

PROJET DE THESE : ICVERE (English below)

(Financement en attente de réponse à un appel à projet)

Intitulé du projet : Isolement et Caractérisation de Vésicules Extracellulaires pour la compréhension de la pathogénie de *Rhodococcus equi* et le diagnostic de la Rhodococcose Equine.

Acronyme du projet : ICVERE

Période d'exécution : printemps 2024 – printemps 2027

Unité de recherche : UR 7450 BioTARGen (Biologie, Génétique et Thérapies Ostéoarticulaires et Respiratoires) – Université de Caen Normandie. Plateforme Normandie Equine Vallée (NEV), site de Saint Contest. 3, rue Nelson Mandela, 14280, Saint Contest.

École doctorale de rattachement : Ecole doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement (Ed497 N BISE)

Contact : Alain RINCE : alain.rince@unicaen.fr ; +33-2-31-56-55-23

Contexte et Objectifs

La rhodococcose équine est une maladie d'origine bactérienne qui se manifeste généralement par une bronchopneumonie pyogranulomateuse associée au développement d'abcès pulmonaires et affecte préférentiellement les poulains âgés de 3 semaines à 6 mois. Dans les nombreux élevages concernés, cette infection liée à *Rhodococcus equi* et plus spécifiquement à des souches hébergeant un plasmide de virulence contenant le gène *vapA* (*R. equi vapA+*) est particulièrement difficile à éradiquer et s'inscrit donc malheureusement de manière durable. Cette maladie, n'épargne pas la Normandie qui est la première région française d'élevage par le nombre de naissances annuelles et elle engendre des pertes économiques importantes liées notamment aux décès des animaux et à une réduction du prix de vente des sujets atteints.

La bactérie excrétée via les fèces des chevaux malades ou porteurs sains contamine le sol où elle persiste (voire se multiplie si les conditions le permettent) et l'inhalation de particules de poussière en suspension dans l'air et porteuses de *R. equi* est considérée comme la principale voie de transmission conduisant aux infections pulmonaires. La pathogénicité de *R. equi* repose sur sa capacité à survivre et à se multiplier au sein de cellules phagocytaires, telles que les macrophages alvéolaires. Cette prolifération intracellulaire conduit à la nécrose cellulaire, généralement accompagnée d'une réponse inflammatoire pyogranulomateuse (1). *R. equi* partage de nombreuses caractéristiques avec *Mycobacterium tuberculosis*, l'agent responsable de la tuberculose : en effet, ces deux bactéries font partie des actinomycètes nocardioformes ayant un génome à fort pourcentage en G+C, possèdent une paroi cellulaire contenant des acides mycoliques, infectent les macrophages alvéolaires et sont capables de s'y multiplier, sont à l'origine de lésions pyogranulomateuses, empêchent la fusion phagolysosomale et se répliquent dans le phagosome. Quelques facteurs de virulence de *R. equi* ont été répertoriés, ils incluent la protéine VapA codée par un gène plasmidique. Cette protéine VapA, sécrétée par les souches possédant le plasmide en question, est capable d'inhiber la maturation des phagosomes contenant *R. equi* et ainsi de favoriser la survie bactérienne intracellulaire (2, 3). Cependant, les mécanismes contribuant au processus de la maladie sont loin d'être entièrement compris.

A défaut de vaccin disponible, les établissements équestres tentent de minimiser l'impact de cette maladie par identification de signes cliniques (incluant la mise en évidence de lésions pulmonaires par échographie) et traitement antibiotique. Des outils diagnostiques fiables sont attendus pour prédire l'évolution d'une infection afin de réduire l'utilisation d'antimicrobiens et par conséquent le développement ultérieur de la résistance (4). Il est en effet important d'appliquer l'antibiothérapie à bon escient c'est-à-dire uniquement à partir d'un stade où le développement de la maladie représente un risque pour l'animal (pour limiter l'apparition de souches résistantes), mais suffisamment tôt pour éviter l'échec thérapeutique.

