



HAL
open science

Etude des différences fonctionnelles entre les granulocytes matures et immatures sur l'induction de la réponse SOS bactérienne au cours de la phase aigüe du sepsis

Stecy Chollet

► **To cite this version:**

Stecy Chollet. Etude des différences fonctionnelles entre les granulocytes matures et immatures sur l'induction de la réponse SOS bactérienne au cours de la phase aigüe du sepsis. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2022. Français. NNT : 2022LIMO0075 . tel-03935913

HAL Id: tel-03935913

<https://theses.hal.science/tel-03935913>

Submitted on 12 Jan 2023

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.



Université de Limoges
ED 652 – OMEGALIM – Biologie-Chimie-Santé (BCS)
UMR Inserm 1092
RESINFIT – Anti-infectieux : supports moléculaires des résistances
et innovations thérapeutiques

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges
Immunologie, oncologie, inflammation et infectiologie

Présentée et soutenue par
Stecy CHOLLET

Le 18 novembre 2022

**Etude des différences fonctionnelles entre les
granulocytes matures et immatures sur l'induction de la
réponse SOS bactérienne au cours de la phase aigüe
du sepsis**

Thèse dirigée par
Le Professeur Marie-Cécile PLOY et le Docteur Robin JEANNET

Jury de thèse

Président

M. Jean FEUILLARD, PU-PH, UMR CNRS 7276 – INSERM 1262, Université de Limoges

Rapporteurs

Mme. Bénédicte PY, CR, INSERM U1111 – CNRS UMR 5308, Université de Lyon

M. Christophe PAGET, CR, UMR INSERM U1100, Université de Tours

Examineur

M. Eric OSWALD, PU-PH, UMR INSERM 1220 – UMR 1416, Université de Toulouse

« Vous n'avez cessé d'essayer ?

Vous n'avez cessé d'échouer ?

Aucune importance !

Réessayez, échouez encore,

Echouez mieux. »

Samuel Beckett

Remerciements

Je souhaite dans un premier temps remercier les membres du jury qui ont accepté de faire le déplacement jusqu'à Limoges le jour de ma soutenance. Je remercie le Dr Bénédicte Py et le Dr Christophe Paget d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse en tant que rapporteur, en espérant que la lecture de ce manuscrit vous a été agréable. Je remercie le Pr Éric Oswald et le Pr Jean Feuillard d'avoir accepté de juger mon travail de thèse en tant qu'examinateur.

Je tiens tout particulièrement à remercier le Pr Marie-Cécile Ploy qui a fait renaître mon espoir pour réaliser une thèse au sein de son laboratoire, mais également pour sa bienveillance, son accompagnement au cours de la thèse, ses conseils qui ont été très enrichissants et encourageants durant ces 3 années, et qui a su me rassurer dans les dernières semaines de rédaction.

Je souhaite sincèrement remercier le Dr Robin Jeannet sans qui cette thèse n'aurait pas vu le jour et sans qui je ne me serais pas perfectionnée dans le monde des neutrophiles. Un grand merci pour ton encadrement, ta bonne humeur, tes petites taquineries pendant ces 3 années, ton soutien dans mes calculs de dilution ou quand j'avais un doute sur le sujet, ton partage de connaissances, tes conseils pour l'après-thèse et surtout pour ta patience qui a été mise à rude épreuve pendant 3 ans et surtout pendant les corrections de mon manuscrit. Sincèrement merci, d'avoir pris le temps de partager avec moi cette passion pour l'immunologie et d'avoir supporté mon manque de patience.

Je remercie tous les membres de RESINFIT – UMR 1092 de m'avoir accueilli malgré le fait d'avoir un bureau qui ne se situe pas au même étage. J'ai tout de même réussi à m'intégrer grâce à votre gentillesse et bienveillance. Le partage de quelques repas ensemble a pu me permettre de vous connaître un peu plus et à vous de mettre un prénom sur un fantôme :P D'en apprendre plus sur le monde de la bactériologie, même-ci les intégrons restent encore un domaine obscur pour ma part.

Je souhaiterais remercier le Pr Jean Feuillard qui m'a permis d'occuper ses locaux en tant que membre de l'équipe UMR 7276 où j'ai pu facilement m'intégrer.

Je remercie également tous les membres de CRIBL – UMR 7276 qui m'ont vu déambuler dans les couloirs sans faire partie officiellement de l'équipe mais qui ont sûrement m'intégrer à chaque réunion, pot de départ, soutenance de thèse, secret santa et les repas de Noël avant et après la Covid.

Je remercie tous les membres de l'association ADPlim, Camille, Amine, Géovani, Héloïse, Gemma, Thomas, Clarisse, Milène, Kenza, Lucie, Clément, Léa et Valentin avec qui j'ai pu partager d'agréable moment et où nous avons pu organiser de superbes évènements. Et surtout un merci à Valentin mon vice-président qui a toujours été là pour m'épauler, m'encourager et me rassurer sans qui l'asso n'aurait pas pu mieux fonctionner.

Merci au JEDI, Cédric, Aurélien, Valentin, Issoufou, Julie et Dylan avec qui j'ai pu partager de superbes moments tant pour les évènements que pour les soirées. Un projet fou qu'a été d'organiser la première édition des JEDI, pendant la Covid, des discussions seulement par visio, une première rencontre le jour de l'évènement, mais on aurait dit des amis d'enfance qui se retrouvaient.

Je tiens à remercier Clarisse, Milène et Kenza qui m'ont encouragé et soutenue que cela soit pour l'asso ou dans les moments durs de l'écriture de la thèse. Un grand merci à Kenza avec qui je peux discuter de tout et qui est devenue une petite sœur de cœur, tu es une personne formidable, ne perd pas confiance en toi, tu vas accomplir de magnifiques choses durant ta thèse. Merci à Clarisse, la pépite, qui a toujours le mot pour faire rire. Tu vas gérer en tant que nouvelle présidente de l'association, j'ai toute confiance en toi.

Merci aux filles du troisième, Linda, Lucie et Jessie pour vos longues discussions variées et diverses dans votre bureau, je me suis sentie comme chez moi avec vous. Mais merci à Lucie avec qui j'ai pu partager 2 ans à mes côtés dans l'association et surtout pour l'organisation de ce gala, mon dieu ... et merci d'avoir été là dans les derniers moments du manuscrit. Linda, merci pour tes conseils et ta bienveillance durant ces 3 années de thèse, toujours là pour les autres, je suis extrêmement ravie que tu sois revenu au CBRS, tu es une personne en or.

Je remercie Catherine et Roussine, pour partager les repas le midi, dans la joie, la colère et les rires. De plus en plus nombreux à table, et que des doctorants, attention on va croire que l'on monte un complot :P Mais cela fait un bien fou de passer un repas en votre compagnie, c'est une source de fraîcheur chaque midi. Merci également à Nader pour tes petites apparitions de temps en temps pour manger avec nous.

Merci à Lucie Paulus, *ma moule*, pour m'avoir appris comment enseigner le TP enzymo et de m'avoir accompagné pendant ces 2 années au concours de l'ED pour recruter les petits nouveaux doctorants tout frais avec plein d'espoir. Que de fou rire pendant ces auditions, mais également en dehors à partager de bon repas autour de rire et commérage, courage pour cette dernière année, tu peux y arriver.

Merci à ma petite Cassandra, qui a su apporter la joie de vivre dans ce laboratoire. Tu es une personne formidable, reste comme tu es.

Un énorme merci à mon bureau 138, ou comme dirait Jennifer « le bureau des grands-parents ». **LE** bureau où j'ai passé plus d'heures que dans mon propre appartement entouré de collègues devenu des amis puis une famille. Donc je souhaiterais remercier Lilian, malgré le fait que l'on est passé seulement un an ensemble, tu as été le premier contact que j'ai eu en arrivant dans l'équipe et avec qui j'ai développé une belle amitié, ta photo est encore dans le bureau. Merci à Quentin, le petit dernier du bureau 138 avec qui une amitié est née, des fous rires et des conversations on ne peut plus sérieuses, sans oublier notre trio de choc avec la mère Prévaud. Merci à Israa et Jennifer qui ont su me faire découvrir leur culture, leur langue et leur bon petit plat libanais, on a réussi à ne pas finir obèse à la fin de cette thèse, ahahaha. Vous êtes des filles formidables avec qui j'ai pu avoir de grandes conversations, Israa a ouvert le bal des soutenances, après moi c'est ton tour ma petite « Jeni-Jeni-Fer » :P Un grand merci à une dernière personne présente dans ce bureau et qui compte beaucoup pour moi : ma petite Léa, ma partenaire dans tous les domaines et avec qui j'ai faits les 400 coups, jamais l'une sans l'autre. Tellement de partage de paroles, de fou rire, de soirées et j'en passe car la liste est très longue et je n'ai pas forcément envie de le dire ici. Une complicité est née entre nous et on a passé quasi tout notre temps ensemble au point que l'on finissait par dire la même chose. Je te remercie infiniment de m'avoir supporté à chaque moment de cette thèse, de m'avoir embarqué dans tes plans les plus fous mais qui en valait la peine et avec qui une complicité est née. Une amitié hors normes est née entre nous tous dans ce bureau, les post-it laissés les soirs, la guirlande « Joyeux anniversaire », les cadeaux, les petites conversations privées et secrètes, les petites sucreries qui font du bien au moral et surtout notre magnifique porte. Tellement de bon moment partagé avec vous dans ce bureau, en passant par la joie, la colère, la tristesse, la fatigue, mais qui m'a permis d'avancer durant ces 3 années de thèses.

Je ne peux pas terminer ces remerciements sans dire un majestueux merci à ma partenaire, ma sœur de thèse ou *thesis sister* sans qui le projet n'aurait pas pu avancer : Ana Catalina ! Deux inconnues + Un sujet = un projet réussi avec la naissance de 2 sœurs de cœur. Trois belles années partagées avec toi ma petite Catalina, des heures interminables passer devant le cytomètre à manger, chanter, dormir, pleurer et rires. Des mises au point à s'en arracher les cheveux, de longues heures d'écritures pour notre article, des idées farfelues pour faire avancer le projet, des weekends et des jours fériés passés au laboratoire, la réalisation de superbes présentations, rien n'aurait été possible sans toi. Mais aussi des moments à se soutenir, se tirer vers le haut, s'encourager, terminer les phrases l'une de l'autre et finir par se comprendre en un seul regard. Nous avons tellement partagé ensemble que je ne peux tout décrire ici, merci infiniment d'avoir été là dans les bons comme les mauvais moments, grâce à toi mon niveau d'anglais s'est amélioré et j'ai pu apprendre un peu de mot en espagnol. Résultat de ces 3 années, une grande amitié est née et tu n'es pas prête de te débarrasser de

moi comme ça. Una amistad para toda la vida, porque te has convertido en una hermana de corazón.

Je terminerais ces remerciements par remercier mes parents et mes sœurs de m'avoir soutenue pendant tout mon cursus universitaire et d'être présent le jour de ma soutenance pour clore ce chapitre universitaire. Notre complicité tous les 5 fait que je n'aurais pas pu soutenir sans votre présence. Vous m'avez toujours soutenu, suivi dans chaque ville où je réalisais mes études, et je vous suis infiniment reconnaissant.

Un petit merci à Flanelle, mon petit chat d'amour, qui m'a suivi partout durant 8 ans et qui avec ses ronronnements et sa présence m'a aidé à ne pas devenir folle et surtout m'a apaisé.

Et grand merci à mon fiancé, Guillaume, qui malgré la distance qui nous a séparés pendant ces 3 années, tu as su me soutenir, m'épauler, me rassurer, me consoler, et me motiver à terminer cette thèse. Merci infiniment de ta présence qui a su me ramener à la raison, de me faire sourires, rires, de partager la découverte de nouvelles cultures, car oui on en a visité des pays pendant ces années de thèse. Bientôt ça sera toi qui soutiendras pour ensuite nous envoler vers de nouvelles aventures.

Merci à tous ceux que j'ai pu oublier de citer et que j'ai pu rencontrer durant ma thèse et mes 3 années à Limoges.

Droit d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Remerciements	4
Droit d’auteurs	8
Table des matières	10
Table des illustrations	16
Table des tableaux	20
Abréviations	22
Introduction	26
Chapitre 1 Les granulocytes neutrophiles	26
I. Granulopoïèse	26
I.1. Production et développement des granulocytes dans la moelle osseuse	27
I.1.1. Les facteurs responsables de la différenciation des granulocytes	27
I.1.2. Composition des granules bactéricides	30
I.1.3. Les différents marqueurs au cours de la différenciation.....	32
I.2. Libération des neutrophiles dans la circulation sanguine	32
I.2.1. Les récepteurs impliqués dans la libération des neutrophiles	33
I.2.2. Les cytokines et facteurs impliqués dans la libération des neutrophiles en absence d’une réponse immunitaire	34
I.3. Devenir des neutrophiles en absence d’une réponse immunitaire	34
I.3.1. Les différents marqueurs et récepteurs exprimés en absence d’une réponse immunitaire	34
I.3.2. Apoptose des neutrophiles	36
II. Les récepteurs impliqués dans la réponse immunitaire par les neutrophiles	38
II.1. Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR)	38
II.2. Récepteurs Fc γ R.....	41
II.2.1. Récepteur Fc γ RIIb (CD32b)	43
II.2.2. Récepteur Fc γ RIIIb (CD16b)	44
II.2.3. Clivage du récepteur Fc γ RIIIb (CD16b)	45
II.3. Récepteurs aux compléments	46
II.4. Récepteurs couplés aux protéines G (GPCR)	48
II.5. Récepteurs aux cytokines	51
III. Fonction des neutrophiles	54
III.1. Dégranulation.....	54
III.2. Phagocytose	56
III.3. Nétose.....	58
III.4. Production de chimiokines et cytokines	60

III.4.1.	Chimiokines ou chimio-attractants.....	60
III.4.2.	Cytokines	61
Chapitre 2	Place des neutrophiles dans le système immunitaire	62
I.	Les deux types d'immunité chez l'Homme	62
I.1.	Immunité innée.....	62
I.2.	Immunité adaptative	64
II.	Les granulocytes dans la réponse immunitaire	65
II.1.	Introduction sur la réponse immunitaire.....	66
II.1.1.	Rolling	66
II.1.2.	Priming.....	68
II.1.3.	Rencontre avec le pathogène.....	68
II.2.	Résolution de la réponse immunitaire.....	69
III.	Production des ROS par les neutrophiles.....	72
III.1.	Différentes sources de production des ROS.....	73
III.2.	Composition du complexe NADPH oxydase.....	73
III.3.	Activation du complexe NADPH oxydase	76
III.4.	Différents ROS produits par le complexe NADPH oxydase	79
III.5.	Mutation du complexe NADPH oxydase.....	82
Chapitre 3	Les granulocytes dans le sepsis.....	84
I.	Introduction.....	84
II.	Dysfonctionnement des cellules de l'immunité chez les patients septiques.....	86
II.1.	Système immunitaire altéré	86
II.1.1.	Les cellules du système immunitaire innée affectées par le sepsis	86
II.1.2.	Les cellules du système immunitaire adaptatif affectées par le sepsis.....	87
II.1.3.	Granulopoïèse d'urgence	88
II.1.3.1.	Les voies d'activation de la granulopoïèse d'urgence	89
II.1.3.2.	Les facteurs déclenchant la granulopoïèse d'urgence	91
II.2.	Dysfonctionnement des neutrophiles.....	91
II.2.1.	Une migration des neutrophiles vers le site infectieux altéré	91
II.2.2.	La phagocytose des neutrophiles septiques altérée	94
II.2.3.	La nétose des neutrophiles septiques altérée.....	95
II.2.4.	Production de ROS par les neutrophiles septiques.....	95
II.2.5.	Elimination des neutrophiles sénescents par apoptose	96
II.3.	Les granulocytes immatures dans le sepsis	98
II.4.	Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC).....	100
III.	Impact de la réponse immunitaire sur la bactérie <i>Escherichia coli</i>	102
III.1.	La bactérie <i>E.coli</i>	102

III.2.	Système SOS.....	103
III.2.1.	Impact des antibiotiques et des ROS sur <i>E.coli</i>	103
III.2.2.	Mécanisme de la réponse SOS bactérienne.....	104
	Objectifs	108
	Matériels et Méthodes	110
I.	Différenciation de la lignée promyélocytaire HL60 en neutrophiles (HL60-neutrophile) et granulocytes immatures (HL60-GI)	110
I.1.	La lignée promyélocytaire HL60	110
I.2.	Culture cellulaire de la lignée promyélocytaire (HL60).....	110
I.3.	Différenciation des HL60 en granulocytes immatures et neutrophiles.....	110
I.4.	Tri cellulaire des HL60-GI et HL60-GM.....	111
II.	Echantillons de donneurs sains, de donneurs de cellules souches hématopoïétiques, de patient CGD (maladie granulomateuse chronique) et de patients septiques	112
II.1.	Collecte des échantillons sanguins de donneurs sains, de donneurs de cellules souches hématopoïétiques, de patient CGD et de patients septiques	112
II.2.	Isolation des granulocytes de donneurs sains, de donneurs de cellules souches hématopoïétiques, de patient CGD et de patients septiques	113
II.3.	Analyse de la morphologie des granulocytes immatures de patients septiques	114
II.4.	Immunophénotypage des granulocytes après stimulation avec <i>E.coli</i>	115
III.	Analyses fonctionnelles des granulocytes en présence de la souche <i>E.coli</i>	116
III.1.	Modèle d'incubation entre les granulocytes et <i>E.coli</i>	116
III.2.	Evaluation de la phagocytose des granulocytes	116
III.3.	Evaluation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).....	116
III.4.	Evaluation de la réponse SOS bactérienne	117
III.5.	Analyse par microscopie confocale	117
III.6.	Extraction de l'ARN des granulocytes triés et incubés avec <i>E.coli</i>	118
III.7.	Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) ...	118
III.8.	Western blot.....	119
III.9.	Pré-stimulation des granulocytes de donneurs sains et de donneurs de cellules souches hématopoïétiques.....	120
III.10.	Analyse de la production de ROS extracellulaire par la lignée cellulaire HL60 par chimioluminescence	120
III.11.	Analyse par l'imageur en flux (AMNIS) sur les HL60-différenciées	120
III.12.	Analyses statistiques.....	121
	Résultats	122
	Chapitre 1 Mise au point des expériences sur un modèle <i>in vitro</i> afin de caractériser les fonctions des granulocytes immatures dans un modèle d'infection	124

I.	Détermination du temps de différenciation de la lignée promyélocytaire HL60 en granulocytes immatures (HL60-GI) et neutrophiles (HL60-neutrophiles)	124
I.1.	Suivi de la différenciation des HL60 en granulocytes par coloration May-Grünwald-Giemsa	124
I.2.	Suivi de la différenciation des HL60 en granulocytes par cytométrie en flux	125
II.	Etude des fonctions antimicrobiennes des HL60-GI en présence d' <i>E.coli</i>	127
II.1.	Comparaison de la capacité à phagocyter et produire des ROS intracellulaires des HL60-GI avec les HL60-neutrophiles	127
II.2.	Etude de la production de ROS intracellulaires et extracellulaires des HL60-GI et des HL60-neutrophiles par chimioluminescence.....	129
II.3.	Comparaison des différences d'expression des gènes du complexe NADPH oxydase entre les HL60-GI et HL60-neutrophiles	130
II.4.	Comparaison des différences d'expression des protéines du complexe NADPH oxydase entre les HL60-GI et les HL60-neutrophiles	132
II.5.	Comparaison des différences d'expression de la voie d'activation des sous-unités du complexe NADPH oxydase entre les HL60-GI et HL60-neutrophiles	133
II.6.	Capacité des HL60-GI et des HL60-neutrophiles à induire la réponse SOS bactérienne de mCherry- <i>E.coli</i> dans leur phagosome	134
II.7.	Visualisation de l'induction de la réponse SOS bactérienne à l'extérieur et intérieur des HL60-GI et HL60-neutrophiles	136
Chapitre 2 Etude des fonctions antimicrobiennes des granulocytes immatures (GI) infectieux et non-infectieux et leur capacité à induire la réponse SOS bactérienne		140
I.	Etude des fonctions antimicrobiennes des GI infectieux et non-infectieux en présence de la bactérie mCherry- <i>E.coli</i>	140
I.1.	Comparaison de la capacité des GI avec les neutrophiles à phagocyter et produire des ROS intracellulaires	140
I.2.	Comparaison des différences d'expression de la voie d'activation des sous-unités du complexe NADPH oxydase entre les GI et les neutrophiles	146
I.3.	Comparaison des différences d'expression des gènes du complexe NADPH oxydase entre les GI et les neutrophiles.....	147
I.4.	Comparaison des différences d'expression des protéines du complexe NADPH oxydase entre les GI et neutrophiles	149
I.5.	Capacité des GI et neutrophiles à induire la réponse SOS bactérienne de mCherry- <i>E.coli</i> dans leur phagosome.....	150
I.6.	Visualisation de la phagocytose, production de ROS et induction de la réponse SOS bactérienne à l'intérieur des GI de patients septiques et de donneurs cellules souches hématopoïétiques.....	153
II.	Caractérisation des GI infectieux, non-infectieux et neutrophiles en présence de la souche bactérienne mCherry- <i>E.coli</i>	155
II.1.	Expression des récepteurs caractéristiques des granulocytes.....	155
II.2.	Expression d'un récepteur impliqué dans la migration des granulocytes	157
II.3.	Expression des récepteurs de phagocytose	158

II.4.	Expression des récepteurs aux chimiokines	162
II.5.	Expression de récepteur de mort.....	164
II.6.	Expression du récepteur LOX-1	165
Chapitre 3	Article	168
Discussion et Perspectives	194
Conclusion		202
Références bibliographiques	204

Table des illustrations

Figure 1 : Représentation schématique d'un neutrophile	26
Figure 2 : Hématopoïèse des cellules sanguines incluant la granulopoïèse pour le développement des neutrophiles	28
Figure 3 : Expression des facteurs de transcription au cours de la différenciation des granulocytes.....	29
Figure 4 : Résumé de la formation des granules en fonction de la maturation des granulocytes.....	31
Figure 5 : Expression des récepteurs aux chimiokines sur les granulocytes dans la moelle osseuse.....	33
Figure 6 : Libération des neutrophiles dans la circulation sanguine	35
Figure 7 : Représentation schématique de la voie intrinsèque apoptotique du neutrophile ..	37
Figure 8 : Schéma des voies de signalisation à la suite de l'activation des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR)	41
Figure 9 : Voie de signalisation après activation des récepteurs FcγR.....	44
Figure 10 : Clivage du récepteur FcγRIIIb (CD16b) après activation du neutrophile par la protéine ADAM17.....	46
Figure 11 : Représentation simplifiée de la cascade d'activation du complément via les récepteurs CR1 et CR3	48
Figure 12 : Voie de signalisation des récepteurs GPCR après leur activation.....	49
Figure 13 : Voies d'activations des récepteurs cytokiniques	53
Figure 14 : Mécanisme de fusion des granules du neutrophile avec sa membrane plasmique pour libérer les protéines antibactériennes	55
Figure 15 : Les grandes étapes de la phagocytose dans le neutrophile	56
Figure 16 : Cellules composant l'immunité innée et adaptative.....	62
Figure 17 : Mécanisme de rolling permettant aux neutrophiles de migrer sur le site du pathogène	67
Figure 18 : Voies de signalisation impliquées dans l'activation de l'apoptose et de la nécroptose pour résoudre la réponse immunitaire.....	71
Figure 19 : Représentation des domaines de liaison des 3 sous-unités cytosoliques du complexe NADPH oxydase	75
Figure 20 : Activation du complexe NADPH oxydase et production de ROS.....	79
Figure 21 : Schéma de la production des différents ROS par le complexe NADPH oxydase	81
Figure 22 : Diagramme d'identification d'un sepsis ou choc septique suite à l'arrivée d'un patient en réanimation	85
Figure 23 : Granulopoïèse d'urgence.....	89
Figure 24 : Les deux voies d'induction de la granulopoïèse d'urgence et la voie de signalisation dans le GMP	90
Figure 25 : Mécanisme d'internalisation du récepteur CXCR2 dans les neutrophiles septiques.....	93
Figure 26 : Représentation schématique de la voie apoptotique du neutrophile septique	98
Figure 27 : Différence morphologique entre le GI et le neutrophile	99
Figure 28 : Technique de séparation des granulocytes dans un échantillon sanguin	100
Figure 29 : Production de ROS et activation du système SOS chez E.coli après un stress oxydatif.....	106
Figure 30 : Stratégie de fenêtrage pour le tri des HL60-GI et des HL60-neutrophiles	112

Figure 31 : Vérification de la pureté des granulocytes de donneurs sains et de patients septiques après tri magnétique négatif par cytométrie en flux	114
Figure 32 : Analyse morphologique de la lignée cellulaire HL60 différenciée en granulocyte par coloration May-Grünwald-Giemsa	125
Figure 33 : Analyse par cytométrie en flux de l'expression des marqueurs CD11b et CD16 au cours de la différenciation de la lignée cellulaire HL60	126
Figure 34 : Stratégie de fenêtrage pour analyser la phagocytose et la production de ROS des HL60-granulocytes.....	128
Figure 35 : Phagocytose et production de ROS par les HL60-granulocytes.....	129
Figure 36 : Sécrétion des ROS par les HL60-granulocytes mesurée par chimioluminescence	130
Figure 37 : Expression des gènes du complexe NADPH oxydase par les HL60-granulocytes en absence et en présence de stimulation.....	131
Figure 38 : Expression des protéines p47phox et gp91phox par les HL60-granulocytes en absence et en présence de stimulation	132
Figure 39 : Expression des protéines kinases ERK1/2 et p38MAPK par les HL60-granulocytes en absence et en présence de stimulation.....	134
Figure 40 : Stratégie de fenêtrage pour suivre l'induction de la réponse SOS dans les HL60-granulocytes ayant fait de la phagocytose	135
Figure 41 : Induction de la réponse SOS bactérienne dans les HL60-granulocytes après leur phagocytose.....	136
Figure 42 : Visualisation de la réponse SOS bactérienne à l'intérieur des HL60-granulocytes par microscopie confocale.....	137
Figure 43 : Stratégie de fenêtrage pour visualiser l'induction de la réponse SOS bactérienne par l'Amnis	138
Figure 44 : Colocalisation de l'induction de la réponse SOS avec la production de ROS des HL60-GI.....	139
Figure 45 : Stratégie de fenêtrage d'analyse de la phagocytose et de la production de ROS des GI et des neutrophiles.....	141
Figure 46 : Phagocytose et production de ROS par les non pré-stimulés GI.....	142
Figure 47 : Phagocytose et nombre relatif de bactérie phagocyté par les granulocytes	143
Figure 48 : Production de ROS par GI de patients septiques.....	144
Figure 49 : Phagocytose et production de ROS par les NP-GI après une pré-stimulation avec du plasma de patients septiques.....	145
Figure 50 : Comparaison de la phagocytose des NP-GI pré-stimulés avec celle des Septic-GI	145
Figure 51 : Expression des protéines kinases ERK1/2 et p38MAPK par les NP-GI et Septic-GI	147
Figure 52 : Expression des gènes du complexe NADPH oxydase par les GI et neutrophiles en présence de mCherry-E.coli	148
Figure 53 : Expression des protéines p47phox et gp91phox par les NP-GI, Septic-GI et HD-neutrophiles.....	149
Figure 54 : Stratégie de fenêtrage pour analyser l'induction de la réponse SOS par les granulocytes.....	151
Figure 55 : Représentation graphique de la réponse SOS bactérienne dans les NP-GI et Septic-GI	151
Figure 56 : Phagocytose, production de ROS et induction de la réponse SOS par les CGD-neutrophiles.....	152
Figure 57 : Visualisation de l'induction de la réponse SOS bactérienne à l'intérieur de GI par microscopie confocale	154
Figure 58 : Expression du marqueur myéloïde CD15 par les GI	156

Figure 59 : Expression du marqueur CD10 par les granulocytes	156
Figure 60 : Expression de CD11b étant un récepteur impliqué dans la migration des granulocytes.....	157
Figure 61 : Expression du récepteur Fc γ RI, CD64	158
Figure 62 : Expression du récepteur Fc γ RI, CD32	159
Figure 63 : Expression du récepteur Fc γ RIII, CD16	160
Figure 64 : Expression de l'isoforme de CD16, CD16b	161
Figure 65 : Analyse de la forme mature ou immature des granulocytes de patients septiques	161
Figure 66 : Expression du récepteur aux chimiokines CXCR4	162
Figure 67 : Expression du récepteur aux chimiokines CXCR2	163
Figure 68 : Expression du récepteur de mort, Fas-L	164
Figure 69 : Expression du récepteur LOX-1	165
Figure 70 : Expression de l'ensemble des récepteurs par les GI et les neutrophiles en absence et en présence d'E.coli	166
Figure 71 : Schéma récapitulatif des résultats obtenu au cours de la thèse	203

Table des tableaux

Tableau I : Expression des marqueurs aux différents stades de différenciation des granulocytes immatures et matures au cours de la granulopoïèse	32
Tableau II : Résumé des récepteurs exprimés par les neutrophiles	38
Tableau III : Récepteur Fc γ R présentent différentes affinités pour les sous-classes d'IgG ...	42
Tableau IV : Ligands et fonctions des autres récepteurs GPCR exprimés par les neutrophiles	51
Tableau V : Les pathogènes capables de déclencher la nétose chez les neutrophiles.....	59
Tableau VI : Production de chimiokines et de cytokines par les neutrophiles humains.....	61
Tableau VII : Fonctions des différents types cellulaires de l'immunité innée.....	63
Tableau VIII : Présentation des gènes permettant la transcription des sous-unités du complexe NADPH oxydase	75
Tableau IX : Fonctions des différentes cellules de l'immunité innée dans le sepsis.....	86
Tableau X : Fonctions des différentes cellules de l'immunité adaptative dans le sepsis	87
Tableau XI : Liste des anticorps utilisés pour réaliser le marquage et l'analyse par cytométrie en flux des granulocytes après tri	113
Tableau XII : Liste des anticorps utilisés pour réaliser le marquage et l'analyse par cytométrie en flux des granulocytes de patients et de donneurs avant et après stimulation	115
Tableau XIII : Indication des temps finaux d'incubation en présence du kit de détection des ROS	117

Abréviations

AD	A Domaine d'activation	C/EBPα	Protéine α de liaison à CCAAT activateur
ADAM17	A Desintegrin And Metalloproteinase 17	CGD	Maladie Chronique Granulomateuse
ADN	Acide Désoxyribonucléiques	clAP	Inhibiteur cellulaire de la protéine apoptotique
Ahp	Alkyl hydroperoxyde réductase	CLP	Progéniteur commun des lymphoïdes
AIR	Région auto-inhibitrice	CLR	Récepteur type lectine-C
Akt	Protéine kinase B	CMH	Complexe Majeur d'histocompatibilité
AP-1	Protéine d'activation 1	CMP	Progéniteur Common des myéloïdes
APAF1	Facteur d'activation de la protéase apoptotique 1	COX-2	Cyclooxygénase-2
APRIL	Un ligand induisant la prolifération	CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
ARN	Acide Ribonucléique	CpG	Cytosine-phosphate-Guanine
ATP	Adénosine Diphosphate	CR	Récepteurs aux compléments
		CSH	Cellules souches hématopoïétiques
	B	CXCR	Récepteurs aux chimiokines
Bad	Agoniste de la mort cellulaire associé à Bcl-2		D
BAFF	Facteur d'activation des cellules B	DAG	Diacylgcérol
Bak	Tueur antagoniste homologue à Bcl-2	DAMPs	Motifs moléculaires associés aux dommages tissulaires/cellulaires de l'hôte
Bax	Bcl-2 associé X	DC-SIGN	Cellules dendritiques spécifiques capable de capturer ICAM-3
Bcl-2	Lymphome à cellule B	DNase	Désoxyribonucléase
Bcl-XL	Lymphome à cellule B extra-large		E
BCR	Récepteur des cellules B	E.coli	<i>Escherichia coli</i>
Bim	Protéine 11 de type Bcl-2	EIK1	ETS Facteur de Transcription 1
	C	ERK	Kinase régulée par le signal extracellulaire
CANDIS	Séquence d'interaction dynamique conservée Adam seventeenN		F
CARS	Syndrome de la réponse anti-inflammatoire compensatoire	FAD	Flavine Adénine Dinucléotide

