pg/mL) par les cellules BEAS-2B après 72h transfection de siRNA SEPT2 et 3h d'infection par *P. aeruginosa* (n=4, **p<0,01, analyse de variance (ANOVA), correction de Bonferroni). **B**) Niveaux d'expression en ARNm de l'IL-6 associés.

c. Conclusion

Dans la lignée cellulaire BEAS-2B, on retrouve un effet du siRNA SEPT2 sur la sécrétion d'IL-6 comparable à ce qui avait été retrouvé précédemment en utilisant le siRNA SEPT7, suggérant des implications similaires de cette SEPT.

La suite des expérimentations sera réalisée en deux temps. Nous étudierons d'abord l'effet du siRNA SEPT9 sur la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 par les BEAS-2B. Puis nous quantifierons dans un second temps, ces sécrétions dans les cellules primaires non-CF et CF afin de comparer si les SEPT2 et SEPT9 ont un effet comparable ou différents en fonction de la variation de la protéine CFTR.

3- Rôle des SEPT sur la persistance intracellulaire de *P. aeruginosa*

a. Contexte et objectif

L'observation de l'implication des SEPT dans le contrôle du nombre de *P. aeruginosa* intracellulaires a été réalisée après un temps d'incubation déterminé expérimentalement. Nous avons alors voulu étudier cet effet SEPT-dépendant avec des temps d'incubation plus long. Pour se faire nous avons mis au point un protocole (**Figure 5**) inspiré par la littérature (213) et nos expérimentations précédentes. Celui-ci nous permet de quantifier la présence bactérienne intracellulaire 4h, 24h et 48h post-infection.

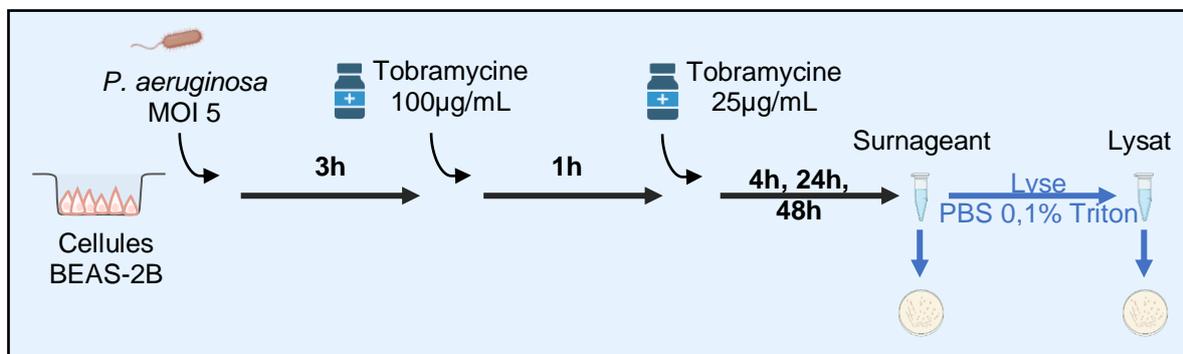


Figure 5 : Schéma du protocole utilisé pour l'étude de la persistance intracellulaire de *P. aeruginosa* dans les cellules BEAS-2B.

b. Résultats

Nos premières expérimentations menées sur des cellules de lignée BEAS-2B nous permettent de valider notre temps 4h post-infection (**Figure 6**). A ce temps, semblable au temps utilisé pour nos expérimentations de dénombrement précédentes, on observe un nombre de bactéries intracellulaire contenu dans un ordre de grandeur comparable. On note ensuite qu'aux temps ultérieurs 24h et 48h post-infection, le nombre de bactéries décroît successivement de manière significative (**Figure 6**).

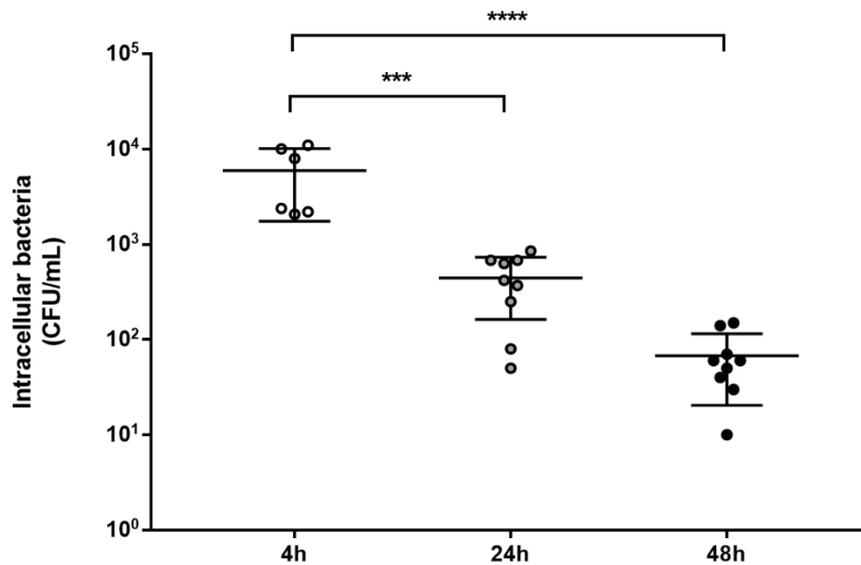


Figure 6 : Persistance intracellulaire de *P. aeruginosa* dans les cellules BEAS-2B. Dénombrement sur gélose des CFU rapportés par mL. Dénombrements réalisés 4h, 24h et 48h après le début du protocole d'infection (n=9, ****p<0,0001, analyse de variance (ANOVA), correction de Bonferroni).

c. Conclusion

Les résultats de ces expériences nous permettent de quantifier la persistance intracellulaire de la bactérie *P. aeruginosa* à des temps allant jusqu'à 48h post-infection. La diminution significative progressive du nombre de bactéries dans les cellules BEAS-2B suggère deux éléments. Tout d'abord que dans la lignée cellulaire BEAS-2B, *P. aeruginosa* est capable de persister durant des temps qui peuvent être considérés comme expérimentalement longs (48h). D'autre part, la quantité décroissante des bactéries en fonction du temps suggère qu'entre deux point temporels les bactéries intracellulaires pourraient soit être éliminées soit retourner dans le milieu extracellulaire.

La mise au point de ce protocole d'étude de la persistance intracellulaire de *P. aeruginosa* va nous permettre ensuite d'étudier la potentielle implication des SEPT dans ce processus. Pour se faire, nous comparerons les dénombrements bactériens entre des conditions transfectées siRNA CTL ou SEPT.

4- SEPT et réparation d'une plaie épithéliale

a. Contexte et objectif

Lors d'un processus infectieux, l'épithélium peut être lésé. En réaction, il peut être initié une phase de réparation. Dans le contexte de la mucoviscidose ce paramètre se révèle important puisque la chronicité des infections rend fréquentes les réparations de l'épithélium bronchique. Cette récurrence peut induire des aberrations et ainsi mener à une altération de l'épithélium bronchique.

Dans la suite de l'étude nous avons ainsi voulu étudier l'implication potentielle des SEPT2, 7 et 9 dans le processus réparation épithéliale. Nous avons alors cultivé des cellules BEAS-2B dans des inserts de culture IBIDI en silicone. Une fois à confluence, le retrait de l'insert en silicone créé un espace vide simulant une plaie épithéliale. Nous avons ensuite fait des acquisitions au microscope d'images des plaies toutes les 30 min pendant 15h. Lors de ces expérimentations, les cellules avaient été transfectées au préalable avec des siRNA SEPT2, 7 ou 9.

b. Résultats

La quantification et la normalisation de l'aire des plaies (**Figure 7**) nous montre que dans toutes les conditions, les plaies rétrécissent. Nous observons également que 900min (soit 15h) d'acquisition n'est pas un temps suffisant pour obtenir la fermeture complète des plaies. Toutefois, nous observons qu'à partir de 630min (soit 10.5h), la plaie siSEPT7 est significativement plus grande que celle siCTL. Nous n'avons pas observé de différence significative entre les conditions siSEPT2, siSEPT9 et siCTL.

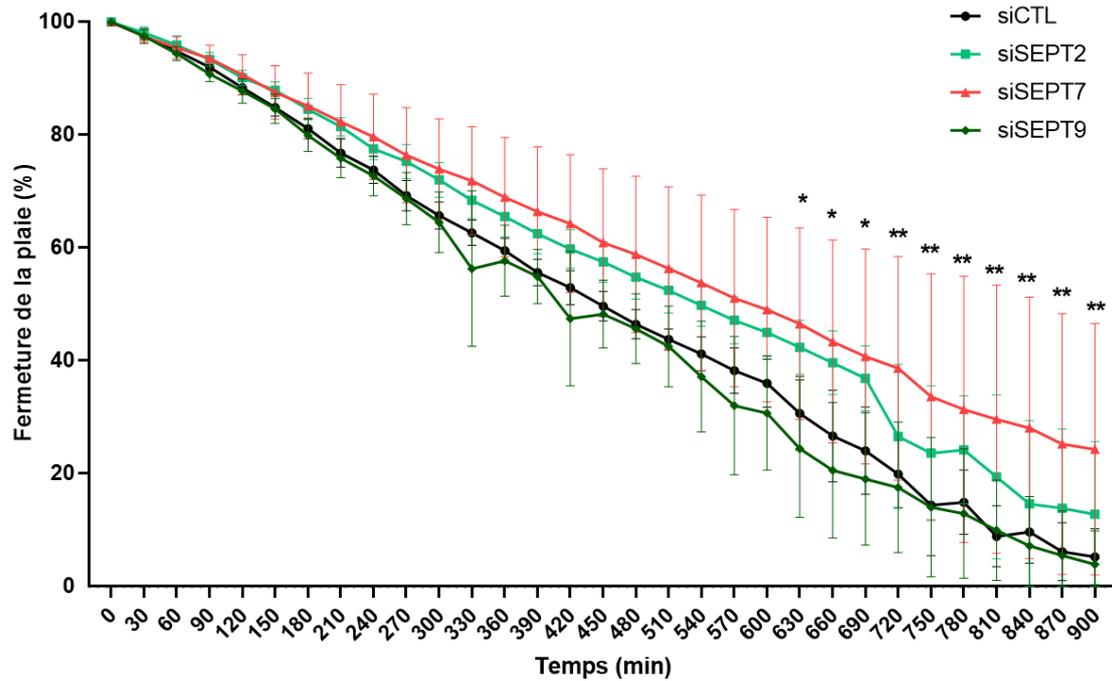


Figure 7 : Fermeture de plaie sur 15h d'un tapis cellulaire de BEAS-2B après transfection de siRNA SEPT. Les BEAS-2B ont été menées à confluence et transfectées dans des inserts de culture IBIDI en silicone. Le retrait de l'insert forme une plaie dans le tapis cellulaire. Des images ont été acquises toutes les 30min. L'analyse des images a été réalisée grâce au logiciel Fiji. Toutes les aires sont rapportées à l'aire de base (en %) (n=3, * et ** : significativité entre les conditions siCTL et siSEPT7, analyse de variance (ANOVA), correction de Bonferroni).

c. Conclusion

Cette étude de l'implication des SEPT2, 7 et 9 dans le processus de réparation épithéliale montre des résultats intéressants. Dans la lignée BEAS-2B, les SEPT2 et 9 ne semblent pas impliquées dans le processus de réparation puisque leur déplétion n'entraîne pas de délais ou d'accélération de la fermeture de la plaie. Toutefois, concernant la SEPT7 le fait que sa déplétion induise une plaie plus grande que la condition siCTL aux mêmes temps reflète d'un temps de fermeture de la plaie ralenti. Ainsi, on peut conjecturer que la SEPT7 aurait une implication positive dans réparation épithéliale.

5- Modèle cellulaire 3D et localisation des SEPT par immunofluorescence

a. Contexte et objectif

Enfin, lors de notre étude nous avons mené des expérimentations visant à caractériser la localisation et l'organisation intracellulaire des SEPT dans les cellules primaires bronchiques. Nous avons alors utilisé de la microscopie optique couplée à des marquages immunofluorescents des SEPT d'intérêts. Nous avons également voulu comparer les différences d'organisation des SEPT entre deux modèles de cultures très différents : la culture immergée dite en 2 dimensions (2D) et la culture à l'interface air-liquide sur insert semi perméants dite en 3 dimensions (3D). La culture 3D se révèle extrêmement intéressante pour l'étude d'épithélia tel que l'épithélium bronchique pour deux raisons : elle induit la différenciation cellulaire et permet ainsi d'obtenir un grand nombre de types cellulaires différents. Mais cette méthode de culture permet aussi d'avoir un modèle cellulaire de laboratoire proche de la physiologie de l'épithélium bronchique grâce à la présence d'une interface air-liquide.

b. Résultats

Concernant la SEPT7, elle forme des réseaux de filaments longs et nombreux dans les cellules 2D (**Figure 8.A**). Dans les cellules différenciées en 3D (**Figure 8.A**), on retrouve la SEPT7 majoritairement au niveau des membranes plasmiques où elle colocalise avec l'actine.

Nous observons pour la SEPT2 que sa présence est diffuse au sein des cellules 2D (**Figure 8.B**), sans structures apparentes. Mais de manière intéressante, dans les cellules 3D (**Figure 8.B**), on retrouve cette protéine majoritairement au niveau des cils des cellules ciliées sur la face apicale des cellules. Que ce soit en 2D ou en 3D, on ne note pas de colocalisation entre l'actine et la SEPT2.

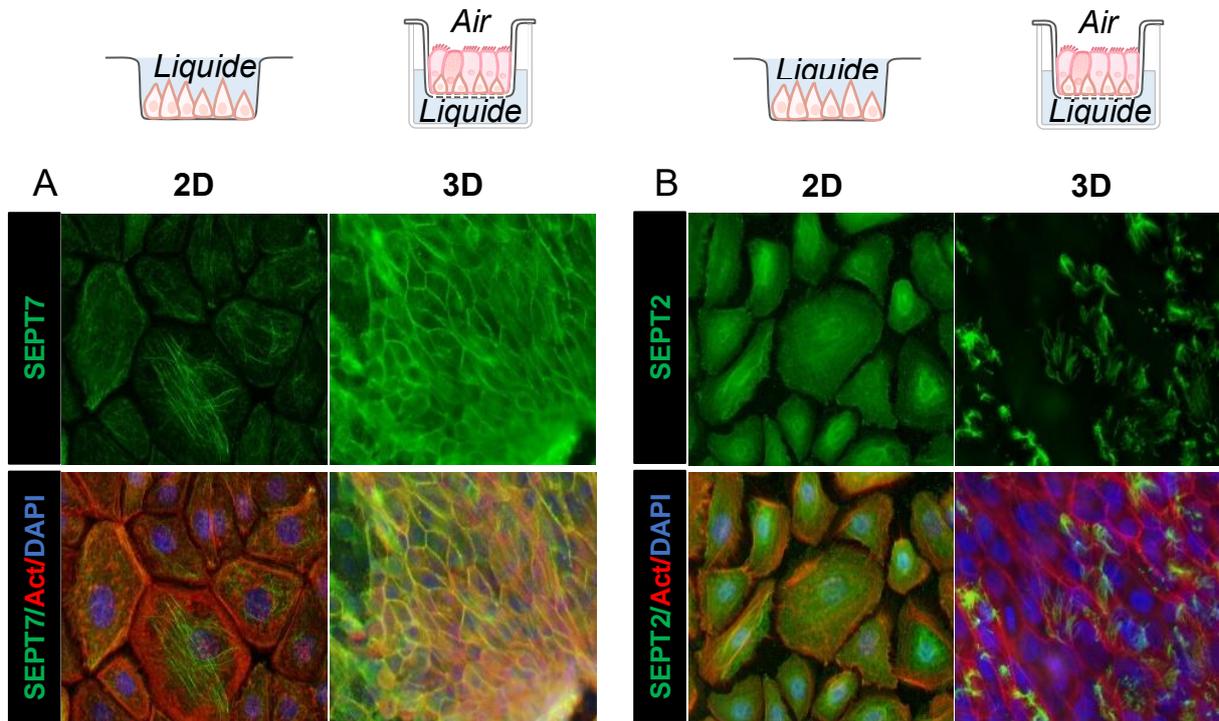


Figure 8 : Localisation intracellulaire des SEPT2 et SEPT7 dans des cellulaires primaires bronchiques non-CF.

Les immunomarquages des SEPT2 et 7 ont été réalisés sur des cellules immergées (2D) ou sur insert semi-perméant (3D). **A**) Immunomarquage de la SEPT7 (vert). **B**) Immunomarquages de la SEPT2 (vert). Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu), l'actine à la phalloïdine (rouge). Objectif 60X. Les images ont été traitées avec le logiciel Fiji.

c. Conclusion

Les immunomarquages des SEPT2 et SEPT7 dans des cellules primaires se sont révélés intéressants. En effet, cela nous a permis d'observer que chacune de ces protéines avait une organisation qui lui était propre. De plus, l'étude des marquages des cellules différenciées à l'interface air-liquide (3D) nous a également montré que chacune de ces deux SEPT avait une localisation cellulaire propre. La localisation membrane de la SEPT7 pourrait suggérer un éventuel rôle dans la régulation des jonctions intercellulaires. Et la présence de la SEPT2 dans les cils pourrait quant à elle suggérer une implication dans le maintien de la morphologie ou de l'activité des cils.