Les Vésicules Extracellulaires (VE) sont libérées par la plupart des types de cellules et interviennent dans la communication intercellulaire. Elles incluent les exosomes libérées par la voie endocytaire et les microvésicules résultant du bourgeonnement de la membrane plasmique. Des bactéries sont aussi capables de sécréter par bourgeonnement des VE. Lors d'une infection bactérienne, le nombre, la taille et le contenu des VE libérées

peuvent varier (5). Ces VE peuvent avoir un impact sur la pathogénèse et la réponse immunitaire et servir de biomarqueurs diagnostiques de la pathogénèse microbienne (6).

Le présent projet intitulé ICVERE (Isolement et Caractérisation de Vésicules Extracellulaires pour la compréhension de la pathogénie de *Rhodococcus equi* et le diagnostic de la Rhodococcose Equine) consistera à isoler les VE plasmatiques à partir de prélèvements sanguins réalisés sur des poulains sains ou à différents stades de la maladie. La pureté, la taille et la concentration de ces VE seront évaluées en utilisant la technologie NTA (Nanoparticle Tracking Analysis), des analyses protéomique et transcriptomique permettront ensuite d'identifier les protéines, ARNm et miARN portés par ces VE et l'étude de l'interaction des VE avec des macrophages permettra d'évaluer leur capacité à moduler la réponse immunitaire des macrophages. Ces travaux ont donc pour finalité d'investiguer le rôle des VE dans le développement de la rhodococcose équine et d'apporter des éléments pour envisager leur éventuelle utilisation en tant que biomarqueurs diagnostiques.

Les travaux envisagés dans ce projet sont particulièrement innovants dans le sens où dans le contexte d'une infection à *R. equi*, aucune étude concernant la caractérisation de VE d'origine eucaryote n'a été publiée. En revanche, chez la bactérie *M. tuberculosis* présentant de nombreux traits communs avec *R. equi*, il a été montré que la concentration en VE du sérum de l'hôte infecté était nettement supérieure à celle des témoins, que ces VE portaient des éléments bactériens (glycopeptidolipides, protéines, ARN) et étaient impliquées dans la modulation de la réponse immunitaire, la croissance et la survie bactérienne (7-13). Les VE libérés par les bactéries peuvent également être impliqués dans de nombreuses fonctions incluant la survie bactérienne, la médiation de la pathogénèse et la modulation des réponses immunitaires de l'hôte (pour review : 14). Dans ce contexte, Xu *et al.* (15) ont récemment montré que les VE sécrétées par *R. equi* étaient capables de médier une réponse inflammatoire dans les macrophages et que les protéines de ces VE étaient essentielles à cette réponse inflammatoire. Parallèlement, Sanclemente *et al.* (4) ont montré que l'infection à *R. equi* altère le lipidome plasmatique des poulains. Tous éléments suggèrent que l'étude des VE (libérées par les cellules de l'hôte et/ou par *R. equi*) pourrait permettre d'apporter des éléments d'informations sur la pathogénie de cette bactérie et d'identifier de potentiels biomarqueurs pour le développement d'outils diagnostiques.

Références :

