

PROJET DE THESE : ICVERE

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 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 s'y 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, 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 ces 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-Muscattello 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.

Projet détaillé

Ce projet comprend 3 principales actions décrites ci-dessous et résumées sur la figure 1 :

1. Recrutement des poulains et isolement de Vésicules Extracellulaires :

Les VE seront isolées à partir de plasma d'une cohorte d'au moins 50 animaux provenant de différents haras et incluant des poulains non infectés, des porteurs sains et des poulains malades à différents stades de développement de la rhodococcose. Chaque animal fera l'objet d'une analyse bactériologique (recherche de *R. equi vapA+* (portant le gène plasmidique *vapA*) et *vapA-* dans les matières fécales et à partir d'écouvillons nasopharyngés) pour distinguer les poulains infectés ou non, d'analyses hématologiques (numération, formule sanguine), d'analyses biochimiques (dosage de la protéine Sérum Amyloïde A et du fibrinogène) et d'échographie thoracique (permettant la mise en évidence de lésions pulmonaires) pour différencier les poulains sains et le stade de développement de la rhodococcose chez les animaux malades.

Les VE plasmatiques seront isolées par ultracentrifugation. La taille et la concentration des VE seront alors déterminées en utilisant la technologie NTA (Nanoparticle Tracking Analysis), cette analyse permettra de visualiser la pureté des extractions (absence d'aggrégats protéiques) et d'évaluer s'il existe une corrélation entre la taille et/ou la concentration des VE et le statut des animaux. Parallèlement des VE produites par *R. equi* seront extraites à partir de surnageants de cultures bactériennes.

2. Caractérisation des Vésicules Extracellulaires :

Les VE ainsi isolées feront ensuite l'objet d'analyses transcriptomiques et protéomiques. Les ARN seront extraits à l'aide de kits commerciaux et analysés par une approche globale (séquençage de l'ARN total et des micro-ARN puis identification par alignement des séquences au génome équin et à celui de la bactérie *R. equi*) couplée à des vérifications par PCR quantitative. Parallèlement, les protéines extraites à partir des différents échantillons de VE feront l'objet d'une digestion par la trypsine de façon à pouvoir les identifier par une approche de chromatographie (HPLC) couplée à de la spectrométrie de masse et comparaison des peptides répertoriés aux séquences protéiques déduites des génomes équin et bactérien. Pour les protéines d'intérêt, des confirmations pourront être réalisées par hybridation de western-blots. Les ARN et protéines identifiés à partir des différents échantillons d'VE plasmatiques feront alors l'objet d'une analyse comparative pour mettre en évidence les différences liées au statut de l'animal. Parallèlement, le contenu (ARN et protéines) des VE plasmatiques sera aussi comparé à celui des VE extraites de surnageant de cultures bactériennes. Des marqueurs d'origine eucaryote ou bactérienne pourront alors être sélectionnés pour discriminer les différents types de VE (VE d'origine eucaryote ne contenant pas de matériel bactérien, VE d'origine eucaryote contenant du matériel bactérien et VE d'origine bactérienne) au sein d'un même échantillon en utilisant la technologie NTA couplée à des marquages fluorescents. Parallèlement, des marqueurs susceptibles de pouvoir servir d'outils diagnostiques pourront être répertoriés.

3. Capacité des Vésicules Extracellulaires à moduler la réponse immunitaire des macrophages :

Les VE (plasmatiques et extraites de surnageants de cultures de *R. equi*) seront ensuite utilisées pour évaluer leur capacité à être absorbées par des macrophages, à entraîner une cytotoxicité des macrophages et à induire une modulation de l'expression de cytokines. Pour évaluer la capacité d'absorption par les macrophages, les VE seront préalablement marquées à la fluorescence avant d'être mis en présence de macrophages et l'observation sera réalisée par microscopie à haute résolution après contre marquage des cellules par un second fluorescent. L'effet des VE sur la viabilité des macrophages sera évalué par impédancemétrie à l'aide de la technologie xCELLigence. Finalement, la capacité des VE à moduler l'expression de cytokines sera évaluée par dosage d'interleukines (IL) et de facteur de nécrose tumorale (TNF) dans le surnageant de cultures de macrophages exposés ou non aux VE, à l'aide de kits ELISA et/ou par hybridation de Western-blots.

