

[COVID Information Commons \(CIC\) Research Lightning Talk](#)

Transcript of a Presentation by Harvey Pollard (Uniformed Services University School of Medicine), December 9, 2024



Title: [COVID-19 airway inflammation is due to Spike inhibition of CFTR signaling](#)

[Harvey Pollard CIC Database Profile](#)

NIH Award #: [1R01HL167048-01](#)

[YouTube Recording with Slides](#)

[December 2024 CIC Webinar Information](#)

Translation Editor: Lauren Close

Transcript

Slide 1

Merci, bonjour à tous, ou bon après-midi. Le titre de cette conférence est : « L'inflammation des voies respiratoires du COVID-19 est due à la signalisation CFTR par la protéine Spike du SARS-CoV-2 ». Puisque nous vivons tous la pandémie de COVID, beaucoup de choses ne vous seront pas inconnues. Mais CFTR est peut-être nouveau. C'est le nom d'une mutation protéique qui provoque une maladie appelée fibrose kystique. C'est quelque chose sur lequel nous travaillons.

Il est difficile de se souvenir, en fait, du nom de cette protéine, car les personnes qui l'étudiaient au début, à l'hôpital pour enfants malades de Toronto, n'avaient aucune idée de ce qu'elle faisait. Ils écoutaient une station de rock, CFTR, Canadian Frequency Toronto, 680 sur le cadran AM, et ils ont décidé de l'appeler CFTR. C'est ainsi que je me souviens du nom – c'est une façon de donner des informations sur ce que les gens faisaient autrefois lorsqu'ils ne savaient pas exactement ce qu'ils faisaient. Quoi qu'il en soit, la protéine elle-même est vraiment essentielle, car de nombreuses protéines ou gènes présents dans les maladies rares sont rares parce qu'il est difficile de vivre sans eux. Nous sommes rejoints par des collègues de l'USAMRI, l'Institut de recherche médicale de l'armée américaine sur les maladies infectieuses, où sont étudiés les virus les plus dangereux. Nous avons pu le faire – c'est une collaboration – et l'article sur lequel reposent la plupart des données dont je vais parler a récemment été publié dans des rapports scientifiques. Hung Caohuy et al. est cité en bas de cette diapositive.

Slide 2

Les objectifs de ce projet étaient de comprendre, tout d'abord, le mécanisme par lequel la tempête de cytokines pro-inflammatoires dans les voies respiratoires de la COVID-19 se produit. Elle est essentiellement mortelle. Deuxièmement, de trouver une stratégie thérapeutique pour supprimer la tempête. Au fait, si vous voyez le trimère de pointe bouger, c'est qu'il est censé bouger, ce ne sont pas vos yeux.

Slide 3

Tout d'abord, nous avons développé un test in vitro pour la liaison de la protéine Spike à l'ACE2. Ensuite, nous avons recherché des médicaments candidats qui pourraient bloquer l'interaction. Enfin, nous avons découvert que les glycosides cardiaques tels que la digitoxine, la digoxine ou l'ouabaïne étaient de puissants inhibiteurs de la liaison Spike-ACE2. Après avoir passé en revue de nombreuses études portant sur la liaison, nous nous sommes demandé si l'un de ces médicaments approuvés dans le monde entier – et la digoxine sous licence est autorisée ici aux États-Unis – interférait réellement avec l'infection.