DISCUSSION

La mucoviscidose ou *Cystic Fibrosis* (CF) en anglais est la maladie génétique rare la plus fréquente dans les populations d'origine caucasiennes, notamment retrouvées en Europe et en Amérique du Nord. Bien qu'il existe aujourd'hui un débat quant au nombre réel de sujets atteints par la mucoviscidose dans le monde, dû à la potentielle défaillance des diagnostics dans certaines régions du monde comme en Asie (75). On estime aujourd'hui le nombre de patients entre 70 000 et 105 000 (83).

Causée par des variants du gène *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR), la mucoviscidose est caractérisée par une atteinte multi-organe. Toutefois l'affection pulmonaire représente la principale cause de morbidité et de mortalité des patients. En cause, une dérégulation des échanges ioniques et hydriques entre l'épithélium bronchique et la lumière des voies aériennes dont la principale conséquence est la déshydratation du mucus. Cela favorise la stagnation des microorganismes pathogènes et mène à une chronicité des infections. En réponse, le microenvironnement bronchique induit une réaction inflammatoire dite exacerbée. Les phases d'infections et d'inflammations lèsent l'épithélium bronchique (96). Or les cellules de l'épithélium bronchique forment une barrière isolant l'organisme de l'infiltration de pathogènes environnementaux. Le développement de molécules modulatrices de CFTR a aujourd'hui permis d'améliorer grandement l'espérance ainsi que la qualité de vie des patients (151). Toutefois la composante infectieuse reste aujourd'hui primordiale dans le traitement de la pathologie notamment due aux capacités de *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) à développer des résistances aux traitements antibiotiques (243,244). Ce pathogène est également capable d'adopter un mode de vie intracellulaire au sein de cellules non phagocytaires. Cela a été observé dans des cellules pulmonaires, alvéolaires de lignée A549 (191), bronchiques de lignée NCI-H1299 (336) et BEAS-2B (213). Or ce mode de vie peut empêcher l'action de certains traitements antibiotiques tels que la tobramycine qui ne pénètre pas dans les cellules. Il est aujourd'hui indispensable de se pencher sur l'étude des interactions entre l'hôte et le pathogène. On sait que le mode de vie intracellulaire de *P. aeruginosa* implique qu'elle utilise le cytosquelette cellulaire.

Dans ce contexte, il nous a paru intéressant de mener cette étude de l'interaction entre *P. aeruginosa* et les cellules épithéliales bronchiques et plus particulièrement le cytosquelette de septines (SEPT). Il est rapporté dans la littérature le rôle important de ces protéines dans les interactions hôte-pathogène, aussi bien lors de l'internalisation *P. aeruginosa* dans des cellules épithéliales bronchiques (336) qu'en intracellulaire avec le processus de formation de

cage de SEPT (ou encagement) autour de ce pathogène (340).

L'étude du rôle joué par ce cytosquelette en contexte d'infection bactérienne au niveau pulmonaire est un sujet d'étude récent. De plus, aucune de ces études n'a porté sur le contexte de la mucoviscidose.

Il nous a paru intéressant de débiter cette étude par la caractérisation du cytosquelette de SEPT dans les cellules épithéliales bronchiques et ce aussi bien en contexte physiologique que pathologique pour la mucoviscidose. Il est aujourd'hui communément admis que le cytosquelette de SEPT est composé de 13 protéines (250) : SEPT1 à SEPT12 et SEPT14. Nous avons alors étudié leur expression en ARNm par *quantitative polymerase chain reaction* (qPCR). Nous avons observé dans les cellules épithéliales bronchiques physiologiques dites non-CF (BEAS-2B, 16HBE et cellules primaires) des profils d'expression comparables entre tous les types cellulaires. A savoir que les SEPT2 et SEPT9 sont les plus exprimées, les SEPT7, 8, 10 et 11 ont des niveaux d'expression importants et les SEPT3, 12 et 14 présentent des niveaux d'expression négligeables. Ces résultats sont cohérents avec la littérature qui montre que les SEPT2, 7 et 9 ont des niveaux d'expression important dans l'organisme et sont ubiquitaires (252), donc exprimées par toutes les cellules de l'organisme. Les SEPT10 et SEPT11 sont exprimées dans plusieurs entités physiologiques mais absentes d'autres. Et enfin les SEPT que l'on trouve être les moins exprimées dans l'épithélium bronchique s'avèrent avoir des expressions tissus spécifiques. Les SEPT12 (264) et SEPT14 (317) sont en effet présentées comme essentiellement exprimées au niveau de l'organe reproducteur masculin.

Les niveaux d'expression des 13 SEPT dans les cellules épithéliales bronchiques sont comparables en tous points avec ceux observés dans le poumon (données issues de GTEXportal.org, une base de transcrits accessible au public). Suggérant ainsi une expression semblable des SEPT au sein des composants de cette entité physiologique.

Au vu de l'inexistence de littérature concernant le cytosquelette de SEPT et le contexte CF, nous avons ensuite comparé les niveaux d'expression des SEPT entre cellules non-CF et cellules CF. La comparaison des niveaux d'ARNm des SEPT ne nous a alors pas montré de différences significatives d'expression et ce aussi bien dans les cellules de lignée isogénique 16HBE/16HBE-CF que dans les cellules bronchiques primaires provenant de sujets sains (hAEC) ou de patients CF (CF-hAEC). Montrant ainsi que la pathologie CF et la présence de variants de la protéine CFTR n'induit pas de modifications quantitatives du cytosquelette de SEPT. Bien

que les SEPT soient capables d'établir des interactions protéines-protéines au moyen de leur domaine C-terminal (258) et qu'elles aient également été montrées capables de se fixer directement aux membranes cellulaires via les phospholipides PIP2 et PIP3 (280). Il n'a jamais été prouvé d'interaction directe entre les protéines de SEPT et la protéine CFTR. Ceci pouvant ainsi expliquer que le cytosquelette de SEPT ne soit pas quantitativement impacté dans ce contexte pathologique.

Nous nous sommes ensuite penchés sur l'expression protéique des SEPT. Pour se faire, nous avons choisi d'étudier l'expression de la SEPT7. En effet, cette protéine est connue pour être centrale dans le cytosquelette de SEPT, seule membre de son sous-groupe, indispensable à la formation de filaments de SEPT (252) et que la génération de souris KO pour la SEPT7 donne des embryons non viables (350). Son rôle à part dans le cytosquelette a fait que nous avons eu un intérêt tout particulier pour elle. Il s'avère que l'expression protéique de la SEPT7 n'a pas montré de différences entre cellules non-CF et CF (cellules de lignée et hAEC). Ces résultats sont en cohérence avec ceux obtenus pour l'expression en ARNm.

Suite à cela s'est posé la question d'un potentiel impact de la présence de la bactérie *P. aeruginosa* sur l'expression protéique de la SEPT7. Il s'est avéré que l'infection de cellules épithéliales bronchiques non-CF et CF par ce pathogène n'a pas induit de modification. Ce résultat s'avère intéressant puisqu'il montre que malgré la relation hôte-pathogène qui existe entre *P. aeruginosa* et les SEPT, au travers notamment de la formation de cages (340), la cellule n'induit pas de modifications quantitatives du cytosquelette de SEPT. On aurait pu supputer que si les SEPT avaient une action bénéfique ou délétère en contexte infectieux, la cellule épithéliale aurait pu modifier son expression à la hausse ou à la baisse suite à la détection d'un pathogène.

Enfin, nous avons immunomarqué la SEPT7 afin de comparer son organisation et sa localisation cellulaire entre les lignées isogéniques 16HBE et 16HBE-CF. Il n'est alors pas observé de différences notables. Suggérant ainsi qu'au-delà d'une expression quantitative semblable, l'expression qualitative est également comparable.

Concernant l'expression protéique des SEPT, au cours des expérimentations, nous avons été amenés à utiliser des *small interfering RNA* (siRNA) spécifiques des SEPT2, 7 et 9. En effet, l'étude rôle des SEPT a été réalisée au moyen de la comparaison entre conditions basales et déplétées en SEPT. Nous avons alors validé l'efficacité des trois siRNA en étudiant leurs

effets sur l'expression en ARNm et en protéine des SEPT. Il s'est avéré que chacun était bien spécifique de l'ARNm correspondant à la SEPT cible. Toutefois l'expression protéique des SEPT s'est révélée intéressante. On a ainsi observé que les siRNA spécifiques des SEPT2 et 9 diminuaient uniquement l'expression protéique des SEPT correspondantes. Mais le siRNA SEPT7 (siSEPT7) a quant à lui diminué l'expression de quatre autres SEPT : les SEPT2, 6, 9 et 11. Cette observation avait déjà été effectuée (267,344) mais elle est cette fois-ci retrouvée dans des cellules bronchiques et notamment primaires. Cette observation valide une fois de plus la théorie selon laquelle la SEPT7 est centrale dans le cytosquelette de SEPT (252). Si son expression est altérée alors c'est l'ensemble du cytosquelette de SEPT qui est altéré.

L'étude de caractérisation du cytosquelette de SEPT passe aussi par son étude qualitative au moyen de l'observation au microscope. Nous avons alors immunomarcqué les SEPT2 et SEPT7 dans des hAEC cultivées de manière immergée (en 2D). Nous avons alors observé des organisations très différentes entre ces deux protéines. La SEPT7 forme des réseaux de filaments parcourant la cellule ce qui est en accord avec le fait que les SEPT peuvent avoir une action grâce à la formation de structures filamenteuses (250). Toutefois nos observations concernant la SEPT2 montrent une présence diffuse de la protéine dans le cytoplasme sans structures notables. Cette observation est étonnante puisqu'actuellement la théorie reconnue dans la littérature est que les monomères de SEPT s'associent selon une structure répétée (262) impliquant, selon le modèle canonique, fréquemment les SEPT2 et SEPT7 (251,265). On aurait ainsi pu s'attendre à retrouver les SEPT2 et SEPT7 dans des structures filamenteuses semblables. On pourrait expliquer cette discordance avec la théorie par le fait que les cellules épithéliales bronchiques immergées sont indifférenciées, ce qui pourrait induire des modifications organisationnelles du cytosquelette. Nous avons ensuite observé l'organisation des SEPT2 et SEPT7 dans des cellules cultivées en 3D (permettant ainsi leur différenciation en cellules épithéliales polarisées) que nous nous sommes procurées auprès de l'entreprise Epithelix. Les marquages montrent alors que la SEPT7 est fortement retrouvée au niveau des membranes cellulaires, position où elle semble co-localiser avec le cytosquelette d'actine. Cela est cohérent avec plusieurs publications montrant une colocalisation entre ces deux cytosquelettes (299) durant plusieurs processus cellulaires différents : lors de la mitose (301) ou encore au niveau membranaire lors de l'internalisation bactérienne (336). Concernant la SEPT2, elle est retrouvée de manière importante au niveau

des cils des cellules ciliées. Les auteurs d'une étude basée sur des cellules épithéliales bronchiques ciliées primaires (293) nous montrent que la SEPT7 est entre autres présente au niveau des cils ainsi que la SEPT2 qui y est très fortement retrouvée. Il est ainsi suggéré que ces protéines pourraient être impliquées dans le développement et/ou le fonctionnement de ces cils. Afin de vérifier expérimentalement ces hypothèses, il serait intéressant d'inhiber l'expression des SEPT2 et SEPT7 dans ces cellules et d'observer d'éventuelles modifications morphologiques des cils ou d'efficacité du processus de clairance mucociliaire qui révélerait une altération fonctionnelle de ces structures.

Une fois la caractérisation du cytosquelette de SEPT établie en condition basale dans nos modèles cellulaires non-CF et CF, nous avons ensuite étudié le rôle des SEPT en contexte infectieux par *P. aeruginosa*. L'utilisation d'une souche bactérienne fluorescente en vert couplée à des immunomarquages nous a permis l'observation au microscope de la localisation cellulaire des SEPT lors d'une incubation des cellules bronchiques avec le pathogène. Il s'avère que l'on a observé des structures en forme de cages de SEPT7 au niveau de *P. aeruginosa*. De manière intéressante, ces observations ont été réalisées aussi bien avec les souches de *P. aeruginosa* de laboratoire PAK que PAO1. Ces structures ont été retrouvées dans l'ensemble de nos modèles cellulaires : cellules de lignée non-CF et CF ainsi que les hAEC et CF-hAEC. Ces structures avaient déjà été montrées dans la littérature dans la lignée cellulaire HeLa (340) et dans la lignée épithéliale bronchique NCI-H1299 (336). Elles sont donc capables de se former autour de *P. aeruginosa* dans le poumon, mais il s'agit ici de la première observation de cages de SEPT7 dans un modèle cellulaire CF. Ces structures s'avèrent comparables entre les types cellulaires, à savoir une présence majoritairement accrue de la SEPT7 aux pôles et au centre de la bactérie. La capture de pathogènes bactériens intracellulaires dans de telles structures est connue pour inhiber la division bactérienne et permettre le recrutement de la machinerie autophagique et lysosomale (340). Le processus d'encagement par la SEPT7 pourrait donc être bénéfique pour la cellule hôte en permettant l'élimination des bactéries intracellulaires. De plus, l'étude de différents pathogènes intracellulaires montre que la formation de la cage et le recrutement de l'autophagosome menant à l'élimination de la bactérie sont deux processus liés (338). Il est ainsi proposé pour la bactérie *S. flexneri* que la formation de cage s'accompagne du recrutement de la protéine Atg5 de l'autophagie. Alors que pour la bactérie *L. monocytogenes*, l'absence de cage de SEPT7 à son contact est associée à un non

recrutement de l'autophagie. Ainsi, le fait que l'on retrouve ces structures autour de *P. aeruginosa* dans des cellules non-CF et CF montre qu'au moins une partie du processus pouvant mener la bactérie à sa dégradation par le lysosome se produit. Il serait maintenant intéressant de réaliser des marquages des protéines liées à l'autophagie et au lysosome afin d'observer s'il existe d'éventuelles différences entre les contextes physiologiques et CF.

Concernant l'aspect quantification du nombre de cages, nous n'avons pas effectué d'expérimentations et ne pouvons donc pas établir s'il y a une potentielle altération quantitative de ce processus dans les cellules CF par rapport aux cellules non-CF, ce qui indiquerait une sensibilité différente aux infections par *P. aeruginosa*. Il est rapporté concernant *S. flexneri* que 10 à 20% des bactéries intracellulaires seraient piégées dans des cages de SEPT (339,340). Et que l'inhibition par siRNA de la SEPT7 réduirait ce nombre à 5% (339). On constate ainsi que le nombre de bactéries piégées est faible. Il serait intéressant de déterminer ce ratio pour *P. aeruginosa* afin de mieux rendre compte de l'importance de ce processus SEPT7-dépendant. De manière intéressante, un élément pourrait augmenter la survenue de ce processus dans un contexte CF. Il a été montré que le LPS (facteur de virulence de *P. aeruginosa*) induisait, après reconnaissance par les TLR de la cellule hôte, une production de médiateurs pro-inflammatoires dont le TNF- α (176). Des lavages broncoalvéolaires de patients CF montrent d'ailleurs des taux élevés de TNF- α (135). Or il a été montré que cette cytokine, appliquée en pré-traitement sur des cellules, induit une multiplication par deux du nombre de cages de SEPT7 (338). De futures expérimentations de quantifications microscopiques des interactions bactérie-SEPT pourraient être rendues plus automatisées et fiables. En effet, il a récemment été publié une étude portant sur l'observation du micro-environnement de *S. flexneri* intracellulaire au moyen de la microscopie à haute résolution couplée à une analyse d'images réalisée par intelligence artificielle (351).

Suite à la validation de l'interaction entre la SEPT7 et *P. aeruginosa* intracellulaire, nous avons ensuite voulu étudier quantitativement l'infection intracellulaire des cellules épithéliales bronchiques et la potentielle implication des SEPT. En plus de la SEPT7, nous nous sommes intéressés aux SEPT2 et SEPT9 puisqu'elles sont montrées comme étant les plus exprimées dans les cellules épithéliales (352) (Brax *et al.*, 2024). La quantification du nombre de bactéries intracellulaires a été réalisée au moyen d'un protocole utilisant de la tobramycine. Nous avons alors observé dans les cellules non-CF (hAEC et lignées) que la

déplétion par siRNA des SEPT2, 7 et 9 entraîne une augmentation significative du nombre de bactéries *P. aeruginosa* intracellulaires. Cet effet avait été observé dans les cellules de lignée NCI-H1299 pour les SEPT2 et SEPT7 (336) mais pas pour la SEPT9. De manière surprenante, lorsque les expérimentations ont été réalisées sur les cellules CF (CF-hAEC et lignée 16HBE-CF), nous n'avons pas observé cet effet d'augmentation de la charge bactérienne induite par la déplétion des SEPT2, 7 et 9. Autre élément d'importance tiré de ces expérimentations, nous avons également observé en comparant les conditions siCTL des cellules non-CF avec les cellules CF que le nombre de bactéries était significativement plus élevé dans les CF-hAEC que dans les hAEC (il en va de même pour les cellules 16HBE/16HBE-CF même s'il ne s'agit que d'une tendance). Pris ensemble ces résultats nous suggèrent qu'en contexte physiologique les SEPT2, 7 et 9 permettent de limiter l'infection intracellulaire par *P. aeruginosa*. Ce contrôle de l'infection pourrait être dû à une limitation de l'internalisation bactérienne via une action des SEPT à la membrane (328,336) et/ou à une élimination efficace des pathogènes via la formation de cages de SEPT7 accompagnée de l'activité de l'autophagolysosome (338). De manière intéressante, la quantité de bactéries dans les cellules CF est comparable à la quantité dans les cellules non-CF déplétées pour les SEPT2, 7 et 9. Nous poussant ainsi à proposer que les mécanismes de défense SEPT-dépendants contre l'infection intracellulaire à *P. aeruginosa* sont altérés dans les cellules CF (352) (Brax *et al.*, 2024). D'un point de vue physiologique, les patients CF sont plus fréquemment sujets aux infections bronchiques que les sujets sains du fait de leur clairance mucociliaire peu efficace. Dans ce contexte, l'altération de ce mécanisme dépendant des SEPT induirait une augmentation de la susceptibilité aux infections intracellulaires et *in fine*, une altération de l'épithélium bronchique augmentée.