- 1-Muscatello G. *Rhodococcus equi* pneumonia in the foal - Part 1: Pathogenesis and epidemiology. 2012. Veterinary J. 192: 20-26.
- 2-Toyooka K, Takai S, Kirikae T. *Rhodococcus equi* can survive a phagolysosomal environment in macrophages by suppressing acidification of the phagolysosome. 2005. J Med Microbiol. 54: 1007-1015.
- 3-von Bargen K, Scraba M, Krämer I, Ketterer M, Nehls C, Krokowski S, Repnik U, Wittlich M, Maaser A, Zapka P, Bunge M, Schlesinger M, Huth G, Klees A, Hansen P, Jeschke A, Bendas G, Utermöhlen O, Griffiths G, Gutschmann T, Wohlmann J, Haas A. Virulence-associated protein A from *R. equi* is an intercompartmental pH-neutralising virulence factor. 2018. Cellular Microbiol. 21:e12958.
- 4- Sanclemente JL, Rivera-Velez SM, Dasgupta N, Horohov DW, Wood PL, X Sanz MG. Plasma lipidome of healthy and *Rhodococcus equi*-infected foals over time. 2022. Equine Vet J. 54: 121-131.
- 5-Delabranche X, Berger A, Boisramé-Helms J, Meziani F. Microparticles and infectious diseases. 2012. Med Mal Infect. 42: 335-343.
- 6-Jnana A, Sadiya SS, Satyamoorthy K, Murali TS. Extracellular vesicles in bacterial and fungal diseases - pathogenesis to diagnostic biomarkers. 2023. Virulence 14, NO. 1, 2180934
- 7-Kruh-Garcia NA, Schorey JS, Dobos KM. Exosomes: new tuberculosis biomarkers - prospects from the bench to the clinic. 2012. in book: Understanding Tuberculosis - Global Experiences and Innovative Approaches to the Diagnosis. doi.org/10.5772/30720.
- 8-(Spencer N, Yeruva L. Role of bacterial infections in extracellular vesicles release and impact on immune response. 2021. Biomed J. 44: 157-164.
- 9-Giri PK, Kruh NA, Dobos KM, Schorey JS. Proteomic analysis identifies highly antigenic proteins in exosomes from *M. tuberculosis*-infected and culture filtrate protein-treated macrophages. 2010. Proteomics. 10: 3190-3202.
- 10- Smith VL, Cheng Y, Bryant BR, Schorey JS. Exosomes function in antigen presentation during an *in vivo Mycobacterium tuberculosis* infection. 2017. Scientific Reports. 7: 43578
- 11- Singh PP, Smith VL, Karakousis PC, Schorey JS. Exosomes isolated from mycobacteria-infected mice or cultured macrophages can recruit and activate immune cells *in vitro* and *in vivo*. 2012. J Immunol. 189: 777-785.
- 12- Kruh-Garcia NA, Wolfe LM, Chaisson LH, Worodria WO, Nahid P, Schorey JS, Davis JL, Dobos KM. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* peptides in the exosomes of patients with active and latent *M. tuberculosis* infection using MRM-MS. 2014. PLoS ONE 9(7): e103811.
- 13-Cheng Y, Schorey JS. Extracellular vesicles deliver Mycobacterium RNA to promote host immunity and bacterial killing. 2019. EMBO Rep. 20:e46613.
- 14-Gilmore WJ, Johnston EL, Zavan L, Bitto NJ, Kaparakis-Liaskos M. Immunomodulatory roles and novel applications of bacterial membrane vesicles. 2021. Mol Immunol. 134: 72-85.
- 15-Xu Z, Hao X, Li M, Luo H. *Rhodococcus equi*-derived extracellular vesicles promoting inflammatory response in macrophage through TLR2-NF- κ B/MAPK pathways. 2022. Int J Mol Sci. 23: 9742.

THESIS PROJECT: ICVERE

(financing: awaiting response to a call for projects)

Project title : Isolation and Characterization of Extracellular Vesicles for the understanding of the pathogenesis of *Rhodococcus equi* and the diagnosis of Equine Rhodococcosis.

Project acronym: ICVERE

Execution period: spring 2024 - spring 2027

Research unit : UR 7450 BioTARGen (Biologie, Génétique et Thérapies Ostéoarticulaires et Respiratoires) – Université de Caen Normandie. Plateforme Normandie Equine Vallée (NEV), site de Saint Contest. 3, rue Nelson Mandela, 14280, Saint Contest.

Doctoral school : Ecole doctorale Normandie Biologie Intégrative, Santé, Environnement (Ed497 N BISE)

Contact: Alain RINCE: alain.rince@unicaen.fr ; +33-2-31-56-55-23

Context and Objectives

Equine rhodococcosis is a disease of bacterial origin which generally manifests as pyogranulomatous bronchopneumonia associated with the development of pulmonary abscesses and preferentially affects foals aged 3 weeks to 6 months. In the many farms concerned, this infection linked to *Rhodococcus equi* and more specifically to strains harboring a virulence plasmid containing the *vapA* gene (*R. equi vapA+*) is particularly difficult to eradicate and is therefore unfortunately lasting. This disease does not spare Normandy, which is the leading French breeding region in terms of the number of annual births, and it generates significant economic losses linked in particular to the deaths of animals and a reduction in the selling price of affected animals.