FADD	Domaine de mort associé à Fas	IκB	Inhibiteur du facteur nucléaire kappa B
Fc	Fragment cristallisable	Iκκ	Inhibiteur de la kinase NFκB
FcγR	Récepteur Fcγ	ITIM	Motif inhibiteur à base de tyrosine immunorécepteur
FLT3	Tyrosine kinase 3 de type FMS	IL-X	Interleukine-X
fMLP	N-formyl-L-méthionyl-L-leucyl-phenylalanine	iNOS	Oxyde nitrique synthase inductible
	G	IP3	Inositol triphosphate
GCs	Guanylate cyclase soluble	IRAK	Kinase associée au récepteur de l'interleukine-1
G-CSF	Facteur stimulant les colonies de granulocytes	IRFX	Facteur X régulant l'interféron
GDI	Inhibiteur de dissociation du nucléotide de la guanosine	ITAM	Motif activateur à base de tyrosine immunorécepteur
GDP	Guanosine Diphosphate		
GEF	Facteur d'échange des nucléotides de la guanosine	J	
GI	Granulocyte Immature	JNK	Janus kinase
GM	Granulocyte Mature	K	
GM-CSF	Facteur stimulant les colonies de Granulocytes et Monocytes	Keap1	Protéine 1 associée à l'ECH de type Kelch
GMP	Progéniteur des Granulocytes-Monocytes	L	
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique	LB	Lymphocyte B
GPCR	Récepteur couplé aux protéines G	LDG	Granulocytes de faible densité
GPI	Glycosylphosphatidylinositol	LDL	Lipoprotéine de faible densité
GRK	Récepteur couplé aux protéines G kinase	LDN	Neutrophiles de faible densité
GTP	Guanosine Triphosphate	LFA-1	Antigène associé à la fonction lymphocytaire 1
	H	LMPP	Progéniteur lymphoïde myéloïde Multipotent
HLA-DR	Human Leucocyte Antigen - DR	LOX-1	Récepteur-1 des lipoprotéines de basse densité oxydée de type lectine
	I	LPS	Lipopolysaccharides
IAP	Protéine inhibitrice de l'apoptose	LT	Lymphocyte T
IBD	Inflammation des intestins	M	
ICAM	Molécule d'adhésion intercellulaire 1	MAC	Complexe d'attaque membranaire
IFN	Interféron	Mac-1	Récepteur 1 des Macrophages
Ig	Immunoglobuline	MAPKK	Protéine kinase kinase activée par les mitogènes

MBL	Lectine liant le mannose	PICD	Mort cellulaire induite par la phagocytose des neutrophiles
Mcl-1	Protéine 1 de cellule de leucémie myéloïde	PI3K	Phosphatidylinositol-3 kinase
MDSC	Cellules myéloïdes suppressives	PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
MEK	Protéine kinase régulée par le signal extracellulaire et activée par des agents mitogènes	PI3P	Phosphatidylinositol-Triphosphate
MEP	Progéniteur des mégacaryocytes et érythrocytes	PKC	Protéine kinase C
MLKL	Mixed lineage kinase domain-like	PKG	Protéine kinase G
MNDA	Antigène de différenciation nucléaire des cellules myéloïdes	PLA2	Phospholipase A2
MPO	Myéloperoxydase	PLCγ	Phospholipase C γ
MPP	Progéniteur Multipotent	PLD	Phospholipase D
MyD88	Réponse primaire de différenciation myéloïde 88	PMA	Acétate de Méthoxypropanol
	N	p38MAPK	Protéine kinase p38 activée par les mitogènes
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide	PMN	Polymorphonucléaire
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate	PRR	Région Riche en Proline
NET	Neutrophils Extracellular Trap	PRR	Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires
NFAT	Facteur nucléaire des cellules T activées	PSGL-1	Ligand 1 de la glycoprotéine P-sélectine
NFκB	Facteur nucléaire kappa B	PX	Domaine structurel de liaison aux phosphoinositide
NK	Natural killer		Q
NLR	Récepteurs de type domaine d'oligomérisation de liaison aux nucléotides	qSOFA	Quick Sequential Organ Failure Assessment
NO	Oxyde nitrique		R
NOX	NADPH oxydase	RIG	Récepteur du gène 1 inducible par l'acide rétinoïque
Nrf2	Facteur 2 lié au facteur nucléaire E2	RIPK	Protéine sérine/thréonine kinase interagissant avec les récepteurs
	P	ROS	Espèces réactives de l'oxygène
PAMPs	Motifs moléculaires associés aux pathogènes		S
PB1	Phox et Bem1	S.aureus	<i>Staphylococcus aureus</i>
PDGF	Platelet-derived growth factor	SCF	Facteur de cellules souches
PDL-1	Ligand de mort programmée 1	SDF-1	Facteur 1 dérivé des cellules stromales
		SH3	Domaine d'homologie 3 SRC

SHIP1	Inositol polyphosphate-5-phosphatase 1	TNFR	Récepteur au facteur de nécrose tumorale
SIRS	Syndrome de la réponse inflammatoire systémique	TPR	Tétratripeptide
SNARE	Récepteur SNAP	TRADD	Domaine de mort associé au récepteur du facteur de nécrose tumorale de type 1
SOD	Superoxyde dismutase	TRAF6	Récepteur au facteur de nécrose tumorale associé au facteur 6
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment	TRAIL	Ligand inducteur d'apoptose lié au facteur de nécrose tumoral
STAT	Transducteur et activateur de signaux de la transcription	Treg	Lymphocyte T régulateur
Syk	Tyrosine kinase de la rate	TRPM2	Canal cationique à potentiel transitoire membre 2
	T		
TAK1	Protéine kinase 1 activée par le facteur de croissance transformant B		
TCR	Récepteur des cellules T		
THX	T helper X		
TIMP3	Inhibiteur tissulaire de la métalloprotéinase 3		
TLR	Récepteur de type Toll		
		V	
		VAMP	Protéine membranaire associée à des vésicules
		X	
		XIAP	Protéine inhibitrice de l'apoptose liée au chromosome X

Introduction

Chapitre 1 Les granulocytes neutrophiles

Les neutrophiles ou granulocytes neutrophiles sont des leucocytes polylobés (Figure 1) issus de la granulopoïèse ayant lieu dans la moelle osseuse puis libérés dans la circulation sanguine. Ils représentent 50 à 70 % des leucocytes totaux présents dans le sang et jouent un rôle crucial dans la défense de la réponse immune contre les microorganismes (Rosales, 2018; Wright et al., 2013).

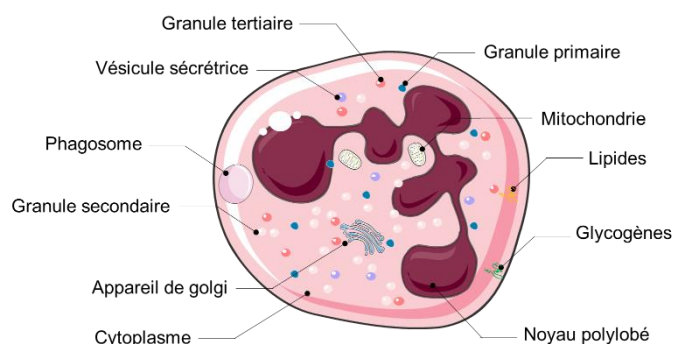


Figure 1 : Représentation schématique d'un neutrophile

Le neutrophile est constitué d'un noyau polylobé et présente différents types de granules nécessaires pour ces actions antimicrobiennes lors d'une réponse immunitaire : primaire, secondaire et tertiaire, ainsi qu'une vésicule sécrétrice contenant plusieurs récepteurs pour la défense contre le pathogène

Les neutrophiles circulants n'ont pas de propriétés prolifératives, sont dans un état dormant et ont une durée de vie courte (24 h). Cependant, la demi-vie des neutrophiles est augmentée de 1 à 2 jours lorsqu'ils s'infiltrent dans les tissus (Lu et al., 2012). En effet, à l'homéostasie on retrouve des neutrophiles ayant une demi-vie 2 à 3 fois plus importante que les neutrophiles circulants. Ils sont présents dans tous les organes tels que la rate, le foie et les poumons mais absent dans les gonades et le cerveau (Ley et al., 2018; Lischke et al., 2013; Summers et al., 2010). Les neutrophiles sont reconnus pour être des cellules phagocytaires comme les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques, ils sont très mobiles et font partie de l'immunité innée (El-Benna et al., 2016; Leliefeld et al., 2016; Ley et al., 2018; Rosales, 2018; Segal, 2005; van Kessel et al., 2014; Witter et al., 2016).

I. Granulopoïèse

La granulopoïèse est une sous-partie de l'hématopoïèse qui permet d'obtenir l'ensemble des cellules sanguines de l'organisme. La granulopoïèse correspond au processus de différenciation des cellules progénitrices des Monocytes-Granulocytes (GMP) aux

neutrophiles, la forme mature des granulocytes. Elle a lieu dans la moelle osseuse que l'on retrouve dans les os longs et dans les os plats, libérant dans la circulation sanguine 10^{11} neutrophiles par jour chez un adulte (Borregaard, 2010; Lu et al., 2012; Manz and Boettcher, 2014; Rosales, 2018; Summers et al., 2010).

I.1. Production et développement des granulocytes dans la moelle osseuse

I.1.1. Les facteurs responsables de la différenciation des granulocytes

Les neutrophiles sont obtenus à la suite d'une succession de différenciation cellulaire ayant lieu dans la moelle osseuse en présence des facteurs de croissance (G-CSF et GM-CSF) et des facteurs de transcriptions (C/EBP α , C/EBP β , C/EBP ϵ et PU.1) (Borregaard, 2010; Mackey et al., 2019). La granulopoïèse débute à partir d'une cellule commune à toutes les cellules sanguines, la cellule souche hématopoïétique (CSH) capable de s'auto-renouveler. Les CSH sont maintenues dans une niche constituée de cellules non hématopoïétiques (ostéoblastes, fibroblastes, cellules adipocytes et cellules endothéliales) libérant des facteurs de croissance tels que le GM-CSF (facteur stimulant les colonies de granulocytes et de monocytes) et le G-CSF (facteur stimulant les colonies de granulocytes) nécessaire pour la différenciation en granulocyte (Borregaard, 2010; Ley et al., 2018; Mackey et al., 2019; Nauseef and Borregaard, 2014; Rosales, 2018; Witter et al., 2016).

Une partie des CSH se multiplieront, tandis qu'une autre partie se différenciera en MPP (Progéniteur multipotent) donnant 2 types de progéniteurs : le premier est le progéniteur LMPP (Progéniteur lymphoïde myéloïde Multipotent) capable de donner les lymphocytes, les Naturel killer (NK) et les cellules dendritiques via le progéniteur CLP (progéniteur commun des lymphoïdes) et les granulocytes, monocytes via le progéniteur GMP (Cowland and Borregaard, 2016; Panigrahi and Pati, 2012). Le deuxième progéniteur est le CMP (Progéniteur commun des myéloïdes) dont la différenciation peut aboutir soit en érythrocytes et en plaquettes via le progéniteur MEP (Progéniteur des Mégacaryocytes-érythrocytes), soit en granulocytes ou monocytes par l'intermédiaire du progéniteur GMP (Panigrahi and Pati, 2012). Par la présence du facteur de croissance G-CSF, des cytokines IL-3 (interleukine-3) et IL-6, le GMP formera les granulocytes immatures (GI) (promyélocytes, myélocytes, métamyélocytes, band cells) pour se différencier au final en neutrophile. Tandis, qu'en présence du facteur GM-CSF, le GMP pourra se différencier en monocytes qui deviendront des macrophages lors d'une réponse immunitaire correspondant à un autre type de leucocyte (Borregaard, 2010; Cowland and Borregaard, 2016). Malgré leur importante proportion (50 à 70 %) parmi les leucocytes, 2 autres types de granulocytes matures sont développés dans la moelle osseuse ne représentant seulement que 1 à 3 % des leucocytes. Ce sont les basophiles et les éosinophiles, produits à partir du progéniteur GMP, jouant un rôle dans la réponse aux

allergies et aux infections contre les parasites (Sasaki et al., 2016; Uhm et al., 2012) (Figure 2).

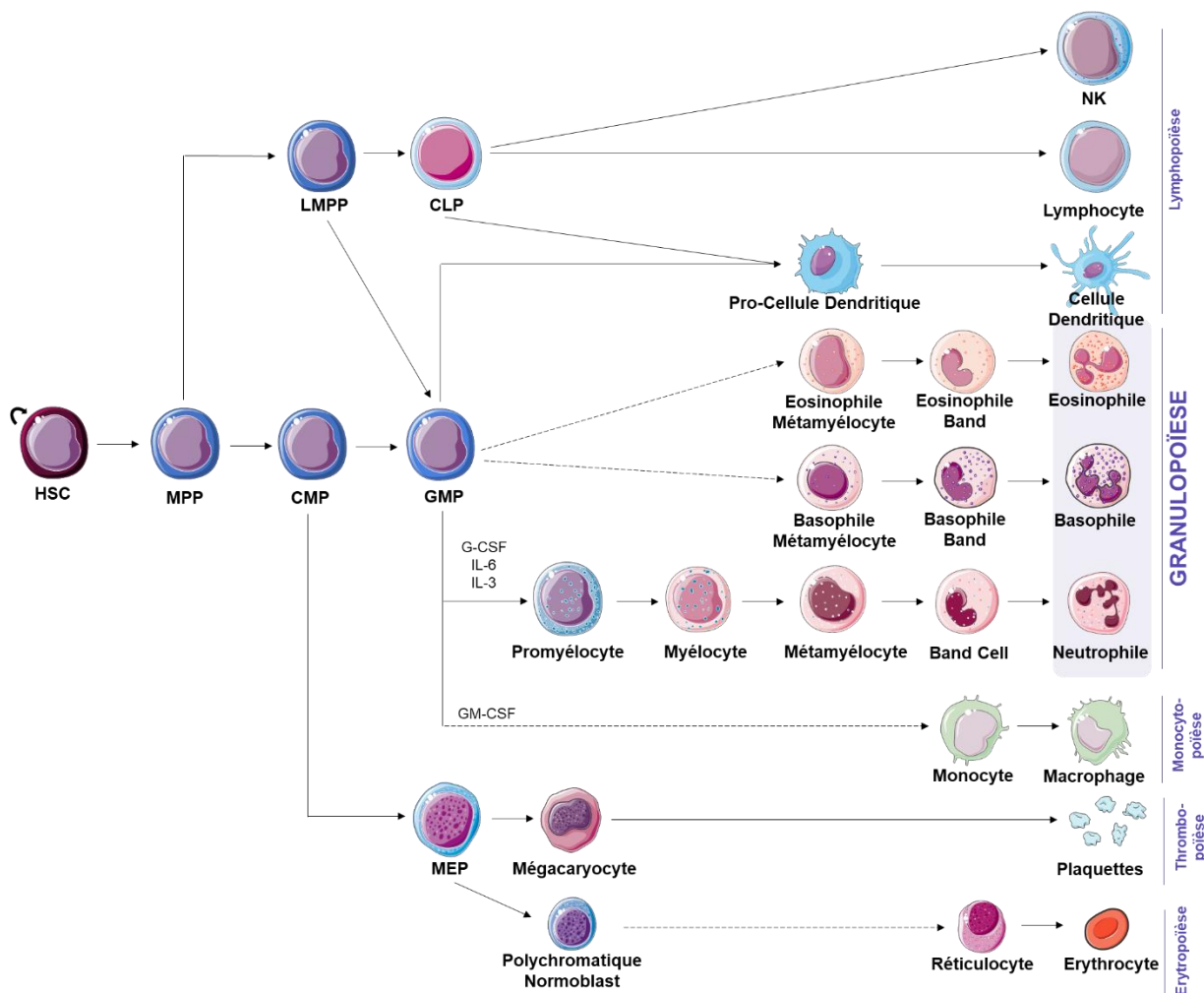


Figure 2 : Hématopoïèse des cellules sanguines incluant la granulopoïèse pour le développement des neutrophiles

La granulopoïèse correspond à une succession de différenciation débutant par une cellule souche hématopoïétique (CSH) commune à l'ensemble des cellules sanguines qui donnera les différents progéniteurs : progéniteur multipotent (MPP), Progéniteur lymphoïde myéloïde Multipotent (LMPP) et progéniteur myéloïde commun (CMP). Le LMPP donnera le progéniteur commun des lymphoïdes (CLP) pour obtenir les lymphocytes, Natural Killer (NK) et cellules dendritiques, le progéniteur des granulocytes-monocytes (GMP) permettra le développement des lignées granulocytaires et monocytaires. Le CMP sera responsable de la naissance du progéniteur des mégacaryocytes-érythrocytes (MEP) pour la différenciation en érythrocytes et plaquettes, et donnera aussi le GMP. Le GMP en présence du facteur stimulant les colonies de granulocytes (G-CSF) se différenciera en granulocytes immatures (GI) : promyélocytes, myélocytes, métamyélocytes et band cells pour terminer par l'état le plus mature, le neutrophile. Le progéniteur GMP pourra donner 2 autres types de granulocytes matures : les basophiles et éosinophiles. Alors qu'en présence du facteur stimulant les colonies de granulocytes et monocytes (GM-CSF), le GMP se différenciera en monocytes qui lors d'une réponse immunitaire donneront les macrophages. D'après Panigrahi and Pati, 2012 ; Sasaki et al., 2016 ; Uhm et al., 2012.

Tout comme les facteurs de croissance, la présence de facteurs de transcriptions sera déterminante pour le devenir de la différenciation en granulocytes. L'évolution des granulocytes dépend d'une balance entre 2 facteurs de transcriptions : C/EBP α (Protéine α de liaison à CCAAT activateur) et PU.1. En effet, lorsque le progéniteur GMP exprime

faiblement les facteurs PU.1, C/EBP β et fortement le facteur C/EBP α , celui-ci se différenciera en neutrophiles. Tandis, que si le progéniteur GMP exprime fortement le facteur PU.1 et faiblement le facteur C/EBP α , il se différenciera en monocytes (Borregaard, 2010; Cowland and Borregaard, 2016). Lorsque la différenciation en granulocyte est enclenchée, l'expression de PU.1 augmente au stade myélocyte et métamyélocyte nécessaire pour terminer la différenciation (Borregaard, 2010). De plus, la prolifération des cellules au stade myélocyte et métamyélocyte sont orchestrés par le facteur C/EBP α et C/EBP ϵ impliqué dans la formation des granules secondaire correspondant aux granules bactéricides nécessaires pour la défense contre les pathogènes (Figure 3) (Cowland and Borregaard, 2016).

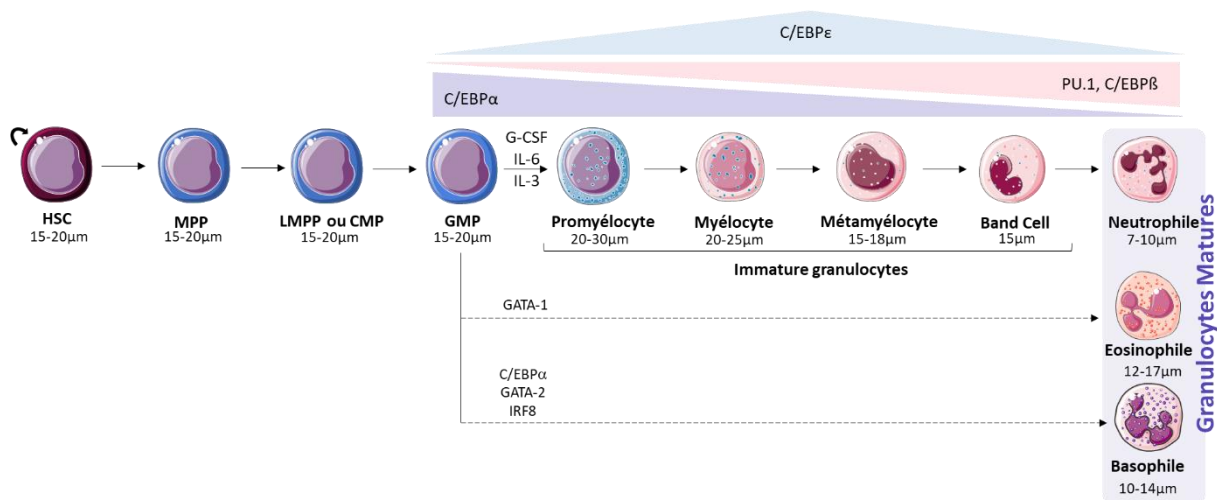


Figure 3 : Expression des facteurs de transcription au cours de la différenciation des granulocytes

Au cours de la différenciation, les différents progéniteurs et les cellules différenciées peuvent être reconnus par la taille cellulaire et nucléaire. Les progéniteurs présentent un noyau arrondi occupant l'ensemble du cytoplasme tandis que les métamyélocytes présentent un noyau incurvé pour ensuite se diviser en 2 lobes afin de donner le band cell, puis le neutrophile où le noyau est polylobé (plusieurs lobes). Les basophiles et éosinophiles sont distingués des neutrophiles par la forme de leur noyau bilobé (2 lobes) et par la contenance de leur cytoplasme. En effet, le cytoplasme des basophiles est rempli de granule leur conférant une coloration violette après coloration avec le May-Grünwald-Giemsa, tandis que celui des éosinophiles possède des granules contenant des protéines cationiques donnant une coloration rose orangée contre rose pour le neutrophile. La différenciation des granulocytes en neutrophiles est orchestrée par des facteurs de transcription où leur expression est différente au cours de la différenciation. Les progéniteurs GMP expriment fortement le facteur C/EBP α (protéine α de liaison à CCAAT activateur) et faiblement les facteurs PU.1 et C/EBP β , puis l'expression s'inversent au cours de la différenciation. De plus, le facteur C/EBP ϵ est fortement exprimé au stade myélocyte et métamyélocyte nécessaire pour la formation des granules secondaire et diminue au stade band cell. Le progéniteur GMP est capable de donner le basophile par expression des facteurs de transcription C/EBP α , GATA-2 (GATA liant la protéine 2) et IRF8 (facteur 8 régulant l'interféron) et l'éosinophile via les facteurs C/EBP α , C/EBP β , PU.1 et GATA-1. D'après Cowland and Borregaard, 2016.

Au cours de la différenciation un changement de taille et de contenu cellulaire est observé. En effet, les progéniteurs (MPP, LMPP/CMP et GMP) possèdent un noyau circulaire occupant la majorité de la cellule. Une fois la différenciation en neutrophile enclenchée, une diminution de la taille cellulaire est observée au stade myélocyte. Au stade suivant (métamyélocytes), le noyau s'incurve pour ensuite se diviser en lobe (2 lobes) avec un éclaircissement du cytoplasme (band cell) pour finalement laisser place à un noyau polylobé (3 à 5 lobes)

correspondant à l'état le plus mature, le neutrophile (Grieshaber-Bouyer and Nigrovic, 2019; Rosales, 2018; Simon, 2003; Witter et al., 2016). Cependant, le progéniteur GMP est capable de donner 2 autres granulocytes, le basophile et l'éosinophile. Ils sont différenciés des neutrophiles par la forme de leur noyau et la contenance de leur cytoplasme. En effet, l'éosinophile possède un noyau bilobé (2 lobes) et des granules contenant des protéines cationiques spécifiques de l'éosinophile, lui donnant une couleur rose orangée lors d'une coloration avec le colorant May-Grünwald-Giemsa, tandis que le neutrophile aura une couleur rose. La différenciation en éosinophile est orchestrée par les mêmes facteurs que le neutrophile (C/EBP α , C/EBP β et PU.1) mais nécessite en plus le facteur de transcription GATA-1 (GATA liant la protéine-1) (Uhm et al., 2012). Le basophile quant à lui possède également un noyau bilobé mais son cytoplasme est rempli de granules contenant de la phosphatase acide lui donnant une coloration violette. Sa différenciation est déclenchée principalement par les facteurs de transcriptions tels que C/EBP α , GATA-2 et IRF8 (Facteur 8 régulant l'interféron) (Figure 3) (Arock et al., 2002; Sasaki et al., 2016). Une dernière modification a lieu au cours de la différenciation des neutrophiles, l'apparition de protéines bactéricides jouant un rôle important dans la réponse immunitaire.

1.1.2. Composition des granules bactéricides

Au cours de la différenciation des granulocytes, plusieurs modifications apparaissent et permettent de distinguer les différents stades de maturation, notamment les granules bactéricides nécessaires pour leur activité antimicrobienne (Fauschou and Borregaard, 2003; Lacy, 2006).

Les granules bactéricides sont au nombre de 3 et formés à partir du réseau de l'appareil de golgi :

i) **Granule primaire** ou azurophile, exprimé à partir du promyélocyte et contient des peptides antimicrobiens (MPO (myéloperoxydase), élastase, cathepsine G, protéinase 3, protéase à sérine, azurocidine et défensines) créant des pores à la membrane du pathogène permettant sa destruction. La MPO est l'enzyme la plus importante dans ce granule (2 à 5 % de son poids), mais l'ARNm de cette enzyme n'est transcrit qu'au stade du promyélocyte et s'arrête à la fin de la différenciation de façon à ne plus être détectable dans les neutrophiles (Serteyn et al., 2003). Ces granules sont très peu libérés en dehors des granulocytes et fusionnent principalement avec la membrane du phagosome dans lequel se trouve le pathogène durant la réponse immunitaire (Fauschou and Borregaard, 2003; Miralda et al., 2017; Rosales, 2020).

ii) **Granule secondaire** ou spécifique exprimé au stade du myélocyte et métamyélocyte contenant de la métalloprotéinase et de la lactoferrine ayant pour fonction de lier les ions fer ou cuivre des bactéries bloquant leur croissance. La lactoferrine est également capable de lier des composants de la membrane des bactéries tels que des sucres appartenant au peptidoglycane, responsable de leur lyse (Cowland and Borregaard, 2016; Miralda et al., 2017; Rosales, 2020).

iii) **Granule tertiaire** ou gélatinase exprimé dans les bands cells contenant de la gélatinase (hydrolyse le collagène), de l'arginase fortement libérée hors des granulocytes et du lysozyme agissant sur le peptidoglycane des bactéries gram-positif et sur le LPS (lipopolysaccharide) (Cowland and Borregaard, 2016; Lelifeld et al., 2016; Miralda et al., 2017; Rosales, 2020; Segal, 2005).

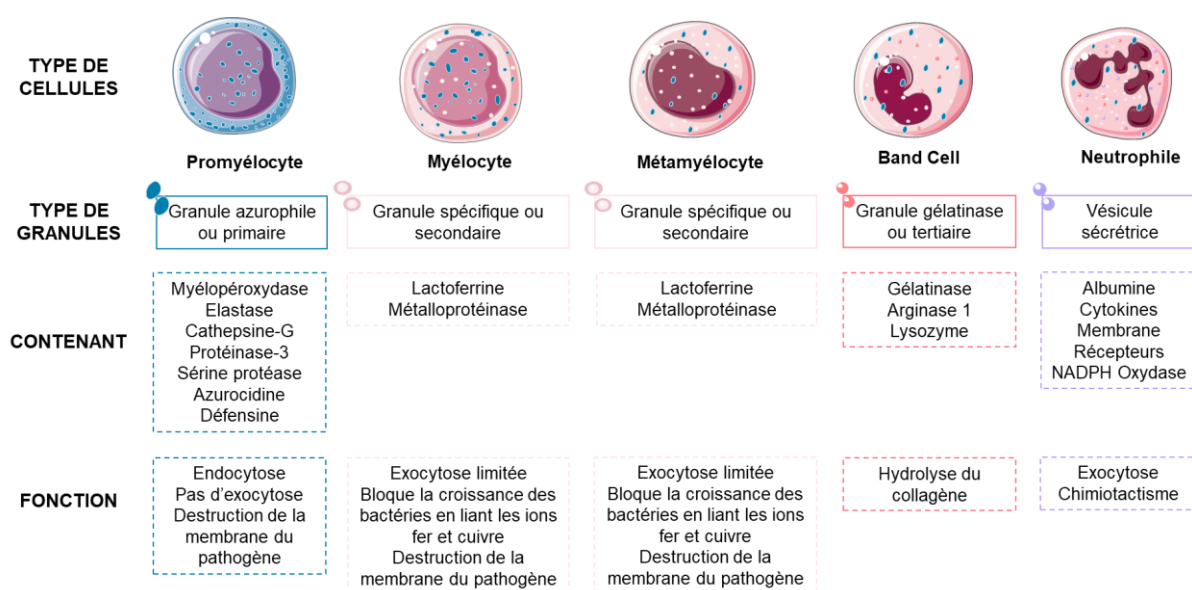


Figure 4 : Résumé de la formation des granules en fonction de la maturation des granulocytes

Au stade le plus immature, les promyélocytes ne possèdent qu'un seul type de granule : granule azurophile ou primaire. Ces granules contiennent la myéloperoxydase, l'élastase, la cathepsine-G, la protéinase-3, la protéase à sérine, l'azurocidine et la défensine ayant pour rôle la destruction de la membrane du pathogène lorsque celui-ci se trouve dans le phagosome. Cependant les granules primaires seront très peu libérés à l'extérieur de la cellule. Au stade intermédiaire, les myélocytes et métamyélocytes se forment en plus des granules primaires, les granules spécifiques ou secondaires contenant la lactoferrine ayant pour rôle l'arrêt de la croissance des bactéries en liant les ions fer et cuivre. Au dernier stade de granulocytes immatures, le band cell dans lequel les granules tertiaires ou gélatinases sont formés, additionnels aux granules primaire et secondaire contenant de la gélatine qui a pour rôle d'hydrolyser le collagène. Et enfin au stade le plus mature, le neutrophile contient en plus les vésicules sécrétrices importantes lors de la réponse immunitaire car elles contiennent les récepteurs nécessaires à la reconnaissance entre la cellule et le pathogène. D'après Cowland and Borregaard, 2016 ; Lelifeld et al., 2016 ; Miralda et al., 2017 ; Rosales, 2020 ; Segal, 2005.

En plus des granules, les neutrophiles possèdent des vésicules sécrétrices considérées comme un sous-type de granules additionnels très importantes durant la première phase de la réponse immunitaire. En effet, ces vésicules contiennent de nombreux récepteurs nécessaires pour l'interaction hôte-pathogène exprimés à la surface du neutrophile après leur exocytose (récepteur du complément 3, du complément 1, pour le fMPL, CD14 et CD16)

(Faurischou and Borregaard, 2003; Nordenfelt and Tapper, 2011; Rosales, 2018; van Kessel et al., 2014) (Figure 4).

Les granules bactéricides ont pour principal rôle la destruction du pathogène se trouvant dans le phagosome des neutrophiles et/ou dans le milieu extracellulaire. Ces granules jouent aussi un rôle dans la phagocytose, la formation des NET (Neutrophils Extracellular Trap), la régulation de l'adhésion et de la transmigration du neutrophile à travers les cellules endothéliales du vaisseau sanguin dans le but de rejoindre le site infectieux (Ley et al., 2018). Les différents stades de maturation du granulocyte peuvent également être distingués par l'expression des marqueurs présents à leur surface.

I.1.3. Les différents marqueurs au cours de la différenciation

En plus de leurs différences morphologiques, chaque granulocyte issu des différents stades de maturation exprimera des marqueurs spécifiques qui permettront leur identification.

