

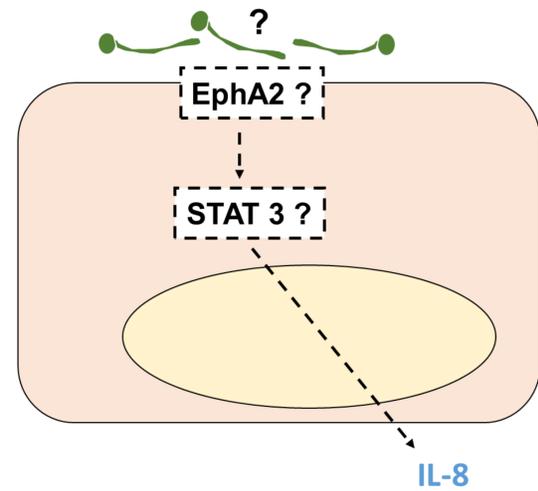
Identification des récepteurs cellulaires et des ligands fongiques impliqués dans la synthèse d'IL-8 par les cellules épithéliales bronchiques infectées par *Aspergillus fumigatus*.

Jeanne Bigot¹ (jeanne.bigot@aphp.fr), Eloi Poucet², Audrey Moreau³, Loïc Guillot², Juliette Guitard¹, Christophe Hennequin¹, Harriet Corvol³, Thierry Fontaine⁴, Viviane Balloy²

¹Service de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, 75012 Paris, France, ²Sorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, Paris, France, ³Sorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, AP-HP, Hôpital Trousseau, Service de Pneumologie Pédiatrique, F-75012 Paris, France, ⁴Unité Biologie et pathogénicité fongiques - Institut Pasteur

Introduction

Aspergillus fumigatus (*A.f*) se propage sous forme de spores qui peuvent pénétrer dans le tractus respiratoire où elles sont éliminées par l'immunité innée. Nous avons montré que les cellules épithéliales bronchiques (CEB), premières cellules respiratoires à entrer en contact avec les pathogènes, reconnaissent les filaments d'*A.f* induisant la synthèse d'IL-8, une chimiokine pro-inflammatoire (Balloy *et al.*, 2008). Notre but est d'identifier les récepteurs cellulaires, les ligands fongiques et les voies de signalisation impliqués dans la réponse inflammatoire des CEB infectées par *A.f*. Le récepteur ephrin type-A récepteur 2 (EphA2), identifié dans des cellules épithéliales orales, est décrit pour interagir avec le β -glucane de *Candida albicans* (Swidergall *et al.*, 2021), et pour activer le facteur de transcription STAT3. En nous appuyant sur cette étude, nos objectifs ont été d'analyser l'activation d'EphA2 et son implication dans la synthèse d'IL-8 lors de l'infection de CEB par *A.f*, de rechercher l'implication de STAT3 dans la synthèse d'IL-8, et d'identifier les composés pariétaux purifiés d'une souche d'*A.f* responsables de la synthèse d'IL-8.

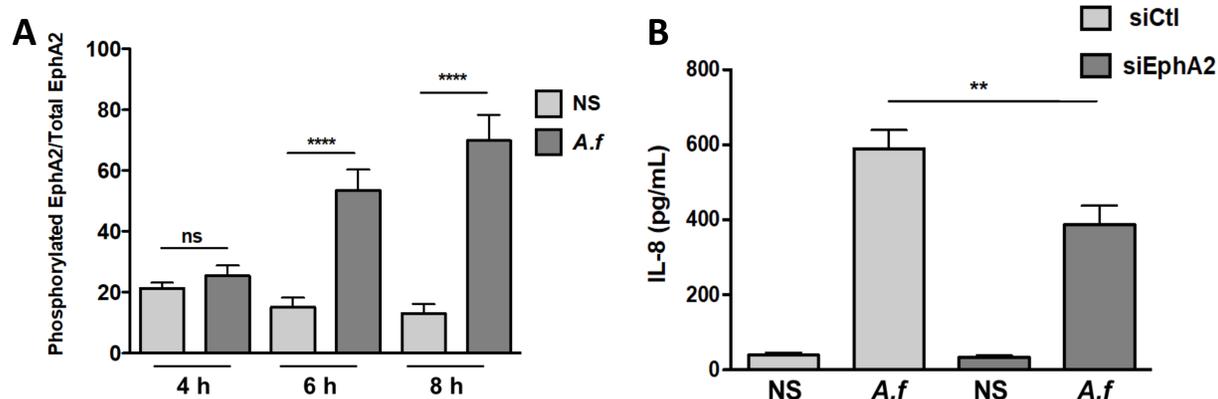


Matériels et Méthodes

Les CEB de la lignée BEAS-2B, cultivées dans du milieu F12 supplémenté en antibiotiques et sérum de veau foetal, ont été infectées avec 3×10^6 spores/mL d'*A.f* (souche DAL-référencée CBS 144.89). Cette souche a été repiquée de façon stérile tous les 7 jours, à partir d'une culture primaire et cultivée en boîte de pétri, à température ambiante sur milieu agar contenant 2% de malt. La phosphorylation de EphA2 a été mesurée par Western Blot, après 4, 6 et 8 heures d'infection des CEB. Les CEB ont été transfectées pendant 48 heures avec un siARN spécifique de EphA2 (10 nM) afin d'étudier son implication dans la synthèse d'IL-8. Un inhibiteur de STAT3, le niclosamide (0,5 μ M), a été utilisé afin d'étudier son rôle dans l'activation des CEB infectées par *A.f*. Les composés pariétaux purifiés de paroi d'*A.f* ont été fournis par le Dr Fontaine. L'IL-8 a été dosé par la méthode ELISA dans les surnageants cellulaires après 15 heures d'infection des CEB par *A.f*.