The bacteria excreted via the feces of sick horses or healthy carriers contaminates the soil where it persists (or even multiplies if conditions permit) and the inhalation of dust particles suspended in the air and carrying *R. equi* is considered as the main route of transmission leading to pulmonary infections. The pathogenicity of *R. equi* relies on its ability to survive and multiply within phagocytic cells, such as alveolar macrophages. This intracellular proliferation leads to cellular necrosis, usually accompanied by a pyogranulomatous inflammatory response (1). *R. equi* shares many characteristics with *Mycobacterium tuberculosis*, the agent responsible for tuberculosis: in fact, these two bacteria are part of the nocardioform actinomycetes having a genome with a high percentage of G+C, have a cell wall containing mycolic acids, infect and are capable of multiplying in alveolar macrophages, cause pyogranulomatous lesions, prevent phagolysosomal fusion and replicate in the phagosome. A few *R. equi* virulence factors have been identified, including the VapA protein encoded by a plasmid-encoded gene. This VapA protein, secreted by strains possessing the plasmid, is capable of inhibiting the maturation of phagosomes containing *R. equi* and thus promoting intracellular bacterial survival (2, 3). However, the mechanisms contributing to the disease process are far from fully understood.

In the absence of an available vaccine, equestrian establishments are trying to minimize the impact of this disease by identifying clinical signs (including the detection of lung lesions by ultrasound) and antibiotic treatment. Reliable diagnostic tools are expected to predict the course of an infection in order to reduce the use of antimicrobials and consequently the subsequent development of resistance (4). It is in fact important to apply antibiotic therapy wisely, i.e. only from a stage where the development of the disease represents a risk for the animal (to limit the appearance of resistant strains), but early enough to avoid therapeutic failure.

Extracellular Vesicles (EVs) are released by most cell types and are involved in intercellular communication. They include exosomes released by the endocytic pathway and microvesicles resulting from plasma membrane budding. Bacteria are also capable of secreting EVs by budding. During bacterial infection, the number, size, and content of EVs released can vary (5). These EVs may impact pathogenesis and immune response and serve as diagnostic biomarkers of microbial pathogenesis (6).

This project entitled ICVERE (Isolation and Characterization of Extracellular Vesicles for the understanding of the pathogenesis of *Rhodococcus equi* and the diagnosis of Equine Rhodococcosis) will consist of isolating plasma EVs from blood samples taken from healthy foals and foals at different stages of disease. The purity, size and concentration of these EVs will be evaluated using NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) technology, proteomic and transcriptomic analyzes will then be used to identify the proteins, mRNAs and miRNAs carried by these EVs and the study of the interaction of EVs with macrophages will allow to evaluate their ability to modulate the macrophage immune response. Therefore, the aims of this work are to investigate the role of EVs in the development of equine rhodococcosis and to provide elements to consider their possible use as diagnostic biomarkers.

The work envisaged in this project is particularly innovative in the sense that in the context of *R. equi* infection, no study concerning the characterization of EVs of eukaryotic origin has been published. On the other hand, in the bacterium *M. tuberculosis* having many traits in common with *R. equi*, it was shown that the concentration of EVs in the serum of the infected host was significantly higher than that of the controls, that these EVs carried bacterial elements (glycopeptidolipids, proteins, RNA) and were involved in the modulation of the immune response, bacterial growth and survival (7-13). EVs released by bacteria may also be involved in numerous functions including bacterial survival, mediation of pathogenesis, and modulation of host immune responses (for review: 14). In this context, Xu et al. (15) recently showed that EVs secreted by *R. equi* are capable of mediating an inflammatory response in macrophages and that the proteins of these EVs are essential for this inflammatory response. At the same time, Sanclemente et al. (4) showed that *R. equi* infection alters the plasma lipidome of foals. All these elements suggest that the study of EVs (released by host cells and/or by *R. equi*) could provide information on the pathogenesis of this bacteria and identify potential biomarkers for the development of diagnostic tools.