Les précurseurs de la lignée myéloïde sont connus pour exprimer spécifiquement CD33 dont l'expression diminue au fur et à mesure de la maturation des granulocytes (Grieshaber-Bouyer and Nigrovic, 2019). La lignée granulocytaire possède ses propres marqueurs tels que CD15, CD62L (sélectine impliquée dans la migration des granulocytes à travers les cellules endothéliales) et CD66b (régule l'adhésion et l'activation) exprimés de façon constitutive au cours de la différenciation. Néanmoins, les marqueurs qui permettront de différencier les différents stades de maturation sont les marqueurs CD11b exprimé dès le myélocyte et CD16 (Fc γ RIII) exprimé progressivement à la surface des granulocytes du moins mature au plus mature (Grieshaber-Bouyer and Nigrovic, 2019; Pillay et al., 2013) (Tableau I).

Tableau I : Expression des marqueurs aux différents stades de différenciation des granulocytes immatures et matures au cours de la granulopoïèse (Grieshaber-Bouyer and Nigrovic, 2019 ; Pillay et al., 2013)

Granulocytes	Promyélocyte	Myélocyte	Métamyélocyte	Band cell	Neutrophile
	CD33 ^{hi} CD15 ⁺	CD33 ^{hi} CD15 ⁺	CD33 ⁺ CD15 ⁺	CD33 ^{low} CD15 ⁺	CD33 ^{low} CD15 ⁺
Marqueurs	CD62L ^{hi} CD66b ⁺ CD11b ⁻ CD16 ⁻	CD62L ^{hi} CD66b ⁺ CD11b ⁺ CD16 ⁻	CD62L ^{hi} CD66b ⁺ CD11b ⁺ CD16 ^{low}	CD62L ^{hi} CD66b ⁺ CD11b ⁺ CD16 ⁺	CD62L ^{hi} CD66b ⁺ CD11b ⁺ CD16 ^{hi}

Une fois le neutrophile à maturité, il est libéré dans la circulation sanguine afin d'exercer ses fonctions.

I.2. Libération des neutrophiles dans la circulation sanguine

Une fois la maturation achevée, la moelle osseuse ne libère seulement que 1 à 2 % de neutrophiles dans la circulation sanguine permettant de réguler leur nombre présent dans le sang et les tissus (Rosales, 2018). La présence de GI dans la circulation sanguine (> 1 %) est le signe de pathologie et leur rôle dans ces pathologies n'est pas totalement connu (Ayles et

al., 2019). Ainsi, dans les chapitres suivants, seront surtout détaillés le rôle et les fonctions des neutrophiles.

I.2.1. Les récepteurs impliqués dans la libération des neutrophiles

La libération des neutrophiles dans la circulation sanguine est régulée par l'expression de 2 récepteurs aux chimiokines CXCR. L'expression de CXCR4 par les GI permet de les maintenir dans la moelle osseuse après reconnaissance de la chimiokine CXCL12 (SDF-1 : Facteur 1 dérivé des cellules stromales) produite de façon constitutive par les cellules stromales (cellules non hématopoïétiques de la moelle osseuse) et endothéliales de la moelle osseuse (Summers et al., 2010). Néanmoins, lorsque le granulocyte devient mature il réprime CXCR4 et exprime à sa surface un autre récepteur, CXCR2. Ce récepteur après reconnaissance des chimiokines telles que CXCL1, CXCL2, CXCL5 et CXCL8 (IL-8) produites par les cellules endothéliales vasculaires provoque la transmigration des neutrophiles dans la circulation sanguine (Figure 5) (Cowland and Borregaard, 2016; Grieshaber-Bouyer and Nigrovic, 2019; Rosales, 2020, 2018; Witter et al., 2016). Dans des conditions d'homéostasie, il a été décrit que certains neutrophiles restaient dans la circulation sanguine, tandis que d'autres peuvent migrer dans les tissus probablement à la recherche d'une éventuelle infection afin de recruter plus efficacement d'autres neutrophiles. Mais leur rôle précis dans les tissus et le mécanisme de leur migration n'est pas encore connu (Ng et al., 2019).

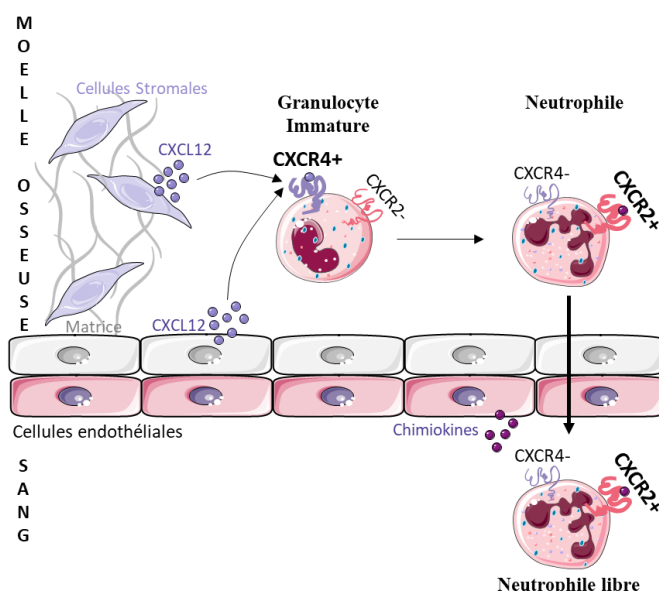


Figure 5 : Expression des récepteurs aux chimiokines sur les granulocytes dans la moelle osseuse

L'expression du récepteur aux chimiokines CXCR4 par les GI permet de les retenir dans la moelle osseuse par fixation des chimiokines CXCL12 produites par les cellules stromales et endothéliales de la moelle osseuse. Une fois matures (neutrophiles), les granulocytes répriment CXCR4 et expriment CXCR2 reconnaissant les chimiokines CXCL1, CXCL2, CXCL5 et CXCL8 (IL-8) produites par les cellules endothéliales vasculaires entraînant la transmigration du neutrophile dans la circulation sanguine. D'après Grieshaber-Bouyer and Nigrovic, 2019.

Néanmoins, l'obtention de CXCR2 à la surface des neutrophiles n'est pas la seule raison de leur transmigration dans la circulation sanguine. Pour que les neutrophiles puissent aller dans le sang, il est nécessaire qu'ils soient attirés par des facteurs tels que les cytokines et les chimiokines (Grieshaber-Bouyer and Nigrovic, 2019)

1.2.2. Les cytokines et facteurs impliqués dans la libération des neutrophiles en absence d'une réponse immunitaire

Dans des conditions d'homéostasie, la libération des neutrophiles dans la circulation sanguine est étroitement régulée par la présence des cytokines (IL-17 et IL-23) produites par des cellules immunitaires et d'un facteur de croissance (G-CSF) (Rosales, 2020).

Afin que les neutrophiles soient libérés dans la circulation sanguine, la cytokine IL-23 est produite par les cellules phagocytaires (macrophages et cellules dendritiques) activant la production d'IL-17 par les lymphocytes T (LT) non conventionnel, LT helper 17 (TH17) ou $LT\gamma\delta$ (Rosales, 2020). L'IL-17 est connue pour être un puissant inducteur du G-CSF, ainsi l'IL-17 induit une forte production du facteur G-CSF par les cellules endothéliales de la moelle osseuse. La grande concentration en G-CSF dans la moelle osseuse induit une inhibition de production de CXCL12 et entraîne la surexpression de CXCR2 sur les neutrophiles permettant leur libération dans la circulation sanguine (Cowland and Borregaard, 2016; Grieshaber-Bouyer and Nigrovic, 2019; Rosales, 2020, 2018; Witter et al., 2016). Lors d'une réponse immunitaire, les neutrophiles circulants qui se trouvent sur le site inflammatoire ou infectieux peuvent produire l'IL-17 ayant un effet autocrine responsable de la production des chimiokines CCL20 et CCL2 par ces neutrophiles circulants. Ces chimiokines se fixent sur les récepteurs CCR6 et CCR2 présents à la surface des TH17 induisant le recrutement de nouveau TH17 sur le site inflammatoire augmentant l'IL-17, la production de G-CSF et par conséquent l'augmentation de la libération des neutrophiles hors de la moelle osseuse (Figure 6) (Grieshaber-Bouyer and Nigrovic, 2019; Rosales, 2020, 2018; Witter et al., 2016).

1.3. Devenir des neutrophiles en absence d'une réponse immunitaire

1.3.1. Les différents marqueurs et récepteurs exprimés en absence d'une réponse immunitaire

En absence d'une réponse immunitaire, les neutrophiles circulants deviennent sénescents au bout de 24 h (Grieshaber-Bouyer and Nigrovic, 2019). Cependant, de nouvelles études ont mis en évidence que les neutrophiles circulants pouvaient finalement avoir une durée de vie de 5,4 jours. Ce phénomène peut être expliqué par la présence de facteurs environnementaux capables de modifier l'expression de gènes induisant une diversité des neutrophiles (Ng et al.,

2019). Néanmoins, lorsque la vie des neutrophiles arrive à terme, ils sont nommés neutrophiles âgés présentant une modification de morphologie (diminution de la taille et noyau hypersegmenté) et d'expression des récepteurs tels qu'une diminution de CD62L et une surexpression de CD11b, CD16 et CXCR4. La surexpression de CXCR4 leur permet de retourner dans la moelle osseuse où ils seront phagocytés par les macrophages résidents (Grieshaber-Bouyer and Nigrovic, 2019; Nauseef and Borregaard, 2014; Rosales, 2020; Witter et al., 2016). Ce retour dans la moelle osseuse semblerait agir sur la niche des CSH permettant de donner un signal aux précurseurs granulocytaires afin de libérer des neutrophiles dans la circulation sanguine (Ng et al., 2019).

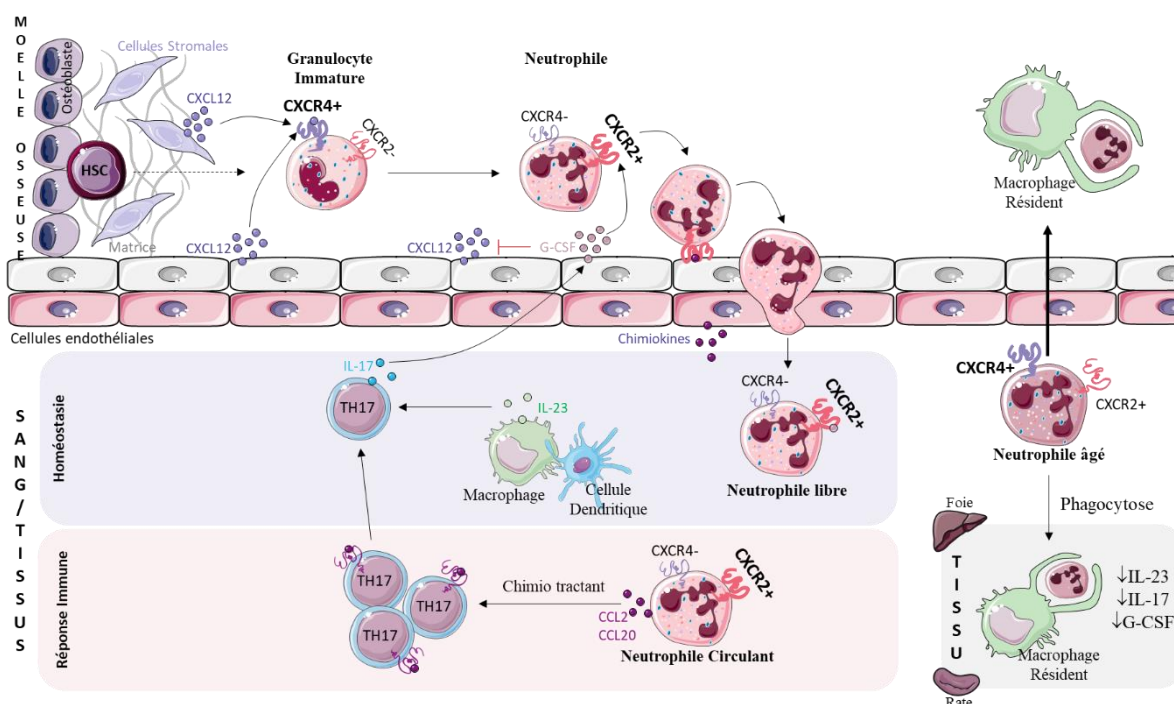


Figure 6 : Libération des neutrophiles dans la circulation sanguine

La fixation de CXCL12 sur son récepteur CXCR4 permet de retenir les GI dans la moelle osseuse. A l'homéostasie, les macrophages et cellules dendritiques produisent la cytokine IL-23 induisant la production d'IL-17 par les LT helper 17 (TH17) agissant sur la production du facteur G-CSF par les cellules endothéliales de la moelle osseuse. Ainsi, la forte concentration en G-CSF diminue la production de CXCL12 par les cellules stromales et endothéliales de la moelle osseuse et permet la surexpression du récepteur CXCR2 par les neutrophiles. L'expression de CXCR2 par les neutrophiles permet la reconnaissance des chimiokines CXCL1, CXCL2, CXCL5 et CXCL8 produites par les cellules endothéliales vasculaires induisant leur libération dans la circulation sanguine. Durant une réponse immunitaire, les neutrophiles circulants se trouvant sur le site infectieux sont capables de produire de l'IL-17 induisant la production des chimiokines CCL20 et CCL2 se fixant sur leurs récepteurs respectifs CCR6 et CCR2 présent sur les TH17. La fixation CXCR/CCL permet le recrutement des TH17 sur le site infectieux, l'augmentation de la concentration en IL-17 et donc une augmentation de production du G-CSF et par conséquent la libération des neutrophiles hors de la moelle osseuse. Certains granulocytes en fin de vie nommés neutrophiles âgés retournent dans la moelle osseuse grâce à la surexpression de CXCR4 et la diminution d'expression de CXCR2 où ils seront phagocytés par les macrophages résidents. Les neutrophiles âgés restants dans les tissus seront phagocytés par les macrophages des tissus. Ainsi, la phagocytose du neutrophile âgé provoque une diminution de production des cytokines IL-23 et IL-17, diminuant la production de G-CSF et donc la granulopoïèse. D'après Grieshaber-Bouyer and Nigrovic, 2019; Nauseef and Borregaard, 2014; Rosales, 2020; Witter et al., 2016.

Cependant, il semblerait que l'ensemble des neutrophiles âgés présent dans la circulation sanguine ne soient pas tous destinés à revenir dans la moelle osseuse. En effet, des souris ne présentant pas le récepteur CXCR4 sur les cellules myéloïdes conservent la clairance des neutrophiles, suggérant qu'il existe un autre mécanisme pour éliminer les neutrophiles sénescents (Rosales, 2018). Ainsi, la phagocytose des neutrophiles âgés ou apoptotiques par les macrophages et cellules dendritiques résidants des tissus ou de la moelle osseuse, diminue leur production d'IL-23. Cette diminution a pour conséquence la diminution de l'IL-17 par les TH17 et par conséquent diminue la production de G-CSF par les cellules endothéliales de la moelle osseuse. La faible concentration en G-CSF entraîne une diminution d'expression de CXCR2 et favorise l'expression de CXCR4 diminuant la libération des neutrophiles dans la circulation sanguine, et responsable d'une diminution de la granulopoïèse dans la moelle osseuse (Borregaard, 2010; Ley et al., 2018; Rosales, 2020; Witter et al., 2016) (Figure 6).

Néanmoins, pour éviter d'induire des lésions tissulaires et de créer d'éventuel dysfonctionnement de l'organisme, les neutrophiles non fonctionnels et âgés seront détruits par un processus appelé l'apoptose.

1.3.2. Apoptose des neutrophiles

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée permettant d'éliminer les neutrophiles inactivés ou âgés se trouvant dans la circulation sanguine. Ce mécanisme permet également de réguler la réponse immunitaire de façon à ne pas entraîner de dysfonctionnement cellulaire responsable de maladies (Geering et al., 2011; Simon, 2003). L'apoptose des neutrophiles est finement régulée par 2 voies : une voie intrinsèque avec l'intervention d'une famille de protéine Bcl-2 (lymphome à cellule B) et une voie extrinsèque impliquant des récepteurs dits de « mort » tels que les récepteurs Fas, TNFR (récepteur au facteur de nécrose tumorale) ou TRAIL (Ligand inducteur d'apoptose lié au facteur de nécrose tumorale) (Glennon-Alty et al., 2018; Simon, 2003). La voie extrinsèque est surtout utilisée après une réponse immunitaire pour pouvoir l'éteindre (elle sera expliquée dans le chapitre 2).

La voie intrinsèque fait intervenir les protéines de la famille Bcl-2 divisées en deux sous-types : les protéines dites pro-apoptotiques responsable de l'induction de l'apoptose, et les protéines anti-apoptotiques inhibant l'apoptose. Les protéines anti-apoptotiques sont constituées par les protéines Mcl-1 (Protéine 1 de cellule de leucémie myéloïde) et Bcl-XL (Lymphome à cellule B extra-large) ayant une durée de vie courte et rapidement dégradées par les protéines pro-apoptotiques présentes dans le cytoplasme (Bim (Protéine 11 de type Bcl-2), Bax (Bcl-2 associé X)/Bak (Tueur antagoniste homologue à Bcl-2) et Bad (Agoniste de la mort cellulaire associé à Bcl-2) (Glennon-Alty et al., 2018; Milot et al., 2012; Simon, 2003). Dans des

conditions apoptotiques, la protéine pro-apoptotique Bad inactive la protéine anti-apoptotique Bcl-XL par fixation et la protéine Bim active le complexe Bax/Bak. Ceci permet de rompre les membranes mitochondriales responsables de la libération du cytochrome C dans le cytoplasme. Le cytochrome C se complexe avec la protéase APAF-1 (Facteur d'activation de la protéase apoptotique 1) afin de former l'apoptosome permettant le clivage de la pro-caspase-9 en caspase-9 s'associant à l'apoptosome (APAF-1/Casp-9). Puis, l'apoptosome clive la pro-caspase-3 en caspase-3 initiant l'apoptose où ils seront ensuite pris en charge par les macrophages pour être totalement éliminés (Glennon-Alty et al., 2018) (Figure 7). L'activation de la caspase-3 provoque le clivage de la protéine nucléaire MNDA (Antigène de différenciation nucléaire des cellules myéloïdes) responsable de sa libération dans le cytoplasme, s'associant à la protéine anti-apoptotique Mcl-1, l'inactivant. Etant donné que l'apoptose n'est plus bloquée par la protéine Mcl-1, le neutrophile entre en apoptose (Milot et al., 2012). Cependant, lors d'une réponse immunitaire la demi-vie des neutrophiles est augmentée (2 à 3 jours) retardant leur apoptose via plusieurs récepteurs (PRR, FcγR, compléments, CXCR, cytokines) afin d'éliminer le pathogène.

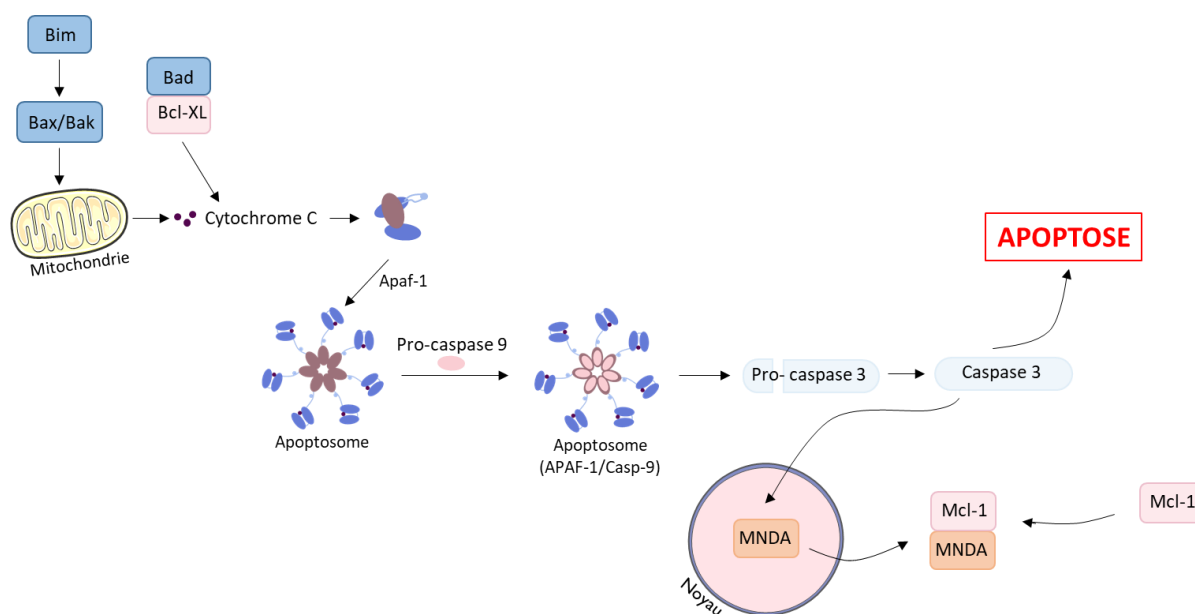


Figure 7 : Représentation schématique de la voie intrinsèque apoptotique du neutrophile

En absence de réponse immunitaire l'apoptose des neutrophiles est induite via la mitochondrie par les protéines pro-apoptotiques Bim (Protéine 11 de type Bcl-2), Bad (Agoniste de la mort cellulaire associé à Bcl-2) et Bax (Bcl-2 associé X)/Bak (Tueur antagoniste homologue à Bcl-2). La protéine Bad se couple à la protéine anti-apoptotique Bcl-XL (Lymphome à cellule B extra-large) permettant de l'inactiver et d'activer le cytochrome C. La protéine Bim en parallèle active Bax/Bak agissant sur la mitochondrie, libérant le cytochrome C. Le cytochrome C formera l'apoptosome après couplage avec la protéine APAF-1 (Facteur d'activation de la protéase apoptotique 1) pour ensuite cliver la pro-caspase-9 en caspase-9 la rendant active. La caspase-9 clivera à son tour la pro-caspase-3 en caspase-3 induisant l'apoptose. La caspase-3 clive la protéine nucléaire MNDA (Antigène de différenciation nucléaire des cellules myéloïdes) provoquant sa libération dans le cytoplasme qui se liera à la protéine anti-apoptotique Mcl-1 (Protéine 1 de cellule de leucémie myéloïde) l'inactivant. Ainsi, Mcl-1 bloquée ne peut pas empêcher l'apoptose, donc l'apoptose du neutrophile sera enclenchée. D'après Glennon-Alty et al., 2018 ; (Milot et al., 2012).

II. Les récepteurs impliqués dans la réponse immunitaire par les neutrophiles

Lors d'une réponse immunitaire, les neutrophiles sont la première ligne de défense et sont rapidement recrutés sur le site de l'infection par des médiateurs chimiotactiques. Afin de répondre à ces médiateurs et reconnaître le pathogène, les neutrophiles expriment plusieurs types de récepteurs à leur membrane (Tableau II).

Tableau II : Résumé des récepteurs exprimés par les neutrophiles (Futosi et al., 2013)

Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR)	Récepteurs Fc γ	Récepteurs aux compléments	Récepteurs aux chimiokines	Récepteurs aux cytokines
<i>Récepteur de type Toll</i>	Fc γ RI	CR1 (CD35)	CXCR1	<i>Récepteurs cytokine type I</i>
TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR8, TLR9	Fc γ RIIA Fc γ RIIB	CR3 (CD11b/CD18 ou Mac-1)	CXCR2 CXCR3 CXCR4	IL-4R, IL-6R, IL-12R, IL-15R, G-CSFR, GM-CSFR
<i>Lectine de type C</i>	Fc γ RIIA Fc γ RIIB	CR4 (CD11c/CD18)	CCR1 CCR2 CCR3 CCR5	<i>Récepteurs cytokine type II</i> IFN α / β R, IFN γ R, IL-10R
<i>Récepteur de type NOD</i>				<i>Familles TNFR</i> TNFR1/2, Fas
NOD2, NLRP3				
<i>Récepteur de type RIG</i>				<i>Famille IL-1</i> IL-1 α , IL- β et IL-18
RIG-1, MDA5				

II.1. Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR)

Les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) ou également appelés les récepteurs de l'immunité innée reconnaissent les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) ou les motifs moléculaires associés aux dommages tissulaires/cellulaires de l'hôte (DAMPs). Les DAMPs correspondent aux signaux de danger ou des alarmines tels que de l'ADN (Acide Désoxyribonucléique), ADN mitochondrial, de l'ARN (Acide ribonucléique), des histones, de l'ATP (Adénosine Diphosphate) et des protéines de l'hôte (HMGB1, eCIRP) libéré par les cellules et les tissus du soi lésé après présence du pathogène dans l'organisme (Angus and van der Poll, 2013; Denning et al., 2019). Ces récepteurs sont présents à la surface des cellules du système immunitaire inné (neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques) activant une cascade de signalisation ayant pour but de détruire le pathogène (Caster et al., 2017; El-Benna et al., 2016; Hotchkiss et al., 2016; van Kessel et al., 2014; Witter et al., 2016). Différents types de PRR sont exprimés à la surface des neutrophiles permettant de reconnaître chacun un type de pathogène :

i) Le récepteur Dectin-1 est un récepteur de type-lectine C (CLR) exprimé à la membrane et reconnaît les champignons.

ii) Les récepteurs de type domaine d'oligomérisation de liaison aux nucléotides (NLR) sont eux exprimés dans le cytoplasme et reconnaissent les composants peptidiques des bactéries gram-négatif et le peptidoglycane des bactéries gram-positif.

iii) Le récepteur du gène 1 inductible par l'acide rétinoïque (RIG) est également un récepteur cytoplasmique et permet de reconnaître l'ARN viral (Angus and van der Poll, 2013; Caster et al., 2017; Hotchkiss et al., 2016).

iv) Enfin, les TLR (récepteur de type Toll) permettent de reconnaître des bactéries ou des virus.

Les TLR sont les récepteurs permettant de faire face à différents types de pathogène. Il existe à la fois des TLR membranaires et des TLR cytoplasmiques :

i) Les **TLR membranaires** : Le récepteur TLR2 forme un hétérodimère avec TLR1 ou TLR6 et reconnaît les lipoprotéines des bactéries gram-positif (acide lipoteichoïque) et les mycoplasmes. Le récepteur TLR4 reconnaît le LPS des bactéries gram-négatif et le récepteur TLR5 est capable de reconnaître les flagellines (protéines constituant le flagelle des bactéries) (Salomão et al., 2008; Smith, 2014; van Kessel et al., 2014; Witter et al., 2016).

ii) Les **TLR intracellulaires** ou cytoplasmiques retrouvés dans les endosomes ou lysosomes du neutrophile : les récepteurs TLR9, TLR7 et TLR8 reconnaissent les acides nucléiques tels que les résidus CpG (Cytosine-phosphate-Guanine) de l'ADN hypométhylyé des bactéries, de l'ADN viral par TLR9 et l'ARN viral double brin par les TLR7 et TLR8 (Caster et al., 2017; Salomão et al., 2008; Smith, 2014).

Les TLR1/2, TLR2/6, TLR4, TLR7, TLR8 et TLR9 recrutent la protéine MyD88 (Réponse primaire de différenciation myéloïde 88) dans leur partie intracellulaire qui sera activée après fixation des ligands sur les TLR. L'activation de MyD88 phosphoryle les protéines IRAKs (Kinases associées au récepteur de l'interleukine-1) différentes entre les 2 types de TLR. Les TLR membranaires expriment les protéines IRAK1 et IRAK4 qui une fois activées provoquent l'activation d'une cascade protéique : TRAF6 (Récepteur au facteur de nécrose tumorale associé au facteur 6), TAK1 (Protéine kinase 1 activée par le facteur de croissance transformant B), MAPKK (Protéine kinase kinase activée par les mitogènes) et I κ κ (Inhibiteur de la kinase NF κ B). Le facteur NF κ B (Facteur nucléaire-kappa B) en absence d'activation du récepteur, est présent dans le cytoplasme lié à un inhibiteur I κ B (Inhibiteur du facteur nucléaire kappa B) l'inactivant. Lorsque le récepteur est activé, l'inhibiteur I κ B est inactivé par la protéine I κ κ, libérant le facteur NF κ B. Une fois NF κ B libéré de son inhibiteur, celui-ci est transloqué dans le noyau et permet la transcription de gènes cibles tels que la production et la libération de chimiokines, de cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires (Cecconi et al., 2018;

Futosi et al., 2013; Hotchkiss et al., 2016; Smith, 2014; Sônego et al., 2016; van Kessel et al., 2014; Witter et al., 2016) (Figure 8).

Cependant, NF κ B n'est pas le seul à provoquer la transcription de gènes cibles, TAK1 est responsable de la phosphorylation de la protéine MAPKK activant 3 voies : p38MAPK (Protéine kinase p38 activée par les mitogènes), JNK (Janus kinase) et ERK (Kinase régulée par le signal extracellulaire) activant la protéine AP-1 (Protéine d'activation 1) impliquée dans la production de cytokines et de chimiokines (Smith, 2014). La protéine TRAF6 est capable d'activer la protéine PI3K (Phosphatidylinositol-3 kinase) puis de phosphoryler la protéine Akt (Protéine kinase B) pour pouvoir induire la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Xiang et al., 2010).

Les TLR cytoplasmiques (TLR7, TLR8 et TLR9), activent via MyD88 les protéines IRAK1 et IRAK2 responsables de l'activation de la protéine TRAF3, activant le facteur de transcription IRF7 qui sera ensuite transloqué dans le noyau pour transcrire l'IFN (Interféron) de type 1 (Smith, 2014).

La production et la libération de cytokines et de chimiokines permettent aux neutrophiles de recruter d'autres types cellulaires et d'activer une réponse immunitaire contre le pathogène (Cecconi et al., 2018; Hotchkiss et al., 2016; Sônego et al., 2016; van Kessel et al., 2014; Witter et al., 2016) (Figure 8).

Les autres PRR (CLR, RIG et NLR) une fois activés via leur ligand, induisent eux aussi une voie de signalisation activant la production de cytokines et de chimiokines. Le récepteur CLR via la protéine RAF1, le récepteur RIG via la protéine TRAF6 et le récepteur NLR via la protéine TAK1 provoquent la translocation de NF κ B dans le noyau permettant la transcription des chimiokines et cytokines pro-inflammatoires. De plus le récepteur RIG via l'activation de TRAF3 permet la translocation du facteur IRF3 dans le noyau afin d'induire la transcription des IFN de type I (Hotchkiss et al., 2016; Smith, 2014) (Figure 8).

Les neutrophiles n'expriment pas seulement les PRR pour pouvoir reconnaître les pathogènes lors d'une réponse immunitaire, ils expriment un autre type de récepteur que l'on appelle les Fc γ R.