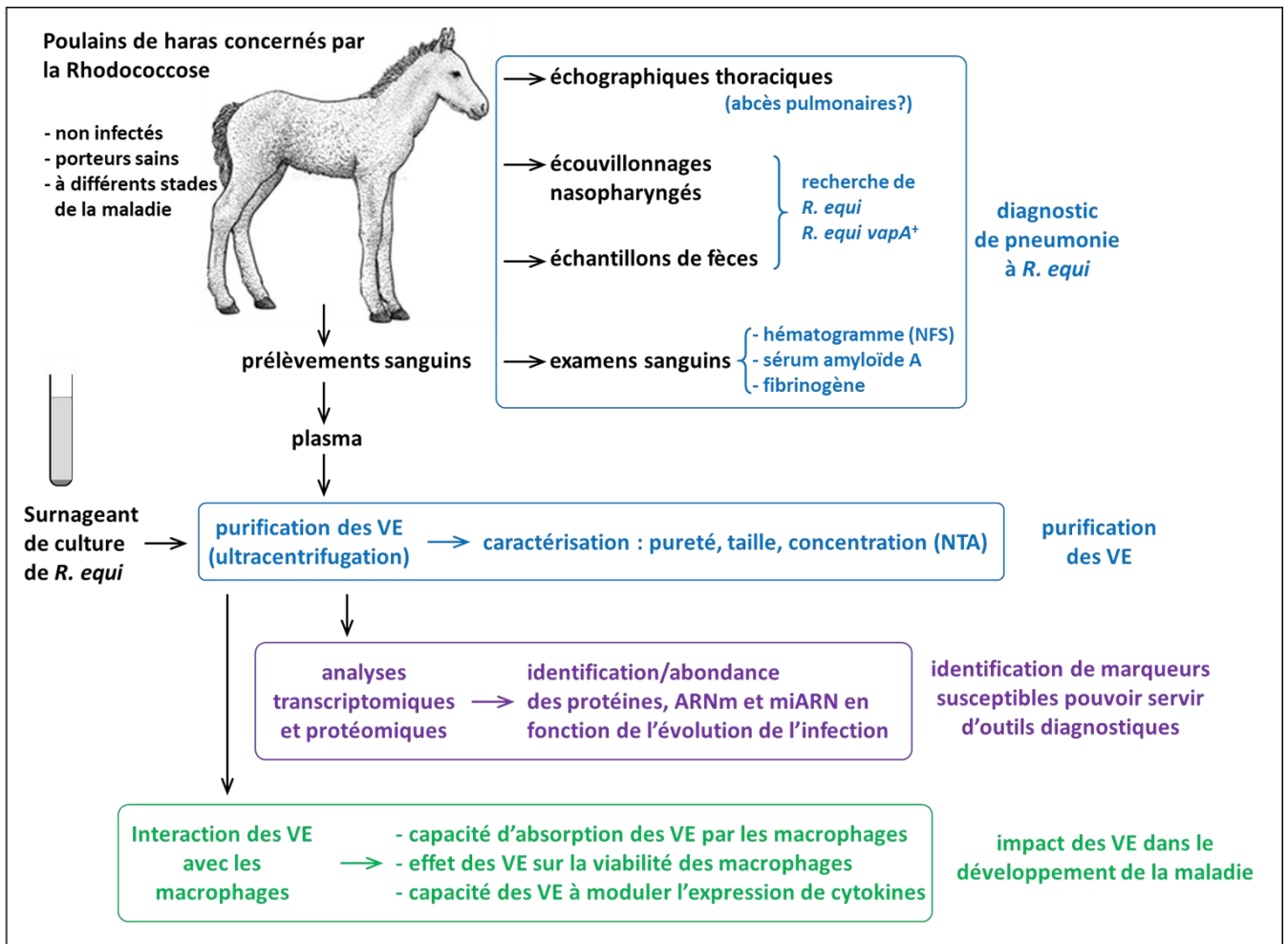


Figure 1 : Représentation schématique des 3 principales actions du projet ICVERE.

Action 1 : Recrutement des poulains et isolement de Vésicules Extracellulaires

Action 2 : Caractérisation des Vésicules Extracellulaires

Action 3 : Capacité des Vésicules Extracellulaires à moduler la réponse immunitaire des macrophages