Toutefois, afin de se questionner sur l'importance de l'infection bronchique intracellulaire de *P. aeruginosa* et de l'importance qu'elle prend dans la pathologie CF, il convient de noter que dans nos conditions expérimentales, l'internalisation ne concernait qu'environ 2% du total de l'inoculum bactérien en condition siCTL et près de 5% en condition siSEPT et cellules CF. Ces ordres de grandeurs correspondent à ce qui avait été rapporté dans les cellules de lignée HeLa (202). Nous faisons ici face à une limitation due au fait que nous utilisons certaines concentrations bactériennes lors de nos expérimentations mais il est toutefois très difficile de déterminer quelle est la réelle charge bactérienne au niveau des bronches des patients CF. Bien qu'il ait été démontré la présence intracellulaire de *P. aeruginosa* dans des tissus provenant de patients CF (206). Il reste ardu de déterminer le nombre de bactéries

intracellulaires dans les poumons et donc leur importance dans la pathogénicité.

Quoi qu'il en soit, l'étude du rôle des SEPT lors de l'infection par *P. aeruginosa* s'étant montrée concluante dans nos modèles cellulaires, il serait à l'avenir intéressant de répéter ces expérimentations sur des hAEC et CF-hAEC cultivées en 3D. En effet, ce mode de culture induisant la différenciation et la polarisation cellulaire permettrait de travailler sur un modèle se rapprochant beaucoup du contexte physiologique bronchique. En plus de l'étude de l'infection par *P. aeruginosa*, un tel modèle expérimental permettrait également d'observer le rôle du cytosquelette dans des processus infectieux par d'autres pathogènes pulmonaires. Parmi lesquels on pourrait citer *S. aureus* dans le contexte de la mucoviscidose (110) ou *Burkholderia cepacia* retrouvée chez des patients CF notamment après une transplantation pulmonaire (353).

Fort de ces résultats, nous avons ensuite voulu étudier plus en profondeur l'implication potentielle de la protéine CFTR et de ses variants dans cette altération de la réponse antibactérienne dépendante des SEPT. Pour se faire, nous avons répété les expérimentations de dénombrement bactériens dans les cellules isogéniques de lignée 16HBE et 16HBE-CF mais en les traitant au préalable avec la trithérapie Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor. Cette combinaison de trois molécules est aujourd'hui commercialisée sous le nom de Kaftrio et permet de traiter une grande partie des patients CF notamment ceux possédant la variation de classe II de CFTR : F508Del (151). L'efficacité du pré-traitement est validée par l'observation du rétablissement de la bande c de la protéine CFTR. Nous avons alors constaté que le rétablissement de la fonction de la protéine CFTR n'était pas suffisant pour rétablir le processus antibactérien SEPT-dépendant dans les cellules 16HBE-CF. Suggérant que l'altération de ce processus ne serait pas causée directement par l'altération de CFTR. Toutefois, il est connu que la protéine CFTR présente un interactome très important (354). Il a également été montré que la protéine CFTR possédant la variation F508Del possédait un interactome qui lui était propre (355) et qui l'impliquait dans diverses voies cellulaires. Nous pouvons ainsi supputer que l'altération de processus SEPT-dépendant, observée en contexte CF, pourrait être causée par une action indirecte de la protéine CFTR.

Enfin, nous avons discuté précédemment du fait que la capture des bactéries par une structure de SEPT était liée à la mobilisation de la machinerie d'autophagie cellulaire (340). Or dans ce contexte, il est rapporté deux éléments d'importance : le fait que la mutation du gène

CFTR induise, en contexte non infectieux, une défaillance de l'autophagie dans les cellules épithéliales bronchiques (356). Mais également le fait que l'ExoS de *P. aeruginosa* favorise la survie intracellulaire (211) notamment via l'inhibition de l'autophagie (357). Nous avons alors voulu tester expérimentalement l'implication de l'autophagie en l'inhibant via un pré-traitement à la chloroquine. Cette molécule est connue pour favoriser la survie intracellulaire de *P. aeruginosa* (358). Et c'est l'effet que nous retrouvons dans nos expérimentations sur les cellules de lignée BEAS-2B. En effet, en inhibant l'autophagie on observe une augmentation du nombre de bactéries intracellulaires comparable à l'augmentation subséquente à l'inhibition de la SEPT7. Nous suggérant que ces composantes cellulaires limitent bien l'infection par *P. aeruginosa*. De plus, le fait que l'inhibition simultanée de l'autophagie et de la SEPT7 n'induit pas d'augmentation de la charge bactérienne plus importante que lors des simples inhibitions pourrait montrer que ces deux éléments agissent conjointement dans le même processus antibactérien. Et donc que l'inhibition de l'un empêche l'activité de l'autre. Ceci est cohérent avec la littérature montrant l'implication obligatoire de ces parties pour le processus d'encagement par la SEPT7. Enfin, nous avons étudié l'expression du marqueur d'autophagie LC3 dans les lignées isogéniques 16HBE et 16HBE-CF. Nous n'avons alors pas observé de différence entre ces deux types cellulaires. Ainsi, entre ces deux lignées isogéniques, la variation de CFTR ne modifierait pas l'état de l'autophagie cellulaire. Nos résultats de quantifications bactériennes ne seraient donc pas liés à une altération de l'autophagie intrinsèque aux cellules 16HBE-CF. En prenant ensemble nos résultats, dans les cellules CF, il n'y a pas de modifications quantitatives de l'expression des SEPT ou de l'autophagie cellulaire par rapport aux cellules non-CF. L'explication de nos résultats pourrait alors se trouver au niveau fonctionnel. L'activité conjointe des SEPT et de la machinerie d'autophagie pourrait être altérée.

L'étude de l'implication des SEPT sur le paramètre infectieux en contexte CF s'étant montré intéressante, nous avons ensuite voulu étudier la réponse inflammatoire causée par cette infection. Dans la physiopathologie de la mucoviscidose, l'inflammation est un élément important puisqu'elle y est exacerbée et ainsi participe à l'altération de l'épithélium bronchique. Nous avons alors, à partir de nos expérimentations infectieuses, quantifié l'expression en ARNm ainsi que la sécrétion protéique de deux interleukines montrées comme importantes au niveau pulmonaire CF : l'IL-6 (135) et l'IL-8 (134). Nous avons alors observé

que l'inhibition de la SEPT7 dans les cellules non-CF (BEAS-2B et hAEC) induisait une diminution significative de la sécrétion d'IL-6 après infection mais sans modifier la sécrétion d'IL-8. Cet effet n'est toutefois pas accompagné de modifications d'expression en ARNm d'IL-6 et d'IL-8. De manière intéressante, il avait été montré dans la lignée de cellules alvéolaires A549 que la perturbation pharmacologique des SEPT induisait une inhibition de la sécrétion d'IL-6 (275). Les auteurs expliquent que cet effet pourrait être lié à l'implication du cytosquelette de SEPT dans les processus d'exocytose, notamment au travers de leurs interactions avec les protéines SNARE. L'observation d'un effet sur la sécrétion d'IL-6 mais pas d'IL-8 pourrait s'expliquer par des mécanismes d'exocytose distincts pour chacune (359). Toutefois lorsque les cellules sont stimulées uniquement avec du LPS de *P. aeruginosa*, nous n'avons pas retrouvé l'effet de la déplétion de la SEPT7 sur la sécrétion d'IL-6. L'explication que nous pourrions alors avancer concernerait la voie des MAP kinases ERK1/2. Il est connu que la production d'IL-6 lors d'une infection par *P. aeruginosa* est dépendante de l'activation de la voie ERK1/2 (360). En parallèle, il a également été montré que l'inhibition des SEPT2 et SEPT7 limitent la phosphorylation de cette voie ERK1/2 dans une lignée cellulaire de cancer du sein (322). Toutefois nous n'avons pas observé dans nos modèles cellulaires non-CF et CF de modulation de phosphorylation de la voie ERK1/2 après inhibition de la SEPT7. L'effet observé sur la sécrétion d'IL-6 pourrait donc être due à une activité de la bactérie au travers de ses facteurs de virulence et de la sécrétion de toxines. L'étude de la sécrétion d'IL-6 par les cellules primaires CF nous montre que l'effet SEPT-dépendant n'est pas retrouvé. Or nous avons observé que cette sécrétion était, en contexte non infectieux et infectieux, plus importante dans les cellules CF que non-CF, suggérant ainsi une activation constitutive de la sécrétion pro-inflammatoire. Ainsi, les variants de la protéine CFTR induiraient une altération des sécrétions de médiateurs inflammatoires (361).

Enfin, nous avons continué cette étude de la sécrétion d'IL-6 mais après inhibition de la SEPT2. Concernant la lignée cellulaire BEAS-2B, la déplétion de la SEPT2 entraîne une diminution de la sécrétion comparable à celle induite par la déplétion de la SEPT7. Nous suggérant ainsi que ces deux SEPT ont une activité comparable favorisant la sécrétion d'IL-6 mais n'ayant pas d'impact sur la sécrétion d'IL-8. De futures expérimentations nous permettront d'étudier l'effet du siRNA SEPT9 sur la sécrétion d'IL-6 dans la lignée cellulaire BEAS-2B. Puis nous étudierons de la même manière les sécrétions d'IL-6 et d'IL-8 suite à la transfection de siRNA

SEPT2 et SEPT9 dans des cellules primaires. Nous permettant ainsi la comparaison entre hAEC et CF-hAEC.

La mise en évidence du rôle des SEPT dans le contrôle de l'infection par les SEPT dont nous venons de discuter a été réalisée expérimentalement à un temps donné nous permettant d'obtenir un nombre quantifiable de bactéries intracellulaires ainsi qu'une réponse inflammatoire de la part des cellules épithéliales. Toutefois nous avons voulu étudier plus largement le rôle des SEPT dans l'internalisation de *P. aeruginosa* en élargissant la fenêtre temporelle d'étude. Ainsi nous nous sommes intéressés aux phases précoces de l'infection mais également à la persistance de la bactérie.

Dans un premier temps, nous avons quantifié l'internalisation de *P. aeruginosa* à des temps d'incubations plus courts (30min et 1h) que précédemment (3h). Nous avons alors observé qu'aux temps précoces, la quantité de bactéries était semblable, que la SEPT7 soit déplétée ou non. Cela suggérerait alors que la limitation de l'infection intracellulaire par la SEPT7 n'interviendrait pas au moment initial de l'infection, lors de l'internalisation mais plus tardivement lorsque la bactérie est déjà intracellulaire. Cette hypothèse est toutefois à considérer avec précaution puisqu'une publication récente (336) a supposé l'inverse. En effet, les auteurs montrent que l'internalisation de *P. aeruginosa* dans des cellules bronchiques de lignée NCI-H1299 est dépendante de l'interaction entre la lectine bactérienne LecA et le récepteur membranaire cellulaire Gb3. Celle-ci induirait une relocalisation membranaire des SEPT2 et SEPT7 notamment afin d'augmenter la rigidité membranaire locale et ainsi d'empêcher l'internalisation de la bactérie. Nonobstant ces hypothèses contradictoires, l'internalisation de *P. aeruginosa* est un processus multifactoriel et donc relativement complexe. On sait que rentrent en jeu les T3SS (205), T6SS (203) et leurs toxines injectées dans la cellule hôte afin d'induire un réarrangement des cytosquelettes d'actine et de microtubules.

Dans un second temps nous nous sommes tournés vers l'étude de la persistance intracellulaire de *P. aeruginosa* dans l'optique d'observer si et comment les SEPT pourraient moduler les infections à des temps longs. Deux publications attrayant aux poumons se sont révélées intéressantes. La première montre que *P. aeruginosa* internalisée dans des cellules alvéolaires de lignée A549 est capable de rester viable au moins 4h (191). La seconde, que ce pathogène peut rester internalisé jusqu'à 120h dans des cellules bronchiques de lignée BEAS-2B, un temps expérimentalement long (213). Nous avons alors adapté leurs protocoles à nos

conditions de culture et en utilisant des cellules BEAS-2B. Nous avons alors réussi à obtenir une quantification bactérienne intracellulaire aux temps 4h, 24h et 48h. Nous avons alors observé que le nombre de bactéries diminuait significativement à chaque temps et que les ordres de grandeur des dénombrements bactériens étaient comparables à ceux obtenus dans la publication précédente (213). De futures expérimentations basées sur ce protocole avec déplétion des SEPT via siRNA seront réalisées. Le but sera de déterminer si les SEPT peuvent jouer un rôle bénéfique ou délétère pour la cellule hôte dans le cadre d'infections longues. Un rôle bénéfique pourrait être l'élimination des pathogènes au moyen notamment de la formation de cages de SEPT (340). Toutefois, à des temps longs, les SEPT pourraient avoir une action délétère. Il a été montré que les SEPT2 et SEPT7 contrôlaient des voies métaboliques telles que celles de la glycolyse. Il a alors été proposé que ces SEPT pourraient favoriser indirectement la prolifération intracellulaire de pathogènes *S. flexneri* non encagés par la SEPT7 (344).

Enfin, dernier point d'intérêt de cette étude : les processus de réparation épithéliale et de migration cellulaire. Dans une pathologie comme la mucoviscidose, l'altération fréquente de l'épithélium bronchique par des cycles répétés d'infections/inflammations rendent fréquentes les phases de réparation de l'épithélium afin de maintenir la fonction de barrière de celui-ci. Une étude réalisée sur des embryons (349) nous apprend que ces structures sont capables de cicatriser une plaie après la contraction des bords de cette même plaie. Les auteurs montrent alors que la SEPT7 est indispensable à la réorganisation du cytosquelette de microtubules permettant lui-même la cicatrisation de la plaie. Dans ce contexte, nous avons mis au point un protocole de plaie sur un tapis de cellules BEAS-2B confluent. La transfection préalable des cellules avec les siRNA SEPT2, 7 ou 9 nous apprend que l'inhibition des SEPT2 et SEPT9 n'a pas d'impact sur la vitesse de fermeture de la plaie. Mais concernant la SEPT7, son inhibition entraîne un retard dans la fermeture. Suggérant qu'elle serait donc impliquée dans le processus de cicatrisation au niveau bronchique. La poursuite de cet axe de l'étude portera sur la comparaison de l'implication, notamment, de la SEPT7 dans les processus de réparation épithéliale entre des tapis cellulaires non-CF et CF. D'autre part, il sera également étudié dans ce cadre l'impact possible de *P. aeruginosa* sur ce processus. Il a en effet été montré que ce microorganisme altérait les processus de réparation épithéliale, pouvant ainsi mener à l'apparition chronique de plaies (362).

Cette étude du cytosquelette de SEPT a été menée en utilisant largement des siRNA spécifiques de diverses SEPT. Cet outil, reconnu et utilisé fréquemment dans la littérature nous a permis d'observer l'implication des SEPT dans divers processus infectieux et inflammatoires grâce à la comparaison entre conditions contrôles et SEPT-déplétées. Lors de ce travail, nous n'avions pas connaissance de molécules activatrices des SEPT. Or récemment une publication portant sur l'étude de la maladie d'Alzheimer (315) a montré une molécule, nommée ReS19-T, capable de favoriser l'assemblage des filaments de SEPT. Ce composé pourrait être utilisé à l'avenir afin de compléter notre étude. Observer l'effet d'une augmentation de la polymérisation des filaments de SEPT en contexte infectieux pourrait montrer une modification de la réponse de l'hôte à l'infection par *P. aeruginosa* pouvant s'avérer intéressante.

Enfin, ce travail a été réalisé en se focalisant essentiellement sur les cellules de l'épithélium bronchique. Toutefois en contexte infectieux dans le poumon, il est connu que plusieurs types de cellules immunitaires jouent un rôle important, notamment les monocytes et les macrophages (73). Il a récemment été publié plusieurs articles concernant l'étude du cytosquelette de SEPT dans les macrophages. Il en ressort que trois d'entre elles, les SEPT2, 7 et 11 semblent être particulièrement importantes dans divers processus fonctionnels des macrophages. Elles ont été montrées comme indispensables à la phagocytose bactérienne médiée par le récepteur Fcγ (298), la régulation de la mortalité des macrophages suite à une infection bactérienne (346) ou encore la modulation de la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires par les macrophages (347). Mieux comprendre le rôle des SEPT dans la réponse aux infections par *P. aeruginosa* passera par une étude de ce cytosquelette dans les cellules immunitaires phagocytaires telles que les macrophages.