Résultats

1 - Etude de l'implication d'EphA2 dans l'activation des CEB infectées par *A. fumigatus*



Moyenne \pm SEM, n = 3 en triplicate; **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, ns : non-significatif (ANOVA test, correction de Bonferroni).

A : Mesure de la phosphorylation de EphA2 : Quantification des western-blot de EphA2-phosphorylé par rapport à EphA2-Total, de CEB infectées, ou non (NS) pendant 4, 6 ou 8h par *A.f*.

A.f induit la phosphorylation de EphA2 dès 6h d'infection.

B : Rôle de EphA2 dans la synthèse d'IL-8 : Transfection des CEB avec un siARN contrôle (siCtl) ou EphA2 (siEphA2) pendant 48 heures, puis infection ou non (NS) par *A.f* pendant 15h.

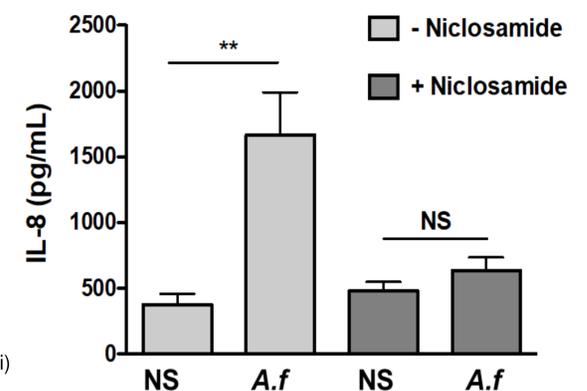
L'inhibition de EphA2 induit une diminution significative de synthèse d'IL-8 des CEB infectées par A.f.

2 - Etude de l'implication de STAT3 dans la synthèse d'IL-8 par les CEB infectées par *A. fumigatus*

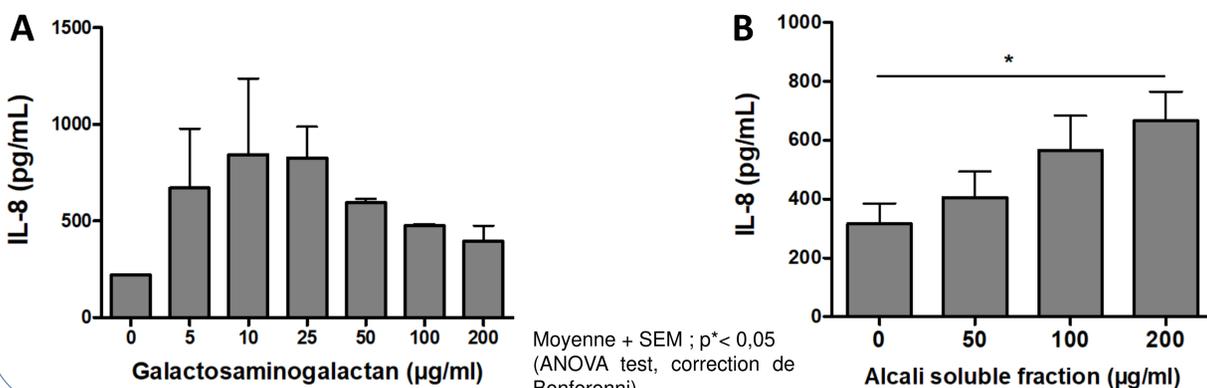
Prétraitement des CEB avec à 0.5 μ M de niclosamide pendant 1h, puis infection ou non (NS) par *A.f*. Mesure de la synthèse d'IL-8 dans les surnageants après 15 h d'infection.

L'inhibition de STAT3 induit une diminution significative de la synthèse d'IL-8 par les CEB infectées par A.f.

Moyenne + SEM, n = 3, en triplicate; **p< 0,01 ; ns : non-significatif (ANOVA test, correction de Bonferroni)



3 - Identification des composés pariétaux d'*A. fumigatus* impliqués dans l'activation des CEB



Moyenne + SEM ; p* < 0,05 (ANOVA test, correction de Bonferroni).

Mesure de la synthèse d'IL-8 par les CEB stimulées pendant 6 h par le galactosaminogalactanne (GAG) (n = 2), en triplicate (A) et une fraction alcali soluble (n= 6), en triplicate (B).

Le galactosaminogalactanne semble induire la synthèse d'IL-8 aux faibles concentrations (5-25 μ g/mL). Cette synthèse diminue lorsque les CEB sont stimulées avec de plus fortes concentrations (50-200 μ g/mL). La fraction alcali soluble, qui contient majoritairement des alpha 1-3 glucanes, induit la synthèse d'IL-8 à 200 μ g/mL.

Conclusions/Perspectives : Pour la première fois, nous démontrons dans cette étude, l'activation d'EphA2 et l'implication du facteur de transcription STAT3 dans la voie de synthèse de l'IL-8 des CEB infectées par *A. fumigatus*. De plus, deux fractions isolées d'*A.f* sur l'ensemble utilisé dans cette étude, à savoir GAG et la fraction alcali soluble, engendrent la synthèse d'IL-8 par les CEB. Nos objectifs sont maintenant d'étudier l'interaction de ces composés pariétaux avec EphA2 et des co-récepteurs potentiels et d'identifier précisément les voies de signalisation activées lors de cette interaction.