Slide 4

Cette diapositive montre que l'infectiosité du virus de la grippe est inhibée par la digitoxine et d'autres glycosides cardiaques dans les cellules pulmonaires humaines - la cellule A549, très typique. En haut se trouve une série de courbes dose-réponse. L'axe des x représente la concentration du médicament et l'axe des y en vert représente les valeurs inhibitrices, ou valeurs K12, essentiellement. En haut se trouve une série de courbes dose-réponse. L'axe des x représente la concentration du médicament et l'axe des y en vert représente les valeurs inhibitrices K1, essentiellement les valeurs CE50 pour les trois médicaments glycosides cardiaques. Elles se situent dans des plages de concentration utilisées pour traiter l'insuffisance cardiaque, ce qui est intéressant. La couleur rouge représente la cytotoxicité. Elle est environ dix fois supérieure aux valeurs CE50 inhibitrices respectives, ce qui signifie que vous pouvez utiliser ces médicaments sans inhiber les cellules. Les deux cases ci-dessous sont les noyaux stéroïdiens qui accompagnent ces médicaments moins les sucres. Ils ne sont pas très efficaces. Cela a été publié dans des rapports scientifiques en 2021, nous sommes donc très heureux de voir que nous avons pu réellement transmettre certaines expériences in vitro à quelque chose qui se rapprochait de l'in vivo.

Slide 5

Il existe des informations préliminaires supplémentaires sur le gène CFTR que je souhaite souligner. Il s'agit d'un gène responsable du contrôle de l'inflammation dans la fibrose kystique, une maladie génétique rare. Et comme nous le verrons dans les prochaines diapositives, il est essentiel au contrôle de l'inflammation dans les voies respiratoires des personnes atteintes de la COVID-19.

Slide 6

Je vais juste lire la première partie parce qu'elle dit ce que je veux dire et nous continuerons. Au début de la pandémie de COVID-19, on a découvert que la tempête mortelle de cytokines était due à l'activation de la voie TNF alpha et NF Kappa B, mais personne ne savait comment cela s'était produit.

Au milieu de cette diapositive, vous pouvez voir une voie de signalisation qui commence par le TNF alpha, qui se lie ensuite à un récepteur TNF dans la membrane de la cellule. Là, il se connecte en fait au premier adaptateur intracellulaire, une molécule appelée TRADD. Le DD signifie Death Domain, vous savez, très déconcertant. Cette molécule est un directeur essentiel pour acheminer tous ces signaux du TNF alpha vers l'IKK'some qui se lie ensuite, ou se phosphoryle à I kappa B alpha, libère suffisamment de Kappa B, qui se déplace dans le noyau et génère toutes ces cytokines - IL-6, IL-8, TNF alpha et un tas d'ARNm, qui sont ensuite synthétisés et sécrétés dans les voies respiratoires et dans le reste du corps. En fait, dans le contexte d'une tempête de cytokines, nous avons, en étudiant cette situation avec la mucoviscidose, découvert que certains cherchaient des médicaments candidats contre-productifs comme la digitoxine - nous vous avons déjà montré qu'ils interfèrent avec l'infection. Nous avons découvert que la digitoxine, la digoxine et l'ouabaïne bloquent essentiellement ce processus. Vous pouvez voir en lettres rouges et en petit bloc, la jonction en T, que lorsque vous créez un complexe binaire entre le TNF alpha et le TNFR1, il veut se lier à TRADD mais il ne le peut pas. Les premières expériences ont donc été réalisées sur des cellules HeLa ordinaires et ont permis de déterminer où se trouvait le problème. L'une des fonctions du CFTR est de bloquer la molécule TRADD et d'inhiber ainsi la tempête de cytokines dans les voies respiratoires de la mucoviscidose. Mais en fait, comme la digitoxine et le CFTR agissent tous au même endroit, les médicaments reproduisent ou imitent essentiellement le CFTR. Nous avons émis l'hypothèse que la tempête de cytokines du COVID-19 était due à la perte du CFTR et que les glycosides cardiaques, qui imiteraient essentiellement le CFTR, pourraient être thérapeutiques.