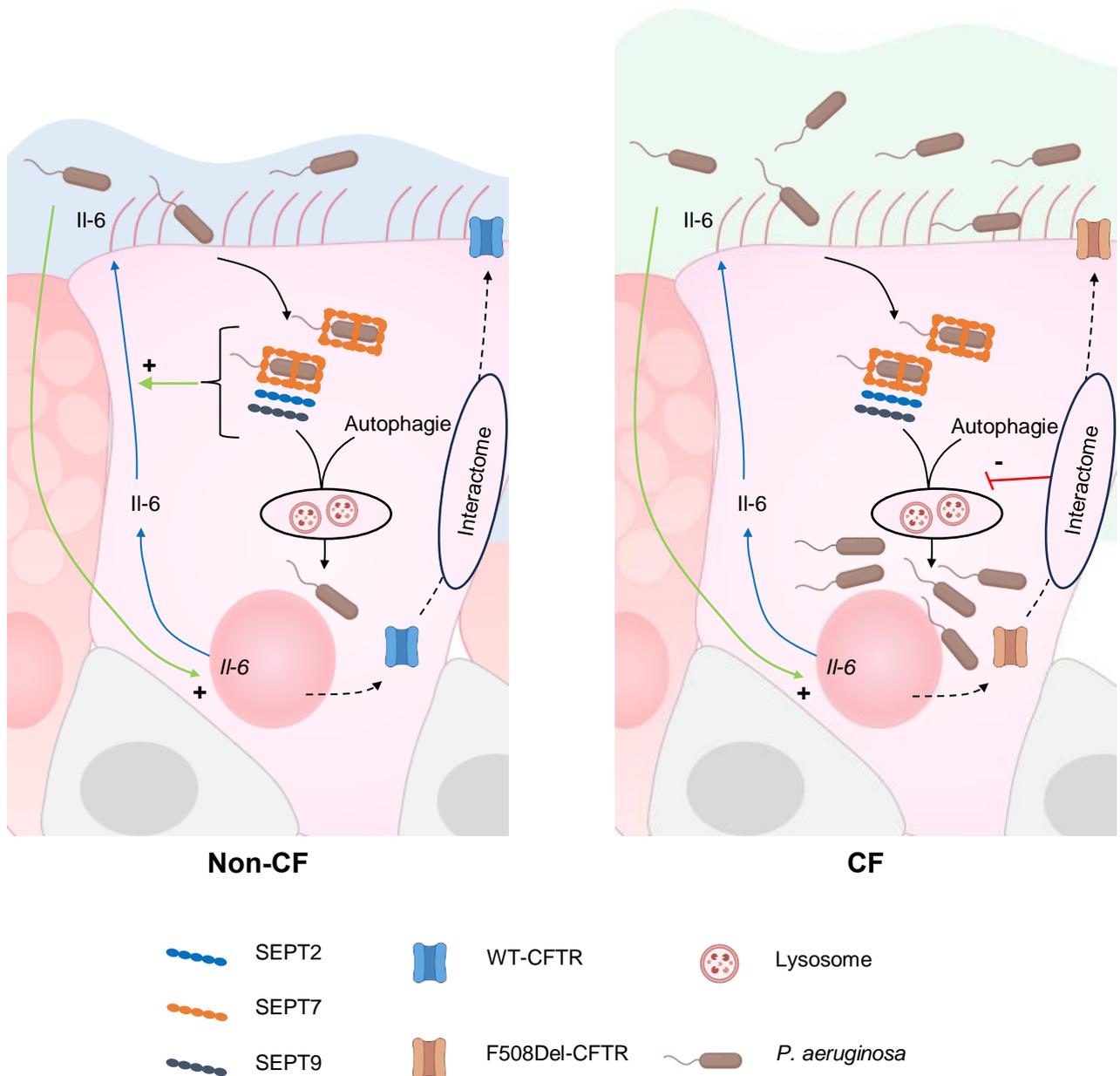


Figure bilan : Comparaison du rôle du cytosquelette de SEPT dans les infections bronchiques par *P. aeruginosa* entre contexte non-CF et CF. Récapitulatif des résultats obtenus et d'éléments issus de la littérature.

Aspect infectieux (flèches noires) : la SEPT7 encage *P. aeruginosa* dans les cellules **non-CF** et **CF**. Dans les cellules **non-CF**, les SEPT2, SEPT9 et cages de SEPT7 participeraient, avec les protéines de l'autophagie (338) à éliminer la bactérie via fusion avec le lysosome (340). Dans les cellules **CF**, l'élimination bactérienne dépendante des SEPT2, 7 et 9 est altérée, potentiellement à cause de l'interactome de F508Del-CFTR (355) et non pas une interaction directe avec la protéine CFTR.

Aspect sécrétoire (flèches bleues) : Dans les cellules **non-CF**, le contexte infectieux et la SEPT7 participent à la sécrétion d'IL-6 en réponse à l'infection par *P. aeruginosa*. Dans les cellules **CF**, cet effet cette participation n'est pas retrouvée.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Bates JHT. Systems physiology of the airways in health and obstructive pulmonary disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. sept 2016;8(5):423-37.
2. Agudelo CW, Samaha G, Garcia-Arcos I. Alveolar lipids in pulmonary disease. A review. *Lipids in Health and Disease*. 3 juin 2020;19(1):122.
3. Louis R, Satia I, Ojanguren I, Schleich F, Bonini M, Tonia T, et al. European Respiratory Society Guidelines for the Diagnosis of Asthma in Adults. *Eur Respir J*. 15 févr 2022;2101585.
4. Mims JW. Asthma: definitions and pathophysiology. *Int Forum Allergy Rhinol*. sept 2015;5 Suppl 1:S2-6.
5. Hayes D, Kraman SS. The physiologic basis of spirometry. *Respir Care*. déc 2009;54(12):1717-26.
6. Graham BL, Steenbruggen I, Miller MR, Barjaktarevic IZ, Cooper BG, Hall GL, et al. Standardization of Spirometry 2019 Update. An Official American Thoracic Society and European Respiratory Society Technical Statement. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 oct 2019;200(8):e70-88.
7. Hankinson JL, Odencrantz JR, Fedan KB. Spirometric Reference Values from a Sample of the General U.S. Population. *Am J Respir Crit Care Med*. janv 1999;159(1):179-87.
8. Spina D. Epithelium smooth muscle regulation and interactions. *Am J Respir Crit Care Med*. nov 1998;158(5 Pt 3):S141-145.
9. Raman T, O'Connor TP, Hackett NR, Wang W, Harvey BG, Attiyeh MA, et al. Quality control in microarray assessment of gene expression in human airway epithelium. *BMC Genomics*. 24 oct 2009;10(1):493.
10. Travaglini KJ, Nabhan AN, Penland L, Sinha R, Gillich A, Sit RV, et al. A molecular cell atlas of the human lung from single-cell RNA sequencing. *Nature*. nov 2020;587(7835):619-25.
11. Pulmonary Epithelium: Cell Types and Functions - The Pulmonary Epithelium in Health and Disease - Wiley Online Library [Internet]. [cité 17 avr 2024]. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470727010.ch1>
12. Khan YS, Lynch DT. Histology, Lung. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cité 17 avr 2024]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534789/>
13. Evans MJ, Plopper CG. The role of basal cells in adhesion of columnar epithelium to airway basement membrane. *Am Rev Respir Dis*. août 1988;138(2):481-3.
14. Rackley CR, Stripp BR. Building and maintaining the epithelium of the lung. *J Clin Invest*. 1 août 2012;122(8):2724-30.
15. Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FBJM. Number and Proliferation of Basal and Parabasal Cells in Normal Human Airway Epithelium. *Am J Respir Crit Care Med*. juin 1998;157(6):2000-6.
16. Rock JR, Gao X, Xue Y, Randell SH, Kong YY, Hogan BLM. Notch-dependent differentiation of adult airway basal stem cells. *Cell Stem Cell*. 3 juin 2011;8(6):639-48.

17. Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, Fuchs E, Stripp BR. In vivo differentiation potential of tracheal basal cells: evidence for multipotent and unipotent subpopulations. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. avr 2004;286(4):L643-9.
18. Meyrick B, Reid L. Ultrastructure of cells in the human bronchial submucosal glands. *J Anat.* sept 1970;107(Pt 2):281-99.
19. Airway Gland Structure and Function | *Physiological Reviews* [Internet]. [cité 17 avr 2024]. Disponible sur: <https://journals-physiology-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/full/10.1152/physrev.00039.2014>
20. Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FBJM. Number and Proliferation of Clara Cells in Normal Human Airway Epithelium. *Am J Respir Crit Care Med*. mai 1999;159(5):1585-91.
21. Smith P, Heath D, Moosavi H. The Clara cell. *Thorax*. 1 mars 1974;29(2):147-63.
22. Montoro DT, Haber AL, Biton M, Vinarsky V, Lin B, Birket SE, et al. A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes. *Nature*. août 2018;560(7718):319-24.
23. Plasschaert LW, Žilionis R, Choo-Wing R, Savova V, Knehr J, Roma G, et al. A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. *Nature*. août 2018;560(7718):377-81.
24. Scudieri P, Musante I, Venturini A, Guidone D, Genovese M, Cresta F, et al. Ionocytes and CFTR Chloride Channel Expression in Normal and Cystic Fibrosis Nasal and Bronchial Epithelial Cells. *Cells*. 13 sept 2020;9(9):2090.
25. Sato Y, Kim D, Turner MJ, Luo Y, Zaidi SSZ, Thomas DY, et al. Ionocyte-Specific Regulation of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *Am J Respir Cell Mol Biol*. sept 2023;69(3):281-94.
26. Shah VS, Rajagopal J. Cystic Fibrosis: « Ionocyte Modulators »? *Am J Respir Cell Mol Biol*. sept 2023;69(3):250-2.
27. Boers JE, den Brok JL, Koudstaal J, Arends JW, Thunnissen FB. Number and proliferation of neuroendocrine cells in normal human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med*. sept 1996;154(3 Pt 1):758-63.
28. Lommel AV. Pulmonary neuroendocrine cells (PNEC) and neuroepithelial bodies (NEB): chemoreceptors and regulators of lung development. *Paediatric Respiratory Reviews*. 1 juin 2001;2(2):171-6.
29. Branchfield K, Nantie L, Verheyden JM, Sui P, Wienhold MD, Sun X. Pulmonary neuroendocrine cells function as airway sensors to control lung immune response. *Science*. 12 févr 2016;351(6274):707-10.
30. Mason RJ. Biology of alveolar type II cells. *Respirology*. 2006;11(s1):S12-5.
31. Guillot L, Nathan N, Tabary O, Thouvenin G, Le Rouzic P, Corvol H, et al. Alveolar epithelial cells: Master regulators of lung homeostasis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1 nov 2013;45(11):2568-73.

32. Fujino N, Kubo H, Suzuki T, Ota C, Hegab AE, He M, et al. Isolation of alveolar epithelial type II progenitor cells from adult human lungs. *Lab Invest.* mars 2011;91(3):363-78.
33. IJMS | Free Full-Text | The History and Mystery of Alveolar Epithelial Type II Cells: Focus on Their Physiologic and Pathologic Role in Lung [Internet]. [cité 17 avr 2024]. Disponible sur: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/5/2566>
34. Kajstura Jan, Rota Marcello, Hall Sean R., Hosoda Toru, D'Amario Domenico, Sanada Fumihiko, et al. Evidence for Human Lung Stem Cells. *New England Journal of Medicine.* 2011;364(19):1795-806.
35. Evans MJ, Shami SG, Cabral-Anderson LJ, Dekker NP. Role of nonciliated cells in renewal of the bronchial epithelium of rats exposed to NO₂. *Am J Pathol.* avr 1986;123(1):126-33.
36. Bowden DH. Cell turnover in the lung. *Am Rev Respir Dis.* août 1983;128(2 Pt 2):S46-48.
37. Rawlins EL, Hogan BLM. Ciliated epithelial cell lifespan in the mouse trachea and lung. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* juill 2008;295(1):L231-4.
38. Parekh KR, Nawroth J, Pai A, Busch SM, Senger CN, Ryan AL. Stem cells and lung regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1 oct 2020;319(4):C675-93.
39. Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, Fuchs E, Stripp BR. Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium. *Am J Pathol.* févr 2004;164(2):577-88.
40. Reynolds SD, Malkinson AM. Clara Cell: Progenitor for the Bronchiolar Epithelium. *Int J Biochem Cell Biol.* janv 2010;42(1):1-4.
41. Barth PJ, Koch S, Müller B, Unterstab F, von Wichert P, Moll R. Proliferation and number of Clara cell 10-kDa protein (CC10)-reactive epithelial cells and basal cells in normal, hyperplastic and metaplastic bronchial mucosa. *Virchows Arch.* 1 déc 2000;437(6):648-55.
42. Pohl C, Hermanns MI, Uboldi C, Bock M, Fuchs S, Dei-Anang J, et al. Barrier functions and paracellular integrity in human cell culture models of the proximal respiratory unit. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 1 juin 2009;72(2):339-49.
43. Hartsock A, Nelson WJ. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta.* mars 2008;1778(3):660-9.
44. Falk MM. Adherens junctions remain dynamic. *BMC Biol.* 8 avr 2010;8:34.
45. Green KJ, Roth-Carter Q, Niessen CM, Nichols SA. Tracing the Origins of the Desmosome: a Vertebrate Innovation. *Curr Biol.* 18 mai 2020;30(10):R535-43.
46. Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol.* juin 2004;286(6):C1213-1228.
47. Jamora C, Fuchs E. Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nat Cell Biol.* avr 2002;4(4):E101-108.
48. Hatzfeld M, Keil R, Magin TM. Desmosomes and Intermediate Filaments: Their Consequences for Tissue Mechanics. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1 juin 2017;9(6):a029157.

49. Shin K, Fogg VC, Margolis B. Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006;22:207-35.
50. Sidhaye VK, Schweitzer KS, Caterina MJ, Shimoda L, King LS. Shear stress regulates aquaporin-5 and airway epithelial barrier function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 4 mars 2008;105(9):3345-50.
51. Shen L, Weber CR, Raleigh DR, Yu D, Turner JR. Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. *Annu Rev Physiol.* 2011;73:283-309.
52. Ibrahim HR, Aoki T, Pellegrini A. Strategies for new antimicrobial proteins and peptides: lysozyme and aprotinin as model molecules. *Curr Pharm Des.* 2002;8(9):671-93.
53. Ganz T. Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. *J Clin Invest.* 15 mars 2002;109(6):693-7.
54. van der Strate BW, Beljaars L, Molema G, Harmsen MC, Meijer DK. Antiviral activities of lactoferrin. *Antiviral Res.* déc 2001;52(3):225-39.
55. McElvaney NG, Nakamura H, Birrer P, Hébert CA, Wong WL, Alphonso M, et al. Modulation of airway inflammation in cystic fibrosis. In vivo suppression of interleukin-8 levels on the respiratory epithelial surface by aerosolization of recombinant secretory leukoprotease inhibitor. *J Clin Invest.* oct 1992;90(4):1296-301.
56. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* sept 2003;3(9):710-20.
57. Becker MN, Diamond G, Verghese MW, Randell SH. CD14-dependent Lipopolysaccharide-induced β -Defensin-2 Expression in Human Tracheobronchial Epithelium *. *Journal of Biological Chemistry.* 22 sept 2000;275(38):29731-6.
58. Mannick JB. The antiviral role of nitric oxide. *Res Immunol.* 1995;146(9):693-7.
59. Kilburn KH. A hypothesis for pulmonary clearance and its implications. *Am Rev Respir Dis.* sept 1968;98(3):449-63.
60. Thornton DJ, Rousseau K, McGuckin MA. Structure and Function of the Polymeric Mucins in Airways Mucus. *Annual Review of Physiology.* 1 févr 2008;70(Volume 70, 2008):459-86.
61. Rose MC, Voynow JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev.* janv 2006;86(1):245-78.
62. Hovenberg HW, Davies JR, Carlstedt I. Different mucins are produced by the surface epithelium and the submucosa in human trachea: identification of MUC5AC as a major mucin from the goblet cells. *Biochem J.* 15 août 1996;318 (Pt 1)(Pt 1):319-24.
63. Wickström C, Davies JR, Eriksen GV, Veerman EC, Carlstedt I. MUC5B is a major gel-forming, oligomeric mucin from human salivary gland, respiratory tract and endocervix: identification of glycoforms and C-terminal cleavage. *Biochem J.* 15 sept 1998;334 (Pt 3)(Pt 3):685-93.
64. Tarran R. Regulation of airway surface liquid volume and mucus transport by active ion transport. *Proc Am Thorac Soc.* 2004;1(1):42-6.

65. Matsui H, Randell SH, Peretti SW, Davis CW, Boucher RC. Coordinated clearance of periciliary liquid and mucus from airway surfaces. *J Clin Invest.* 15 sept 1998;102(6):1125-31.
66. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* 18 oct 2007;449(7164):819-26.
67. Roach JC, Glusman G, Rowen L, Kaur A, Purcell MK, Smith KD, et al. The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 5 juill 2005;102(27):9577-82.
68. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* 11 déc 1998;282(5396):2085-8.
69. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature.* 26 avr 2001;410(6832):1099-103.
70. Sokol CL, Luster AD. The chemokine system in innate immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 29 janv 2015;7(5):a016303.
71. de Boer WI, Sont JK, van Schadewijk A, Stolk J, van Krieken JH, Hiemstra PS. Monocyte chemoattractant protein 1, interleukin 8, and chronic airways inflammation in COPD. *J Pathol.* avr 2000;190(5):619-26.
72. Sibille Y, Marchandise FX. Pulmonary immune cells in health and disease: polymorphonuclear neutrophils. *Eur Respir J.* nov 1993;6(10):1529-43.
73. Deprez M, Zaragosi LE, Truchi M, Becavin C, Ruiz García S, Arguel MJ, et al. A Single-Cell Atlas of the Human Healthy Airways. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 déc 2020;202(12):1636-45.
74. Lambrecht BN, Prins JB, Hoogsteden HC. Lung dendritic cells and host immunity to infection. *Eur Respir J.* oct 2001;18(4):692-704.
75. Mehta G, Macek M, Mehta A. Cystic fibrosis across Europe: EuroCareCF analysis of demographic data from 35 countries. *Journal of Cystic Fibrosis.* 1 déc 2010;9:S5-21.
76. Navarro S. Historical compilation of cystic fibrosis. *Gastroenterología y Hepatología (English Edition).* 1 janv 2016;39(1):36-42.
77. Gerritsen J. Book Review Cystic Fibrosis Third edition. Edited by Margaret Hodson, Duncan Geddes, and Andrew Bush. 503 pp., illustrated. London, Hodder Arnold, 2007. \$198.50. 978-0-340-90758-0. *New England Journal of Medicine - N ENGL J MED.* 24 avr 2008;358:1873-4.
78. Andersen DH, Hodges RG. Celiac syndrome; genetics of cystic fibrosis of the pancreas, with a consideration of etiology. *Am J Dis Child (1911).* juill 1946;72:62-80.
79. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science.* 8 sept 1989;245(4922):1073-80.
80. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science.* 8 sept 1989;245(4922):1059-65.

81. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 8 sept 1989;245(4922):1066-73.
82. Grasemann H, Ratjen F. Cystic Fibrosis. *N Engl J Med*. 2 nov 2023;389(18):1693-707.
83. Chen Q, Shen Y, Zheng J. A review of cystic fibrosis: Basic and clinical aspects. *Animal Model Exp Med*. sept 2021;4(3):220-32.
84. Sharma N, Singh M, Kaur G, Thapa BR, Prasad R. Identification and Characterization of CFTR Gene Mutations in Indian CF Patients. *Annals of Human Genetics*. 2009;73(1):26-33.
85. Munck A, Cheillan D, Girodon E, Nguyen Khoa T, Wizla N, Audrezet MP, et al. Dépistage néonatal de la mucoviscidose en France : aspects pratiques et perspectives. *Perfectionnement en Pédiatrie*. 1 juin 2019;2(2):163-71.
86. Harris A. Cystic fibrosis gene. *Br Med Bull*. oct 1992;48(4):738-53.
87. Hanssens LS, Duchateau J, Casimir GJ. CFTR Protein: Not Just a Chloride Channel? *Cells*. 22 oct 2021;10(11):2844.
88. Functional interaction of CFTR and ENaC in sweat glands - PubMed [Internet]. [cité 17 avr 2024]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12548396/>
89. Quinton PM. The neglected ion: HCO₃⁻. *Nat Med*. mars 2001;7(3):292-3.
90. Elborn JS. Cystic fibrosis. *Lancet*. 19 nov 2016;388(10059):2519-31.
91. Dewulf J, Vermeulen F, Wanyama S, Thomas M, Proesmans M, Dupont L, et al. Treatment burden in patients with at least one class IV or V CFTR mutation. *Pediatr Pulmonol*. déc 2015;50(12):1230-6.
92. McKone EF, Emerson SS, Edwards KL, Aitken ML. Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet*. 17 mai 2003;361(9370):1671-6.
93. Saint-Criq V, Gray MA. Role of CFTR in epithelial physiology. *Cell Mol Life Sci*. janv 2017;74(1):93-115.
94. Fischbarg J. Fluid transport across leaky epithelia: central role of the tight junction and supporting role of aquaporins. *Physiol Rev*. oct 2010;90(4):1271-90.
95. Knowles MR, Boucher RC. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest*. mars 2002;109(5):571-7.
96. Zhou-Suckow Z, Duerr J, Hagner M, Agrawal R, Mall MA. Airway mucus, inflammation and remodeling: emerging links in the pathogenesis of chronic lung diseases. *Cell Tissue Res*. mars 2017;367(3):537-50.
97. Stick SM, Brennan S, Murray C, Douglas T, von Ungern-Sternberg BS, Garratt LW, et al. Bronchiectasis in infants and preschool children diagnosed with cystic fibrosis after newborn screening. *J Pediatr*. nov 2009;155(5):623-628.e1.

98. Cantin AM, Hartl D, Konstan MW, Chmiel JF. Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. *Journal of Cystic Fibrosis*. 1 juill 2015;14(4):419-30.
99. Mall MA, Schultz C. A new player in the game: epithelial cathepsin S in early cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 juill 2014;190(2):126-7.
100. Gehrig S, Duerr J, Weitnauer M, Wagner CJ, Graeber SY, Schatterny J, et al. Lack of neutrophil elastase reduces inflammation, mucus hypersecretion, and emphysema, but not mucus obstruction, in mice with cystic fibrosis-like lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 mai 2014;189(9):1082-92.
101. Ledder O, Haller W, Couper RT, Lewindon P, Oliver M. Cystic fibrosis: An update for clinicians. Part 2: Hepatobiliary and pancreatic manifestations. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2014;29(12):1954-62.
102. Ooi CY, Dorfman R, Cipolli M, Gonska T, Castellani C, Keenan K, et al. Type of CFTR mutation determines risk of pancreatitis in patients with cystic fibrosis. *Gastroenterology*. janv 2011;140(1):153-61.
103. Holl RW, Wolf A, Thon A, Bernhard M, Buck C, Missel M, et al. Insulin resistance with altered secretory kinetics and reduced proinsulin in cystic fibrosis patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. août 1997;25(2):188-93.
104. Lanng S, Thorsteinsson B, Lund-Andersen C, Nerup J, Schiøtz P, Koch C. Diabetes mellitus in Danish cystic fibrosis patients: prevalence and late diabetic complications. *Acta Paediatrica*. 1994;83(1):72-7.
105. Ratjen F, Döring G. Cystic fibrosis. *The Lancet*. 22 févr 2003;361(9358):681-9.
106. Kernen Y, Roulet M, Sauty A. Détection et prise en charge précoce de la primo-infection à «*Pseudomonas aeruginosa*» chez les patients avec mucoviscidose. *Rev Med Suisse*. 2 mars 2005;009:637-40.
107. Nichols D, Chmiel J, Berger M. Chronic inflammation in the cystic fibrosis lung: alterations in inter- and intracellular signaling. *Clin Rev Allergy Immunol*. avr 2008;34(2):146-62.
108. Blanchard AC, Waters VJ. Opportunistic Pathogens in Cystic Fibrosis: Epidemiology and Pathogenesis of Lung Infection. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*. 1 sept 2022;11(Supplement_2):S3-12.
109. Naehrig S, Chao CM, Naehrlich L. Cystic Fibrosis. *Dtsch Arztebl Int*. 21 août 2017;114(33-34):564-74.
110. Goss CH, Muhlebach MS. Review: Staphylococcus aureus and MRSA in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. sept 2011;10(5):298-306.
111. Hudson VL, Wielinski CL, Regelman WE. Prognostic implications of initial oropharyngeal bacterial flora in patients with cystic fibrosis diagnosed before the age of two years. *J Pediatr*. juin 1993;122(6):854-60.
112. Dasenbrook EC, Checkley W, Merlo CA, Konstan MW, Lechtzin N, Boyle MP. Association between respiratory tract methicillin-resistant Staphylococcus aureus and survival in cystic fibrosis. *JAMA*. 16 juin 2010;303(23):2386-92.

113. Dasenbrook EC, Merlo CA, Diener-West M, Lechtzin N, Boyle MP. Persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and rate of FEV1 decline in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 oct 2008;178(8):814-21.
114. Ren CL, Morgan WJ, Konstan MW, Schechter MS, Wagener JS, Fisher KA, et al. Presence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in respiratory cultures from cystic fibrosis patients is associated with lower lung function. *Pediatric Pulmonology*. 2007;42(6):513-8.
115. Pamukcu A, Bush A, Buchdahl R. Effects of *Pseudomonas aeruginosa* colonization on lung function and anthropometric variables in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. janv 1995;19(1):10-5.
116. Schelstraete P, Haerynck F, Van daele S, Deseyne S, De Baets F. Eradication therapy for *Pseudomonas aeruginosa* colonization episodes in cystic fibrosis patients not chronically colonized by *P. aeruginosa*. *J Cyst Fibros*. janv 2013;12(1):1-8.
117. Cogen JD, Onchiri FM, Hamblett NM, Gibson RL, Morgan WJ, Rosenfeld M. Association of Intensity of Antipseudomonal Antibiotic Therapy With Risk of Treatment-Emergent Organisms in Children With Cystic Fibrosis and Newly Acquired *Pseudomonas Aeruginosa*. *Clin Infect Dis*. 15 sept 2021;73(6):987-93.
118. Whiteford ML, Wilkinson JD, McColl JH, Conlon FM, Michie JR, Evans TJ, et al. Outcome of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* colonisation in children with cystic fibrosis following a hospital outbreak. *Thorax*. nov 1995;50(11):1194-8.
119. Stephenson AL, Sykes J, Berthiaume Y, Singer LG, Aaron SD, Whitmore GA, et al. Clinical and demographic factors associated with post-lung transplantation survival in individuals with cystic fibrosis. *J Heart Lung Transplant*. sept 2015;34(9):1139-45.
120. Denton M, Todd NJ, Littlewood JM. Role of anti-pseudomonal antibiotics in the emergence of *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. mai 1996;15(5):402-5.
121. Waters V, Atenafu EG, Lu A, Yau Y, Tullis E, Ratjen F. Chronic *Stenotrophomonas maltophilia* infection and mortality or lung transplantation in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*. sept 2013;12(5):482-6.
122. Valenza G, Tappe D, Turnwald D, Frosch M, König C, Hebestreit H, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. mars 2008;7(2):123-7.
123. Amin R, Dupuis A, Aaron SD, Ratjen F. The effect of chronic infection with *Aspergillus fumigatus* on lung function and hospitalization in patients with cystic fibrosis. *Chest*. janv 2010;137(1):171-6.
124. Reece E, Segurado R, Jackson A, McClean S, Renwick J, Grealley P. Co-colonisation with *Aspergillus fumigatus* and *Pseudomonas aeruginosa* is associated with poorer health in cystic fibrosis patients: an Irish registry analysis. *BMC Pulm Med*. 21 avr 2017;17(1):70.
125. Wat D, Doull I. Respiratory virus infections in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev*. sept 2003;4(3):172-7.

126. Hendricks MR, Lashua LP, Fischer DK, Flitter BA, Eichinger KM, Durbin JE, et al. Respiratory syncytial virus infection enhances *Pseudomonas aeruginosa* biofilm growth through dysregulation of nutritional immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 9 févr 2016;113(6):1642-7.
127. Miró-Cañís S, Capilla-Rubio S, Marzo-Checa L, Fontanals-Aymerich D, Sanfeliu-Sala I, Espasa-Soley M, et al. Multiplex PCR reveals that viruses are more frequent than bacteria in children with cystic fibrosis. *J Clin Virol*. janv 2017;86:1-4.
128. Schaffer K. Epidemiology of infection and current guidelines for infection prevention in cystic fibrosis patients. *Journal of Hospital Infection*. 1 avr 2015;89(4):309-13.
129. Green DM, Collaco JM, McDougal KE, Naughton KM, Blackman SM, Cutting GR. Heritability of respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *J Pediatr*. août 2012;161(2):290-295.e1.
130. Bedrossian CWM, Donald Greenberg S, Singer DB, Hansen JJ, Rosenberg HS. The lung in cystic fibrosis: A quantitative study including prevalence of pathologic findings among different age groups. *Human Pathology*. 1 mars 1976;7(2):195-204.
131. Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DW. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. avr 1995;151(4):1075-82.
132. Livraghi-Butrico A, Kelly EJ, Klem ER, Dang H, Wolfgang MC, Boucher RC, et al. Mucus clearance, MyD88-dependent and MyD88-independent immunity modulate lung susceptibility to spontaneous bacterial infection and inflammation. *Mucosal Immunology*. 1 juill 2012;5(4):397-408.
133. Hybiske K, Fu Z, Schwarzer C, Tseng J, Do J, Huang N, et al. Effects of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and $\Delta F508CFTR$ on inflammatory response, ER stress, and Ca^{2+} of airway epithelia. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. nov 2007;293(5):L1250-60.
134. Hartl D, Gaggar A, Bruscia E, Hector A, Marcos V, Jung A, et al. Innate immunity in cystic fibrosis lung disease. *Journal of Cystic Fibrosis*. 1 sept 2012;11(5):363-82.
135. Elizur A, Cannon CL, Ferkol TW. Airway Inflammation in Cystic Fibrosis. *CHEST*. 1 févr 2008;133(2):489-95.
136. Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat Immunol*. juill 2014;15(7):602-11.
137. Sly PD, Gangell CL, Chen L, Ware RS, Ranganathan S, Mott LS, et al. Risk factors for bronchiectasis in children with cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 23 mai 2013;368(21):1963-70.
138. Proteases and antiproteases in chronic neutrophilic lung disease – relevance to drug discovery - Greene - 2009 - *British Journal of Pharmacology* - Wiley Online Library [Internet]. [cité 17 avr 2024]. Disponible sur: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5381.2009.00448.x>
139. Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face - De Boeck - 2020 - *Acta Paediatrica* - Wiley Online Library [Internet]. [cité 17 avr 2024]. Disponible sur: <https://onlinelibrary-wiley-com.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/10.1111/apa.15155>

140. Stern RC, Eisenberg JD, Wagener JS, Ahrens R, Rock M, doPico G, et al. A comparison of the efficacy and tolerance of pancrelipase and placebo in the treatment of steatorrhea in cystic fibrosis patients with clinical exocrine pancreatic insufficiency. *Am J Gastroenterol.* août 2000;95(8):1932-8.
141. Flume PA, Robinson KA, O'Sullivan BP, Finder JD, Vender RL, Willey-Courand DB, et al. Cystic fibrosis pulmonary guidelines: airway clearance therapies. *Respir Care.* avr 2009;54(4):522-37.
142. Yang C, Montgomery M. Dornase alfa for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 18 mars 2021;3(3):CD001127.
143. Konstan MW, Schluchter MD, Xue W, Davis PB. Clinical use of Ibuprofen is associated with slower FEV1 decline in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 déc 2007;176(11):1084-9.
144. Rafeeq MM, Murad HAS. Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches. *J Transl Med.* 27 avr 2017;15(1):84.
145. Smyth AR, Bell SC, Bojcin S, Bryon M, Duff A, Flume P, et al. European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Best Practice guidelines. *Journal of Cystic Fibrosis.* 1 mai 2014;13:S23-42.
146. Kidd TJ, Canton R, Ekkelenkamp M, Johansen HK, Gilligan P, LiPuma JJ, et al. Defining antimicrobial resistance in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis.* 1 nov 2018;17(6):696-704.
147. Sherrard LJ, Tunney MM, Elborn JS. Antimicrobial resistance in the respiratory microbiota of people with cystic fibrosis. *The Lancet.* 23 août 2014;384(9944):703-13.
148. Hirche TO, Knoop C, Hebestreit H, Shimmin D, Solé A, Elborn JS, et al. Practical Guidelines: Lung Transplantation in Patients with Cystic Fibrosis. *Pulmonary Medicine.* 30 mars 2014;2014:e621342.
149. M G, Ma M. Ion Channel Modulators in Cystic Fibrosis. *Chest [Internet].* août 2018 [cité 17 avr 2024];154(2). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29750923/>
150. A Z, J E, D E, H E, A S. A Review of Trikafta: Triple Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Modulator Therapy. *Cureus [Internet].* 7 mars 2021 [cité 17 avr 2024];13(7). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34268058/>
151. Taylor-Cousar JL, Robinson PD, Shteinberg M, Downey DG. CFTR modulator therapy: transforming the landscape of clinical care in cystic fibrosis. *The Lancet.* 30 sept 2023;402(10408):1171-84.
152. Ivacaftor - PubMed [Internet]. [cité 17 avr 2024]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22543461/>
153. Yi B, Dalpke AH, Boutin S. Changes in the Cystic Fibrosis Airway Microbiome in Response to CFTR Modulator Therapy. *Front Cell Infect Microbiol [Internet].* 17 mars 2021 [cité 17 avr 2024];11. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.548613>
154. Beneath the surface: assessing cystic fibrosis pulmonary infections in the era of highly effective modulator therapy - PubMed [Internet]. [cité 17 avr 2024]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34275758/>

155. Dp N, Sj M, M S, At V, Jm VD, Sb S, et al. Pharmacologic improvement of CFTR function rapidly decreases sputum pathogen density, but lung infections generally persist. *The Journal of clinical investigation* [Internet]. 15 mai 2023 [cité 17 avr 2024];133(10). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36976651/>
156. Peix A, Ramírez-Bahena MH, Velázquez E. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infection, Genetics and Evolution*. 1 déc 2009;9(6):1132-47.
157. Diggle SP, Whiteley M. Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology (Reading)*. janv 2020;166(1):30-3.
158. Arai H. Regulation and Function of Versatile Aerobic and Anaerobic Respiratory Metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*. 5 mai 2011;2:103.
159. Botzenhart K, Döring G. Ecology and Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. In: Campa M, Bendinelli M, Friedman H, éditeurs. *Pseudomonas aeruginosa as an Opportunistic Pathogen* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 1993 [cité 1 juill 2024]. p. 1-18. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3036-7_1
160. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 31 août 2000;406(6799):959-64.
161. Freschi L, Vincent AT, Jeukens J, Emond-Rheault JG, Kukavica-Ibrulj I, Dupont MJ, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* Pan-Genome Provides New Insights on Its Population Structure, Horizontal Gene Transfer, and Pathogenicity. *Genome Biol Evol*. 29 nov 2018;11(1):109-20.
162. Crone S, Vives-Flórez M, Kvich L, Saunders AM, Malone M, Nicolaisen MH, et al. The environmental occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*. *APMIS*. 2020;128(3):220-31.
163. Kerr KG, Snelling AM. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *Journal of Hospital Infection*. 1 déc 2009;73(4):338-44.
164. Bodey GP, Bolivar R, Fainstein V, Jadeja L. Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Reviews of Infectious Diseases*. 1 mars 1983;5(2):279-313.
165. Inserm [Internet]. [cité 1 juill 2024]. Infections nosocomiales · Inserm, La science pour la santé. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/dossier/infections-nosocomiales/>
166. Rosenthal VD, Al-Abdely HM, El-Kholy AA, AlKhawaja SAA, Leblebicioglu H, Mehta Y, et al. International Nosocomial Infection Control Consortium report, data summary of 50 countries for 2010-2015: Device-associated module. *American Journal of Infection Control*. 1 déc 2016;44(12):1495-504.
167. Gonçalves-de-Albuquerque CF, Silva AR, Burth P, Rocco PRM, Castro-Faria MV, Castro-Faria-Neto HC. Possible mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa*-associated lung disease. *International Journal of Medical Microbiology*. 1 janv 2016;306(1):20-8.
168. Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *Int J Mol Sci*. 18 mars 2021;22(6):3128.