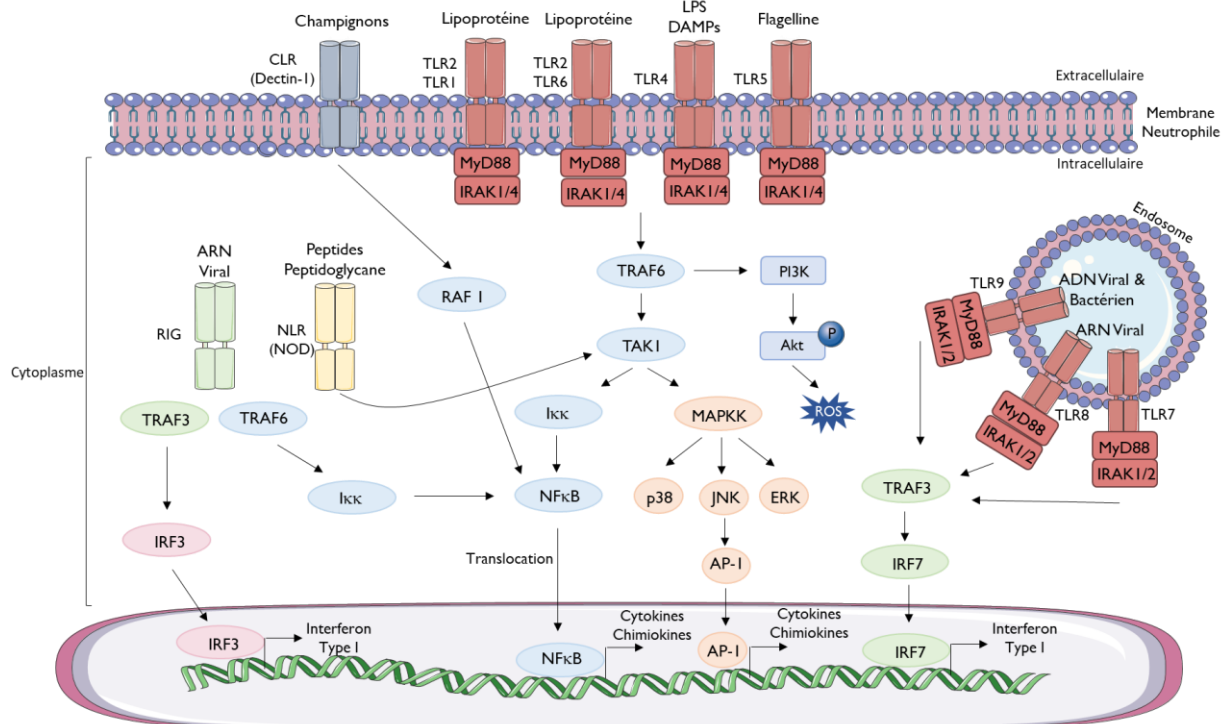


Figure 8 : Schéma des voies de signalisation à la suite de l'activation des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR)

Les neutrophiles expriment une famille de récepteurs les PRR permettant de reconnaître les PAMPs (Motifs moléculaires associés aux pathogènes) et les DAMPs (Motifs moléculaires associés aux dommages tissulaires/cellulaires de l'hôte) : **i**) TLR (Récepteur de type Toll) membranaires (TLR1/2, TLR2/6, TLR4 et TLR5) sont reconnus par les lipoprotéines des bactéries gram-positif, le LPS (lipopolysaccharide) des bactéries gram-négatif et les flagellines, respectivement. Ces récepteurs sont tous liés à la protéine MyD88 (Réponse primaire de différenciation myéloïde 88) qui sera activée après fixation de leur ligand, phosphorylant les protéines IRAK1 et 4, responsable d'une cascade d'activation protéique via la protéine TRAF6 (Récepteur au facteur de nécrose tumorale associé au facteur 6) et la protéine TAK1 (Protéine kinase 1 activée par le facteur de croissance transformant B). TRAF6 phosphoryle la protéine PI3K (Phosphatidylinositol-3 kinase) puis Akt (Protéine kinase B) responsable de la production de ROS (Espèces réactives de l'oxygène). La protéine TAK1 active à la fois la protéine Iκκ (Inhibiteur de la kinase NFκB) permettant d'inactiver la protéine IκB (Inhibiteur du facteur nucléaire kappa B) étant l'inhibiteur du facteur NFκB. Ainsi, NFκB n'étant plus lié à son inhibiteur est activé et transloqué dans le noyau afin d'induire la transcription de chimiokines et cytokines. La protéine TAK1 active la protéine MAPKK (Protéine kinase kinase activée par les mitogènes), phosphorylant 3 protéines kinases (p38, JNK (Janus kinase), ERK (Kinase régulée par le signal extracellulaire) provoquant la translocation du facteur AP-1 (Protéine d'activation 1) dans le noyau et induisant la transcription de cytokines et chimiokines. **ii**) TLR cytoplasmiques localisés dans l'endosome, TLR9 reconnaît les ADN viraux et bactériens, TLR8 et TLR7 reconnaissent l'ARN viral. Ils possèdent également la protéine MyD88 activant les protéines IRAK1 et 2 puis TRAF3 responsable de la translocation d'IRF7 dans le noyau afin de transcrire les interférons de type I. **iii**) Le récepteur CLR (récepteur type lectine-C) est membranaire, reconnaît les champignons responsables de l'activation de la protéine RAF1 et la translocation de NFκB dans le noyau. **iv**) Le récepteur RIG (récepteur du gène 1 inducible par l'acide rétinolique) après reconnaissance de l'ARN viral active 2 voies de signalisation : translocation de IRF3 dans le noyau via l'activation de TRAF3, et activation de la protéine Iκκ via TRAF6 permettant la translocation de NFκB dans le noyau. **v**) Enfin, le récepteur NLR (récepteur de type domaine d'oligomérisation de liaison aux nucléotides) est activé par la reconnaissance des peptides et peptidoglycane responsable de l'activation de la protéine TAK1. D'après Cecconi et al., 2018; Futosi et al., 2013; Hotchkiss et al., 2016; Smith, 2014; Sônego et al., 2016; van Kessel et al., 2014; Witter et al., 2016.

II.2. Récepteurs FcγR

Les récepteurs Fcγ (FcγR) permettent une meilleure reconnaissance du pathogène entouré par les immunoglobulines de type G (IgG, protéines les plus abondantes du sérum) lors de la

phagocytose. Plus précisément, les récepteurs de classe Fc γ R reconnaissent la partie Fc (fragment cristallisable) des anticorps monomériques ou agrégés c'est-à-dire lorsque l'anticorps reconnaît des antigènes formant un complexe immun (anticorps/antigènes), tels que les pathogènes entourés par les IgG, c'est l'opsonisation. Ainsi, le neutrophile exprime 3 récepteurs de classe Fc γ R permettant de reconnaître les IgG encerclant le pathogène :

i) **Fc γ RII (CD32)** constitué de 3 isoformes : Fc γ RIIa (CD32a), Fc γ RIIb (CD32b) et Fc γ RIIc (CD32c), mais Fc γ RIIb et Fc γ RIIc sont faiblement exprimé par les neutrophiles.

ii) **Fc γ RIII (CD16)** constitué de 2 isoformes : Fc γ RIIIa (CD16a) et Fc γ RIIIb (CD16b) seulement exprimé sur les neutrophiles, tandis que la forme Fc γ RIIIa est exprimé principalement à la surface des monocytes et des NK et faiblement sur les neutrophiles.

iii) **Fc γ RI (CD64)** exprimé après stimulation du neutrophile avec le facteur G-CSF et ayant la plus forte affinité de fixation aux IgG (Futosi et al., 2013; Nordenfelt and Tapper, 2011; Roberts and Barb, 2018; Rosales, 2017; Wang and Jönsson, 2019). Cependant, l'activation des neutrophiles par un complexe immun nécessite les 2 récepteurs CD32a et CD16b (Futosi et al., 2013).

Les différentes voies de signalisation des récepteurs Fc γ R sont activées via la reconnaissance de la partie Fc d'une IgG et chaque récepteur Fc γ R à une affinité différente pour chaque classe d'IgG : IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 (Tableau III).

Tableau III : Récepteur Fc γ R présentent différentes affinités pour les sous-classes d'IgG (Rosales, 2017) +++ forte affinité, ++ faible affinité, + très faible affinité, - pas d'affinité

	CD64 (FcγRI)	CD32a (FcγRIIa)	CD32b (FcγRIIb)	CD32c (FcγRIIc)	CD16a (FcγRIIIa)	CD16b (FcγRIIIb)
IgG1	+++	++	+	++	++	++
IgG2	-	++	+	+	+	-
IgG3	+++	++	+	++	++	++
IgG4	+++	++	+	++	+	++

Tous les récepteurs Fc γ R sauf CD32b et CD16b possèdent dans leur partie cytosolique des motifs ITAM (Motif activateur à base de tyrosine immunorécepteur) lesquels seront phosphorylés par la protéine kinase Syk (Tyrosine kinase de la rate) activée par la protéine Src-kinase. Cette activation provoque une cascade de signalisation impliquant différentes protéines pour activer les gènes impliqués dans la clairance du pathogène :

i) Activation de PI3K responsable de la production de PIP3 (Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate) activant les petites protéines GTPase (Rho et Rac). Ces protéines permettent la polymérisation de l'actine correspondant au cytosquelette du neutrophile responsable de sa mobilisation et de la phagocytose (Nguyen et al., 2017; Rosales, 2017). De plus, PIP3 recrute

la protéine PLC γ (Phospholipase C γ) capable de générer 2 protéines : DAG (Diacylglycérol) et IP3 (Inositol triphosphate). La protéine DAG active la protéine kinase C (PKC) provoquant la phosphorylation de ERK1/2 et p38MAPK activant le complexe NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) oxydase libérant des ROS en extracellulaire et en intracellulaire. La protéine IP3 induit la libération du calcium cytosolique via le réticulum endoplasmique. Ce calcium permet la fusion des granules avec la membrane du phagosome provoquant ainsi la dégranulation. Le calcium peut également agir sur l'activation de 2 protéines, la calmoduline et la calcineurine responsable de l'activation du facteur NFAT (Facteur nucléaire des cellules T activées) transloqué dans le noyau pour la production des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, TNF- α et IFN- γ) (Alemán et al., 2021; Nguyen et al., 2017; Rosales, 2017).

ii) Activation des protéines Ras/Raf responsable de l'activation de la protéine kinase MAPKK1/2 provoquant la phosphorylation de la protéine kinase ERK1/2. Cette dernière induit la translocation des facteurs NFAT, AP-1 et NF κ B dans le noyau pour induire la production des cytokines (IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α et IFN- γ), chimiokines et expression des protéines de survies.

iii) Phosphorylation de la petite protéine VAV phosphorylant une sous-unité du complexe NADPH oxydase et activant la protéine Rac par transformation du GDP (Guanosine Diphosphate) en GTP (Guanosine Triphosphate). L'activation de la protéine Rac est importante pour former le complexe NADPH oxydase et induire la production de ROS (Rosales, 2017) (Figure 9).

Lorsque le système immunitaire est activé, l'expression des récepteurs Fc γ R change drastiquement. La présence de l'IFN- γ et du facteur G-CSF augmente l'expression de CD64 améliorant la phagocytose et la destruction du pathogène suite à une meilleure reconnaissance de l'IgG monomérique et de la production de ROS (Wang and Jönsson, 2019). Mais la régulation de ces récepteurs peut également être modifiée à la suite d'une activation du récepteur au complément C5a augmentant l'activité des Fc γ R et diminuant celle de CD32b. A l'inverse lors d'une diminution de la réponse immunitaire, les cytokines anti-inflammatoires sont produites (IL-10, IL-4) et augmentent l'activité de CD32b (Rosales, 2017).

II.2.1. Récepteur Fc γ RIIb (CD32b)

Le récepteur CD32b est le seul récepteur lié à des motifs ITIM (Motif inhibiteur à base de tyrosine immunorécepteur) qui une fois phosphorylé active la protéine SHIP1 (Inositol polyphosphate-5-phosphatase 1) régulant négativement la cascade initiée par les motifs ITAM (Rosales, 2017; Wang and Jönsson, 2019) (Figure 9). Par son effet inhibiteur, il permet l'inactivation des autres récepteurs Fc γ R et donc de réguler la réponse immunitaire.

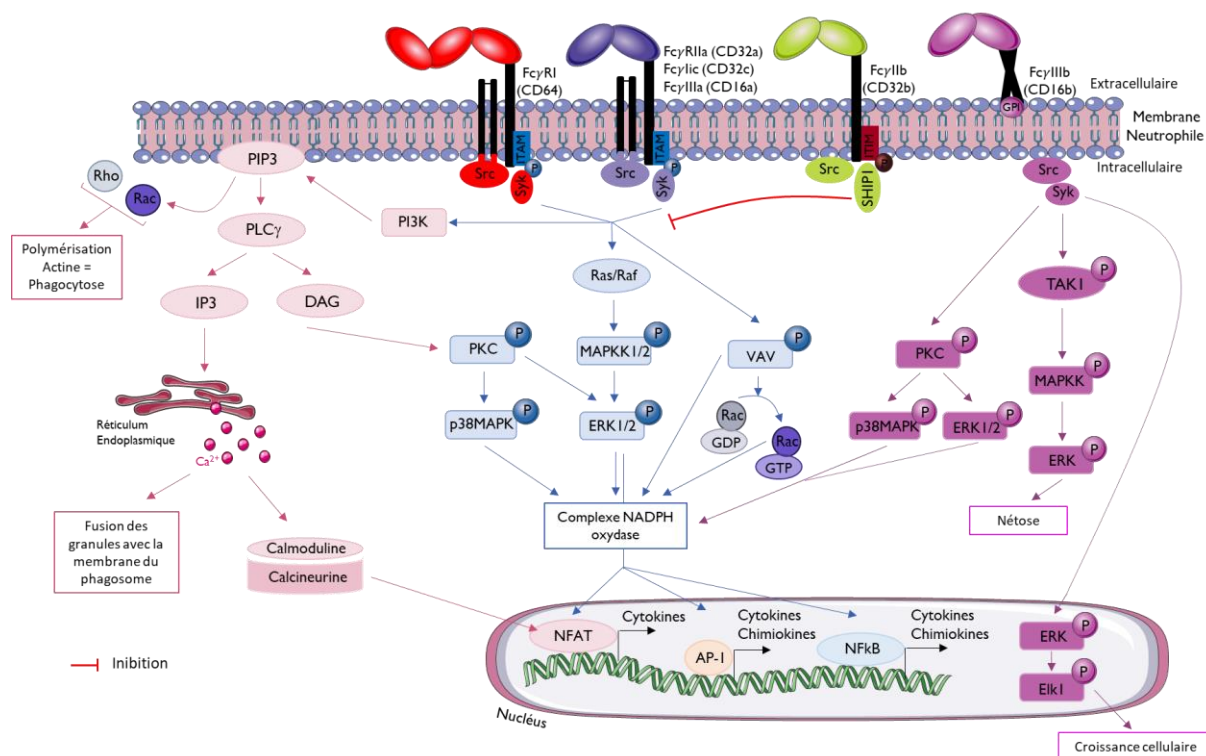


Figure 9 : Voie de signalisation après activation des récepteurs Fc γ R

Les Fc γ R sauf CD32b et CD16b possèdent des motifs ITAM qui seront phosphorylés par la protéine Syk activée par la protéine Src-kinase provoquant une cascade d'activation protéique : i) activation des protéines Ras/Raf puis de la protéine MAPKK phosphorylant la protéine ERK1/2 responsable de la production des cytokines et chimiokines. ii) Activation de la protéine PI3K donnant PIP3 activant PLC γ produisant 2 protéines : DAG responsable de l'activation de PKC puis phosphorylation de p38MAPK et ERK1/2 activant le complexe NADPH oxydase. La protéine IP3 induit la libération du calcium intracytoplasmique via le réticulum endoplasmique provoquant la fusion des granules avec la membrane du phagosome et l'activation de 2 protéines : la calmoduline et la calcineurine induisant la translocation dans le noyau du facteur NFAT responsable de la production des cytokines. iii) PIP3 peut également activer les petites protéines GTPases (Rho et Rac) responsable de la polymérisation de l'actine. iv) Phosphorylation de la protéine VAV responsable de la phosphorylation d'une sous-unité du complexe NADPH oxydase et de la protéine Rac nécessaire pour former le complexe NADPH oxydase. Le récepteur CD16b possède une voie de signalisation qui lui est propre après l'activation de la protéine Syk où une cascade d'activation est déclenchée : TAK1, MAPKK, ERK pour aboutir à la formation de NET. Mais la protéine Syk peut phosphoryler ERK se trouvant dans le noyau et activant Elk1 responsable de la survie des granulocytes. De plus, via PKC puis p38MAPK et ERK1/2 le récepteur CD16b est capable d'activer le complexe NADPH oxydase pour la production de ROS. Le récepteur CD32b est un inhibiteur responsable de l'inactivation des autres Fc γ R. D'après Alemán et al., 2021 ; Nguyen et al., 2017 ; Rosales, 2017

II.2.2. Récepteur Fc γ RIIIb (CD16b)

L'activité cytotoxique des granulocytes passe par ce récepteur lorsque celui-ci a rencontré le pathogène via les IgG (Roberts and Barb, 2018). Le récepteur CD16b est différent des autres Fc γ R, car il ne présente pas de motif ITAM mais est lié à la membrane par une protéine GPI (glycosylphosphatidylinositol). Cependant il semblerait que la protéine GPI soit dans un raft lipidique, endroit où se trouvent de nombreuses protéines kinases dont Src. Lors de l'activation du récepteur par son ligand, les protéines Src et Syk phosphorylent la protéine TAK1, activant successivement les protéines MAPKK et ERK pour induire principalement la nétose. D'autres fonctions sont également activées via cette voie de signalisation cellulaire telles que la

production de cytokines et chimiokines, l'induction de la phagocytose et la production de calcium via le canal TRPM2 (Canal cationique à potentiel transitoire membre 2) (Figure 9). De plus, il semblerait que CD16b soit capable de provoquer l'activation du complexe NADPH oxydase via la protéine Syk phosphorylant PKC qui active les protéines p38MAPK et ERK, mais ceci n'est pas tout à fait encore élucidé (Alemán et al., 2021, 2016; Coxon et al., 2000). Une dernière voie mise en évidence pour ce récepteur, est l'activation de la croissance cellulaire via la phosphorylation de la protéine nucléaire ERK, responsable de la phosphorylation du facteur nucléaire Elk1 (ETS facteur de transcription 1). Cependant le mécanisme précis de phosphorylation d'ERK nucléaire reste pour le moment inconnu, mais une étude a mis en évidence 6 variants de protéines MAPK/ERK dont certaines seraient capables de s'autophosphoryler (Alemán et al., 2016; García-García et al., 2009). Toutefois, ce récepteur subit des dommages lors d'une réponse immunitaire.

II.2.3. Clivage du récepteur Fc γ R111b (CD16b)

Après stimulation du neutrophile ou après la réalisation de la phagocytose, la partie cytoplasmique du récepteur CD16b est rapidement clivée. Ce clivage est rendu possible à la suite d'une activation d'une métalloprotéase ADAM17 (A Desintegrin And Metalloproteinase 17) qui par son domaine catalytique est capable de cliver le récepteur CD16b (Rosales, 2017; Wang et al., 2013).

ADAM17 est une métalloprotéase transmembranaire avec 4 domaines extracellulaires :

i) un domaine catalytique maintenu inactif par la protéine inhibitrice TIMP3 (Inhibiteur tissulaire de la métalloprotéinase 3).

ii) un domaine désintégrine permettant de reconnaître les intégrines jouant un rôle dans la migration cellulaire.

iii) un domaine membrane proximale ayant un rôle dans la régulation du clivage.

iv) et un domaine CANDIS (Séquence d'interaction dynamique conservée Adam seventeeN) correspondant à un domaine très conservé permettant de reconnaître les phosphatidylsérines présentes à la membrane des cellules améliorant leur interaction et donc le clivage des substrats.

ADAM17 présente une région cytosolique nécessaire pour son activation (Düsterhöft et al., 2019; Grötzinger et al., 2017) (Figure 10).

Lorsque le neutrophile phagocyte le pathogène ou reconnaît le fMLP (N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine) correspondant à un peptide bactérien capable d'induire une réponse immunitaire, des voies de signalisation se mettent en place pour pouvoir produire les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-1 β). Ces cytokines vont pouvoir contribuer à la destruction du

pathogène par la création de lésions dans sa membrane. Néanmoins, les cytokines sont produites par l'activation des protéines PKC, p38MAPK et ERK, également capable de phosphoryler la région cytosolique d'ADAM17. Cette phosphorylation est responsable du départ de la protéine TIMP3 et l'activation de son domaine catalytique clivant le récepteur CD16b. Le domaine CANDIS permet de renforcer l'interaction entre la protéase ADAM17 et le clivage du récepteur cible par la reconnaissance des phosphatidylsérines présentes dans la membrane du granulocyte (Düsterhöft et al., 2019; Grötzinger et al., 2017; Mishra et al., 2017; Wang et al., 2013, 2011) (Figure 10).

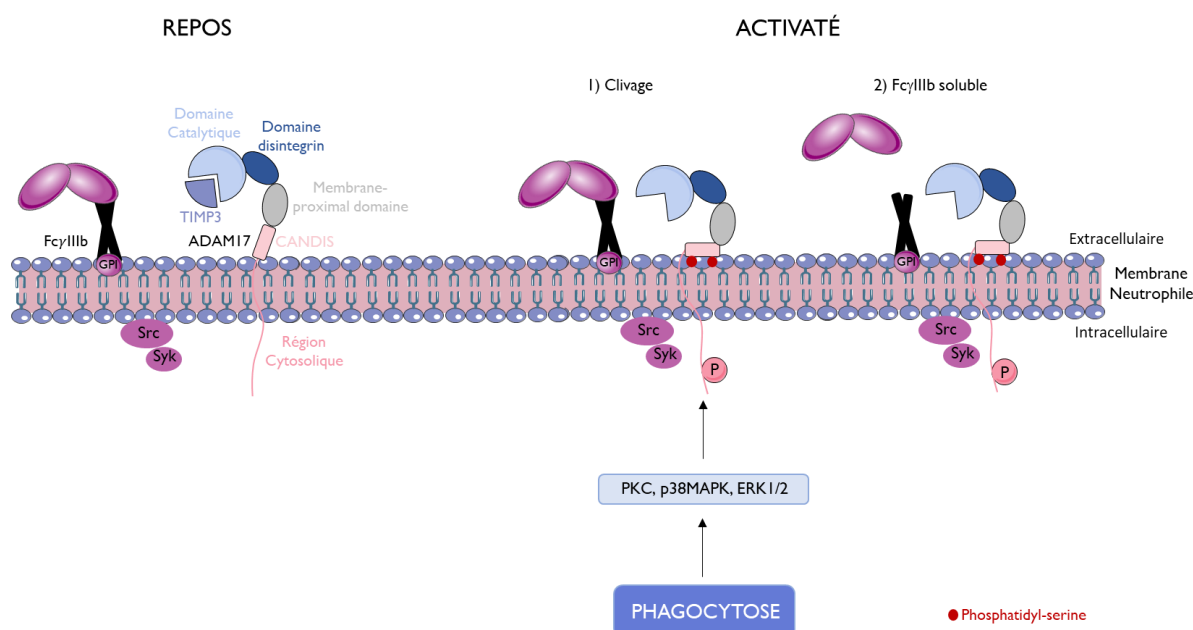


Figure 10 : Clivage du récepteur Fc γ RIIIb (CD16b) après activation du neutrophile par la protéine ADAM17

ADAM17 (A Desintegrin and Metalloproteinase 3) est une métalloprotéase constituée de 5 domaines : domaine catalytique, domaine désintégrine, domaine membrane-proximale, domaine CANDIS (Séquence d'interaction dynamique conservée Adam seventeenN) et la région cytosolique. Au repos, la métalloprotéase est exprimée à la membrane du neutrophile sous sa forme inactive bloquée au niveau de son domaine catalytique par la protéine TIMP3 (Inhibiteur tissulaire de la métalloprotéase 3). Lorsque le neutrophile phagocyte le pathogène, les voies de signalisation PKC, p38MAPK et ERK1/2 sont activées, phosphorylant la région cytosolique de la protéine ADAM17. Ainsi, le domaine CANDIS se lie aux phosphatidylsérines présentes dans la membrane du neutrophile renforçant l'interaction avec la cellule et le clivage du récepteur CD16b le rendant non fonctionnel. D'après Düsterhöft et al., 2019; Grötzinger et al., 2017; Mishra et al., 2017; Wang et al., 2013, 2011.

Cependant, les bactéries peuvent être opsonisées par d'autres protéines que les IgG telles que les protéines plasmatiques qui seront reconnues par les récepteurs du complément au moment de la phagocytose de la bactérie.

II.3. Récepteurs aux compléments

Le complément correspond à un complexe immun impliqué dans le système de surveillance de la réponse immunitaire innée. Il est composé par les protéines plasmatiques produites par le foie ou les protéines membranaires présent à la surface des cellules (Merle et al., 2015a).

La présence du pathogène dans l'organisme induit un changement conformationnel et l'activation du complément permet la dégradation des protéines plasmatiques en facteur du complément. Ces facteurs vont venir entourer le pathogène et seront reconnus par les récepteurs aux compléments (CR), aux nombres de 3 sur les neutrophiles : CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18 ou Mac-1) et CR4 (CD11c/CD18). Ces récepteurs, tout comme les récepteurs Fc γ R permettent une meilleure reconnaissance et phagocytose du pathogène via les facteurs du complément produits dans le plasma, les tissus ou à l'intérieur des cellules (Merle et al., 2015b, 2015a; van Kessel et al., 2014). Le complément peut être activé via 3 voies dépendantes du type de pathogène :

i) la **voie classique** reconnaissant les IgG fixés à la surface du pathogène via la protéine C1q produite par les macrophages, cellules dendritiques et monocytes.

ii) la **voie des lectines** indépendantes des IgG se liant directement sur le pathogène par des protéines sériques reconnaissantes des motifs sucrés (mannose, fructose, glucose) exprimés seulement par les bactéries, les virus et les cellules mortes via la protéine MBL (Lectine liant le mannose).

iii) la **voie alternative** exprimée constitutivement chez l'individu sain à faible niveau dépendant des composants du pathogène clivant ceux du complément (Merle et al., 2015b).

Les 3 voies convergent pour former l'enzyme C3 convertase hydrolysant le fragment C3 afin de donner 2 autres fragments : C3a responsable du recrutement des cellules immunitaires (macrophages, éosinophiles et neutrophiles) et C3b se fixant à la surface du pathogène lequel sera reconnu par les récepteurs CR1, CR3 et CR4 du neutrophile afin d'avoir une meilleure phagocytose du pathogène. Le facteur C3b se complexe à l'enzyme C3 convertase pour former C5 convertase, hydrolysant à son tour le fragment C5 en 2 fragments : C5a étant un fort chimio-attractant en particulier pour les neutrophiles, monocytes et macrophages, il permet la libération de cytokines et de chimiokines ainsi que la production de ROS par les neutrophiles et améliore la phagocytose. C5b recrute d'autres facteurs du complément (C6, C7, C8 et C9) afin de former le complexe d'attaque membranaire (MAC) à la membrane du pathogène. MAC correspond à un pore de 10nm de large ayant pour rôle la destruction du pathogène (Figure 11). Ce processus est surtout observé pour les bactéries gram-négatif car les bactéries gram-positif présentent une membrane épaisse dans lequel le complexe MAC ne peut pas s'infiltrer (Merle et al., 2015b; van Kessel et al., 2014).

Ainsi, le complément permet de participer à la destruction du pathogène via la création du MAC provoquant la lyse de celui-ci. Par la libération des facteurs du complément (C5a, C3b), il participe au recrutement des cellules de l'immunité innée (macrophages, éosinophiles, neutrophiles) afin d'augmenter la neutralisation du pathogène via C5a (Merle et al., 2015a,

2015b). Enfin, il permet une meilleure phagocytose du pathogène via la fixation du facteur C3b sur celui-ci, reconnu par les récepteurs du complément présent (CR1, CR3, CR4) à la surface du neutrophile (van Kessel et al., 2014).

Toutefois, lors de la pénétration du pathogène dans l'organisme, celui-ci provoque des lésions tissulaires et cellulaires libérant des protéines appelées chimiokines. Ces protéines permettent de créer un signal d'alerte et de recruter les cellules de la réponse immunitaire sur le site infectieux via les récepteurs couplés aux protéines G.

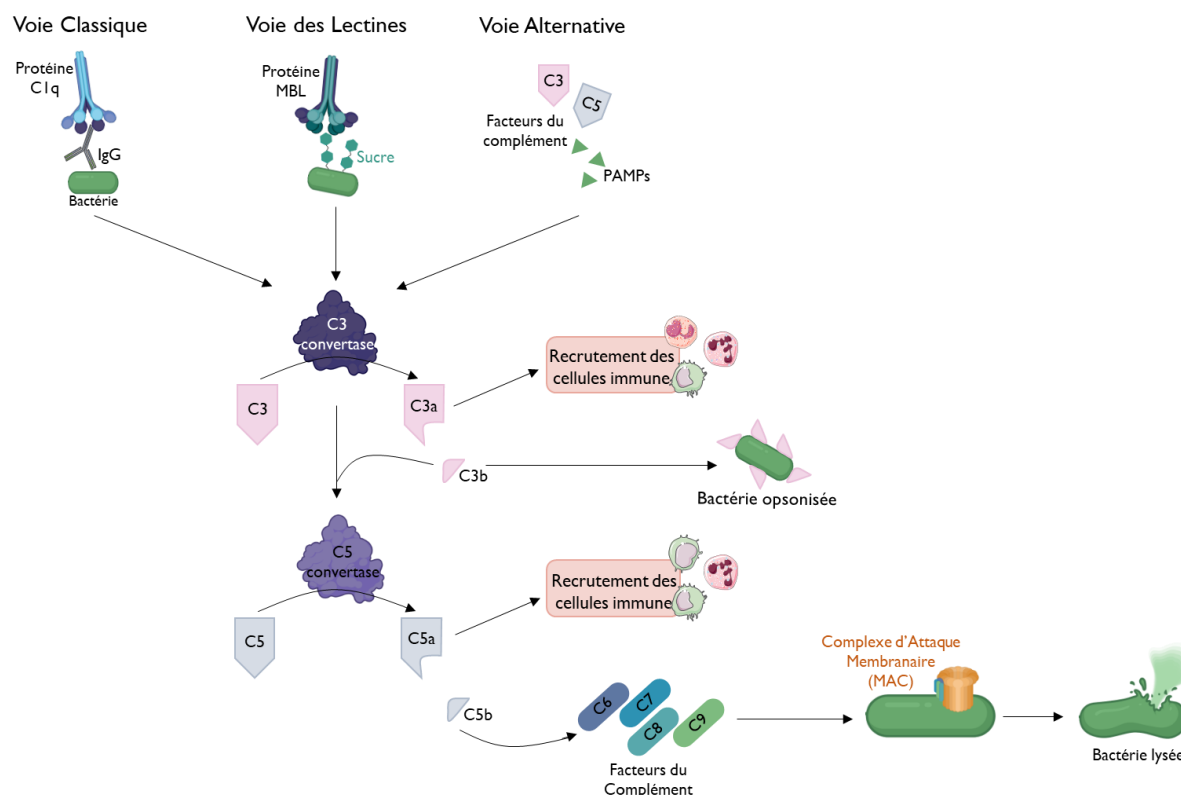


Figure 11 : Représentation simplifiée de la cascade d'activation du complément via les récepteurs CR1 et CR3

Les neutrophiles présentent à leur surface 3 récepteurs aux compléments CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) et CR4 (CD11c/CD18) permettant de reconnaître C3b un facteur du complément fixé sur le pathogène permettant une meilleure phagocytose de celui-ci. Cependant afin d'obtenir C3b, il est nécessaire que le complément soit activé suivant 3 voies dépendantes : **voie classique** reconnaissant les IgG fixés à la surface du pathogène via la protéine C1q ; **voie des lectines** reconnaissant les motifs sucrés se trouvant à la surface des bactéries, des virus et des cellules mortes via la protéine MBL (lectine liant le mannose). Enfin, la **voie alternative** constitutivement activée à faible niveau, reconnaît les motifs associés aux pathogènes. Les 3 voies convergent pour former la C3 convertase transformant le fragment C3 en C3a responsable du recrutement des cellules immunitaires et le fragment C3b se lie aux pathogènes. C3b se lie également à la C3 convertase afin de former C5 convertase hydrolysant le fragment C5 en C5a et C5b. C5b recrute les facteurs du complément : C6, C7, C8, C9 et forme le complexe d'attaque membranaire (MAC) responsable de la destruction du pathogène. Et C5a permet le recrutement des cellules de l'immunité sur le site où se trouve le pathogène. D'après Merle et al., 2015.

II.4. Récepteurs couplés aux protéines G (GPCR)

Durant une réponse immunitaire, le recrutement des cellules de l'immunité innée telle que les neutrophiles, les macrophages et les monocytes sont nécessaires pour pouvoir neutraliser et détruire le pathogène afin qu'il ne se répande pas dans l'organisme. De cette façon, des

chimiokines sont produites par les cellules présentes sur le site de l'infection via les cellules lésées par le pathogène permettant le recrutement des cellules et leur pré-stimulation (Metzemaekers et al., 2020; Rosales, 2020). Ainsi, les neutrophiles expriment à leur membrane des récepteurs permettant de reconnaître les chimiokines (récepteurs CXCR) appartenant à la famille des récepteurs couplés à la protéine G (GPCR) déterminant pour activer les fonctions essentielles du neutrophile (Ley et al., 2018; Rosales, 2020).