References:

- 1-Muscatello G. *Rhodococcus equi* pneumonia in the foal - Part 1: Pathogenesis and epidemiology. 2012. Veterinary J. 192: 20-26.
- 2-Toyooka K, Takai S, Kirikae T. *Rhodococcus equi* can survive a phagolysosomal environment in macrophages by suppressing acidification of the phagolysosome. 2005. J Med Microbiol. 54: 1007-1015.
- 3-von Bargen K, Scraba M, Krämer I, Ketterer M, Nehls C, Krokowski S, Repnik U, Wittlich M, Maaser A, Zapka P, Bunge M, Schlesinger M, Huth G, Klees A, Hansen P, Jeschke A, Bendas G, Utermöhlen O, Griffiths G, Gutschmann T, Wohlmann J, Haas A. Virulence-associated protein A from *R. equi* is an intercompartmental pH-neutralising virulence factor. 2018. Cellular Microbiol. 21:e12958.
- 4- Sanclemente JL, Rivera-Velez SM, Dasgupta N, Horohov DW, Wood PL, X Sanz MG. Plasma lipidome of healthy and *Rhodococcus equi*-infected foals over time. 2022. Equine Vet J. 54: 121-131.
- 5-Delabranche X, Berger A, Boisramé-Helms J, Meziani F. Microparticles and infectious diseases. 2012. Med Mal Infect. 42: 335-343.
- 6-Jnana A, Sadiya SS, Satyamoorthy K, Murali TS. Extracellular vesicles in bacterial and fungal diseases - pathogenesis to diagnostic biomarkers. 2023. Virulence 14, NO. 1, 2180934
- 7-Kruh-Garcia NA, Schorey JS, Dobos KM. Exosomes: new tuberculosis biomarkers - prospects from the bench to the clinic. 2012. in book: Understanding Tuberculosis - Global Experiences and Innovative Approaches to the Diagnosis. doi.org/10.5772/30720.
- 8-(Spencer N, Yeruva L. Role of bacterial infections in extracellular vesicles release and impact on immune response. 2021. Biomed J. 44: 157-164.
- 9-Giri PK, Kruh NA, Dobos KM, Schorey JS. Proteomic analysis identifies highly antigenic proteins in exosomes from *M. tuberculosis*-infected and culture filtrate protein-treated macrophages. 2010. Proteomics. 10: 3190-3202.
- 10- Smith VL, Cheng Y, Bryant BR, Schorey JS. Exosomes function in antigen presentation during an *in vivo Mycobacterium tuberculosis* infection. 2017. Scientific Reports. 7: 43578
- 11- Singh PP, Smith VL, Karakousis PC, Schorey JS. Exosomes isolated from mycobacteria-infected mice or cultured macrophages can recruit and activate immune cells *in vitro* and *in vivo*. 2012. J Immunol. 189: 777-785.
- 12- Kruh-Garcia NA, Wolfe LM, Chaisson LH, Worodria WO, Nahid P, Schorey JS, Davis JL, Dobos KM. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* peptides in the exosomes of patients with active and latent *M. tuberculosis* infection using MRM-MS. 2014. PLoS ONE 9(7): e103811.
- 13-Cheng Y, Schorey JS. Extracellular vesicles deliver Mycobacterium RNA to promote host immunity and bacterial killing. 2019. EMBO Rep. 20:e46613.
- 14-Gilmore WJ, Johnston EL, Zavan L, Bitto NJ, Kaparakis-Liaskos M. Immunomodulatory roles and novel applications of bacterial membrane vesicles. 2021. Mol Immunol. 134: 72-85.
- 15-Xu Z, Hao X, Li M, Luo H. *Rhodococcus equi*-derived extracellular vesicles promoting inflammatory response in macrophage through TLR2-NF- κ B/MAPK pathways. 2022. Int J Mol Sci. 23: 9742.