169. Williams P, Cámara M. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Current Opinion in Microbiology*. 1 avr 2009;12(2):182-91.
170. Nadal Jimenez P, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH, Quax WJ. The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev*. mars 2012;76(1):46-65.
171. Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell*. janv 2015;6(1):26-41.
172. Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front Cell Infect Microbiol*. 15 févr 2017;7:39.
173. De Kievit TR. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology*. févr 2009;11(2):279-88.
174. Mann EE, Wozniak DJ. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol Rev*. juill 2012;36(4):893-916.
175. Maldonado RF, Sá-Correia I, Valvano MA. Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. *FEMS Microbiol Rev*. juill 2016;40(4):480-93.
176. Qin S, Xiao W, Zhou C, Pu Q, Deng X, Lan L, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduct Target Ther*. 25 juin 2022;7:199.
177. Yan F, Li W, Jono H, Li Q, Zhang S, Li JD, et al. Reactive oxygen species regulate *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide-induced *MUC5AC* mucin expression via PKC-NADPH oxidase-ROS-TGF- α signaling pathways in human airway epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 8 févr 2008;366(2):513-9.
178. Eutamene H, Theodorou V, Schmidlin F, Tondereau V, Garcia-Villar R, Salvador-Cartier C, et al. LPS-induced lung inflammation is linked to increased epithelial permeability: role of MLCK. *European Respiratory Journal*. 1 mai 2005;25(5):789-96.
179. Duan Q, Zhou M, Zhu L, Zhu G. Flagella and bacterial pathogenicity. *Journal of Basic Microbiology*. 2013;53(1):1-8.
180. Talà L, Fineberg A, Kukura P, Persat A. *Pseudomonas aeruginosa* orchestrates twitching motility by sequential control of type IV pili movements. *Nat Microbiol*. mai 2019;4(5):774-80.
181. Johnson MDL, Garrett CK, Bond JE, Coggan KA, Wolfgang MC, Redinbo MR. *Pseudomonas aeruginosa* PilY1 Binds Integrin in an RGD- and Calcium-Dependent Manner. *PLoS One*. 29 déc 2011;6(12):e29629.
182. Bleves S, Viarre V, Salacha R, Michel GPF, Filloux A, Voulhoux R. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *International Journal of Medical Microbiology*. 1 déc 2010;300(8):534-43.
183. Sharma AK, Dhasmana N, Dubey N, Kumar N, Gangwal A, Gupta M, et al. Bacterial Virulence Factors: Secreted for Survival. *Indian J Microbiol*. mars 2017;57(1):1-10.

184. Javanmardi F, Emami A, Pirbonyeh N, Keshavarzi A, Rajaei M. A systematic review and meta-analysis on Exo-toxins prevalence in hospital acquired *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Infection, Genetics and Evolution*. 1 nov 2019;75:104037.
185. He C, Zhou Y, Liu F, Liu H, Tan H, Jin S, et al. Bacterial Nucleotidyl Cyclase Inhibits the Host Innate Immune Response by Suppressing TAK1 Activation. *Infect Immun*. 18 août 2017;85(9):e00239-17.
186. Hauser AR. The Type III Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa*: Infection by Injection. *Nat Rev Microbiol*. sept 2009;7(9):654-65.
187. Chen L, Zou Y, Kronfl AA, Wu Y. Type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* is associated with biofilm formation but not environmental adaptation. *Microbiologyopen*. 21 janv 2020;9(3):e991.
188. Dadashi M, Chen L, Nasimian A, Ghavami S, Duan K. Putative RNA Ligase RtcB Affects the Switch between T6SS and T3SS in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci*. 22 nov 2021;22(22):12561.
189. Johanson WG Jr, Woods DE, Chaudhuri T. Association of Respiratory Tract Colonization with Adherence of Gram-Negative Bacilli to Epithelial Cells. *The Journal of Infectious Diseases*. 1 juin 1979;139(6):667-73.
190. Stern GA, Lubniewski A, Allen C. The Interaction Between *Pseudomonas aeruginosa* and the Corneal Epithelium: An Electron Microscopic Study. *Archives of Ophthalmology*. 1 août 1985;103(8):1221-5.
191. Chi E, Mehl T, Nunn D, Lory S. Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with A549 pneumocyte cells. *Infect Immun*. mars 1991;59(3):822-8.
192. Fleiszig SM, Zaidi TS, Preston MJ, Grout M, Evans DJ, Pier GB. Relationship between cytotoxicity and corneal epithelial cell invasion by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*. juin 1996;64(6):2288-94.
193. Fleiszig SM, Wiener-Kronish JP, Miyazaki H, Vallas V, Mostov KE, Kanada D, et al. *Pseudomonas aeruginosa*-mediated cytotoxicity and invasion correlate with distinct genotypes at the loci encoding exoenzyme S. *Infect Immun*. févr 1997;65(2):579-86.
194. Hauser AR, Fleiszig S, Kang PJ, Mostov K, Engel JN. Defects in Type III Secretion Correlate with Internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by Epithelial Cells. *Infection and Immunity*. avr 1998;66(4):1413-20.
195. Lepanto P, Bryant DM, Rossello J, Datta A, Mostov KE, Kierbel A. *Pseudomonas aeruginosa* interacts with epithelial cells rapidly forming aggregates that are internalized by a Lyn-dependent mechanism. *Cell Microbiol*. août 2011;13(8):10.1111/j.1462-5822.2011.01611.x.
196. Emam A, Carter WG, Lingwood C. Glycolipid-Dependent, Protease Sensitive Internalization of *Pseudomonas aeruginosa* Into Cultured Human Respiratory Epithelial Cells. *Open Microbiol J*. 13 déc 2010;4:106-15.
197. Comolli JC, Waite LL, Mostov KE, Engel JN. Pili Binding to Asialo-GM1 on Epithelial Cells Can Mediate Cytotoxicity or Bacterial Internalization by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*. juill 1999;67(7):3207-14.

198. Eierhoff T, Bastian B, Thuenauer R, Madl J, Audfray A, Aigal S, et al. A lipid zipper triggers bacterial invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2 sept 2014;111(35):12895-900.
199. Fleiszig SM, Zaidi TS, Pier GB. *Pseudomonas aeruginosa* invasion of and multiplication within corneal epithelial cells in vitro. *Infection and Immunity*. oct 1995;63(10):4072-7.
200. Evans DJ, Maltseva IA, Wu J, Fleiszig SMJ. *Pseudomonas aeruginosa* internalization by corneal epithelial cells involves MEK and ERK signal transduction proteins. *FEMS Microbiology Letters*. 1 juill 2002;213(1):73-9.
201. Sana TG, Berni B, Bleves S. The T6SSs of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1 and Their Effectors: Beyond Bacterial-Cell Targeting. *Front Cell Infect Microbiol*. 9 juin 2016;6:61.
202. Sana TG, Baumann C, Merdes A, Soscia C, Rattei T, Hachani A, et al. Internalization of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1 into Epithelial Cells Is Promoted by Interaction of a T6SS Effector with the Microtubule Network. *mBio*. 2 juin 2015;6(3):e00712-15.
203. Jiang F, Waterfield NR, Yang J, Yang G, Jin Q. A *Pseudomonas aeruginosa* Type VI Secretion Phospholipase D Effector Targets Both Prokaryotic and Eukaryotic Cells. *Cell Host & Microbe*. 14 mai 2014;15(5):600-10.
204. Cowell BA, Chen DY, Frank DW, Vallis AJ, Fleiszig SMJ. ExoT of Cytotoxic *Pseudomonas aeruginosa* Prevents Uptake by Corneal Epithelial Cells. *Infect Immun*. janv 2000;68(1):403-6.
205. Resko ZJ, Suhi RF, Thota AV, Kroken AR. Evidence for intracellular *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 206(5):e00109-24.
206. Malet K, Faure E, Adam D, Donner J, Liu L, Pilon SJ, et al. Intracellular *Pseudomonas aeruginosa* within the Airway Epithelium of Cystic Fibrosis Lung Tissues. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 juin 2024;209(12):1453-62.
207. Leoni Swart A, Laventie BJ, Sütterlin R, Junne T, Lauer L, Manfredi P, et al. *Pseudomonas aeruginosa* breaches respiratory epithelia through goblet cell invasion in a microtissue model. *Nat Microbiol*. 10 juin 2024;1-13.
208. Lawin-Brüssel CA, Refojo MF, Leong FL, Hanninen L, Kenyon KR. Time Course of Experimental *Pseudomonas aeruginosa* Keratitis in Contact Lens Overwear. *Archives of Ophthalmology*. 1 juill 1990;108(7):1012-9.
209. Jolly AL, Takawira D, Oke OO, Whiteside SA, Chang SW, Wen ER, et al. *Pseudomonas aeruginosa*-Induced Bleb-Niche Formation in Epithelial Cells Is Independent of Actinomyosin Contraction and Enhanced by Loss of Cystic Fibrosis Transmembrane-Conductance Regulator Osmoregulatory Function. *mBio*. 24 févr 2015;6(2):e02533-14.
210. Angus AA, Lee AA, Augustin DK, Lee EJ, Evans DJ, Fleiszig SMJ. *Pseudomonas aeruginosa* Induces Membrane Blebs in Epithelial Cells, Which Are Utilized as a Niche for Intracellular Replication and Motility. *Infect Immun*. mai 2008;76(5):1992-2001.
211. Angus AA, Evans DJ, Barbieri JT, Fleiszig SMJ. The ADP-Ribosylation Domain of *Pseudomonas aeruginosa* ExoS Is Required for Membrane Bleb Niche Formation and Bacterial Survival within Epithelial Cells. *Infect Immun*. nov 2010;78(11):4500-10.

212. Heimer SR, Evans DJ, Stern ME, Barbieri JT, Yahr T, Fleiszig SMJ. *Pseudomonas aeruginosa* Utilizes the Type III Secreted Toxin ExoS to Avoid Acidified Compartments within Epithelial Cells. *PLoS One*. 18 sept 2013;8(9):e73111.
213. Malet JK, Hennemann LC, Hua EML, Faure E, Waters V, Rousseau S, et al. A Model of Intracellular Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in Airway Epithelial Cells. Kahl B, éditeur. *Cellular Microbiology*. 12 août 2022;2022:1-14.
214. Wagener BM, Hu R, Wu S, Pittet JF, Ding Q, Che P. The Role of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factors in Cytoskeletal Dysregulation and Lung Barrier Dysfunction. *Toxins (Basel)*. 2 nov 2021;13(11):776.
215. Sun J, Barbieri JT. ExoS Rho GTPase-activating Protein Activity Stimulates Reorganization of the Actin Cytoskeleton through Rho GTPase Guanine Nucleotide Disassociation Inhibitor*. *Journal of Biological Chemistry*. 8 oct 2004;279(41):42936-44.
216. Pederson KJ, Vallis AJ, Aktories K, Frank DW, Barbieri JT. The amino-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* ExoS disrupts actin filaments via small-molecular-weight GTP-binding proteins. *Molecular Microbiology*. 1999;32(2):393-401.
217. Sato H, Frank DW. Intoxication of Host Cells by the T3SS Phospholipase ExoU: PI(4,5)P2-Associated, Cytoskeletal Collapse and Late Phase Membrane Blebbing. *PLoS One*. 25 juill 2014;9(7):e103127.
218. Belyy A, Raoux-Barbot D, Saveanu C, Namane A, Ogryzko V, Worpenberg L, et al. Actin activates *Pseudomonas aeruginosa* ExoY nucleotidyl cyclase toxin and ExoY-like effector domains from MARTX toxins. *Nat Commun*. 5 déc 2016;7:13582.
219. Mancl JM, Suarez C, Liang WG, Kovar DR, Tang WJ. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme Y directly bundles actin filaments. *J Biol Chem*. 13 mars 2020;295(11):3506-17.
220. de Bentzmann S, Polette M, Zahm JM, Hinnrasky J, Kileztky C, Bajolet O, et al. *Pseudomonas Aeruginosa* Virulence Factors Delay Airway Epithelial Wound Repair by Altering the Actin Cytoskeleton and Inducing Overactivation of Epithelial Matrix Metalloproteinase-2. *Laboratory Investigation*. 1 févr 2000;80(2):209-19.
221. Heggors JP, Haydon S, Ko F, Hayward PG, Carp S, Robson MC. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A: its role in retardation of wound healing: the 1992 Lindberg Award. *J Burn Care Rehabil*. 1992;13(5):512-8.
222. Chakravorty D, Nanda Kumar KS. Bacterial lipopolysaccharide induces cytoskeletal rearrangement in small intestinal lamina propria fibroblasts: actin assembly is essential for lipopolysaccharide signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 3 janv 2000;1500(1):125-36.
223. Zanetti S, Fiori PL, Monaco G, Cappuccinelli P. Evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* influence on the cytoskeleton of Hep-2 cells. *Microbiologica*. oct 1986;9(4):455-60.
224. Coburn J, Dillon ST, Iglewski BH, Gill DM. Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* ADP-ribosylates the intermediate filament protein vimentin. *Infect Immun*. mars 1989;57(3):996-8.
225. Mayaud C. *Pseudomonas* et bronches. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 1 juin 2007;37(6):300-4.

226. Cramer N, Klockgether J, Tümmler B. Microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* in the airways of people with cystic fibrosis. *Current Opinion in Immunology*. 1 août 2023;83:102328.
227. Lavoie EG, Wangdi T, Kazmierczak BI. Innate immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Microbes Infect*. déc 2011;13(14-15):1133-45.
228. Kim YJ, Paek SH, Jin S, Park BS, Ha UH. A novel *Pseudomonas aeruginosa*-derived effector cooperates with flagella to mediate the upregulation of interleukin 8 in human epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*. 1 janv 2014;66:24-8.
229. Pier GB. Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1 août 2000;97(16):8822-8.
230. Kowalski MP, Pier GB. Localization of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator to Lipid Rafts of Epithelial Cells Is Required for *Pseudomonas aeruginosa*-Induced Cellular Activation 1. *The Journal of Immunology*. 1 janv 2004;172(1):418-25.
231. Pier GB, Grout M, Zaidi TS. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 28 oct 1997;94(22):12088-93.
232. Plotkowski MC, de Bentzmann S, Pereira SHM, Zahm JM, Bajolet-Laudinat O, Roger P, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Internalization by Human Epithelial Respiratory Cells Depends on Cell Differentiation, Polarity, and Junctional Complex Integrity. *Am J Respir Cell Mol Biol*. mai 1999;20(5):880-90.
233. Darling KEA, Dewar A, Evans TJ. Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by polarized respiratory epithelial cells. *Cellular Microbiology*. 2004;6(6):521-33.
234. Stanton BA. Effects of *Pseudomonas aeruginosa* on CFTR chloride secretion and the host immune response. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1 avr 2017;312(4):C357-66.
235. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed [Internet]. [cité 1 juill 2024]. Disponible sur: <https://www-who-int.proxy.insermbiblio.inist.fr/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
236. Stefani S, Campana S, Cariani L, Carnovale V, Colombo C, Lleo MM, et al. Relevance of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *International Journal of Medical Microbiology*. 1 sept 2017;307(6):353-62.
237. Azam MW, Khan AU. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discovery Today*. 1 janv 2019;24(1):350-9.
238. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*. 1 janv 2019;37(1):177-92.
239. Nikaido H, Nikaido K, Harayama S. Identification and characterization of porins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*. 15 janv 1991;266(2):770-9.
240. Dreier J, Ruggerone P. Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*. 8 juill 2015;6:660.

241. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr.* avr 2016;4(2):10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
242. Schnell A, Hober H, Kaiser N, Ruppel R, Geppert A, Tremel C, et al. Elexacaftor – Tezacaftor – Ivacaftor treatment improves systemic infection parameters and *Pseudomonas aeruginosa* colonization rate in patients with cystic fibrosis a monocentric observational study. *Heliyon.* 24 avr 2023;9(5):e15756.
243. Armbruster CR, Hilliam YK, Zemke AC, Atteih S, Marshall CW, Moore J, et al. Persistence and evolution of *Pseudomonas aeruginosa* following initiation of highly effective modulator therapy in cystic fibrosis. *mBio.* 15(5):e00519-24.
244. Ledger EL, Smith DJ, Teh JJ, Wood ME, Whibley PE, Morrison M, et al. Impact of CFTR Modulation on *Pseudomonas aeruginosa* Infection in People With Cystic Fibrosis. *The Journal of Infectious Diseases.* 5 mars 2024;jiae051.
245. Burgel PR, Ballmann M, Drevinek P, Heijerman H, Jung A, Mainz JG, et al. Considerations for the use of inhaled antibiotics for *Pseudomonas aeruginosa* in people with cystic fibrosis receiving CFTR modulator therapy. *BMJ Open Respir Res.* 3 mai 2024;11(1):e002049.
246. Hartwell LH. Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp Cell Res.* déc 1971;69(2):265-76.
247. Byers B, Goetsch L. A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. *J Cell Biol.* juin 1976;69(3):717-21.
248. Haarer BK, Pringle JR. Immunofluorescence localization of the *Saccharomyces cerevisiae* CDC12 gene product to the vicinity of the 10-nm filaments in the mother-bud neck. *Mol Cell Biol.* oct 1987;7(10):3678-87.
249. Weirich CS, Erzberger JP, Barral Y. The septin family of GTPases: architecture and dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* juin 2008;9(6):478-89.
250. Mostowy S, Cossart P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol.* mars 2012;13(3):183-94.
251. Dolat L, Hu Q, Spiliotis ET. Septin functions in organ system physiology and pathology. *Biol Chem.* févr 2014;395(2):123-41.
252. Gönczi M, Dienes B, Dobrosi N, Fodor J, Balogh N, Oláh T, et al. Septins, a cytoskeletal protein family, with emerging role in striated muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 2021;42(2):251-65.
253. Leipe DD, Wolf YI, Koonin EV, Aravind L. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases1. *Journal of Molecular Biology.* 15 mars 2002;317(1):41-72.
254. Sirajuddin M, Farkasovsky M, Zent E, Wittinghofer A. GTP-induced conformational changes in septins and implications for function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 29 sept 2009;106(39):16592-7.
255. Mendoza M, Hyman AA, Glotzer M. GTP Binding Induces Filament Assembly of a Recombinant Septin. *Current Biology.* 29 oct 2002;12(21):1858-63.
256. Hall PA, Jung K, Hillan KJ, Russell SH. Expression profiling the human septin gene family. *The Journal of Pathology.* 2005;206(3):269-78.

257. Valadares NF, d' Muniz Pereira H, Ulian Araujo AP, Garratt RC. Septin structure and filament assembly. *Biophys Rev.* 13 sept 2017;9(5):481-500.
258. Casamayor A, Snyder M. Molecular Dissection of a Yeast Septin: Distinct Domains Are Required for Septin Interaction, Localization, and Function. *Mol Cell Biol.* avr 2003;23(8):2762-77.
259. Bai X, Bowen JR, Knox TK, Zhou K, Pendziwiat M, Kuhlenbäumer G, et al. Novel septin 9 repeat motifs altered in neuralgic amyotrophy bind and bundle microtubules. *J Cell Biol.* 23 déc 2013;203(6):895-905.
260. Smith C, Dolat L, Angelis D, Forgacs E, Spiliotis ET, Galkin VE. Septin 9 exhibits polymorphic binding to F-actin and inhibits myosin and cofilin activity. *J Mol Biol.* 9 oct 2015;427(20):3273-84.
261. Kinoshita M. Assembly of Mammalian Septins. *The Journal of Biochemistry.* 1 oct 2003;134(4):491-6.
262. Sirajuddin M, Farkasovsky M, Hauer F, Kühlmann D, Macara IG, Weyand M, et al. Structural insight into filament formation by mammalian septins. *Nature.* sept 2007;449(7160):311-5.
263. Sellin ME, Sandblad L, Stenmark S, Gullberg M. Deciphering the rules governing assembly order of mammalian septin complexes. *Mol Biol Cell.* 1 sept 2011;22(17):3152-64.
264. Kuo YC, Shen YR, Chen HI, Lin YH, Wang YY, Chen YR, et al. SEPT12 orchestrates the formation of mammalian sperm annulus by organizing core octameric complexes with other SEPT proteins. *Journal of Cell Science.* 1 mars 2015;128(5):923-34.
265. Nagata K ichi, Asano T, Nozawa Y, Inagaki M. Biochemical and Cell Biological Analyses of a Mammalian Septin Complex, Sept7/9b/11*. *Journal of Biological Chemistry.* 31 déc 2004;279(53):55895-904.
266. Güler GÖ, Mostowy S. The septin cytoskeleton: Heteromer composition defines filament function. *J Cell Biol.* 23 févr 2023;222(3):e202302010.
267. Kinoshita M, Field CM, Coughlin ML, Straight AF, Mitchison TJ. Self- and actin-templated assembly of Mammalian septins. *Dev Cell.* déc 2002;3(6):791-802.
268. Bridges AA, Zhang H, Mehta SB, Occhipinti P, Tani T, Gladfelter AS. Septin assemblies form by diffusion-driven annealing on membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11 févr 2014;111(6):2146-51.
269. Sellin ME, Holmfeldt P, Stenmark S, Gullberg M. Microtubules support a disk-like septin arrangement at the plasma membrane of mammalian cells. *Mol Biol Cell.* 1 déc 2011;22(23):4588-601.
270. Joberty G, Perlungher RR, Sheffield PJ, Kinoshita M, Noda M, Haystead T, et al. Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by Cdc42. *Nat Cell Biol.* oct 2001;3(10):861-6.
271. Hernández-Rodríguez Y, Momany M. Posttranslational modifications and assembly of septin heteropolymers and higher-order structures. *Current Opinion in Microbiology.* 1 déc 2012;15(6):660-8.

272. Ivanov AI, Le HT, Naydenov NG, Rieder F. Novel Functions of the Septin Cytoskeleton. *Am J Pathol.* janv 2021;191(1):40-51.
273. Dolat L, Spiliotis ET. Septins promote macropinosome maturation and traffic to the lysosome by facilitating membrane fusion. *J Cell Biol.* 29 août 2016;214(5):517-27.
274. Traikov S, Stange C, Wassmer T, Paul-Gilloteaux P, Salamero J, Raposo G, et al. Septin6 and Septin7 GTP Binding Proteins Regulate AP-3- and ESCRT-Dependent Multivesicular Body Biogenesis. *PLoS One.* 7 nov 2014;9(11):e109372.
275. Tokhtaeva E, Capri J, Marcus EA, Whitelegge JP, Khuzakhmetova V, Bukharaeva E, et al. Septin Dynamics Are Essential for Exocytosis. *J Biol Chem.* 27 févr 2015;290(9):5280-97.
276. Fung KYY, Dai L, Trimble WS. Chapter Seven - Cell and Molecular Biology of Septins. In: Jeon KW, éditeur. *International Review of Cell and Molecular Biology* [Internet]. Academic Press; 2014 [cité 1 août 2024]. p. 289-339. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128001806000074>
277. Zhang N, Zhang Y, You S, Tian Y, Lu S, Cao L, et al. Septin4 Prevents PDGF-BB-induced HAVSMC Phenotypic Transformation, Proliferation and Migration by Promoting SIRT1-STAT3 Deacetylation and Dephosphorylation. *Int J Biol Sci.* 14 janv 2020;16(4):708-18.
278. Gonzalez ME, Makarova O, Peterson EA, Privette LM, Petty EM. Up-regulation of SEPT9_v1 stabilizes c-Jun-N-Terminal Kinase and contributes to its pro-proliferative activity in mammary epithelial cells. *Cell Signal.* avr 2009;21(4):477-87.
279. Amir S, Golan M, Mabjeesh NJ. Targeted Knockdown of SEPT9_v1 Inhibits Tumor Growth and Angiogenesis of Human Prostate Cancer Cells Concomitant with Disruption of Hypoxia-Inducible Factor-1 Pathway. *Molecular Cancer Research.* 1 mai 2010;8(5):643-52.
280. Gilden J, Krummel MF. Control of Cortical Rigidity by the Cytoskeleton: Emerging Roles for Septins. *Cytoskeleton (Hoboken).* août 2010;67(8):477-86.
281. Mostowy S, Janel S, Forestier C, Roduit C, Kasas S, Pizarro-Cerdá J, et al. A Role for Septins in the Interaction between the *Listeria monocytogenes* Invasion Protein InlB and the Met Receptor. *Biophys J.* 20 avr 2011;100(8):1949-59.
282. Sharma S, Quintana A, Findlay GM, Mettlen M, Baust B, Jain M, et al. An siRNA screen for NFAT activation identifies septins as coordinators of store-operated Ca²⁺ entry. *Nature.* 11 juill 2013;499(7457):10.1038/nature12229.
283. Xie Y, Vessey JP, Konecna A, Dahm R, Macchi P, Kiebler MA. The GTP-Binding Protein Septin 7 Is Critical for Dendrite Branching and Dendritic-Spine Morphology. *Current Biology.* 23 oct 2007;17(20):1746-51.
284. Kinoshita N, Kimura K, Matsumoto N, Watanabe M, Fukaya M, Ide C. Mammalian septin Sept2 modulates the activity of GLAST, a glutamate transporter in astrocytes. *Genes to Cells.* 2004;9(1):1-14.
285. Yang YM, Fedchyshyn MJ, Grande G, Aitoubah J, Tsang CW, Xie H, et al. Septins Regulate Developmental Switching from Microdomain to Nanodomain Coupling of Ca²⁺ Influx to Neurotransmitter Release at a Central Synapse. *Neuron.* 15 juill 2010;67(1):100-15.

286. Tsang CW, Estey MP, DiCiccio JE, Xie H, Patterson D, Trimble WS. Characterization of presynaptic septin complexes in mammalian hippocampal neurons. 1 août 2011;392(8-9):739-49.
287. Toure A, Rode B, Hunnicutt GR, Escalier D, Gacon G. Septins at the annulus of mammalian sperm. 1 août 2011;392(8-9):799-803.
288. Chao HCA, Lin YH, Kuo YC, Shen CJ, Pan HA, Kuo PL. The expression pattern of SEPT7 correlates with sperm morphology. *J Assist Reprod Genet.* juin 2010;27(6):299-307.
289. Lin YH, Lin YM, Wang YY, Yu IS, Lin YW, Wang YH, et al. The Expression Level of Septin12 Is Critical for Spermiogenesis. *Am J Pathol.* mai 2009;174(5):1857-68.
290. Spiliotis ET, Hunt SJ, Hu Q, Kinoshita M, Nelson WJ. Epithelial polarity requires septin coupling of vesicle transport to polyglutamylated microtubules. *J Cell Biol.* 28 janv 2008;180(2):295-303.
291. Ghossoub R, Hu Q, Failler M, Rouyez MC, Spitzbarth B, Mostowy S, et al. Septins 2, 7 and 9 and MAP4 colocalize along the axoneme in the primary cilium and control ciliary length. *J Cell Sci.* 15 juin 2013;126(12):2583-94.
292. Hu Q, Milenkovic L, Jin H, Scott MP, Nachury MV, Spiliotis ET, et al. A Septin Diffusion Barrier at the Base of the Primary Cilium Maintains Ciliary Membrane Protein Distribution. *Science.* 23 juill 2010;329(5990):436-9.
293. Fliegau M, Kahle A, Häffner K, Zieger B. Distinct localization of septin proteins to ciliary sub-compartments in airway epithelial cells. *Biol Chem.* févr 2014;395(2):151-6.
294. Sidhaye VK, Chau E, Breyse PN, King LS. Septin-2 Mediates Airway Epithelial Barrier Function in Physiologic and Pathologic Conditions. *Am J Respir Cell Mol Biol.* juill 2011;45(1):120-6.
295. Lassen LB, Füchtbauer A, Schmitz A, Sørensen AB, Pedersen FS, Füchtbauer EM. Septin9 is involved in T-cell development and CD8+ T-cell homeostasis. *Cell Tissue Res.* 1 juin 2013;352(3):695-705.
296. Gilden JK, Peck S, Chen YC, Krummel MF. The septin cytoskeleton facilitates membrane retraction during motility and blebbing. *J Cell Biol.* 9 janv 2012;196(1):103-14.
297. Sui L, Zhang W, Liu Q, Chen T, Li N, Wan T, et al. Cloning and functional characterization of human septin 10, a novel member of septin family cloned from dendritic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2 mai 2003;304(2):393-8.
298. Huang YW, Yan M, Collins RF, DiCiccio JE, Grinstein S, Trimble WS. Mammalian Septins Are Required for Phagosome Formation. *Mol Biol Cell.* avr 2008;19(4):1717-26.
299. Spiliotis ET, Nakos K. Cellular functions of actin- and microtubule-associated septins. *Curr Biol.* 24 mai 2021;31(10):R651-66.
300. Spiliotis ET. Spatial effects – site-specific regulation of actin and microtubule organization by septin GTPases. *J Cell Sci.* 1 janv 2018;131(1):jcs207555.
301. Joo E, Surka MC, Trimble WS. Mammalian SEPT2 Is Required for Scaffolding Nonmuscle Myosin II and Its Kinases. *Developmental Cell.* 6 nov 2007;13(5):677-90.

302. Calvo F, Ranftl R, Hooper S, Farrugia AJ, Moeendarbary E, Bruckbauer A, et al. Cdc42EP3/BORG2 and Septin Network Enables Mechano-transduction and the Emergence of Cancer-Associated Fibroblasts. *Cell Rep.* 17 déc 2015;13(12):2699-714.
303. Estey MP, Di Ciano-Oliveira C, Froese CD, Bejide MT, Trimble WS. Distinct roles of septins in cytokinesis: SEPT9 mediates midbody abscission. *J Cell Biol.* 15 nov 2010;191(4):741-9.
304. Martins CS, Taveneau C, Castro-Linares G, Baibakov M, Buzhinsky N, Eroles M, et al. Human septins organize as octamer-based filaments and mediate actin-membrane anchoring in cells. *J Cell Biol.* 23 déc 2022;222(3):e202203016.
305. Moore KS, Moore R, Fulmer DB, Guo L, Gensemer C, Stairley R, et al. DCHS1, Lix1L, and the Septin Cytoskeleton: Molecular and Developmental Etiology of Mitral Valve Prolapse. *J Cardiovasc Dev Dis.* 17 févr 2022;9(2):62.
306. Nakos K, Rosenberg M, Spiliotis ET. Regulation of microtubule plus end dynamics by septin 9. *Cytoskeleton (Hoboken).* janv 2019;76(1):83-91.
307. Ageta-Ishihara N, Miyata T, Ohshima C, Watanabe M, Sato Y, Hamamura Y, et al. Septins promote dendrite and axon development by negatively regulating microtubule stability via HDAC6-mediated deacetylation. *Nat Commun.* 11 oct 2013;4:2532.
308. Nakos K, Radler MR, Spiliotis ET. Septin 2/6/7 complexes tune microtubule plus-end growth and EB1 binding in a concentration- and filament-dependent manner. *Mol Biol Cell.* 1 nov 2019;30(23):2913-28.
309. Woods BL, Gladfelter AS. State of the septin cytoskeleton from assembly to function. *Curr Opin Cell Biol.* févr 2021;68:105-12.
310. Ueda M, Kawamura N, Tateishi T, Sakae N, Motomura K, Ohyagi Y, et al. Phenotypic spectrum of hereditary neuralgic amyotrophy caused by the SEPT9 R88W mutation. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry.* 1 janv 2010;81(1):94-6.
311. Pennington K, Beasley CL, Dicker P, Fagan A, English J, Pariante CM, et al. Prominent synaptic and metabolic abnormalities revealed by proteomic analysis of the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder. *Mol Psychiatry.* déc 2008;13(12):1102-17.
312. Ihara M, Tomimoto H, Kitayama H, Morioka Y, Akiguchi I, Shibasaki H, et al. Association of the Cytoskeletal GTP-binding Protein Sept4/H5 with Cytoplasmic Inclusions Found in Parkinson's Disease and Other Synucleinopathies*. *Journal of Biological Chemistry.* 27 juin 2003;278(26):24095-102.
313. Takehashi M, Alioto T, Stedeford T, Persad AS, Banasik M, Masliah E, et al. Septin 3 Gene Polymorphism in Alzheimer's Disease. *Gene Expr.* 7 juin 2018;11(5-6):263-70.
314. Marttinen M, Kurkinen KM, Soininen H, Haapasalo A, Hiltunen M. Synaptic dysfunction and septin protein family members in neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener.* 3 avr 2015;10:16.
315. Princen K, Van Dooren T, van Gorsel M, Louros N, Yang X, Dumbacher M, et al. Pharmacological modulation of septins restores calcium homeostasis and is neuroprotective in models of Alzheimer's disease. *Science.* 31 mai 2024;384(6699):eadd6260.