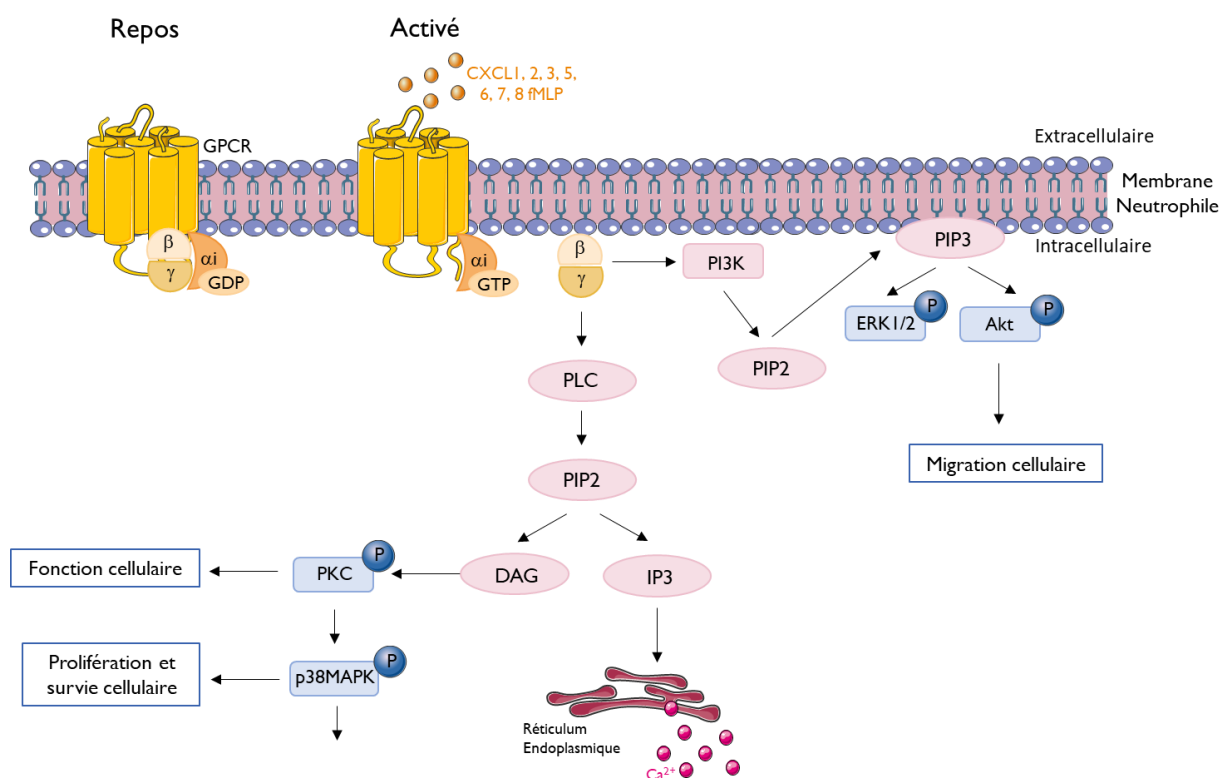


Figure 12 : Voie de signalisation des récepteurs GPCR après leur activation

Au repos, les récepteurs aux GPCR sont liés à la protéine hétérotrimérique constituée de 3 domaines : β , γ , α_i , « i » pour inhibiteur rendant le récepteur inactif. Lorsque les ligands se fixent sur le récepteur, cela provoque un changement conformationnel provoquant la transformation de la protéine GDP en GTP fixé sur le domaine α_i et responsable de sa séparation avec les 2 autres domaines. Ainsi, les domaines β et γ engendrent l'activation de plusieurs voies protéiques : i) activation de PLC capable de donner la protéine PIP2 qui se transforme en DAG activant la voie PKC puis p38MAPK et IP3 responsables de la libération du calcium produit par le réticulum endoplasmique. ii) PIP2 est capable de donner le PIP3 activant les voies ERK1/2 et Akt, mais PIP3 peut être activé par la voie PI3K. L'activation de ces voies de signalisation est responsable de la migration, des fonctions, de la prolifération, de la survie cellulaire et de la production de ROS par le neutrophile. D'après Metzemaekers et al., 2020; Sheshachalam et al., 2014.

Le GPCR contient 7 domaines transmembranaires interconnectés par 3 boucles intracellulaires et 3 extracellulaires. Au repos, le GPCR est lié à la protéine hétérotrimérique G constituée de 3 domaines : β , γ , α_i , « i » pour inhibiteur rendant le récepteur inactif. La fixation ligand/récepteur, provoque un changement conformationnel de celui-ci, transformant le GDP en GTP fournissant l'énergie nécessaire pour pouvoir séparer la protéine $G\alpha_i$ des 2 autres domaines β et γ . La protéine $G\beta\gamma$ provoque l'activation de plusieurs voies de signalisation telle que la PLC responsable de la conversion de PIP2 en DAG et IP3. Ce dernier

conduit à une mobilisation du calcium intracellulaire provenant du réticulum endoplasmique et DAG active la voie PKC activant la voie p38MAPK. Cependant, PIP2 par l'activation de la protéine PI3K peut être converti en PIP3 responsable de l'activation des voies ERK et Akt impliquées dans la migration cellulaire (Metzemaekers et al., 2020; Sheshachalam et al., 2014) (Figure 12).

De ce fait, les deux récepteurs GPCR les plus étudiés sont CXCR1 et CXCR2, le premier fixant 2 chimiokines (CXCL6 et CXCL8) tandis que le deuxième fixe 7 chimiokines (CXCL1, 2, 3, 5, 6, 7 et 8) (Borregaard, 2010; Capucetti, 2020; Caster et al., 2017; Chishti et al., 2004; El-Benna et al., 2016; Rosales, 2018). Le récepteur CXCR2 est important dans l'activation de plusieurs voies de signalisation telle que PI3K/Akt induisant la migration cellulaire, PLC/PKC affectant la fonction cellulaire ou p38MAPK responsable de la survie et de la prolifération cellulaire (Figure 12).

Néanmoins, lorsque CXCR2 reconnaît son ligand cela engendre son internalisation dans le neutrophile régulé par la métalloprotéase ADAM17. Ceci est un processus réversible permettant le recyclage de CXCR2 qui peut être de nouveau exprimé à la membrane du neutrophile (Mishra et al., 2017). Le récepteur CXCR2 n'est pas seulement impliqué dans la migration, prolifération et survie cellulaire. En effet, ce récepteur est impliqué dans la formation de NET et la dégranulation du neutrophile après reconnaissance de la chimiokine CXCL1 qui sont des processus importants pour la destruction du pathogène. Le récepteur CXCR1 quant à lui est surtout responsable de la production de ROS après activation de la voie des phospholipases D (PLD). Les 2 récepteurs CXCR1 et CXCR2 sont également impliqués dans la transcription de plusieurs cytokines et chimiokines via l'activation du facteur NF κ B amplifiant le recrutement des neutrophiles (Capucetti, 2020). Cependant, les neutrophiles expriment d'autres récepteurs aux chimiokines tels que CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CXCR3 et CXCR4 ayant des rôles importants dans la réponse immunitaire (Tableau IV). Ces récepteurs sont exprimés dans la membrane des granules puis lors de la dégranulation, les granules fusionnent avec la membrane plasmique du neutrophile permettant leur expression à sa surface (Capucetti, 2020; Ley et al., 2018).

Tableau IV : Ligands et fonctions des autres récepteurs GPCR exprimés par les neutrophiles (Capucetti, 2020 ; Metzemaekers et al., 2020)

Récepteurs	Ligands	Fonctions	Remarques
CCR1	CCL3, 4, 5, 7, 8, 14, 15, 16 et 23	Recrutement des neutrophiles	Expression améliorée en présence du facteur GM-CSF et des cytokines TNF- α et IFN- γ
CCR2	CCL2, 7, 8, 13 et 16	Augmentation dans des conditions infectieux responsables d'une augmentation de l'activité phagocytaire et production de ROS par le neutrophile	
CCR3	CCL3L1, CCL4, 5, 7, 11, 13, 15, 24, 26 et 28	Recrutement des neutrophiles	
CCR5	CCL3, CCL3L1, CCL4, 5, 8, 14 et 16	Recrutement des neutrophiles Augmentation dans des conditions infectieux responsable d'une augmentation de l'activité phagocytaire et production de ROS par le neutrophile	Neutrophiles pré-stimulés avec GM-CSF puis reconnaissance de CCL3 induisent la phosphorylation de ERK1/2
CXCR3	CXCL9, 10, 11	Phagocytose et production de ROS	Exprimé seulement sur les neutrophiles localisés dans les poumons
CXCR4	CXCL12	Bloque les neutrophiles dans la moelle osseuse, permet le retour des neutrophiles sénescents dans la moelle osseuse ou les organes	Exprimé sur les neutrophiles dans la moelle osseuse et les neutrophiles sénescents

Les GPCR ne sont pas les seuls récepteurs capables d'induire les fonctions essentielles à la défense contre le pathogène. Un autre type de protéines est produit par les cellules de l'immunité, ce sont les cytokines reconnues par les récepteurs du même nom présent à la surface des neutrophiles.

II.5. Récepteurs aux cytokines

Les neutrophiles sont capables de produire des protéines que l'on appelle les cytokines ayant une fonction importante dans la réponse immunitaire mais également dans la cicatrisation et la granulopoïèse. Les cytokines vont venir se fixer sur le récepteur du même nom et permettront d'agir sur le neutrophile lui-même ou sur d'autres types cellulaires de l'organisme. Ces récepteurs peuvent être divisés en 3 grandes catégories : les récepteurs aux cytokines dites de type I et II, les membres de la famille TNF (Facteur de nécrose tumorale) et la famille IL-1 (Futosi et al., 2013)

- **Les récepteurs de type I et II**

Les récepteurs de type I se présentent sous la forme d'hétérodimère (IL-4R, IL-6R, IL-12R, IL-15R et GM-CSFR) ou d'homodimère (G-CSFR) partageant des chaînes communes avec d'autres types de récepteurs (IL-2, IL-7, IL-9, IL-13 et IL-21). Tandis que les récepteurs de type II (IFN- α , IFN- β , IFN- γ et l'IL-10) partagent moins de chaînes avec les autres récepteurs mais sont fortement présents à la surface des neutrophiles. Lorsque les cytokines sont produites, elles viennent se fixer à leur récepteur et sont alors responsables de l'activation d'une cascade protéique via la protéine JAK. Cette protéine une fois activée via la fixation ligand/récepteur, provoque la phosphorylation des résidus tyrosines présentes sur la partie intracellulaire du récepteur. Ces résidus tyrosines engendrent la phosphorylation de 2 facteurs de transcription STAT (Transducteurs et activateurs de signaux de la transcription) libérés dans le cytoplasme et vont s'associer pour former un dimère. Ce dimère est ensuite transloqué dans le noyau où il reconnaîtra des séquences d'ADN et régulera la transcription des gènes essentiels de la réponse immunitaire telle que la transcription de l'IFN (Futosi et al., 2013) (Figure 13).

- **Les récepteurs TNF**

Les récepteurs de la famille TNF peuvent être divisés en 2 catégories : les récepteurs TNF avec un domaine de mort (TNFR1, TNFR2, Fas) et sans domaine de mort (RANK). Les récepteurs TNFR1 et TNFR2 ont pour ligand la cytokine TNF- α responsable de l'activation et du priming des neutrophiles via l'activation de voie de signalisation différente entre les 2 récepteurs (Futosi et al., 2013).

Concernant la voie de signalisation passant par le récepteur TNFR1, lorsque le TNF- α se fixe sur TNFR1 cela engendre le recrutement de 2 protéines : TRADD (Domaine de mort associé au récepteur du facteur de nécrose tumorale de type 1) et RIPK1 (Protéine Sérine/thréonine kinase interagissant avec les récepteurs) conduisant au recrutement de 2 protéines inhibitrices de l'apoptose cIAP1 et cIAP2 (Inhibiteur cellulaire de la protéine apoptotique 1 ou 2) et de 2 autres protéines TRAF2, TRAF3 responsables de la dégradation de RIPK1 (Wang et al., 2018). L'ensemble de ces protéines appelées le complexe I est responsable de l'activation du facteur NF κ B régulant la transcription des gènes impliqués dans la survie, la prolifération et la production de cytokines pro-inflammatoires (Futosi et al., 2013; Wang et al., 2018). Lors d'une forte concentration en TNF- α , le récepteur TNFR1 aura une activité pro-apoptotique impliquée dans l'activation des protéines RIPK1, TRADD et FADD (Domaine de mort associé à Fas). Cette activation protéique provoque un changement conformationnel du récepteur, ce qui entraîne son internalisation dans le neutrophile. Ces protéines viennent activer la caspase-8 responsable de l'apoptose (Futosi et al., 2013; Wang et al., 2018). La fixation de TNF- α à

TNFR1 peut aussi induire la phosphorylation de la protéine p38MAPK augmentant la production de ROS et l'activation de la caspase-3 induisant l'apoptose du neutrophile (Figure 13) (Futosi et al., 2013; Geering et al., 2011). La cytokine TNF- α peut également se fixer sur un autre récepteur TNF, le TNFR2 qui active la même réponse cellulaire (survie, prolifération) que TNFR1 mais via une signalisation différente. En effet, lorsque le TNF- α se fixe sur le récepteur, la protéine TRADD est activée recrutant directement les protéines TRAF2, TRAF3, cIAP1 et cIAP2 pour activer le facteur NF κ B (Futosi et al., 2013) (Figure 13).

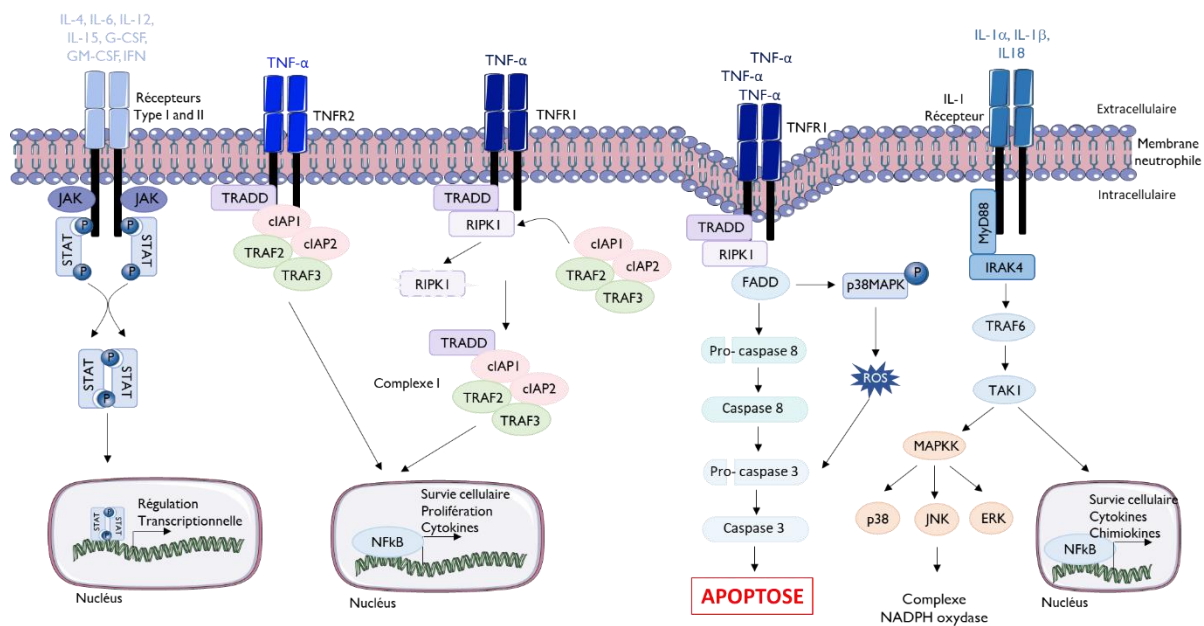


Figure 13 : Voies d'activations des récepteurs cytokiniques

Les neutrophiles possèdent 3 grands types de récepteurs : i) les récepteurs de type I et II capable de reconnaître les cytokines IL-4, IL-6, IL-12, G-CSF, GM-CSF et IFN provoquant l'activation des protéines JAK phosphorylant des résidus tyrosines présents sur le récepteur. Les protéines STAT (Transducteur et activateur de signaux de la transcription) vont venir reconnaître les résidus tyrosines provoquant leur phosphorylation et former un dimère. Ce dimère sera par la suite transloqué dans le noyau pour transcrire les gènes de régulation de la réponse immunitaire. ii) les récepteurs TNFR1 et TNFR2 reconnaissent la cytokine TNF- α impliquée dans l'activation du facteur NF κ B responsable de la survie, prolifération cellulaire et production de cytokines via une activation d'une cascade protéique différente entre les 2 récepteurs. En effet, la protéine TRADD (Domaine de mort associé au récepteur du facteur de nécrose tumorale de type 1) du récepteur TNFR2 provoque le recrutement de 4 protéines : cIAP1 (Inhibiteur cellulaire de la protéine apoptotique), cIAP2, TRAF2 et TRAF3. Tandis que la protéine TRADD du récepteur TNFR1 est liée à la protéine RIPK1 (Protéine sérine/thréonine kinase interagissant avec les récepteurs) qui sera ubiquitiné par les protéines cIAP1 et 2 où elles pourront se fixer à TRADD et recruter les autres protéines TRAF2 et 3. Mais en présence de forte concentration de TNF- α , la protéine RIPK1 n'est pas dégradée, il y a alors recrutement de la protéine FADD (Domaine de mort associé à Fas) activant les caspases-8 et 3 provoquant l'apoptose du neutrophile. TNFR1 peut également activer la voie p38MAPK, augmenter la production de ROS et augmenter l'activation de la caspase-3. iii) les récepteurs IL-1, reconnaissent les cytokines IL-1 α , IL-1 β et IL-18 qui dès fixation sont responsables du recrutement de la protéine MyD88, puis IRAK4, TRAF6 et enfin TAK1. Cette dernière est responsable de l'activation de MAPKK et le facteur NF κ B, impliqué dans l'activation du complexe NADPH oxydase et la production de cytokines et chimiokines, respectivement. D'après Futosi et al., 2013 ; Geering et al., 2011.

- **Les récepteurs de la famille IL-1**

Les neutrophiles présentent un autre type de récepteur appartenant à la famille IL-1, important dans la réponse immunitaire permettant de reconnaître d'autres cytokines telles que IL-1 α , IL-1 β et l'IL-18 (Futosi et al., 2013; Tecchio et al., 2014). Le récepteur IL-1 est activé via la protéine MyD88 après reconnaissance de l'IL-1 β et l'IL-18 provoquant le recrutement de la protéine IRAK4. Ces protéines vont par la suite activer la protéine TRAF6, puis TAK1 activant les protéines ERK, JNK et p38MAPK via la protéine MAPKK et le facteur NF κ B. Ainsi, l'IL-1 β permet d'augmenter la survie du neutrophile et IL-18 la production de cytokines et de chimiokines, améliorer l'activation du complexe NADPH oxydase et inhiber l'apoptose du neutrophile (Futosi et al., 2013; Schett et al., 2016). La cytokine IL-1 α se fixe sur le même récepteur que les 2 autres cytokines mais n'induit pas les mêmes fonctions qu'IL-1 β et IL-18, elle est surtout impliquée dans l'induction de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF et IL-6) (Schett et al., 2016) (Figure 13).

L'ensemble des récepteurs présents à la surface du neutrophile permettra dans un premier temps de prévenir les granulocytes de la présence d'un pathogène dans l'organisme et dans un deuxième temps d'activer les fonctions du neutrophile afin d'éliminer ce pathogène.

III. Fonction des neutrophiles

Les neutrophiles sont les leucocytes les plus nombreux dans le sang, par conséquent ils ont un rôle primordial dans la réponse immunitaire face à un pathogène. Le neutrophile possède 3 grandes fonctions : la dégranulation, la phagocytose et la nétose (Mócsai, 2013).

III.1. Dégranulation

Le neutrophile est constitué de 3 types de granules (primaire, secondaire et tertiaire), ainsi que des vésicules sécrétrices qui lors d'une réponse immunitaire, vont venir fusionner avec la membrane plasmique du neutrophile ou la membrane du phagosome, c'est la dégranulation (Lacy, 2006; Sheshachalam et al., 2014). Ce processus précis n'est pas totalement élucidé, mais il semblerait qu'après activation des récepteurs aux GPCR, une cascade d'activation protéique serait enclenchée permettant la fusion des granules avec la membrane plasmique du neutrophile (Lacy, 2006; Rosales, 2020). En effet, après fixation des ligands sur le récepteur aux GPCR cela engendre l'activation en cascade de plusieurs protéines : PI3K, PIP3, PLC γ et IP3 aboutissant à la libération calcique produit par le réticulum endoplasmique (Lacy, 2006). Cette augmentation de calcium dans le cytoplasme agit sur la mobilisation des filaments d'actines correspondant au cytosquelette du neutrophile rapprochant les granules vers sa

membrane plasmique. Afin de permettre le rapprochement et le contact entre les granules et la membrane plasmique du neutrophile, un type de protéines SNARE (SNAP REcepteur) sont exprimées : les VAMPs (Protéine membranaire associée à des vésicules) pour les granules et SNAP-23 et syntaxin-4 pour la membrane du neutrophile (Cowland and Borregaard, 2016; Lacy, 2006). Par conséquent, les VAMPs reconnaissent SNAP-23 et syntaxin-4 provoquant la fusion des granules avec la membrane plasmique, créant un pore réversible et la libération des protéines antibactériennes contenues dans les granules en extracellulaire (Lacy, 2006; Rosales, 2020). Néanmoins, d'autres récepteurs sont impliqués dans la dégranulation, tels que les TLR et récepteurs Fc γ R activant la voie PI3K. Les récepteurs Fc γ R activent en plus la protéine VAV responsable de l'activation de la petite protéine Rac provoquant la mobilisation des granules (Sheshachalam et al., 2014) (Figure 14).

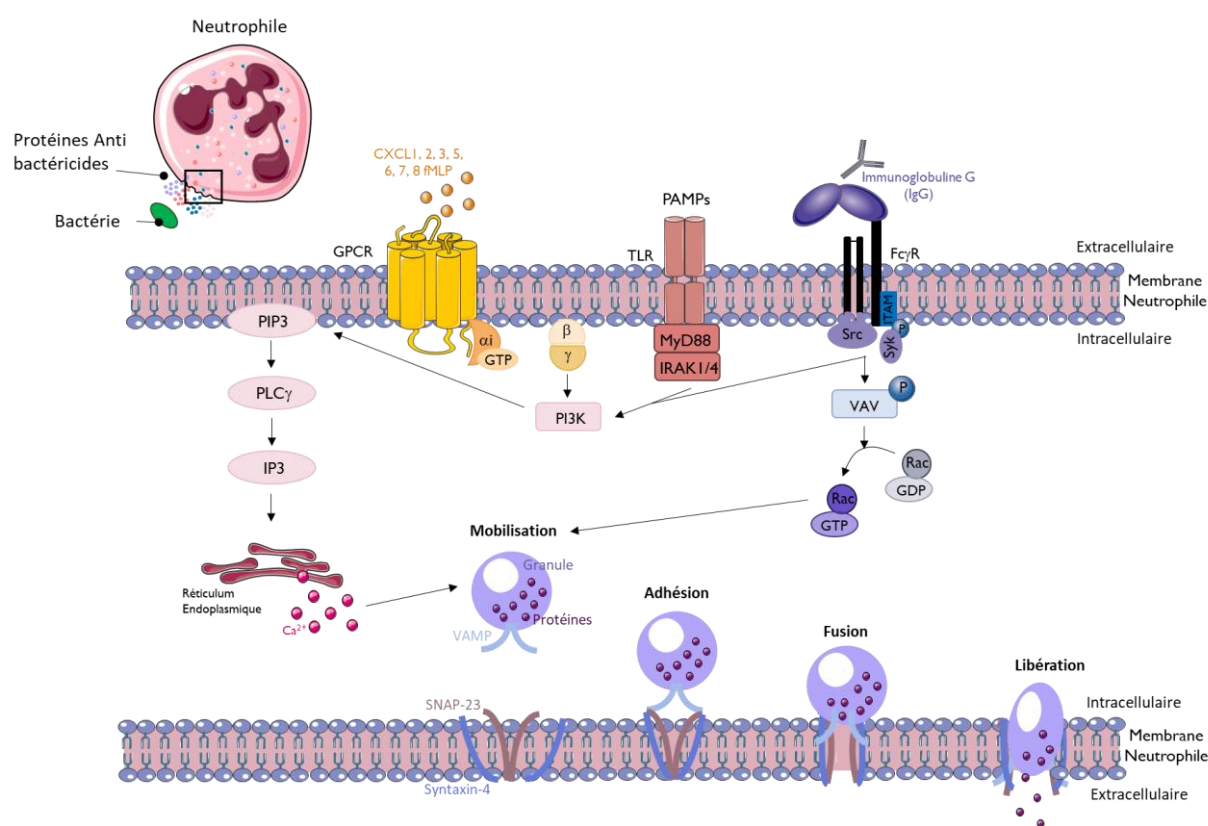


Figure 14 : Mécanisme de fusion des granules du neutrophile avec sa membrane plasmique pour libérer les protéines antibactériennes

La dégranulation des granules en dehors du neutrophile passe par l'activation du récepteur aux GPCR, TLR et Fc γ R après fixation de leurs ligands. L'activation de ces récepteurs provoque une cascade d'activation impliquant plusieurs protéines : PI3K, PIP3, PLC γ , IP3. Cette dernière provoque la libération d'une grande concentration calcique via le réticulum endoplasmique responsable d'une mobilisation des filaments d'actine se résultant par un mouvement des granules vers la membrane plasmique. De plus le récepteur Fc γ R active la protéine VAV activant la protéine Rac responsable de la mobilisation des granules. Le granule grâce aux protéines VAMPs (Protéine membranaire associée à des vésicules) présent à sa membrane, lie les autres protéines SNAP-23 et syntaxin-4 présent à la membrane du neutrophile. Après l'adhésion des granules à la membrane, un pore réversible se crée, le granule fusionne et libère ses protéines antimicrobiennes en dehors du neutrophile. D'après Lacy, 2006 ; Sheshachalam et al., 2014 ; Cowland and Borregaard, 2016.

Cependant, l'augmentation du calcium est responsable d'un ordre hiérarchique pour la libération des granules qui est comme suit : vésicules sécrétrices, granules tertiaires, granules secondaires et granules primaires (Sheshachalam et al., 2014). De plus, le neutrophile doit être pré-stimulé par des cytokines pro-inflammatoires, chimiokines ou produits bactériens pour que les granules primaires puissent libérer leur contenu en dehors du neutrophile. Tandis que les granules secondaires et tertiaires ne requièrent pas de pré-stimulation (Miralda et al., 2017; Rosales, 2020). Une étude *in vivo* a mis en évidence que les neutrophiles libéraient 100 % de leurs vésicules sécrétrices, 40 % de leurs granules tertiaires, 20 % de leurs granules secondaires et moins de 10 % de leurs granules primaires (Miralda et al., 2017; Sheshachalam et al., 2014; Vogt et al., 2018).

III.2. Phagocytose

La phagocytose est un processus actif par lequel le neutrophile réarrange son cytosquelette constitué de filaments d'actines permettant l'extension de sa membrane plasmique autour du pathogène formant ainsi les pseudopodes. L'internalisation du pathogène par les pseudopodes est dépendante des récepteurs présents à la surface du neutrophile et permet de reconnaître les IgG ou le facteur du complément (C3b) entourant le pathogène. Les extrémités des pseudopodes fusionnent permettant de créer le phagosome contenant le pathogène et dans lequel seront déversés les granules et les ROS afin de détruire le pathogène par lyse de ses membranes. Puis, les composants du pathogène non digérés par le neutrophile seront expulsés du granulocyte par exocytose (Nordenfelt and Tapper, 2011) (Figure 15).

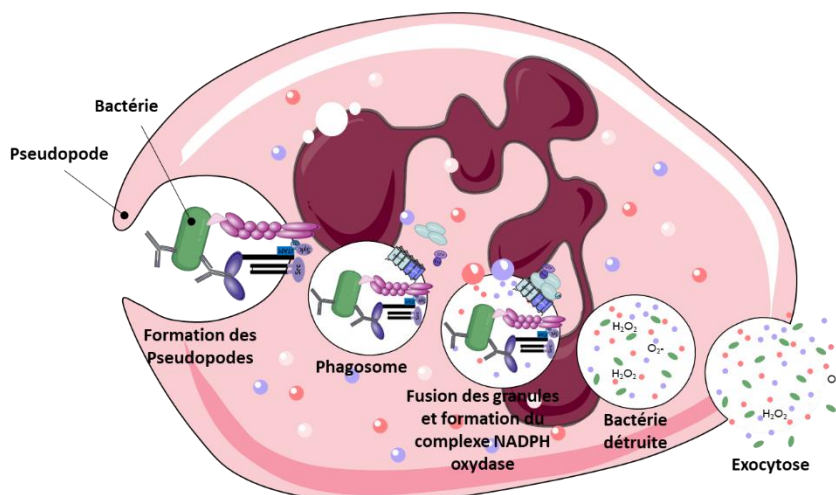


Figure 15 : Les grandes étapes de la phagocytose dans le neutrophile

Les récepteurs Fc γ R et du complément permettent de reconnaître le pathogène par les IgG et le facteur C3b présent à sa surface formant les pseudopodes correspondant à l'extension de la membrane plasmique du neutrophile et améliorant sa phagocytose. Le pathogène est internalisé dans le neutrophile formant le phagosome, et les granules fusionnent avec la membrane du phagosome. Au cours de sa formation, les sous-unités du complexe NADPH oxydase pour la production de ROS s'assemblent. Les granules et la production de ROS détruisent le pathogène pour ensuite expulser les composants non digérés du pathogène par exocytose. D'après Nordenfelt and Tapper, 2011.

La première étape de la phagocytose est la reconnaissance des IgG ou du facteur C3b présents à la surface du pathogène par les récepteurs CD32a (Fc γ RIIa), CD64 (Fc γ RI) et CD16b (Fc γ RIIIb) décrit comme étant indispensable pour la phagocytose ou par les récepteurs CR1 et CR3 du neutrophile, respectivement. La présence des IgG et/ou de C3b autour du pathogène correspond à l'opsonisation permettant une meilleure phagocytose du pathogène par le neutrophile. Il semblerait que le neutrophile soit capable d'internaliser le pathogène lié aux IgG en moins de 20 secondes contre plusieurs minutes pour le macrophage (Nordenfelt and Tapper, 2011). La rencontre récepteur/ligand provoque l'activation des récepteurs responsables de l'extension de la membrane plasmique par la polymérisation de l'actine et le changement des lipides afin de former les pseudopodes (Nordenfelt and Tapper, 2011; Nunes et al., 2013; Rosales, 2020; van Kessel et al., 2014). Ainsi, les récepteurs Fc γ R du neutrophile sont activés après reconnaissance de leurs ligands présents sur le pathogène, augmentant le niveau de calcium cytosolique responsable de la fusion des granules primaires et secondaires avec la membrane du phagosome en cours de formation. De plus, la polymérisation de l'actine permet le mouvement des granules primaires, secondaires et tertiaires vers la membrane plasmique afin de déverser leur contenu dans le milieu extracellulaire pour pouvoir neutraliser les pathogènes non phagocytés (Nordenfelt and Tapper, 2011; Nunes et al., 2013; van Kessel et al., 2014). Au cours de la formation du phagosome, le complexe NADPH oxydase est assemblé dans la membrane du phagosome et la production de ROS peut avoir lieu dans le phagosome afin de détruire le pathogène (Rosales, 2020).