Slide 7

La question était donc de savoir si l'exposition à la protéine Spike réduit le CFTR. Nous avons en fait réalisé cette expérience en utilisant un organoïde pulmonaire humain préparé à l'interface air-eau. Vous placez des cellules basales que nous avons obtenues d'un collègue dans cette interface air-eau et, au cours de 28 jours d'élevage, vous faites pousser un bel épithélium. Vous pouvez voir des cellules caliciformes, des cellules auxiliaires et d'autres types de cellules vérifiées par immunofluorescence ci-dessous. Sur le côté droit, nous avons utilisé des analyses Western blot des effets de la protéine Spike sur les niveaux de CFTR. Le long de l'axe horizontal, nous avons augmenté la concentration dans la première colonne supérieure, A, la protéine Spike ancestrale ou originale de Wuhan. Elle provoque une perte de CFTR dépendante de la dose, significativement dépendante de la dose. Nous avons ensuite examiné une souche beaucoup plus puissante biologiquement. Il s'agit de la souche sud-africaine Beta, beaucoup plus puissante, comme il s'est avéré, en tant que virus COVID. Beaucoup plus puissante pour réduire le CFTR. Vous voyez la différence dans les graphiques à barres et dans les tracés Western. Nous avons donc conclu que l'exposition à la protéine Spike réduit les niveaux de CFTR.

Slide 8

La question suivante était de savoir si les protéines de pointe activent la signalisation pro-inflammatoire NF kappa B. Eh bien, dans le graphique que j'ai montré des voies de signalisation, il y a une série de protéines. En commençant par le haut, TNF Alpha, TRADD, etc. Ces protéines sont activées si la CFTR est perdue. Lorsque vous augmentez la concentration de la protéine de pointe, encore une fois, nous utilisons ici la souche de Wuhan, toutes ces flèches rouges sur la gauche montrent en fait les endroits où une augmentation se produit. Si vous regardez, vous verrez que TRADD augmente en fait. Au final, l'IL-8, qui est l'une des cytokines que nous avons mesurées, augmente également. Donc oui, la protéine de pointe active la signalisation pro-inflammatoire NF kappa B.

Slide 9

C'est là que nos collègues de l'USAMRI nous ont été utiles. Les glycosides cardiaques protègent-ils les cellules épithéliales de la perte de CFTR par le virus natif ? Sur le côté gauche, vous verrez un graphique Western. Divers éléments sont ajoutés au milieu. Là où il est écrit « virus uniquement », vous verrez que le niveau d'intensité de cette bande CFTR, dans ce cas-ci le dimère, est considérablement réduit par rapport au témoin moyen et que la digitoxine et l'ouabaïne augmentent les niveaux. Le graphique à barres montre essentiellement des choses très similaires. Elles sont toutes basées sur quatre expériences indépendantes. La situation réelle ici est qu'il est très bien pour nous de faire des expériences avec des protéines Spike, mais il est très important de vérifier que cela se produit dans de vrais virus et de vraies maladies. C'était quelque chose que nous voulions montrer et valider.

Slide 10

La question suivante est : « Comment Spike se lie-t-il uniquement à l'ACE2, mais affecte-t-il également les niveaux de CFTR ? » Comment cela est-il possible ? Une possibilité était que le CFTR existant était peut-être lié à l'ACE2 dans la membrane cellulaire. Il s'avère que oui, il est lié à l'ACE2. Le côté gauche de cette figure montre qu'en fait, CFTR et ACE2 se trouvent à la fois dans les cellules basales qui composent l'épithélium différencié et dans l'épithélium indifférencié. Le CFTR est là, l'ACE2 et en fait tout ce dont vous avez besoin pour avoir une bonne infection (tant que vous pouvez appeler une infection bonne). Sur le côté droit, cela montre que si vous prenez un anticorps contre l'ACE2 et que vous l'immunoprécipitez, puis que vous testez cet immunoprécipité pour le CFTR lié, vous pouvez bien sûr trouver beaucoup de CFTR. Ce sont deux expériences en double, le NRS est simplement du sérum de rat normal. Vous pouvez également trouver du CFTR immunoprécipité uniquement dans les cellules basales, il est donc essentiellement accessible dans toutes les différentes parties de l'épithélium.