316. Kuo YC, Lin YH, Chen HI, Wang YY, Chiou YW, Lin HH, et al. SEPT12 mutations cause male infertility with defective sperm annulus. *Human Mutation*. 2012;33(4):710-9.
317. Vahabi Barzi N, Kakavand K, Sodeifi N, Ghezelayagh Z, Sabbaghian M. Expression and localization of Septin 14 gene and protein in infertile men testis. *Reproductive Biology*. 1 juin 2020;20(2):164-8.
318. Angelis D, Spiliotis ET. Septin Mutations in Human Cancers. *Front Cell Dev Biol*. 9 nov 2016;4:122.
319. He H, Li J, Xu M, Kan Z, Gao Y, Yuan C. Expression of septin 2 and association with clinicopathological parameters in colorectal cancer. *Oncol Lett*. sept 2019;18(3):2376-83.
320. James NE, Cantillo E, Yano N, Chichester CO, DiSilvestro PA, Hovanesian V, et al. Septin-2 is overexpressed in epithelial ovarian cancer and mediates proliferation via regulation of cellular metabolic proteins. *Oncotarget*. 26 avr 2019;10(31):2959-72.
321. Wang X, Fei F, Qu J, Li C, Li Y, Zhang S. The role of septin 7 in physiology and pathological disease: A systematic review of current status. *J Cell Mol Med*. juill 2018;22(7):3298-307.
322. Zhang N, Liu L, Fan N, Zhang Q, Wang W, Zheng M, et al. The requirement of SEPT2 and SEPT7 for migration and invasion in human breast cancer via MEK/ERK activation. *Oncotarget*. 19 août 2016;7(38):61587-600.
323. Osaka M, Rowley JD, Zeleznik-Le NJ. MSF (MLL septin-like fusion), a fusion partner gene of MLL, in a therapy-related acute myeloid leukemia with a t(11;17)(q23;q25). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25 mai 1999;96(11):6428-33.
324. Sun J, Zheng MY, Li YW, Zhang SW. Structure and function of Septin 9 and its role in human malignant tumors. *World J Gastrointest Oncol*. 15 juin 2020;12(6):619-31.
325. Connolly D, Yang Z, Castaldi M, Simmons N, Oktay MH, Coniglio S, et al. Septin 9 isoform expression, localization and epigenetic changes during human and mouse breast cancer progression. *Breast Cancer Res*. 2011;13(4):R76.
326. Amir S, Wang R, Matzkin H, Simons JW, Mabeesh NJ. MSF-A Interacts with Hypoxia-Inducible Factor-1 α and Augments Hypoxia-Inducible Factor Transcriptional Activation to Affect Tumorigenicity and Angiogenesis. *Cancer Research*. 19 janv 2006;66(2):856-66.
327. Liu M, Shen S, Chen F, Yu W, Yu L. Linking the septin expression with carcinogenesis. *Mol Biol Rep*. 1 oct 2010;37(7):3601-8.
328. Cossart P. Met, the HGF–SF receptor: another receptor for *Listeria monocytogenes*. *Trends in Microbiology*. 1 mars 2001;9(3):105-7.
329. Van Ngo H, Mostowy S. Role of septins in microbial infection. *Journal of Cell Science*. 30 avr 2019;132(9):jcs226266.
330. Cossart P, Sansonetti PJ. Bacterial Invasion: The Paradigms of Enteroinvasive Pathogens. *Science*. 9 avr 2004;304(5668):242-8.
331. Pizarro-Cerdá J, Kühbacher A, Cossart P. Entry of *Listeria monocytogenes* in Mammalian Epithelial Cells: An Updated View. *Cold Spring Harb Perspect Med*. nov 2012;2(11):a010009.

332. Mostowy S, Nam Tham T, Danckaert A, Guadagnini S, Boisson-Dupuis S, Pizarro-Cerdá J, et al. Septins Regulate Bacterial Entry into Host Cells. *PLoS One*. 15 janv 2009;4(1):e4196.
333. Haglund CM, Welch MD. Pathogens and polymers: Microbe–host interactions illuminate the cytoskeleton. *J Cell Biol*. 3 oct 2011;195(1):7-17.
334. Boddy KC, Gao AD, Truong D, Kim MS, Froese CD, Trimble WS, et al. Septin-regulated actin dynamics promote *Salmonella* invasion of host cells. *Cell Microbiol*. oct 2018;20(10):e12866.
335. Esen M, Grassmé H, Riethmüller J, Riehle A, Fassbender K, Gulbins E. Invasion of Human Epithelial Cells by *Pseudomonas aeruginosa* Involves Src-Like Tyrosine Kinases p60Src and p59Fyn. *Infect Immun*. janv 2001;69(1):281-7.
336. Aigal S, Omidvar R, Stober K, Ziegelbauer J, Eierhoff T, Schampera JN, et al. Septin barriers protect mammalian host cells against *Pseudomonas aeruginosa* invasion. *Cell Reports*. 18 oct 2022;41(3):111510.
337. Gouin E, Welch MD, Cossart P. Actin-based motility of intracellular pathogens. *Current Opinion in Microbiology*. 1 févr 2005;8(1):35-45.
338. Mostowy S, Bonazzi M, Hamon MA, Tham TN, Mallet A, Lelek M, et al. Entrapment of Intracytosolic Bacteria by Septin Cage-like Structures. *Cell Host & Microbe*. 18 nov 2010;8(5):433-44.
339. Sirianni A, Krokowski S, Lobato-Márquez D, Buranyi S, Pfanzelter J, Galea D, et al. Mitochondria mediate septin cage assembly to promote autophagy of *Shigella*. *EMBO Rep*. juill 2016;17(7):1029-43.
340. Krokowski S, Lobato-Márquez D, Chastanet A, Pereira PM, Angelis D, Galea D, et al. Septins Recognize and Entrap Dividing Bacterial Cells for Delivery to Lysosomes. *Cell Host Microbe*. 12 déc 2018;24(6):866-874.e4.
341. Lobato-Márquez D, Xu J, Güler GÖ, Ojiakor A, Pilhofer M, Mostowy S. Mechanistic insight into bacterial entrapment by septin cage reconstitution. *Nat Commun*. 23 juill 2021;12:4511.
342. Yuan K, Huang C, Fox J, Laternus D, Carlson E, Zhang B, et al. Autophagy plays an essential role in the clearance of *Pseudomonas aeruginosa* by alveolar macrophages. *J Cell Sci*. 15 janv 2012;125(2):507-15.
343. Mostowy S, Sancho-Shimizu V, Hamon MA, Simeone R, Brosch R, Johansen T, et al. p62 and NDP52 Proteins Target Intracytosolic *Shigella* and *Listeria* to Different Autophagy Pathways. *J Biol Chem*. 29 juill 2011;286(30):26987-95.
344. Lobato-Márquez D, Krokowski S, Sirianni A, Larrouy-Maumus G, Mostowy S. A requirement for septins and the autophagy receptor p62 in the proliferation of intracellular *Shigella*. *Cytoskeleton (Hoboken)*. janv 2019;76(1):163-72.
345. Robertin S, Mostowy S. The history of septin biology and bacterial infection. *Cellular Microbiology*. 2020;22(4):e13173.
346. Brokatzky D, Gomes MC, Robertin S, Albino C, Miles SL, Mostowy S. Septins promote macrophage pyroptosis by regulating gasdermin D cleavage and ninjurin-1-mediated plasma

- membrane rupture. *Cell Chemical Biology* [Internet]. 5 août 2024 [cité 14 août 2024];0(0). Disponible sur: [https://www.cell.com/cell-chemical-biology/abstract/S2451-9456\(24\)00305-2](https://www.cell.com/cell-chemical-biology/abstract/S2451-9456(24)00305-2)
347. Fu B, Xiong Y, Sha Z, Xue W, Xu B, Tan S, et al. SEPTIN2 suppresses an IFN- γ -independent, proinflammatory macrophage activation pathway. *Nat Commun*. 17 nov 2023;14:7441.
 348. Prislusky MI, Lam JGT, Contreras VR, Ng M, Chamberlain M, Pathak-Sharma S, et al. The septin cytoskeleton is required for plasma membrane repair. *EMBO reports*. 5 juill 2024;1-26.
 349. Shindo A, Audrey A, Takagishi M, Takahashi M, Wallingford JB, Kinoshita M. Septin-dependent remodeling of cortical microtubule drives cell reshaping during epithelial wound healing. *J Cell Sci*. 15 juin 2018;131(12):jcs212647.
 350. Menon MB, Sawada A, Chaturvedi A, Mishra P, Schuster-Gossler K, Galla M, et al. Genetic Deletion of SEPT7 Reveals a Cell Type-Specific Role of Septins in Microtubule Destabilization for the Completion of Cytokinesis. *PLoS Genet*. 14 août 2014;10(8):e1004558.
 351. López-Jiménez AT, Brokatzky D, Pillay K, Williams T, Güler GÖ, Mostowy S. High-content high-resolution microscopy and deep learning assisted analysis reveals host and bacterial heterogeneity during *Shigella* infection. *eLife* [Internet]. 3 juin 2024 [cité 3 sept 2024];13. Disponible sur: <https://elifesciences.org/reviewed-preprints/97495>
 352. Brax S, Gaudin C, Calmel C, Boëlle PY, Corvol H, Ruffin M, et al. Septin-dependent defense mechanisms against *Pseudomonas aeruginosa* are stalled in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *European Journal of Cell Biology*. 1 juin 2024;103(2):151416.
 353. Husain S, Singh N. Burkholderia cepacia infection and lung transplantation. *Semin Respir Infect*. déc 2002;17(4):284-90.
 354. Lim SH, Snider J, Birimberg-Schwartz L, Ip W, Serralha JC, Botelho HM, et al. CFTR interactome mapping using the mammalian membrane two-hybrid high-throughput screening system. *Molecular Systems Biology*. févr 2022;18(2):e10629.
 355. Pankow S, Bamberger C, Calzolari D, Martínez-Bartolomé S, Lavallée-Adam M, Balch WE, et al. Δ F508 CFTR interactome remodeling promotes rescue of Cystic Fibrosis. *Nature*. 24 déc 2015;528(7583):510-6.
 356. Luciani A, Villella VR, Esposito S, Brunetti-Pierri N, Medina D, Settembre C, et al. Defective CFTR induces aggresome formation and lung inflammation in cystic fibrosis through ROS-mediated autophagy inhibition. *Nat Cell Biol*. sept 2010;12(9):863-75.
 357. Rao L, De La Rosa I, Xu Y, Sha Y, Bhattacharya A, Holtzman MJ, et al. *Pseudomonas aeruginosa* survives in epithelia by ExoS-mediated inhibition of autophagy and mTOR. *EMBO Rep*. 3 févr 2021;22(2):e50613.
 358. Junkins RD, Shen A, Rosen K, McCormick C, Lin TJ. Autophagy Enhances Bacterial Clearance during *P. aeruginosa* Lung Infection. *PLoS One*. 28 août 2013;8(8):e72263.
 359. Stanley AC, Lacy P. Pathways for Cytokine Secretion. *Physiology*. août 2010;25(4):218-29.
 360. Bérubé J, Roussel L, Nattagh L, Rousseau S. Loss of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Function Enhances Activation of p38 and ERK MAPKs, Increasing Interleukin-6

Synthesis in Airway Epithelial Cells Exposed to *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*. 16 juill 2010;285(29):22299-307.

361. Cohen TS, Prince A. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nat Med*. 5 avr 2012;18(4):509-19.

362. Ruffin M, Brochiero E. Repair Process Impairment by *Pseudomonas aeruginosa* in Epithelial Tissues: Major Features and Potential Therapeutic Avenues. *Front Cell Infect Microbiol*. 31 mai 2019;9:182.

ANNEXES

I- Liste des publications et communications

1- Publication

Brax S, Gaudin C, Calmel C, Boëlle PY, Corvol H, Ruffin M, et al. Septin-dependent defense mechanisms against *Pseudomonas aeruginosa* are stalled in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *European Journal of Cell Biology*. 1 juin 2024 ;103(2):151416.

2- Communications orales

- Colloque national *Pseudomonas* 2022, Cabourg, 11 octobre 2022.
Présentation orale de 10min en français.
- 17^{ème} Séminaire annuel du Centre de Recherche Saint-Antoine, Lieusaint, 24 novembre 2022.
Présentation orale de 10min en français.
- 19^{ème} Journées de Recherche Respiratoire, Société de Pneumologie de Langue Française, Tours, 13 octobre 2023.
Présentation orale de 10min en français.
- 25^{ème} Colloque français des jeunes chercheurs en mucoviscidose, Association Vaincre la Mucoviscidose, Institut Imagine, Paris, 6 février 2024.
Présentation orale de 10min en français.
Prix de la meilleure communication orale.

3- Communications affichées (poster)

- 22^{ème} Journées de l'école doctorale 394, site des Cordeliers, Paris, mai 2022.
- 24^{ème} Colloque français des jeunes chercheurs, Association Vaincre la mucoviscidose, Institut Imagine, Paris, 7 février 2023.
- 23^{ème} Journées de l'école doctorale 394, site des Cordeliers, Paris, juin 2023.
- 19^{ème} Journées de Recherche Respiratoire, Société de Pneumologie de Langue Française, Tours, 13 octobre 2023.
- 18^{ème} Séminaire annuel du Centre de Recherche Saint-Antoine, Lieusaint, novembre 2023.
- 19^{ème} *ECFS Basic Science Conference, European Cystic Fibrosis Society*, La Valette, Malte, mars 2024.
- 24^{ème} Journées de l'école doctorale 394, Campus Pierre et Marie Curie, Paris, juin 2024.
- *North American Cystic Fibrosis Conference (NACFC)*, Boston, États-Unis, septembre 2024.

II- Extrait plan de formation

- Formation FUN MOOC « La science ouverte », Sorbonne Université.
- Formation « Déposer en HAL en 3 clics : Pourquoi ? Comment ? », Bibliothèque de Sorbonne Université.
- Formation « La science ouverte en 3 points », Bibliothèque de Sorbonne Université.
- Formation FUN MOOC « Intégrité scientifique dans les métiers de la recherche », Université de Bordeaux.
- Formation « Travaillez mieux en équipe et encadrer une équipe », département de formation continue, Sorbonne Université.
- Formation « APEC : Savoir identifier ses compétences », département de formation continue, Sorbonne Université.
- Formation « Préparer son intégration professionnelle et se mettre en action », département de formation continue, Sorbonne Université.
- Formation à la culture des cellules iPS (*induced Pluripotent Stem cell*). Théorique et observation de la pratique de toutes les étapes de culture des cellules iPS sur 5 jours. *Institute for Regenerative Medicine and Biotherapy* (IRMB), Université de Montpellier. Groupe du Pr Jos De Vos. Encadrement par le Dr Saïd Assou.

ABSTRACT

Role of the septin cytoskeleton in bronchial *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis

Bronchial epithelial cells form a physical barrier against inhaled microorganisms and coordinate the immune responses of the lung. However, in the context of cystic fibrosis (CF), impairment of the mucociliary clearance process and the immune response favours colonisation of patients' bronchi by the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. The repetition of infection/inflammation cycles induces lesions in this bronchial epithelium, leading to a decline in patients' respiratory function, the leading cause of patient mortality. It is therefore crucial today to identify new molecular cellular players involved in the host response.

In this study, we focused on the septin cytoskeleton (SEPT) which has been shown to be important in host-pathogen interactions and in the maintenance of barrier function. We first demonstrated the central role of SEPT7 in the maintenance of the SEPT cytoskeleton. But also, for the formation of cage-like structures around intracellular *P. aeruginosa*. We have also shown that SEPT2, SEPT7 and SEPT9 are involved in the response of the bronchial epithelium to infections. They participate in a process aimed at limiting the number of intracellular *P. aeruginosa*. And SEPT7 also modulates IL-6 cytokine secretion following infection by this pathogen. However, this SEPT-dependent response is impaired in the CF context, which could explain the persistence of *P. aeruginosa* infections in the pathology. Finally, we observed that pre-treatment with CFTR modulators did not restore these processes, suggesting that the CFTR protein is not directly involved.

A better understanding of the role played by the SEPT cytoskeleton in the response of the bronchial epithelium to CF and non-CF infections could lead to the development of new therapeutic approaches to combat pathogens such as *P. aeruginosa*.

Keywords: cystic fibrosis - septin cytoskeleton - host/pathogen interaction - *Pseudomonas aeruginosa* - bronchial epithelial cells

RÉSUMÉ

Rôle du cytosquelette de septines dans les infections bronchiques à *Pseudomonas aeruginosa* dans le contexte de la mucoviscidose

Les cellules épithéliales bronchiques forment une barrière physique contre les microorganismes inhalés et coordonnent les réponses immunitaires du poumon. Toutefois dans le contexte de la mucoviscidose (CF), l'altération du processus de clairance mucociliaire et de la réponse immunitaire favorise la colonisation des bronches des patients par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. La répétition des cycles d'infection/inflammation va induire des lésions de cet épithélium bronchique et mener à un déclin progressif de la fonction respiratoire des patients, représentant la première cause de mortalité des patients. Il est donc aujourd'hui crucial d'identifier de nouveaux acteurs moléculaires cellulaires impliqués dans la réponse de l'hôte.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés au cytosquelette de septines (SEPT) qui a été montré comme important dans les interactions hôte-pathogène et dans le maintien de la fonction de barrière. Nous avons tout d'abord observé le rôle central de la SEPT7 pour le maintien du cytosquelette de SEPT. Mais également pour la formation de structures en forme de cage autour de *P. aeruginosa* intracellulaire. Nous avons ensuite montré que les SEPT2, SEPT7 et SEPT9 étaient impliquées dans la réponse de l'épithélium bronchique face aux infections. Elles participent à un processus visant à limiter le nombre de *P. aeruginosa* intracellulaires. Et la SEPT7 module également la sécrétion de la cytokine IL-6 subséquente à l'infection par ce pathogène. Toutefois, cette réponse SEPT-dépendante est altérée en contexte CF ce qui pourrait expliquer la persistance des infections par *P. aeruginosa* dans la pathologie. Enfin, nous avons observé que le prétraitement avec les modulateurs de CFTR ne restaurait pas ces processus, suggérant que la protéine CFTR n'est pas directement impliquée.

Une meilleure compréhension du rôle joué par le cytosquelette de SEPT dans la réaction de l'épithélium bronchique aux infections non-CF et CF permettrait de développer de nouvelles voies thérapeutiques de lutte contre des pathogènes tels que *P. aeruginosa*.

Mots clés : mucoviscidose – cytosquelette de septines – interaction hôte/pathogène – *Pseudomonas aeruginosa* – cellules épithéliales bronchiques