La deuxième étape de la phagocytose, correspond à la fusion des pseudopodes pour pouvoir former le phagosome et internaliser le pathogène. Ainsi, le pathogène est présent dans le phagosome en présence des protéines antibactériennes (élastases, cathepsines G et protéases) contenues dans les granules permettant la destruction du pathogène (Leliefeld et al., 2016; Nordenfelt and Tapper, 2011; Nunes et al., 2013; van Kessel et al., 2014). Néanmoins, le pH du phagosome du neutrophile conserve un pH neutre (pH=7) contrairement au pH du phagolysosome du macrophage qui est acide (pH=4/5). Ce phénomène peut s'expliquer par la présence des protons (H⁺) présents dans le phagolysosome du macrophage médié par l'activation des canaux chlorure et V-ATPase acidifiant le milieu. Les protons sont nécessaires pour recycler les récepteurs, activer les enzymes et réguler le complexe NADPH oxydase permettant la production de ROS et la destruction du pathogène. Toutefois, le pH du phagosome des neutrophiles reste neutre car les protons sont directement pris en charge par le complexe NADPH oxydase et ne présentent pas de canal V-ATPase (Glennon-Alty et al., 2018; Nordenfelt and Tapper, 2011; Nunes et al., 2013; Segal, 2005). Dans le macrophage, le pH acide est nécessaire afin de dégrader le pathogène, mais dans le neutrophile celui-ci ne

semble pas nécessaire car certaines enzymes peuvent fonctionner sous un pH neutre telle que la MPO (Nordenfelt and Tapper, 2011).

Une étude a mis en évidence que les neutrophiles de donneurs sains ont la même capacité de phagocytose avec des bactéries opsonisées ou non opsonisées (Edmisson et al., 2018). Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que les TLR sont capables de reconnaître les PAMPs et d'induire une voie de signalisation aboutissant à la production de cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, il semblerait que le TLR4 soit impliqué dans l'activation de la phagocytose via la protéine kinase IRAK4 jouant également un rôle dans l'exocytose des granules et la production de ROS, mais le mécanisme précis n'est pas étudié (Prince et al., 2011; Rosales, 2020).

La phagocytose permet la destruction des pathogènes via la MPO, les ROS et l'oxyde nitrique (NO) venant détruire la membrane polysaccharidique des bactéries (Serteyn et al., 2003). Grâce à ce processus les neutrophiles sont capables de phagocyter plus de 50 bactéries en quelques secondes contre plusieurs minutes pour le macrophage (van Kessel et al., 2014). Une étude sur le *zebrafish* a mis en évidence qu'un neutrophile peut phagocyter en moyenne 300 bactéries (*E.coli*) par heure (Colucci-Guyon et al., 2011). Néanmoins, certains pathogènes peuvent échapper à la phagocytose due à leur taille comme les virus, les parasites, ou parce qu'ils possèdent des moyens de défense empêchant de reconnaître leur antigène, c'est le cas des bactéries encapsidées (Branzk et al., 2014; Warnatsch et al., 2017). Ainsi, les neutrophiles possèdent un autre mécanisme de défense contre le pathogène, c'est la nétose.

III.3. Nétose

La nétose est un mécanisme de mort cellulaire programmée, activée par plusieurs types de micro-organismes (Tableau V) provoquant le suicide du neutrophile (Alemán et al., 2016; Li and Tablin, 2018; Rosales, 2018). C'est un processus par lequel 10 % des neutrophiles deviennent des NET correspondant à la libération de leur chromatine en extracellulaire associée aux protéines nucléaires (histones) et protéines antimicrobiennes (MPO, défensines, élastase, cathepsine G et lactoferrine) permettant de piéger les pathogènes dans le « filet » d'ADN (Alemán et al., 2016; Li and Tablin, 2018; Lu et al., 2012; Rosales, 2018).

La nétose est complémentaire à la phagocytose car d'une part elle pourra neutraliser les pathogènes ayant échappé à la phagocytose. D'autre part, l'ensemble des pathogènes ne peuvent pas être phagocytés par le neutrophile, tels que les champignons, les protozoaires et les parasites dus à leur grande taille nécessitant la nétose. Ainsi la formation de NET sera plus sensible aux pathogènes de grande taille détectée par les récepteurs présents à la surface du neutrophile (Ley et al., 2018; Lipińska-Gediga, 2017; Warnatsch et al., 2017). Cette formation

est rendue possible après fixation des ligands sur les récepteurs Fc γ R (complexes immuns, bactéries opsonisées), TLR (bactéries gram-positif ou négatif, LPS), CLR (champignons), aux cytokines (TNF- α , IFN) et aux compléments (bactéries opsonisées) (Caster et al., 2017; Glennon-Alty et al., 2018; van Kessel et al., 2014; Zawrotniak et al., 2017). L'activation de ces récepteurs conduit à l'activation de voie de signalisations cellulaires telles que p38MAPK, Akt et ERK1/2 responsable de l'activation du complexe NADPH oxydase impliqué dans la production de ROS importante pour la formation de NET. En effet, les ROS intracellulaires sont responsables d'une augmentation de la perméabilité membranaire provoquant la libération de la chromatine hors du neutrophile (Hashiba et al., 2015; Leliefeld et al., 2016; Li and Tablin, 2018; van Kessel et al., 2014). Afin que la chromatine sorte du neutrophile, le noyau se décondense, la membrane nucléaire se rompt provoquant l'expansion de la chromatine dans le cytosol. Puis le contenu des granules est libéré dans le cytosol entraînant la lyse de la membrane plasmique et la libération de la chromatine (Alemán et al., 2016; Caster et al., 2017; Hashiba et al., 2015; Kovach and Standiford, 2012; Rosazza et al., 2021).

Tableau V : Les pathogènes capables de déclencher la nétose chez les neutrophiles (Li and Tablin, 2018)

Micro-organismes	Espèces	Types de nétose
BACTERIES		
<i>Staphylococcus aureus</i>	Souris, Humain	Vital
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Humain	Suicide
<i>Escherichia coli</i>	Humain, Souris, Cheval, chats, bovin	Vital en présence de plaquette
LPS d' <i>E.coli</i>	Humain, souris, chien	Vital <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>
VIRUS		
HIV	Humain	Suicide ROS dépendant
Influenza H1N1	Humain	Suicide ROS dépendant
Influenza A	Souris	Suicide
PARASITES		
<i>Toxoplasma gondii</i>	Humain, souris, phoques	Suicide
FONGI		
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Humain	Suicide
<i>Candida albicans</i>	Humain	Vital

Il existe un autre type de formation de NET qui est rapide et permet de garder le neutrophile vivant, c'est ce que l'on appelle la nétose vitale (Denning et al., 2019; Li and Tablin, 2018; Lipińska-Gediga, 2017; Rosazza et al., 2021). Elle se produit après stimulation du neutrophile via les TLR4 et coopère avec le récepteur aux compléments CR3. Il semblerait que l'ADN libéré en extracellulaire, soit de l'ADN mitochondrial contenu dans des vésicules fusionnant avec la membrane plasmique du neutrophile et nécessitant l'activation du complexe NADPH oxydase en absence de lyse de sa membrane (Denning et al., 2019; Li and Tablin, 2018;

Rosazza et al., 2021; Zawrotniak et al., 2017). Mais les mécanismes précis de développement des 2 types de nétose restent à être étudiés.

Les NET ne sont pas seulement impliqués dans la destruction du pathogène. Ils le sont aussi dans l'initiation de la coagulation en piégeant les plaquettes et les globules rouges formant ainsi une thrombose et inhibent les protéines anticoagulantes via la libération des histones (Ley et al., 2018; Lipińska-Gediga, 2017; Lu et al., 2012; Rosales, 2018; Shen et al., 2017). En effet, les neutrophiles fixent les plaquettes qui elles sont capables de venir se fixer sur les cellules endothéliales, provoquant le recrutement de nouveaux neutrophiles créant la formation d'une thrombose (Lipińska-Gediga, 2017). Néanmoins, comme dans la phagocytose, si les NET ne sont pas rapidement éliminés, ils peuvent devenir pathogéniques. C'est le cas des patients atteints de lupus érythémateux systémique où des auto-anticorps se sont formés contre l'ADN, les histones et les antigènes du soi venant suractiver les neutrophiles créant une hyperinflammation. Dans des conditions physiologiques les NET sont dégradés par une DNase (Désoxyribonucléase) produite par le pancréas suivi de leur apoptose (Ley et al., 2018).

Les grandes fonctions du neutrophile (dégranulation, phagocytose, nétose) sont associées à la production de chimiokines et de cytokines permettant de détruire le pathogène mais également dans l'activation des autres cellules de la réponse immunitaire (NK, LT, LB).

III.4. Production de chimiokines et cytokines

Les neutrophiles sont capables de produire des chimiokines et des cytokines de façon constitutive ou après une stimulation afin de détruire le pathogène (bactérien ou viral). La production de ces molécules est également impliquée dans la régulation de l'angiogenèse, l'hématopoïèse et la fibrinogenèse. Mais également dans des fonctions d'homéostasies telles que la survie, la différenciation, la prolifération cellulaire et la régulation de la réponse immunitaire (Futosi et al., 2013; Tecchio et al., 2014).

III.4.1. Chimiokines ou chimio-attractants

Lors d'une réponse immunitaire, les neutrophiles sont activés par différents signaux (PAMPs et DAMPs) induisant la production de chimiokines ou chimio-attractants libérés par les cellules immunitaires présentes sur le site de l'infection (macrophages, cellules dendritiques) et les cellules endothéliales. Ces chimiokines sont essentielles pour recruter les neutrophiles sur le site de l'infection, de les pré-stimuler et de les activer. Elles peuvent être classées en 4 catégories : famille des lipides (LTB₄, leucotriène B₄), chimiokines (CXCL1, 3, 5 et 8), les facteurs du complément (C3a et C5a) et les produits bactériens (fMLP) reconnus par les GPCR

des neutrophiles (Metzemaekers et al., 2020). Ces chimiokines peuvent être produites par le neutrophile lui-même (Tableau VI), ce qui permet de recruter de nouveaux neutrophiles et d'autres types cellulaires tels que les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les NK via les chimiokines CCL2, CCL3 et CCL4. En plus des cellules de l'immunité innée, les chimiokines sont capables de recruter sur le site de l'infection des cellules de l'immunité adaptative tels que les TH1 et TH17 via les chimiokines CCL2, CCL20 et CXCL10 (Caster et al., 2017; Tecchio et al., 2014).

Tableau VI : Production de chimiokines et de cytokines par les neutrophiles humains (Caster et al., 2017 ; Dumas and Pouliot, 2009 ; Futosi et al., 2013 ; Tecchio et al., 2014)

Chimiokines se fixant sur les récepteurs CXC	CXCL1, CXCL8, CXCL11, CXCL10
Chimiokines se fixant sur les récepteurs CC	CCL2, CCL3, CCL4, CCL20
Cytokines pro-inflammatoires	IL-17, IL-1 β , IL-6
Cytokines anti-inflammatoires	IL-1ra, IL-10, IL-4, TGF- β
Cytokines immuno- régulatrices	IFN- γ , IFN- α , IFN- β
Facteurs de croissance	G-CSF, GM-CSF
Membres de la superfamille TNF	TNF- α , APRIL, BAFF, FasL, TRAIL

III.4.2. Cytokines

Les neutrophiles produisent des cytokines qui sont aussi importantes que les chimiokines (Tableau VI) et qui vont être essentielles dans la réponse immunitaire. Les principales cytokines produites par le neutrophile sont l'IL-1 β et le TNF- α qui sont des cytokines pro-inflammatoires et ont 2 fonctions :

i) un **effet autocrine** permettant d'augmenter leur adhérence aux cellules endothéliales, mais également la production de ROS.

ii) un **effet paracrine** permettant de recruter et d'activer les macrophages et les cellules dendritiques (Dumas and Pouliot, 2009).

En plus de la cytokine TNF- α , les neutrophiles sont capables de produire 2 molécules pro-inflammatoires, BAFF (Facteur d'activation des cellules B) et APRIL (un ligand induisant la prolifération) permettant d'activer la maturation, les fonctions et la survie des lymphocytes B (LB) (Tecchio et al., 2014). Enfin, les facteurs G-CSF et GM-CSF sont impliqués dans la différenciation, survie et activation des neutrophiles (Futosi et al., 2013).

Un autre type de cytokines est produit par le neutrophile, ce sont les cytokines immuno-régulatrices : IFN- γ , IFN- α , IFN- β ayant des actions sur le retard de l'apoptose (IFN- α , IFN- β) et favorisant la production de ROS (IFN- γ). Cependant, les neutrophiles produisent également des cytokines anti-inflammatoires nécessaires pour éteindre la réponse immunitaire. Ainsi, le neutrophile produit les cytokines IL-4 et IL-10 exerçant des effets inhibiteurs sur différentes fonctions du neutrophile incluant la production de cytokines et chimiokines (Futosi et al., 2013).

Chapitre 2 Place des neutrophiles dans le système immunitaire

Le système immunitaire est composé de plusieurs types cellulaires possédant des modes d'activations et de fonctionnements différents tous essentiels dans la réponse immunitaire. Historiquement deux groupes de cellules immunitaires ont été établis : les cellules de l'immunité innée et les cellules de l'immunité adaptative. Néanmoins, 2 types cellulaires se situent à l'interface de l'immunité innée et adaptative, les NK et les $LT\gamma\delta$ intervenant dans les 2 immunités (Abbas et al., 2008; Ribot et al., 2021). (Figure 16).

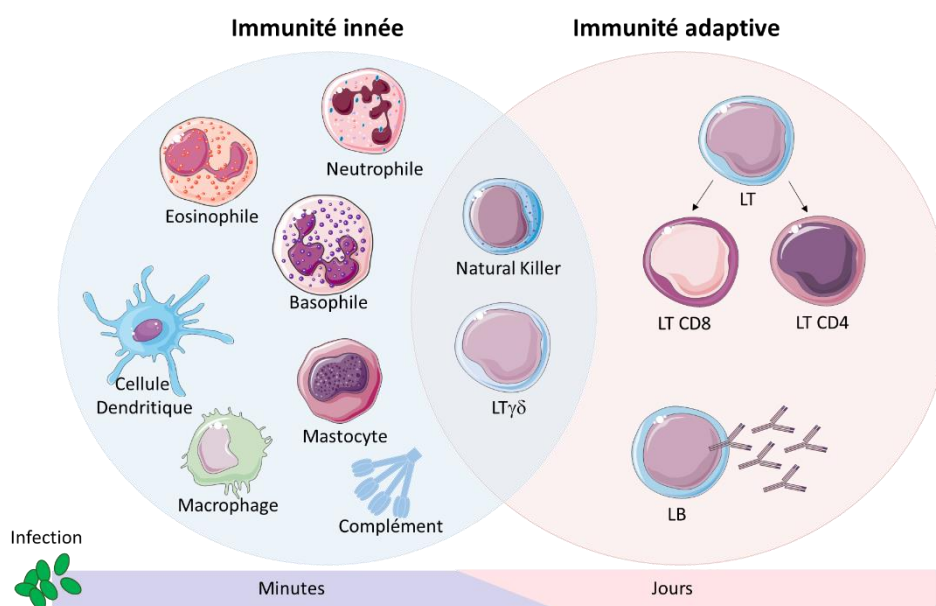


Figure 16 : Cellules composant l'immunité innée et adaptative

L'immunité innée se met en place dans la minute suivant l'infection impliquant différents types cellulaires (neutrophile, éosinophile, basophile, cellules dendritiques, mastocyte, macrophage et complément). L'immunité adaptative se met en place dans les jours suivant l'infection impliquant les LT et LB. Cependant, des cellules se trouvent à l'interface entre l'immunité innée et adaptative car elles sont impliquées dans les 2 types d'immunités, ce sont les Natural Killer (NK) et les $LT\gamma\delta$. D'après Abbas et al., 2008; Ribot et al., 2021.

I. Les deux types d'immunité chez l'Homme

I.1. Immunité innée

L'immunité innée est décrite pour être la première à se mettre en place après pénétration du pathogène à travers les barrières naturelles de l'hôte. Les cellules qui composent cette immunité possèdent des mécanismes de défense qui sont rapides à se mettre en place (dans la minute) mais sont non spécifiques du pathogène (Beutler, 2004; Turvey and Broide, 2010). La destruction de celui-ci est cruciale et permettra d'activer et de réguler le deuxième mécanisme : l'immunité adaptative. Charles Janeway a décrit que l'immunité innée est capable de reconnaître les molécules du soi associé à un « danger » immunologique (DAMPs) libéré durant la destruction tissulaire et cellulaire. Elle est également capable de reconnaître les molécules du non-soi (PAMPs) libéré durant la destruction du pathogène par les récepteurs

PRR (Turvey and Broide, 2010). L'immunité innée est constituée à la fois de cellules non hématopoïétiques (cellules épithéliales) et de cellules hématopoïétiques qui auront un rôle important dans la réponse immunitaire. Ainsi, les cellules hématopoïétiques se composent de monocytes/macrophages, cellules dendritiques, neutrophiles, éosinophiles, mastocytes et NK (Abbas et al., 2008; Beutler, 2004; Turvey and Broide, 2010). Ces cellules se trouvent principalement dans la circulation sanguine à la recherche d'un éventuel pathogène. La réponse immunitaire est enclenchée à partir du moment où le pathogène pénètre dans l'organisme, provoquant la destruction et la lyse des cellules épithéliales et endothéliales. Ces dernières vont produire et libérer des chimiokines et cytokines activant les cellules de l'immunité innée et leur recrutement sur le site où se trouve le pathogène (Beutler, 2004; Turvey and Broide, 2010). Ces cellules vont toutes avoir des rôles distinctifs qui permettront de détruire le pathogène (Tableau VII).

Tableau VII : Fonctions des différents types cellulaires de l'immunité innée (Abbas et al., 2008 ; Beutler, 2004 ; Ribot et al., 2021 ; Turvey and Broide, 2010)

Monocytes/Macrophages	Cellule présentatrice de l'antigène Cellule phagocytaire Production cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-1 α , IL-6, IL-12) Production de ROS
Cellules dendritiques	Cellule présentatrice de l'antigène Production d'IL-10, IFN de type 1, IL-12, IL-18, IL-15
Natural Killer	Activité cytotoxique Production d'IFN- γ
LT$\gamma\delta$	Recrutement des neutrophiles Destruction des cellules infectées Activation des cellules phagocytaires Production d'IFN- γ et IL-17 Développement en LT mémoire
Eosinophiles	Défense contre les allergies et les parasites
Mastocytes	Dégranulation Défense contre les allergies
Neutrophiles	Dégranulation Cellule phagocytaire Nérose Production de cytokines et chimiokines Production de ROS

Les monocytes sont présents en faible quantité dans la circulation sanguine (2 à 10 %) par rapport aux neutrophiles (Tigner et al., 2022). Néanmoins, lorsque le pathogène se trouve dans l'organisme, les monocytes traversent les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, recrutés par la présence des chimiokines produites sur le site de l'infection. Une fois dans les tissus, le monocyte devient un macrophage et acquiert plusieurs fonctions telles que la phagocytose du pathogène, la production de ROS et devient une cellule présentatrice de l'antigène (CPA) (Turvey and Broide, 2010; Yang et al., 2014). Cette dernière fonction est importante car elle permettra d'activer une partie de l'immunité adaptative par présentation de

l'antigène dérivé du pathogène aux LT CD4⁺ via le CMH II (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type II) (Abbas et al., 2008; Beutler, 2004; Turvey and Broide, 2010). Un autre type cellulaire de l'immunité innée a également le rôle d'une CPA, c'est la cellule dendritique. Son rôle principal est de capturer l'antigène du pathogène, pour ensuite migrer dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques) où elle présentera l'antigène aux lymphocytes. De plus, les cellules dendritiques produisent des cytokines capables de recruter les neutrophiles sur le site infectieux (Abbas et al., 2008).

Concernant les NK, ils sont situés à l'interface de l'immunité innée et adaptative et ont pour fonction la libération de granules cytotoxiques (perforine et granzyme) créant un pore irréversible sur les cellules infectées provoquant leur mort. Les NK sont capables de produire la cytokine IFN- γ après leur activation, nécessaire pour activer les macrophages et les cellules dendritiques (Abbas et al., 2008). Un autre type de lymphocyte se trouvant à l'interface des 2 immunités : les LT $\gamma\delta$ sont principalement localisés dans les muqueuses et sont connus pour produire les cytokines IFN- γ et IL-17. Ces LT $\gamma\delta$ expriment des chaînes $\gamma\delta$ du TCR tandis que les LT conventionnels expriment les chaînes $\alpha\beta$. Durant une infection, les LT $\gamma\delta$ font partie des premières cellules à aller à la rencontre du pathogène et vont jouer un rôle dans la destruction des cellules infectées, le recrutement des neutrophiles et l'activation des cellules phagocytaires. De plus, après la rencontre avec le pathogène dans les tissus ils vont pouvoir se différencier en LT mémoires d'où leur interface entre l'immunité innée et adaptative (Ribot et al., 2021).

1.2. Immunité adaptative

A l'inverse de l'immunité innée, l'immunité adaptative possède un mécanisme de défense contre le pathogène qui sera plus long à se mettre en place (plusieurs jours). Cependant par la présence de récepteurs spécifiques au pathogène, présent sur chaque type cellulaire composant l'immunité adaptative, elle sera plus efficace dans reconnaissance et la destruction du pathogène (Beutler, 2004; Bonilla and Oettgen, 2010). Cette immunité est constituée de 2 grands types cellulaires, les LB impliqués dans la réponse humorale et les LT dans la réponse cellulaire.

La **réponse humorale** correspond à la production d'anticorps spécifiques par le LB mature dans le but de neutraliser les antigènes extracellulaires et les toxines du pathogène. L'activation des LB peut se faire par 2 voies : i) Indépendante des LT : le LB est activé par la présence de plusieurs antigènes pathogéniques via leur BCR (Récepteur des cellules B) déclenchant peu ou pas la production d'anticorps mais augmentant leur prolifération. ii) Dépendante des LT : le LB reconnaît l'antigène du pathogène via son BCR et présentera cet

antigène par son CMH II au LT reconnu par son TCR (Récepteur des cellules T). Cette connexion entre le LT et le LB permet d'envoyer un signal au LB afin de se transformer en plasmocyte permettant la production d'anticorps spécifiques du pathogène (Abbas et al., 2008; Bonilla and Oettgen, 2010).

Pour finir, par contact avec le LT, le LB sera capable de se transformer en LB mémoire, important dans la réponse immunitaire car il permet de répondre plus rapidement à une seconde infection contre le même pathogène (Bonilla and Oettgen, 2010).

La **réponse cellulaire** correspond à la neutralisation des antigènes intracellulaire médiée par les LT. On distingue 2 grandes sous populations de LT avec 2 fonctions complémentaires : LT CD4⁺ et LT CD8⁺ (Abbas et al., 2008). L'activation des LT nécessite la reconnaissance du peptide pathogénique via leur TCR, présenté soit par le CMH I présent sur les cellules nucléées pour les LT CD8⁺, soit le CMH II présent uniquement sur les CPA pour le LT CD4⁺. Cette synapse immunologique provoque l'activation de plusieurs protéines kinases dans le LT responsable de l'activation de plusieurs facteurs de transcription, tels que NFAT et NFκB afin d'activer le LT (Abbas et al., 2008; Bonilla and Oettgen, 2010). La majorité des LT CD8⁺ seront cytotoxiques via la production de granules cytotoxiques (perforine et granzyme) exerçant les mêmes fonctions que les NK. La seule différence est que les LT CD8⁺ ont besoin d'être activés par les LT CD4⁺ pour exercer leur fonction cytotoxique contrairement au NK. Les LT CD4⁺ se polariseront en différents TH en fonction du type de cytokines produites (TH1, TH2, TH17, etc...) et agiront sur l'activation des LB, macrophages ou le recrutement des granulocytes (Bonilla and Oettgen, 2010). Tout comme les LB, les LT CD4⁺ et CD8⁺ pourront devenir des LT mémoires afin de répondre plus rapidement à une seconde infection contre le même pathogène.

II. Les granulocytes dans la réponse immunitaire

Les neutrophiles sont une population cellulaire très importante pour la défense de l'organisme contre la présence d'un corps étranger. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, les neutrophiles possèdent 3 modes d'actions pour détruire le pathogène (phagocytose, dégranulation et formation de NET). Cependant, le neutrophile doit exercer ce que l'on appelle le « rolling » pour pouvoir aller vers le site où se trouve le pathogène, suivie du « priming » pour améliorer ses fonctions (Rosales, 2020).

II.1. Introduction sur la réponse immunitaire

II.1.1. Rolling

Le rolling est un phénomène permettant aux neutrophiles présents dans la circulation sanguine de traverser les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (Rosales, 2020). Ce processus est rendu possible par la présence des DAMPs libérés par les cellules épithéliales de l'hôte après passage du pathogène et des PAMPs activant dans un premier temps les premières cellules présentes sur le site où se trouve le pathogène telles que les macrophages résidents, les cellules dendritiques, les mastocytes et les cellules épithéliales. Une fois activées, ces cellules libèrent de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-12, IL-15 et IL-18) induisant l'expression des récepteurs à la surface des cellules endothéliales vasculaires et une augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins (Borregaard, 2010; Caster et al., 2017; El-Benna et al., 2016; Rosales, 2020). Ces 2 phénomènes permettent la fixation puis la transmigration des neutrophiles vers le site du pathogène, et définissent le rolling qui se déroule en 2 grandes étapes (Caster et al., 2017; Rosales, 2020) (Figure 17).

La première étape est la fixation des récepteurs présents à la surface des cellules endothéliales vasculaires avec leurs ligands présents à la membrane des neutrophiles ce qui permet leur recrutement. Les cellules endothéliales surexpriment 2 récepteurs aux sélectines, P-sélectine (ou CD62P) et E-sélectine (ou CD62E) suite à leur activation par des cytokines inflammatoires telles que le TNF- α , IL-1 β et IL-17 (Alves-Filho et al., 2008; Borregaard, 2010; Kovach and Standiford, 2012). Ces sélectines reconnaissent la L-sélectine (ou CD62L) et PSGL-1 (Ligand-1 de la glycoprotéine P-sélectine) exprimés à la surface des neutrophiles (Borregaard, 2010; Brown et al., 2006; Caster et al., 2017).

La deuxième étape est la reconnaissance des chimiokines (fMLP, C5a, LTB4 et PAF) produites en grande concentration par les cellules résidentes des tissus après leur activation par les PAMPs et les DAMPs. Ces chimiokines viennent se fixer sur les cellules endothéliales permettant d'attirer le neutrophile via ses récepteurs spécifiques aux chimiokines CXC (Borregaard, 2010; Caster et al., 2017; El-Benna et al., 2016; Kovach and Standiford, 2012; Ley et al., 2018; Rosales, 2018). La double fixation (sélectine et chimiokines) provoque un changement conformationnel du récepteur aux intégrines LFA-1 (Antigène associé à la fonction lymphocytaire 1 ou CD11a/CD18) exprimé par les neutrophiles, améliorant l'affinité pour les ligands ICAM-1 (Molécule d'adhésion intercellulaire 1) et ICAM-2 présent sur les cellules endothéliales (Caster et al., 2017). Cette liaison provoque un arrêt du neutrophile nécessaire afin d'augmenter l'expression de l'intégrine Mac-1 (Récepteur 1 des Macrophages ou CD11b/CD18) exprimé par le neutrophile. Cette intégrine reconnaît le ligand ICAM-1, essentiel pour traverser la jonction des cellules endothéliales vasculaires. Afin de traverser

cette jonction, les neutrophiles vont venir réarranger leur cytosquelette afin d'induire leur déformation. Une fois les cellules endothéliales traversées, les neutrophiles doivent encore traverser la membrane basale se trouvant accolée aux cellules endothéliales. Pour cela, les neutrophiles libèrent leurs granules tertiaires, lysant la membrane basale et permettent aux neutrophiles d'arriver dans les tissus infectés (Alves-Filho et al., 2010 ; Caster et al., 2017 ; Summers et al., 2010 ; Vogt et al., 2018) (Figure 17).

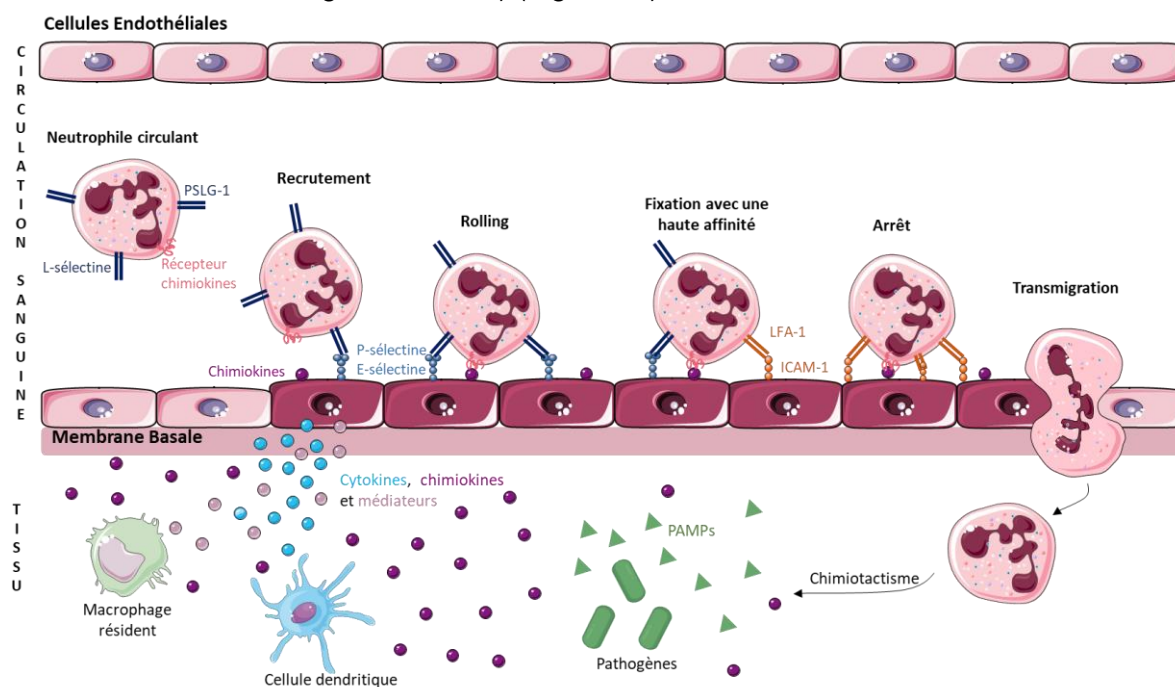


Figure 17 : Mécanisme de rolling permettant aux neutrophiles de migrer sur le site du pathogène

Le neutrophile circulant est attiré à la membrane vasculaire par la présence de grande concentration de chimiokines produites par les cellules résidentes du tissu où se trouve le pathogène. La présence des chimiokines provoque l'augmentation de la perméabilité des cellules épithéliales vasculaires, lesquelles se mettent à exprimer les récepteurs aux sélectines (P- et E-sélectine). Le neutrophile vient fixer les sélectines via ces récepteurs PSGL-1 (Ligand 1 de la glycoprotéine P-sélectine) et L-sélectine, c'est le recrutement. Puis, le neutrophile reconnaît les chimiokines présentes en faible concentration dans la circulation sanguine par ces récepteurs aux chimiokines, permettant au neutrophile de rouler sur les cellules endothéliales, c'est le phénomène de rolling. Cette double fixation sélectine/chimiokines provoque un changement conformationnel du neutrophile, entraînant l'expression du récepteur aux intégrines LFA-1 (Antigène associé à la fonction lymphocytaire 1 ou CD11a/CD18) reconnaissant ses ligands ICAM-1 et ICAM-2 (Molécule d'adhésion intercellulaire 1) présent à la surface des cellules endothéliales ce qui induit un arrêt du neutrophile. Durant l'arrêt, il y a surexpression d'une autre intégrine Mac-1 (Récepteur 1 des macrophages) sur le neutrophile permettant de fixer lui aussi ICAM-1 nécessaire pour traverser la jonction des cellules endothéliales vasculaires. Et lorsque le neutrophile arrive dans la membrane basale, celui-ci libère ses granules tertiaires avant de lyser cette membrane pour se retrouver dans les tissus. D'après Borregaard, 2010; Brown et al., 2006; Caster et al., 2017 ; Alves-Filho et al., 2010 ; Summers et al., 2010.