Slide 11

Je voudrais faire une pause ici pour rappeler ou souligner à tout le monde que le CFTR est un canal chlorure activé par l'AMP cyclique. Ce canal est essentiel pour maintenir l'hydratation des voies respiratoires. Lorsque le canal n'est pas présent, les voies respiratoires s'assèchent et une inflammation se produit. Dans ce cas particulier, nous avons la protéine CFTR à la surface de la

cellule. En haut se trouvent les voies respiratoires, en bas se trouve l'intérieur de la cellule. La norépinéphrine ou l'épinéphrine peut se lier à une protéine - une autre protéine qui se lie au CFTR est appelée récepteur bêta-2 adrénergique. Cela génère de l'AMP cyclique, la protéine kinase A est activée. Elle marque ensuite les phosphorélates avec le CFTR. L'activité du canal est activée. Vous pouvez voir une molécule de chlorure sortir.

Pourquoi est-ce que je montre cela ? Eh bien, si la protéine est perdue, on s'attend à ce que l'activité du canal soit également perdue. C'est une sorte de test. Est-il vraiment vrai que la protéine Spike réduit et supprime tout ce qui est associé au CFTR ?

Slide 12

Sur le côté droit, il y a essentiellement une expérience de chambre classique. Mais nous pourrions en fait regarder l'axe horizontal sur le côté gauche - c'est une évolution temporelle et l'axe vertical est l'activité de transport du chlorure d'un côté de l'interface liquide vers le côté air. Si vous ajoutez un peu d'IBMX ou quelque chose pour stabiliser le [inaudible], le vert - le canal s'ouvre. Vous pouvez voir un très beau signal. Si vous vous tournez et ajoutez un inhibiteur de CFTR, il diminuera, mais si vous ajoutez une protéine de pointe, vous perdez environ 50 % du signal. Dans cette expérience, la pointe est Wuhan, donc c'est la moins puissante d'entre elles, mais si vous ajoutez de l'ouabine ou de la digitoxine ou de la digoxine à cette culture cellulaire qui se cultive pendant 24 heures, l'effet de pointe est perdu. Sur le côté droit, vous pouvez voir cette histoire avec les graphiques à barres, mais juste en dessous de l'endroit où il est écrit "CFTR", vous pouvez voir que lorsque vous avez ajouté la pointe, vous obtenez encore moins de CFTR. Ainsi, la protéine Spike provoque la perte de la protéine CFTR dans le même système et la perte de protéine CFTR est compensée par le traitement de l'épithélium avec les trois glycosides cardiaques. La perte d'activité du canal et la perte de protéine se produisent toutes en même temps. Cela signifie que nous pensons avoir résolu le concept selon lequel la protéine Spike, et le virus d'ailleurs, ont réduit les niveaux de CFTR.

Slide 13

Nos conclusions sont que les données soutiennent l'hypothèse selon laquelle la tempête de cytokines de la COVID-19 est due à la perte de CFTR. La deuxième conclusion est que la perte de CFTR active TRADD pour piloter la signalisation TNF α /NF kappa B. La digitoxine, la digoxine et l'ouabaine étaient peut-être thérapeutiques, d'abord en bloquant l'infection, en empêchant le virus de se lier à l'ACE2, et ensuite en inhibant l'inflammation, en inhibant TRADD, et en remplaçant ainsi le CFTR perdu. Nous suggérons que l'avantage du glycoside cardiaque est qu'il s'agit d'une famille de médicaments avec deux activités thérapeutiques candidates simultanées pour la COVID-19.

Slide 14

Nous devons avoir ces remerciements. En partie, notre laboratoire des services uniformes et aussi les laboratoires Herbert et Florez de l'USAMRIID. Nous devons également avoir une clause de non-responsabilité du ministère de la Défense qui mentionne le fait que nous n'essayons pas de vendre quoi que ce soit à qui que ce soit. Nous vous en remercions.

Slide 15

Merci – je répondrai avec impatience à toutes vos questions plus tard dans la présentation.