Il semblerait que certains neutrophiles expriment un récepteur intracellulaire, CD177, présent dans la membrane des granules spécifiques. Le rôle du CD177 n'est pas totalement élucidé, mais les premières études ont mis en évidence que CD177 pourrait venir augmenter l'expression de LFA-1 à la surface des neutrophiles, permettant une meilleure affinité avec ICAM-1 et renforcerait l'arrêt de la transmigration (Borregaard, 2010; Grieshaber-Bouyer and Nigrovic, 2019; Rosales, 2020). Seulement l'expression de CD177 n'a été retrouvée que sur

40 à 60 % des neutrophiles de donneurs sains et serait associée à une activité antimicrobienne améliorée ayant potentiellement un rôle protecteur dans les maladies intestinales (Grieshaber-Bouyer and Nigrovic, 2019).

II.1.2. Priming

Le priming ou pré-stimulation des neutrophiles permet d'induire des changements phénotypiques afin d'améliorer la réponse immunitaire. Elle ne correspond pas à un état intermédiaire avant l'activation du neutrophile. Ces changements permettent d'améliorer la production de ROS, la libération des granules, la synthèse de cytokines et de lipides, l'adhésion et la transmigration, le chimiotactisme, la phagocytose, la formation de NET et le retard de l'apoptose (Metzemaekers et al., 2020; Miralda et al., 2017; Vogt et al., 2018). Ainsi, un neutrophile pré-stimulé ou totalement activé après rencontre du pathogène, sera différent d'un neutrophile au repos provoquant ainsi l'hétérogénéité des neutrophiles présents dans l'organisme (Grieshaber-Bouyer and Nigrovic, 2019). Ce phénomène a lieu en parallèle au rolling, lorsque les neutrophiles se trouvent dans la circulation sanguine et avant leur rencontre avec le pathogène.

La pré-stimulation des neutrophiles a lieu en présence des cytokines (TNF- α et IL-1 β) et des chimiokines (PAMPs, IL-8, LTB₄, C5a et GM-CSF) (Metzemaekers et al., 2020; Summers et al., 2010; Vogt et al., 2018). Le TNF- α et le GM-CSF augmentent la libération des cytokines IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α et des chimiokines CXCL1, CXCL2, CCL3, CCL4 par le neutrophile (Miralda et al., 2017; Wright et al., 2013). Ils augmentent la demi-vie du neutrophile suite à un changement dans la stabilité et la fonction des protéines pro- et anti-apoptotiques (Vogt et al., 2018). Le TNF- α induit la mobilisation des granules et vésicules contenant le complexe NADPH oxydase formant les ROS à la membrane plasmique via l'activation de la protéine kinase ERK. Il permet l'activation d'une sous-unité de ce même complexe via une autre voie de signalisation impliquant la protéine kinase p38MAPK (Vogt et al., 2018; Wright et al., 2013).

Une fois le neutrophile pré-stimulé et présent sur le site de l'infection, celui-ci est prêt pour rencontrer le pathogène.

II.1.3. Rencontre avec le pathogène

Une fois le neutrophile pré-stimulé et présent sur le site de l'infection, il va pouvoir être complètement activé et exercer ses fonctions (dégranulation, phagocytose, nétose) afin d'éliminer le pathogène (Caster et al., 2017; El-Benna et al., 2016; van Kessel et al., 2014; Witter et al., 2016).

Les mécanismes immunitaires mis en place par les neutrophiles sont surtout décrits dans le cadre d'infections bactériennes et fongiques et dans une moindre mesure dans le cas d'une infection virale. Toutefois, le neutrophile exprime les récepteurs TLR7 et TLR8 capable de reconnaître des particules virales ou directement le virus (Mócsai, 2013). De plus, via la formation de NET, il peut piéger les virus dans ses filets d'ADN et les attaquer via les enzymes antimicrobiennes (Mócsai, 2013; Prince et al., 2011). Les bactéries quant à elles seront reconnues par les TLR2, 4, 5 et 6 ou via les récepteurs Fc γ R (CD32a,CD16b) permettant la phagocytose et la destruction de celles-ci suite à l'induction d'une cascade d'activation protéique (Smith, 2014). Bien que le rôle principal des neutrophiles soit de réaliser les 3 fonctions décrites dans le chapitre 1 (dégranulation, phagocytose, nétose), ils jouent aussi un rôle dans l'activation des cellules de l'immunité afin d'améliorer l'élimination du pathogène. Le neutrophile est capable de migrer dans la rate à la rencontre des LB, d'induire leur transformation en plasmocyte afin de produire des anticorps spécifiques du pathogène, via la production des cytokines BAFF et APRIL (Mócsai, 2013).

Les neutrophiles peuvent induire la maturation et l'activation des cellules dendritiques via le contact Mac-1/DC-SIGN (Cellules dendritiques spécifiques capables de capturer ICAM-3) présent sur les cellules dendritiques (Mócsai, 2013; Yang et al., 2009). A la suite de cette rencontre, les neutrophiles et les cellules dendritiques peuvent coopérer afin d'activer les NK via leur production d'IL-18 et d'IL-12. Ils peuvent également interférer sur la transformation des LT en TH1 (réponse antibactérienne) lorsqu'ils sont en contact avec la cellule dendritique (Mócsai, 2013).

Lorsque le pathogène est totalement neutralisé et éliminé, il est nécessaire à l'organisme de revenir à un état normal afin de diminuer la production de cytokines, chimiokines et d'éliminer les cellules apoptotiques.

II.2. Résolution de la réponse immunitaire

Une fois l'infection maîtrisée et le pathogène détruit, le retour à l'homéostasie normale se fait via la production de médiateurs anti-inflammatoires (IL-10 et TGF- β) qui peuvent être produits par le neutrophile (Dumas and Pouliot, 2009). Ainsi que par la présence de molécules gazeuses telles que le NO et le monoxyde de carbone qui vont entraîner une modification de la biosynthèse du neutrophile. De plus, l'apoptose des neutrophiles activés ou sénescents va être un mécanisme essentiel pour éteindre la réponse immunitaire (Alves-Filho et al., 2008; Dumas and Pouliot, 2009).

Lors d'une réponse immunitaire, certaines cellules du soi peuvent être lésées par la présence à la fois du pathogène et des cytokines/chimiokines produites par les cellules de l'immunité

(Kennedy and DeLeo, 2009). Les cellules libèrent alors une grande concentration d'adénosine extracellulaire, un composant de l'ATP. La forte concentration en adénosine provoque l'inhibition du chimiotactisme des neutrophiles après fixation de celle-ci sur son récepteur A_{2A} empêchant la transformation de l'acide arachidonique en LTB₄ (Dumas and Pouliot, 2009). Cependant, l'acide arachidonique sera transformé en lipoxine A₄ induisant la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Alves-Filho et al., 2008; Caster et al., 2017). L'adénosine permet également l'inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α) et de chimiokines (CCL4, CXCL2 et CCL20) augmentant ainsi la production de cytokines anti-inflammatoires (Dumas and Pouliot, 2009).

Un des mécanismes de régulation de la réponse immunitaire des neutrophiles important est l'apoptose, n'étant pas activée de façon constitutive (Kennedy and DeLeo, 2009). Elle est régulée à la fois par les protéines anti-apoptotiques et la présence d'inhibiteurs de caspase permettant leur inactivation dans des conditions où le neutrophile n'a pas besoin d'être éliminé. L'inhibiteur de caspase IAP (Protéine inhibitrice de l'apoptose) ou appelé XIAP (Protéine inhibitrice de l'apoptose liée au chromosome X) se lie sur les caspases et surtout sur les caspases-3 et 9. La fixation de cet inhibiteur entraîne l'ubiquitination des caspases sous forme active et leur dégradation vers le protéasome (Mica et al., 2004; Simon, 2003).

Nous avons vu dans le chapitre 1 que l'apoptose des neutrophiles pouvait se faire par 2 voies : intrinsèque et extrinsèque. Cette dernière est impliquée après une réponse immunitaire et fait intervenir des récepteurs de mort tels que les récepteurs Fas (CD95, APO-1), les TNFR ou TRAIL présent à la membrane des neutrophiles. Les ligands TNF- α et Fas-L se fixent sur leurs récepteurs respectifs TNFR et Fas, induisant une cascade de signalisation en présence de la protéine FADD. Cette protéine clive la pro-caspase-8 en caspase-8, clivant à son tour la pro-caspase-3 en caspase-3, responsable de l'induction de l'apoptose du neutrophile (Geering et al., 2011; Lu et al., 2012; Mica et al., 2004; Simon, 2003) (Figure 18). A noter, que les neutrophiles possèdent à la fois le récepteur Fas et Fas-L à leur surface (Simon, 2003).

Une autre voie d'induction de l'apoptose peut être mise en place après ingestion du pathogène, le PICD (Mort cellulaire induite par la phagocytose des neutrophiles). Ce mécanisme est peu compris mais il semblerait que la présence du pathogène mort dans le phagosome et la production de ROS déclenchent l'apoptose du neutrophile (Kennedy and DeLeo, 2009; Lu et al., 2012).

Néanmoins, la clairance du neutrophile apoptotique est nécessaire pour résoudre la réponse immunitaire. Lors de son apoptose, le neutrophile vient surexprimer à sa membrane la lipoxine A₄ produite par diminution du LTB₄ donnant le signal « eat-me » aux macrophages résidents afin de phagocyter les neutrophiles (Glennon-Alty et al., 2018) (Figure 18). Leur phagocytose

permet de reprogrammer les macrophages pour initier la réponse anti-inflammatoire via la libération des cytokines TGF- β et IL-10. Cette étape est essentielle afin d'éteindre la réponse immune et revenir à l'homéostasie (Rosales, 2020).

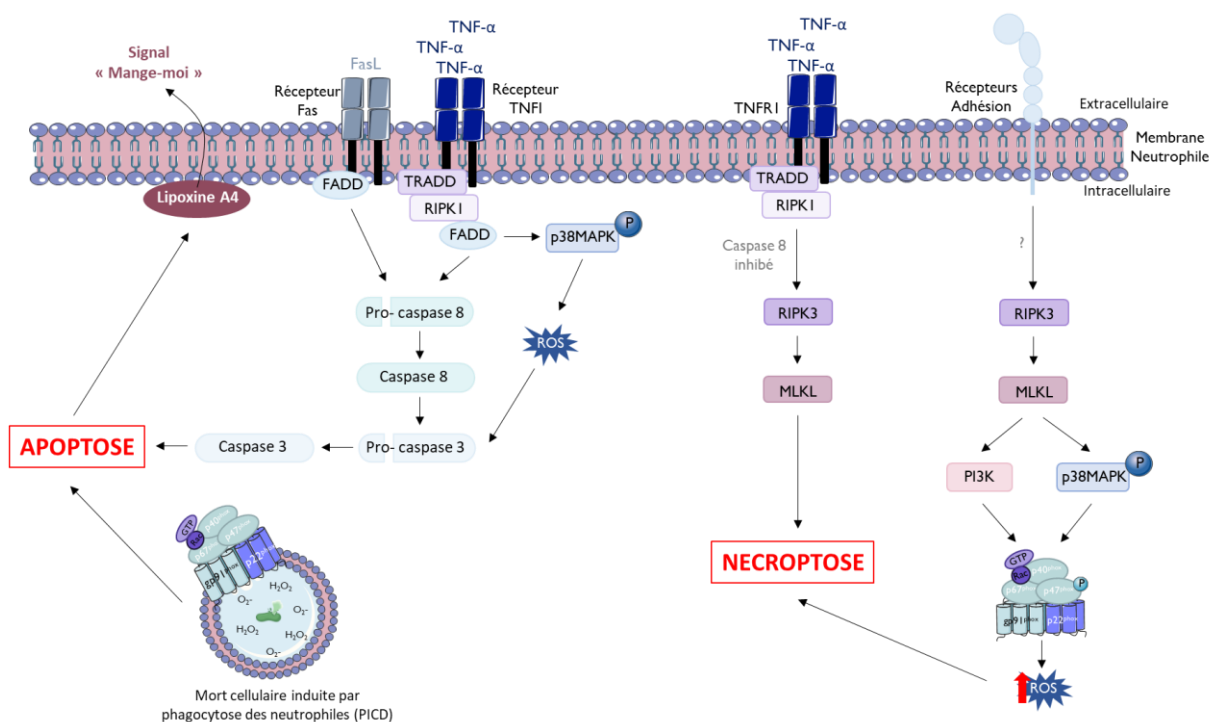


Figure 18 : Voies de signalisation impliquées dans l'activation de l'apoptose et de la nécroptose pour résoudre la réponse immunitaire

La résolution de la réponse immunitaire se fait en partie par l'élimination des neutrophiles, pour cela il y a 2 types de mort : i) l'apoptose est une mort programmée via les récepteurs de mort Fas et TNFR1 activant la protéine FADD, responsable du clivage de la pro-caspase-8 en caspase-8, clivant la pro-caspase-3 en caspase-3 responsable de l'apoptose. Cette apoptose peut être enclenchée après la phagocytose des pathogènes créant le phagosome dans lequel les ROS sont produits pouvant entraîner le PICD (Mort cellulaire induite par la phagocytose des neutrophiles). Ainsi les neutrophiles apoptotiques vont venir sur-exprimer la lipoxine A4 à leur membrane afin que les macrophages puissent les phagocyter. ii) La nécroptose est une mort programmée réalisée soit par le TNFR si la caspase-8 est inactivée responsable de l'activation de 2 protéines RIPK3 et MLKL, soit via les récepteurs d'adhésion activant le complexe NADPH oxydase via les voies PI3K et p38MAPK augmentant la production de ROS. D'après Kennedy and DeLeo, 2009 ; Lu et al., 2012 ; Glennon-Alty et al., 2018 ; Rosales, 2020.

Toutefois, les neutrophiles ne meurent pas que par apoptose, il existe une autre forme de mort programmée, la nécroptose similaire à la nécrose (Pérez-Figueroa et al., 2021; Wang et al., 2018). Au cours de la nécroptose l'ADN des neutrophiles sera libéré dans le milieu extracellulaire contenu dans des vésicules n'induisant pas de réponse immunitaire, à l'inverse de la nécrose. La nécroptose peut être induite via différents récepteurs tels que le récepteur de mort TNFR1 et les récepteurs d'adhésions. Lors d'une forte concentration en TNF- α , celui-ci se fixe sur son récepteur TNFR1, activant la protéine RIPK1 qui recrute RIPK3, mais seulement dans le cas où la caspase-8 est liée à son inhibiteur IAP. Ainsi, RIPK3 phosphoryle MLKL (Domaine de la kinase de lignage mixte) où elle est transloquée à la membrane plasmique du neutrophile et induit une perméabilisation de la membrane, responsable de sa

nécroptose. Les récepteurs d'adhésion (CD11b, CD18, CD44 et CD15) peuvent provoquer l'activation de la nécroptose via la voie RIPK3 – MLKL – p38MAPK ou PI3K, mais l'activation de la protéine RIPK3 par le récepteur est pour le moment inconnu (Pérez-Figueroa et al., 2021; Wang et al., 2018). Les 2 voies p38MAPK et PI3K sont responsables de l'activation du complexe NADPH oxydase provoquant la libération de ROS par le neutrophile. Par cet effet, la forte concentration en ROS provoque des dommages irréversibles à l'ADN du neutrophile induisant la nécroptose (Belambri et al., 2018; Wang et al., 2018) (Figure 18). Si l'inflammation n'est pas contrôlée et que les neutrophiles ne sont pas éliminés cela peut entraîner une hyperinflammation causant la lyse et le dysfonctionnement des cellules saines et des tissus sains de l'hôte causant des pathologies inflammatoires ou auto-immunes (Milot et al., 2012; Miralda et al., 2017; Nordenfelt and Tapper, 2011).

III. Production des ROS par les neutrophiles

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont produites par l'ensemble des cellules de l'organisme et sont issues de la consommation de l'oxygène (Bedard and Krause, 2007). Les ROS étant des produits toxiques, les cellules les transforment en molécules d'eau. Toutefois, certaines cellules, telles que les cellules phagocytaires (macrophages, neutrophiles) produisent les ROS pour les utiliser lorsque l'organisme est menacé par les pathogènes (Bedard and Krause, 2007; Nguyen et al., 2017; Nunes et al., 2013; Roos et al., 2003). Ainsi, ces cellules peuvent produire à la fois des ROS extracellulaires et des ROS intracellulaires suivant la taille du pathogène. En effet, un pathogène de grande taille (champignon, parasite, protozoaire) ne pourra pas être phagocyté et donc nécessite la libération de ROS en extracellulaire pour le dégrader. Tandis qu'un pathogène de petite taille (bactéries, virus) sera phagocyté par les cellules phagocytaires, créant le phagosome, dans lequel les ROS sont produits (Warnatsch et al., 2017).

Durant une réponse infectieuse, la reconnaissance du pathogène par les récepteurs du neutrophile (TLR, Fc γ R) lui permet d'activer des voies de signalisation pour répondre à cette invasion, augmentant la production de ROS intracellulaires (Nguyen et al., 2017). Cette augmentation leur permet d'améliorer la production de chimiokines, de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α), l'adhésion cellulaire, le chimiotactisme, le retard de l'apoptose et d'augmenter leur survie (Caster et al., 2017; Warnatsch et al., 2017).

Comme nous l'avons vu précédemment, l'ensemble des cellules de l'organisme sont capables de produire des ROS dont les sources peuvent varier suivant la localisation cellulaire.

III.1. Différentes sources de production des ROS

La génération des ROS est issue de la réduction de l'oxygène (O_2) en anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Cet anion pourra par la suite donner d'autres types de ROS suivant l'environnement cellulaire : peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), radical hydroxyle ($\cdot OH$) et acide hypochloreux (HOCl) (El-Benna et al., 2016; Prauchner, 2017). Cette génération s'opère via plusieurs mécanismes cellulaires tels que :

i) Le cytochrome p450 monooxygénase, une métalloenzyme localisée principalement dans le foie qui transforme une molécule d'oxygène en anion superoxyde et peroxyde d'hydrogène en présence d'un ion fer.

ii) La lipoxigénase et cyclooxygénase qui sont des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'acide arachidonique capable de générer des ROS (Dharmaraja, 2017; Finkel and Holbrook, 2000)

iii) La xanthine oxydase, une métalloflavoprotéine constitutivement exprimée dans le foie transformant l'hypoxanthine en xanthine, puis la xanthine en acide urique utilisant une molécule d'oxygène pour libérer du peroxyde d'hydrogène (Dharmaraja, 2017).

iv) La mitochondrie produit des ROS via la chaîne respiratoire se trouvant dans la membrane mitochondriale, constituée par 4 complexes. Les ROS sont majoritairement produits par le complexe I, où 1 à 4 % de l'oxygène est transformé en anion superoxyde et peroxyde d'hydrogène suite à l'oxydation du NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide). L'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène peuvent également être produits via le complexe II par le cytochrome c réductase et le complexe III par l'oxydation de l'ubiquinone (Dharmaraja, 2017; Finkel and Holbrook, 2000; Pinegin et al., 2018).

v) Pour finir, le complexe NADPH oxydase localisé dans la membrane plasmique ou des granules des neutrophiles est la source la plus importante de production des ROS (Dharmaraja, 2017; Nathan and Ding, 2010; Xiang et al., 2010).

III.2. Composition du complexe NADPH oxydase

Lorsque le neutrophile est au repos, le complexe NADPH oxydase est constitué de 5 protéines ayant des localisations différentes, et qui s'assemble pour permettre la production de ROS lorsque le neutrophile est activé (El-Benna et al., 2016). Dans les neutrophiles au repos le cytochrome b_{558} ou flavocytochrome est principalement localisé au niveau de la membrane des granules spécifiques (90 %). On le retrouve également au niveau de la membrane des vésicules sécrétrices (5-15 %) et au niveau de la membrane plasmique (10 %) (Bedard and Krause, 2007; DeLeo et al., 1998; Glennon-Alty et al., 2018; Segal, 2005). Le complexe

cytochrome b_{558} se compose de 2 protéines transmembranaires, gp91^{phox} et p22^{phox} (DeLeo et al., 1998; Glennon-Alty et al., 2018). La sous-unité gp91^{phox} est connue aussi sous le nom de NOX2, appartenant à la famille NOX (NADPH oxydase) et elle est présente seulement dans les cellules myéloïdes. Les autres cellules de l'organisme capables de produire des ROS, exprimeront une autre sous-unité appartenant à la famille NOX (NOX1, 3, 4 et 5) (Bedard and Krause, 2007; Roos et al., 2003). Tandis que la sous-unité p22^{phox} est présente dans toutes les cellules (Bedard and Krause, 2007; Clark, 1999).

Le complexe NADPH oxydase présente également 3 protéines cytosoliques : p47^{phox}, p67^{phox} et p40^{phox} liées ensemble dans le cytoplasme à l'état basal sous une forme inactive. Chaque sous-unité possédera des domaines permettant de les lier ensemble mais également de lier d'autres composants du neutrophile qui sont essentiels lors de son activation.

Dans la région N-terminale de la sous-unité p47^{phox} se trouve le domaine PX (Domaine structurel de liaison au phosphoinositide) qui permet de lier les phospholipides de la membrane plasmique du neutrophile activé lors de la fusion avec celle-ci. A côté du domaine PX, se trouvent 2 domaines SH3 (Domaine d'homologie 3 SRC) qui permettent de lier les motifs PRR (Région riche en proline) de la sous-unité p22^{phox}, suivie d'une région AIR (Région auto-inhibitrice). Cette région permet l'auto-inhibition des domaines SH3 et PX par fixation sous une conformation d'épingle à cheveux. Lors de l'activation du neutrophile, la région AIR est phosphorylée, libérant les domaines SH3 et PX (Bedard and Krause, 2007; El-Benna et al., 2016; Nguyen et al., 2017; Nunes et al., 2013; Roos et al., 2003). Dans la région C-terminale de la sous-unité p47^{phox}, se trouve une région PRR permettant de lier la sous-unité p67^{phox} (Figure 19).

La sous-unité p67^{phox} possède dans sa région N-terminale, 3 domaines tripeptides (TPR) qui permettent de lier la protéine Rac lors de l'activation du neutrophile. Ces TPR sont suivis d'un domaine d'activation (AD) nécessaire pour l'activité enzymatique de gp91^{phox} lorsque p67^{phox} est fixée sur celle-ci. Cette sous-unité présente également 2 domaines SH3 séparés par le domaine PB1 (Phox et Bem1) qui reconnaît le même domaine exprimé par la sous-unité p40^{phox}. Le domaine SH3 localisé dans la région C-terminale de p67^{phox} permet de fixer les régions PRR de la sous-unité p47^{phox} (El-Benna et al., 2016; Glennon-Alty et al., 2018; Nunes et al., 2013; Segal, 2005) (Figure 19).

La sous-unité p40^{phox} possède également un domaine PX masqué à l'état de repos. Mais dans un état activé ce domaine permet de lier le PIP3 (Phosphatidylinositol-Triphosphate) de la membrane plasmique du neutrophile à côté du complexe cytochrome b_{558} . La sous-unité est aussi composée d'un domaine SH3 dont la fonction est pour le moment inconnue et d'un

domaine PB1 qui permet de lier celui de la sous-unité p67^{phox} (Bedard and Krause, 2007; Nunes et al., 2013; Roos et al., 2003) (Figure 19).

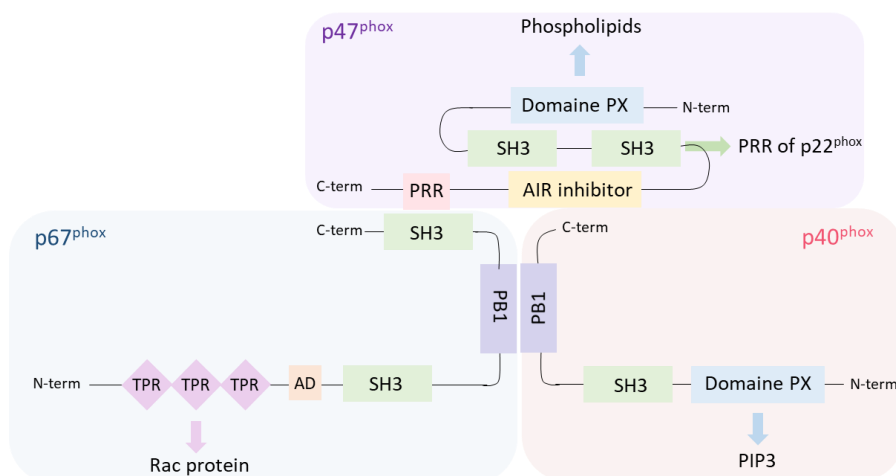


Figure 19 : Représentation des domaines de liaison des 3 sous-unités cytosoliques du complexe NADPH oxydase

La sous-unité p47^{phox} est constituée d'un domaine PX (Domaine structural de liaison aux phosphoinositides) qui permet de lier les phospholipides de la membrane du neutrophile lors de la fusion ; 2 domaines SH3 (Domaine d'homologie 3 SRC) permettant de lier les domaines riches en prolines (PRR) de la sous-unité p22^{phox} ; d'un inhibiteur AIR (Région auto-inhibitrice) permettant d'inhiber les domaines SH3 et PX dans un état de repos sous une conformation d'épingle à cheveux et enfin d'un domaine PRR permettant de lier la sous-unité p67^{phox}. La sous-unité p67^{phox} est constituée de plusieurs domaines tripeptides (TPR) permettant de lier la protéine Rac lors de son activation ; d'un domaine d'activation (AD) nécessaire pour enclencher l'activité enzymatique de gp91^{phox} ; d'un domaine PB1 (Phox et Bem1) permettant de lier la sous-unité p40^{phox} et d'un domaine SH3 permettant de lier la sous-unité p47^{phox} par son PRR. La sous-unité p40^{phox} est constituée d'un domaine PX permettant de lier la phosphatidylinositol-Triphosphate (PIP3) présente à la membrane du neutrophile ; d'un domaine SH3 et d'un domaine PB1 permettant de lier la sous-unité p67^{phox} par son domaine PB1. (Figure adaptée de Belambri et al., 2018).

Cependant, pour fonctionner correctement le complexe NADPH oxydase nécessite une petite protéine G, Rac2 libre dans le cytoplasme et maintenue à un état inactif d'une part par un inhibiteur Rho-GDI (Inhibiteur de dissociation du nucléotide de la guanosine) et d'autre part liée par la protéine GDP (El-Benna et al., 2016; Nguyen et al., 2017). L'activation de Rac2 passe par plusieurs voies de signalisation transformant la protéine GDP en GTP, permettant sa liaison avec la sous-unité p67^{phox} via les motifs TPR (Bedard and Krause, 2007; Nunes et al., 2013; Roos et al., 2003). Pour exister, les 5 protéines du complexe sont transcrites par des gènes ayant des localisations chromosomiques différentes (Tableau VIII).

Tableau VIII : Présentation des gènes permettant la transcription des sous-unités du complexe NADPH oxydase (Bedard and Krause, 2007 ; Clark, 1999 ; Nguyen et al., 2017)

Sous-unités	gp91 ^{phox}	p22 ^{phox}	p47 ^{phox}	p67 ^{phox}	p40 ^{phox}
Gène des sous-unités	CYBB	CYBA	NCF1	NCF2	NCF4
Chromosome	X	16	7	1	22
Poids moléculaire (kDa)	91	22	47	67	40

La protéine gp91^{phox} est transcrite à partir du gène *CYBB* localisé sur le chromosome X. La transcription est régulée par des facteurs répresseurs (CCAAT, HOXA10 et Meis1) et des facteurs activateurs (IFN- γ , TNF- α , NF κ B, PU.1, IRF1, IRF2, CP-1, Elf-1, STAT1 et YY-1) (Bedard and Krause, 2007; Frazão et al., 2015). Cependant, le facteur PU.1 semble être le plus impliqué dans la transcription du gène *CYBB* car un modèle murin KO (knockout) pour le facteur PU.1 présente une absence des transcrits *CYBB* (Bedard and Krause, 2007). La protéine p22^{phox} est transcrite à partir du gène *CYBA* localisé sur le chromosome 16. La protéine p47^{phox} fortement présente dans les cellules myéloïdes, est transcrite à partir du gène *NCF1* localisé sur le chromosome 7 (Bedard and Krause, 2007; Nguyen et al., 2017). La protéine p67^{phox} présente dans les cellules phagocytaires et LB, est transcrite à partir du gène *NCF2* localisé sur le chromosome 1 et sera fortement exprimée en présence de la cytokine IFN- γ (Bedard and Krause, 2007; Roos et al., 2003). Enfin la protéine p40^{phox} présente dans les cellules phagocytaires et LB, est transcrite à partir du gène *NCF4* localisé sur le chromosome 22 dont sa transcription nécessite le facteur PU.1 (Bedard and Krause, 2007).

Dans les neutrophiles au repos, les sous-unités du complexe NADPH oxydase sont libres dans celui-ci et ne peuvent pas produire de ROS. La production sera induite lorsque le neutrophile sera activé par différents facteurs (DAMPs, PAMPs, cytokines) et ainsi former le complexe NADPH oxydase.

III.3. Activation du complexe NADPH oxydase

Durant une réponse immunitaire, le neutrophile a besoin de produire des ROS pour pouvoir éliminer le pathogène de l'organisme. Cette production se fait via le complexe NADPH oxydase qui est activé en 2 temps : la phosphorylation des sous-unités du complexe puis l'assemblage de ces sous-unités permettant la production de ROS (Belambri et al., 2018; Vogt et al., 2018)

Lorsque le pathogène pénètre dans l'organisme, de multiples facteurs vont être libérés à la fois par le pathogène (PAMPs) et par les cellules du soi (DAMPs, cytokines, chimiokines). Ces facteurs vont venir se fixer sur leurs récepteurs présents à la surface du neutrophile enclenchant l'activation des voies de signalisation se résultant par l'activation du complexe NADPH oxydase.

C'est le cas des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et GM-CSF produits par les cellules de l'organisme (lymphocytes, macrophages, cellules endothéliales, NK) qui en se fixant sur leurs récepteurs (TNFR et GM-CSFR) activent les protéines kinases p38MAPK et ERK1/2, respectivement. Ces protéines kinases induisent la phosphorylation de la thréonine 233 de la sous-unité p67^{phox} et de la sérine 345 de la sous-unité p47^{phox} engendrant un changement conformationnel de p47^{phox}. Cette modification permet la phosphorylation des autres sérines

de la sous-unité p47^{phox} par les récepteurs TLR et CXCR, nécessaire pour induire la production de ROS par le neutrophile (Belambri et al., 2018; Dang, 2006; El-Benna et al., 2016; Miralda et al., 2017; Nguyen et al., 2017).

Ainsi, le neutrophile reconnaît les DAMPs et les PAMPs via les TLR2, TLR4 et TLR9 présents à sa surface, activant plusieurs voies de signalisation responsable de la phosphorylation des sous-unités du complexe. Lorsque les DAMPs et les PAMPs se fixent sur les TLR, cela induit l'activation de MyD88 – IRAK4 – TRAF6 responsables de l'activation de plusieurs protéines kinases :

i) TAK1 permet la phosphorylation de p38MAPK via MAPK ou MEK3/6 (Protéine kinase régulée par le signal extracellulaire et activée par des agents mitogènes) et d'ERK1/2 par MEK1/2.

ii) PI3K entraîne la phosphorylation de la protéine PKC β activant p38MAPK, aboutissant à la phosphorylation de la protéine Akt.

Ces cascades d'activation de kinases convergent pour induire la phosphorylation de la sous-unité p47^{phox} sur les autres sérines 303 et 379. La charge négative ainsi créée va alors entraîner un changement conformationnel de la sous-unité p47^{phox}, la mettant en conformation ouverte. Cette conformation permet d'éloigner ces domaines PX et SH3 de l'inhibiteur AIR, et peut ainsi lier les phospholipides membranaires et la sous-unité p22^{phox} (Belambri et al., 2018 ; Dewas et al., 2000 ; El-Benna et al., 2016 ; Fan et al., 2007 ; Glennon-Alty et al., 2018 ; Kolar and Liu, 2017 ; Nordenfelt and Tapper, 2011 ; Xiang et al., 2010) (Figure 20).

Les sérines 303 et 379 de la sous-unité p47^{phox}, sont également phosphorylées suite à l'activation des récepteurs aux GPCR par fixation des chimiokines (IL-8, PAF, C5a, LTB4, fMLP) activant des voies de signalisation. Le GPCR pour rappel, est lié à la protéine hétérotrimérique G constituée de 3 domaines : β , γ , α i inactivant le récepteur. Lorsque les chimiokines telles que le fMLP se fixent sur ce récepteur, un changement conformationnel est opéré sur celui-ci transformant le GDP en GTP fournissant l'énergie nécessaire pour pouvoir séparer la protéine G α i des 2 autres domaines β et γ . Ainsi, la protéine G $\beta\gamma$ est capable d'activer différentes protéines kinases aboutissant à la phosphorylation des sous-unités du complexe (en jaune sur la Figure 20) :

i) les enzymes phospholipidiques membranaires tels que la PLC, et PLD conduisent à l'activation de PKC pour phosphoryler : les sérines 303 et 379 de la sous-unité p47^{phox} ; la thréonine 233 de p67^{phox} ; la thréonine 154 (important pour l'assemblage du complexe) et la sérine 315 (augmentant sa liaison avec la sous-unité p67^{phox} lorsqu'ils sont fixés au complexe cytochrome b₅₅₈) de p40^{phox}. Mais également la phosphorylation de gp91^{phox} nécessaire pour

le transfert d'électron afin de transformer l'oxygène en anion superoxyde et pour la fixation avec les autres sous-unités (Belambri et al., 2018; El-Benna et al., 2005; Nguyen et al., 2017).

ii) PI3K active 2 protéines, Ras et Raf appartenant à la famille des MAPK activant MEK1/2 puis ERK1/2 qui phosphoryle les résidus sérines de p47^{phox} et les résidus thréonines de p67^{phox}.

iii) PI3K active directement MAPKK provoquant la phosphorylation de MEK3/6 puis de p38MAPK et enfin les résidus sérines et thréonines des sous-unités p47^{phox} et p67^{phox}, respectivement (Belambri et al., 2018; Hidalgo et al., 2015; Nguyen et al., 2017).

La protéine Gβγ active en plus la protéine GEF (Facteur d'échange des nucléotides de la guanosine) transformant le GDP en GTP de la protéine Rac la dissociant de son inhibiteur Rho-GDI et la rendant active. Cette protéine s'associera à la sous-unité p67^{phox} entraînant un changement conformationnel de p67^{phox} qui aura une forte affinité aux sous-unités gp91^{phox} et p22^{phox} formant ainsi le complexe NADPH oxydase (Dewas et al., 2000; Nguyen et al., 2017).

D'autres récepteurs présents à la surface des neutrophiles sont aussi capables d'induire la production de ROS. Par exemple, suite à leurs opsonisations par les IgG, les pathogènes peuvent être reconnus puis phagocytés par les récepteurs FcγR ayant une faible affinité pour les IgG tels que le CD32a (FcγRIIa) et CD16b (FcγRIIIb) (Violet et rose sur la Figure 20) (Nguyen et al., 2017; Wang and Jönsson, 2019).

Le récepteur CD32a après reconnaissance du pathogène opsonisé active une cascade de signalisation protéique : PI3K – PIP3 - PLCγ - DAG - PKCβ pour ensuite activer p38MAPK et ERK1/2 phosphorylant les sous-unités cytoplasmiques du complexe NADPH oxydase (Coxon et al., 2000; Nguyen et al., 2017; Nunes et al., 2013; Wang and Jönsson, 2019). La liaison CD32a/pathogène active la protéine Syk puis VAV qui à la fois phosphoryle la sous-unité p40^{phox} et active la protéine Rac2 par transformation du GDP en GTP (Nguyen et al., 2017).

Concernant le récepteur CD16b, celui-ci active la production de ROS via les protéines p38MAPK et ERK1/2 phosphorylé par PKC (Alemán et al., 2021; Coxon et al., 2000) (Figure 20). Cependant, l'équipe de Coxon a montré que le récepteur CD16b était capable d'engendrer une production de ROS plus importante que le récepteur CD32a car celui-ci est 10 fois plus exprimé à la surface de la cellule et la voie p38MAPK est par conséquent plus fortement activée. Néanmoins, les 2 FcγR phosphorylent le résidu sérine 486 de la sous-unité gp91^{phox} et le résidu thréonine 147 de p22^{phox} par activation de la protéine kinase PKC après reconnaissance du pathogène par le neutrophile (Belambri et al., 2018).

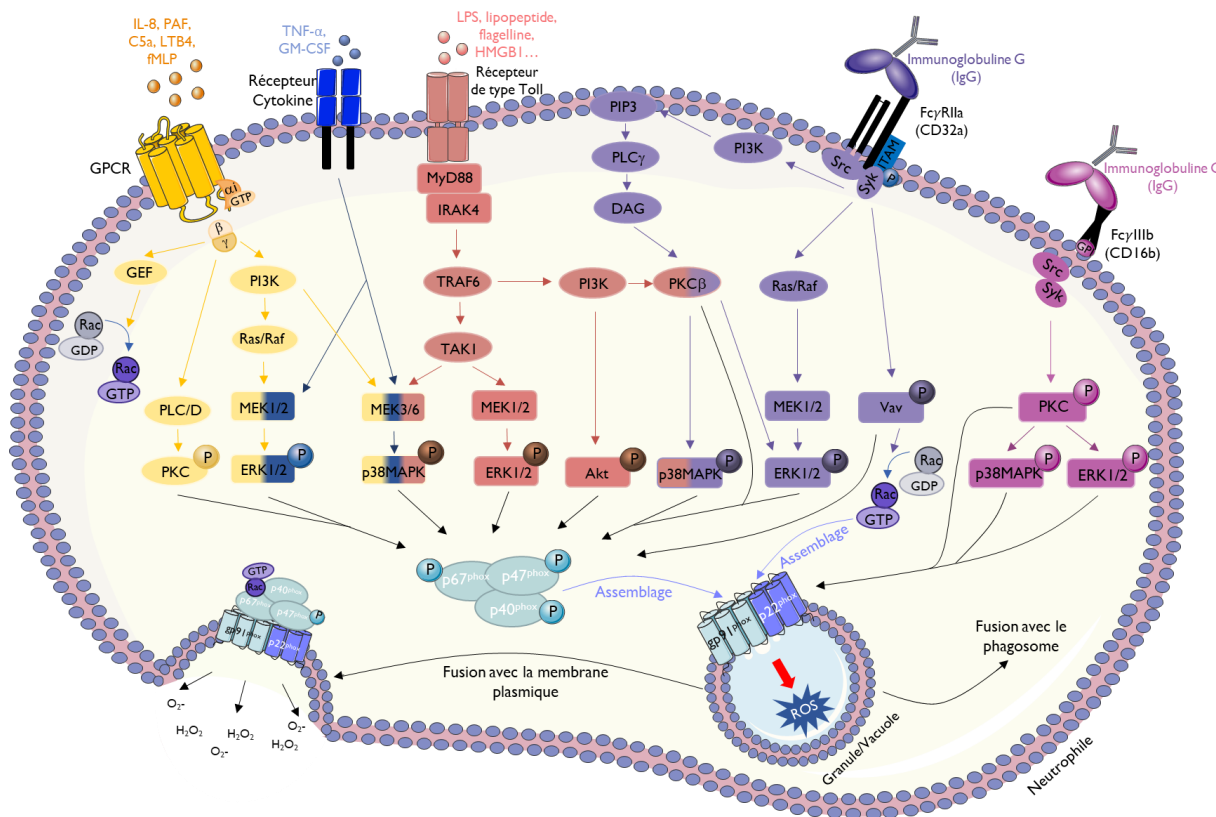


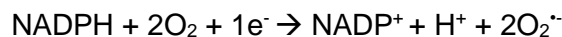
Figure 20 : Activation du complexe NADPH oxydase et production de ROS

Lors d'une réponse immunitaire des molécules inflammatoires sont libérées telles que les cytokines TNF- α et GM-CSF reconnaissant leur récepteur aux cytokines. Cette fixation active les protéines ERK1/2 et p38MAPK pour induire la phosphorylation des sous-unités p67^{phox} et p47^{phox} mais qui sera insuffisante pour p47^{phox}. L'activation des TLR par le LPS par exemple, complète la phosphorylation de p47^{phox} par activation d'une cascade protéique : MyD88 - IRAK4 - TRAF6 activant TAK1 qui active p38MAPK et ERK1/2 via MEK3/6 et MEK1/2, respectivement. TRAF6 active également PI3K et PKC β phosphorylant ensuite Akt et p38MAPK, respectivement. Le récepteur aux GPCR par fixation du fMLP permet l'activation de la protéine G $\beta\gamma$ qui active plusieurs protéines kinases : i) la protéine GEF ce qui permet de transformer le GDP en GTP de la protéine Rac l'activant ; ii) activation de PLC ou PLD puis de PKC qui permet de phosphoryler les sous-unités p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} et gp91^{phox} ; iii) phosphorylation d'ERK1/2 via la voie PI3K – Ras/Raf – MEK1/2 phosphorylant p47^{phox} et p67^{phox} ; iv) activation de MEK3/6 puis p38MAPK phosphorylant p47^{phox} et p67^{phox}. Le récepteur Fc γ R1Ia (CD32a) permet de phosphoryler les sous-unités p47^{phox}, p67^{phox} et p40^{phox} via l'activation de p38MAPK et ERK1/2 activé par une succession d'activation protéique PI3K – PIP3 - PLC γ - DAG - PKC β . De plus, ce récepteur active la protéine VAV qui permet d'activer la sous-unité p40^{phox} et la protéine Rac2. Le récepteur Fc γ R1IIb (CD16b) phosphoryle p38MAPK et ERK1/2 via PKC phosphorylant les sous-unités gp91^{phox} et p22^{phox}. Ainsi, la phosphorylation de l'ensemble des sous-unités permet leur assemblage et la production de ROS. D'après Alemán et al., 2021 ; Coxon et al., 2000 ; Nguyen et al., 2017 ; Belambri et al., 2018.

III.4. Différents ROS produits par le complexe NADPH oxydase

Une fois le complexe NADPH oxydase constitué de ses 6 protéines (gp91^{phox}, p22^{phox}, p40^{phox}, p67^{phox}, p47^{phox} et Rac-GTP) suite à l'activation du neutrophile, l'oxygène peut être transformé en différents ROS où ils pourront être libérés soit dans le phagosome, soit en extracellulaire après fusion des granules avec la membrane plasmique du neutrophile (Bedard and Krause, 2007). Le complexe NADPH oxydase est au final une enzyme constituée de plusieurs protéines avec un centre redox qui permet le transfert d'électron. La sous-unité gp91^{phox} possède dans sa partie cytosolique 2 hèmes participant au transfert d'électron entre le donneur

NADPH et l'accepteur FAD (Flavine adénine dinucléotide). Ainsi, gp91^{phox} peut transformer 2 molécules d'oxygène (O₂) en 2 molécules d'anion superoxyde (O₂^{•-}), avec libération d'un hydrogène (H⁺) via la réaction chimique suivante (Aviello and Knaus, 2018; Bedard and Krause, 2007; Nguyen et al., 2017; Nunes et al., 2013; Roos et al., 2003) :



L'anion superoxyde (O₂^{•-}) est un produit instable avec une demi-vie de 10⁻⁵ seconde (Aviello and Knaus, 2018). Malgré sa demi-vie courte, il permet d'induire l'activation du facteur NFκB par dégradation de son inhibiteur IκBα et sa translocation dans le noyau pour induire la production du TNF-α (Hidalgo et al., 2015). Il peut également endommager les protéines contenant des clusters de fer-sulfure libérant le fer ferreux (Fe²⁺) dans la matrice extracellulaire. Mais étant instable, les 2 anions superoxyde (O₂^{•-}) seront rapidement transformés en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) via la superoxyde dismutase (SOD) ou en peroxynitrite (ONOO⁻) par la présence de l'oxyde nitrique (NO) (Aviello and Knaus, 2018; Dharmaraja, 2017) (Figure 21).

La présence simultanée de l'anion superoxyde, du peroxyde d'hydrogène et du Fe²⁺ peuvent donner un autre type de ROS, le radical hydroxyle (•OH) ayant une demi-vie encore plus courte, de l'ordre de 10⁻⁹ seconde (Aviello and Knaus, 2018; El-Benna et al., 2005). Ce radical est un composé très microbicide provoquant l'inactivation d'enzymes, la peroxydation des lipides, des mutations ou des modifications de l'ADN souvent irréversible (Dharmaraja, 2017).

Le peroxyde d'hydrogène est un ROS relativement stable ayant une demi-vie de 10⁻² – 10⁻³ secondes. Il est perméable aux membranes et à de fortes concentrations il a une action microbicide pouvant entraîner l'inactivation des facteurs de virulence des bactéries (Bedard and Krause, 2007; Glennon-Alty et al., 2018). Il a également des fonctions au sein du neutrophile, comme l'activation des facteurs de transcription, AP-1 et NF-κB impliqués dans la division cellulaire et la synthèse de protéines en réponse aux médiateurs inflammatoires (El-Benna et al., 2005). Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est transformé en acide hypochloreux (HOCl) qui est le ROS le plus toxique par l'action de la MPO. Cet acide hypochloreux (HOCl) donnera 2 autres ROS, l'acide hypobromeux (HOBr) et hypocyaneux (HOSCN). Ils sont capables de pénétrer les membranes hydrophobes du pathogène et de dégrader son ADN grâce à leurs propriétés microbicides (modification des protéines, des lipides et de l'ADN) dans l'intention de le détruire (Glennon-Alty et al., 2018; Nunes et al., 2013; van Kessel et al., 2014) (Figure 21).

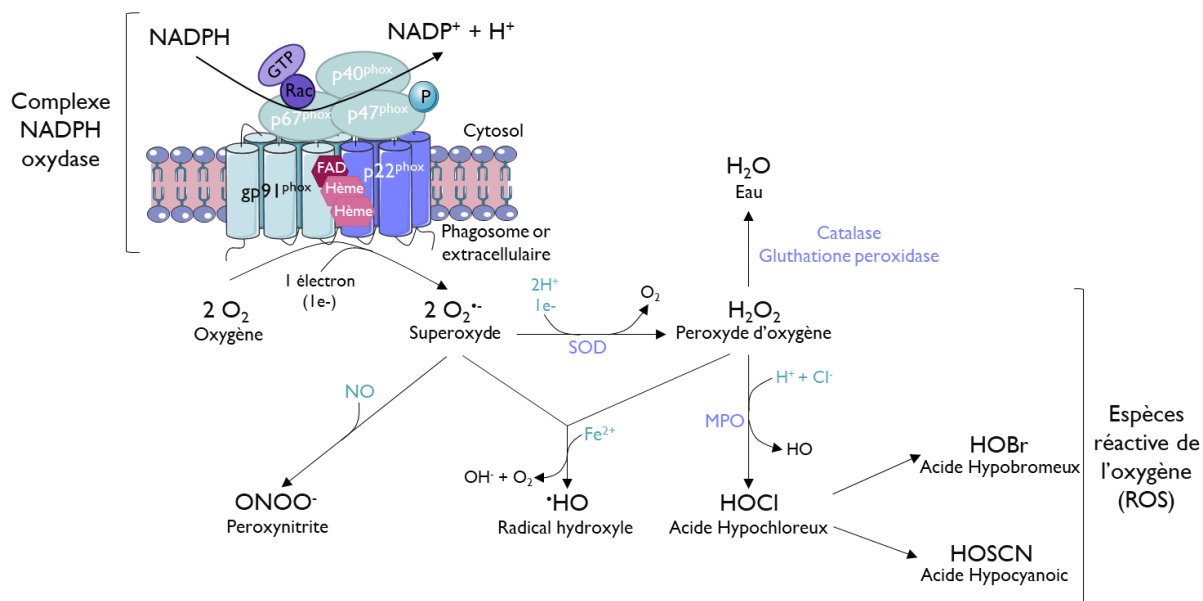


Figure 21 : Schéma de la production des différents ROS par le complexe NADPH oxydase

Les ROS sont produits par la transformation de l'oxygène (O_2) en anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) à la suite d'un transfert d'électron ($1e^-$) sur l'oxygène par le complexe NADPH oxydase en passant par un accepteur d'électrons FAD (Flavine adénine dinucléotide) et 2 hèmes. Suivant l'environnement dans lequel est produit l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) il pourra donner le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) ou en présence de l'oxyde nitrique (NO) donner le peroxynitrite ($ONOO^{\bullet}$). L'anion superoxyde est capable d'endommager les protéines contenant des clusters de Fer-sulfure, libérant du fer ferreux (Fe^{2+}) et en se complexant avec l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) se formera le radical hydroxyle ($\bullet OH$). Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en présence de la myéloperoxydase (MPO) se transformera en acide hypochloreux (HOCl) qui lui donnera l'acide hypobromeux (HOBr) et l'acide hypocyaneux (HOSCN). De plus, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la catalase et la glutathion peroxydase donnera un produit consommable par la cellule, l'eau (H_2O). D'après (Glennon-Alty et al., 2018 ; Nunes et al., 2013 ; van Kessel et al., 2014 ; Dharmaraja, 2017).

Afin de minimiser les dommages liés aux ROS et de rétablir l'homéostasie, des antioxydants non enzymatiques (glutathion, vitamines C et E, albumine, bilirubine) et enzymatiques (SOD, catalase, glutathion peroxydase, thioredoxine réductase et peroxyredoxine) sont produits afin de diminuer le niveau de ROS dans le neutrophile (Dharmaraja, 2017; Finkel and Holbrook, 2000). Ainsi, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est catalysé par la catalase et la glutathion peroxydase pour donner une molécule d'eau (H_2O) (Dharmaraja, 2017; Glennon-Alty et al., 2018; Kaymak et al., 2011). Mais si l'acide hypochloreux est présent alors la catalase et la superoxyde dismutase peuvent être inactivées (Glennon-Alty et al., 2018; Kaymak et al., 2011). La glutathion peroxydase est généralement produite en excès afin de neutraliser le radical hydroxyle ($\bullet OH$) et protéger le neutrophile (Dharmaraja, 2017). L'expression des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase et la glutathion peroxydase sont sous le contrôle des éléments de contrôle antioxydant correspondant à de courtes séquences d'ADN. Ces éléments sont transcrits après translocation du facteur nucléaire Nrf2 (Facteur 2 lié au facteur nucléaire E2) dans le noyau suite à l'oxydation de la protéine Keap1 (Protéine 1 associée à l'ECH de type Kelch) à laquelle il était lié en présence de forte concentration en ROS (Glennon-Alty et al., 2018; Kaymak et al., 2011). Le complexe NADPH oxydase peut être

inhibé directement par des molécules endogènes telles que le NO, les stéroïdes, l'adrénaline, l'IL-10 et l'IL-4 (El-Benna et al., 2005).

Cependant, si une seule sous-unité du complexe est non fonctionnelle suite à une mutation par exemple, il n'y aura pas de production de ROS. Ainsi, pour fonctionner, le complexe NADPH oxydase doit avoir les 5 sous-unités et la protéine Rac fonctionnelles.

III.5. Mutation du complexe NADPH oxydase

Certaines maladies présentent des mutations génétiques au niveau des gènes codant les sous-unités du complexe NADPH oxydase, responsable du dysfonctionnement de celui-ci ayant pour conséquence l'absence de production de ROS (Roos et al., 2003).

C'est le cas de la maladie chronique granulomateuse (CGD) touchant 1 naissance sur 200 000, diagnostiquée dans les 3 premières années de vie de l'enfant. Afin d'améliorer la qualité de vie de ces enfants une transplantation de cellules souches hématopoïétiques est nécessaire. Les patients CGD en absence de transplantation présente des infections à répétitions et une absence de formation de NET (Rider et al., 2018; Yu et al., 2021). Ces infections induisent la présence de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , IL-6 et TNF- α , créant un état hyper-inflammatoire (Aviello and Knaus, 2018; El-Benna et al., 2005; Nunes et al., 2013). La maladie peut être liée au chromosome X et présenter une mutation au niveau du gène *CYBB* codant pour la protéine gp91^{phox}. Cette mutation est la plus fréquente, elle est retrouvée chez 65 % des patients et provoque la diminution voire l'absence totale de la sous-unité gp91^{phox} (Nguyen et al., 2017; Rider et al., 2018). Elle peut également être liée au chromosome autosomal récessif présentant une mutation au niveau des gènes *CYBA* (5 % des patients), *NCF1* (25 % des patients), *NCF2* (<5 % des patients) et *NCF4* (<5 % des patients) codant pour les protéines non fonctionnelles p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} et p40^{phox} respectivement (Nguyen et al., 2017; Rider et al., 2018; Roos et al., 2003).

Une autre maladie liée à l'inflammation des intestins (IBD) présente également une altération de la production de ROS. C'est une inactivation rare, non héréditaire présentant des mutations *de novo* au niveau du complexe NADPH oxydase responsable d'une diminution de production de ROS et donc la diminution de la clairance du pathogène (Aviello and Knaus, 2018). Cependant, les patients présentant une déficience du complexe NADPH oxydase produisent toutefois un minimum de ROS via la mitochondrie mais ils ne sont pas suffisants pour détruire les pathogènes (Pinegin et al., 2018).

Chapitre 3 Les granulocytes dans le sepsis

Le sepsis correspond au dysfonctionnement d'organe menaçant le pronostic vital causé par une réponse immunitaire dérégulée de l'hôte à une infection (Singer et al., 2016).

I. Introduction

Le sepsis, anciennement nommé septicémie par le Docteur Pierre Piorry désigne la présence de bactéries dans le sang. A l'heure actuelle le sepsis reste un problème de santé majeure malgré les découvertes et les avancés scientifiques. Dans le monde, on estime que 48,9 millions de personnes (enfants et adultes) sont atteintes du sepsis et 11 millions en succombent par an (World Health Organization). Le sepsis est une des principales raisons d'une admission en réanimation avec un taux de décès de plus de 50 % des patients au bout de 3 mois d'hospitalisation (Angus and van der Poll, 2013). De plus, les personnes guérissant du sepsis présentent des fonctions physiques et cognitives altérées associées à une diminution de la qualité de vie (Hotchkiss et al., 2016).

Le sepsis est dû à la persistance du pathogène dans l'organisme après une première infection principalement localisée à 3 endroits : les voies respiratoires (64 %), le tractus digestif (20 %) et le système génito-urinaire (14 %) (Angus and van der Poll, 2013; Cecconi et al., 2018; Stearns-Kurosawa et al., 2011). L'infection est principalement causée par des bactéries gram-négatif (69 %, *E.coli*, *Klebsiella* et *Pseudomonas aeruginosa*) mais les infections fongiques (19 %), virales (4 %) et parasitaires (3 %) ne sont pas exclues (Angus and van der Poll, 2013; Annane et al., 2005; Cecconi et al., 2018; Stearns-Kurosawa et al., 2011).

Le sepsis est caractérisé par une persistance de la réponse inflammatoire, associé à une libération importante de médiateurs pro-inflammatoires (cytokines et chimiokines) créant le syndrome de la réponse inflammatoire systémique (SIRS). Ce SIRS est accompagné d'une diminution de l'oxygène dans les tissus avec la présence de médiateurs anti-inflammatoires provoquant le dysfonctionnement multi-organes tissulaires (Kovach and Standiford, 2012; Singer et al., 2016).

Cependant, certains patients présentent un état plus sévère que le sepsis, c'est ce que l'on appelle le choc septique. Celui-ci est caractérisé par le SIRS, d'un dysfonctionnement multi-organes, d'une hypotension, d'une altération profonde des tissus en état d'hypoxie et d'une augmentation du niveau de lactate. Ces patients ont une espérance de vie de 28 à 30 jours après leur admission en réanimation (Denning et al., 2019; Sônego et al., 2016; Vincent et al., 2019).

Lors de l'arrivée du patient en réanimation présentant une suspicion de sepsis ou infection sans sepsis, un outil de mesure est appliqué afin de confirmer ou non le sepsis, c'est le qSOFA (quick Sequential Organ Failure Assessment). Cet outil permet de mesurer l'altération mentale, la pression systolique (pression de l'artère cardiaque au moment de la contraction du cœur) et le taux respiratoire. Le patient est considéré comme septique quand au moins 2 critères sont présents (Ayres et al., 2019; Cecconi et al., 2018; Singer et al., 2016). Afin de confirmer l'état septique du patient, un score plus complet est appliqué, c'est le score SOFA. Il permet de mesurer le degré des fonctions respiratoires, neurologiques, rénales, hépatiques, cardiaques et le dysfonctionnement d'organe, et si 2 critères sont présents le patient est considéré comme septique. Afin de mesurer la gravité de la maladie, des tests supplémentaires sont réalisés pour définir si le patient est dans un état septique ou de choc septique par mesure de la pression artérielle et du niveau de lactate. Le patient est considéré en choc septique lorsque la pression sanguine est inférieure à 65 mm de mercure et un lactate supérieur à 2 mmol/L (Singer et al., 2016) (Figure 22). Cependant, la persistance du pathogène dans le sang des patients provoque une altération des fonctions des cellules du système immunitaire.

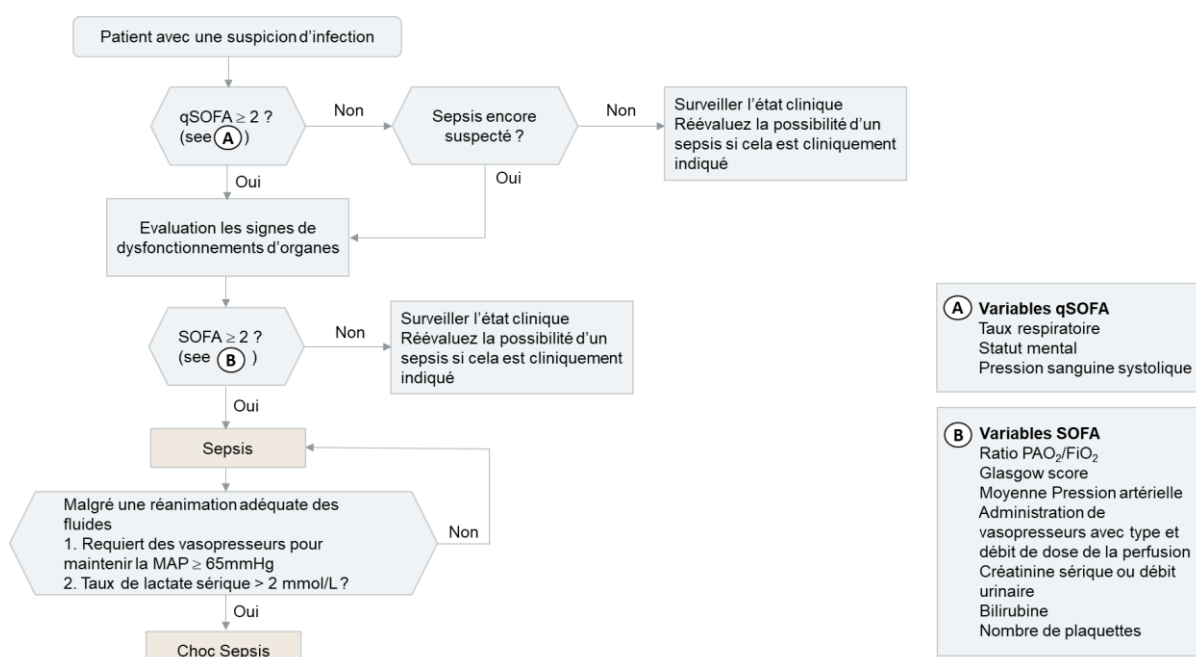


Figure 22 : Diagramme d'identification d'un sepsis ou choc septique suite à l'arrivée d'un patient en réanimation

Un patient arrivant en réanimation avec une suspicion de sepsis ou infection sans sepsis, un outil mesurant le taux respiratoire, le statut mental et la pression sanguine est mesuré, permet de déterminer si le patient est en sepsis ou non, c'est le score quick SOFA (qSOFA). Si au moins 2 critères sont présents alors un test plus complet est appliqué, c'est le test SOFA. Il permet de mesurer le degré des fonctions respiratoires, neurologiques, rénales, hépatiques, cardiaques et le dysfonctionnement d'organe. Comme le qSOFA si au moins 2 critères sont présents alors le patient est considéré comme étant septique. Afin d'évaluer la gravité de son état (choc septique), le niveau de lactate est mesuré ainsi que la pression artérielle. On considère que le patient est en choc septique lorsque le taux de lactate est supérieur à 2mmol/L et une hypotension inférieure à 65 mmHg. (Singer et al., 2016).

II. Dysfonctionnement des cellules de l'immunité chez les patients septiques

II.1. Système immunitaire altéré

Le sepsis affecte le fonctionnement de nombreuses cellules tant de la réponse immunitaire innée que de la réponse adaptative exposant le patient septique à une seconde infection pouvant entraîner la mort du patient (Hotchkiss et al., 2013). Toutefois, la réponse immunitaire du patient peut être divisée en 3 phases : i) libération de grandes quantités de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6) créant le SIRS. ii) coexistence des cytokines pro- et anti-inflammatoires, iii) libération des médiateurs anti-inflammatoires (IL-10, IL-1 α , prostaglandines) créant le syndrome de la réponse anti-inflammatoire compensatoire (CARS) (Brown et al., 2006; Danikas et al., 2008; Kovach and Standiford, 2012; Shen et al., 2017).

II.1.1. Les cellules du système immunitaire innée affectées par le sepsis

Le système immunitaire inné est composé principalement des macrophages, cellules dendritiques, NK et neutrophiles. Il permet une réponse rapide et non spécifique après pénétration du pathogène dans l'organisme. Si l'infection n'est pas contrôlée rapidement, la persistance du pathogène dans l'organisme des patients septiques peut provoquer des altérations fonctionnelles sur les cellules suivantes (Tableau IX) :

Tableau IX : Fonctions des différentes cellules de l'immunité innée dans le sepsis (Girardot et al., 2017 ; Hotchkiss et al., 2013 ; Rubio et al., 2019 ; Venet and Monneret, 2018)

↑ : augmentation, ↓ : diminution

Cellule dendritiques	↑Apoptose ↓Présentation d'antigène aux LT et LB ↓Production cytokines pro-inflammatoires (IL-12, IL15, IFN- γ) ↓Nombre dans la circulation sanguine ↓Expression HLA-DR ↑Production IL-10
Monocytes/Macrophages	↑Production cytokines anti-inflammatoire ↓Expression HLA-DR ↓Production cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-1 α , IL-6, IL-12) ↓Tueur des pathogènes
Natural Killer	↑Apoptose ↓Fonction cytotoxique ↓Production cytokines (IFN- γ) ↓Nombre dans le sang
Granulocytes matures	↑Libération de granulocytes immatures ↑Production d'IL-10 ↓Apoptose ↓Libération de ROS ↓Libération d'oxyde nitrite ↓Expression de marqueurs d'adhésion
LT $\gamma\delta$	↓Nombre dans la circulation sanguine

Ces patients présentent une diminution drastique du nombre de cellules dendritiques et de NK causée par une augmentation de leur apoptose. A l'inverse, les neutrophiles vont voir leur apoptose retardée et ils vont s'accumuler sur le site de l'infection causant des dommages tissulaires et cellulaires (Hotchkiss et al., 2016; Stearns-Kurosawa et al., 2011). Certains patients septiques ou en chocs septiques vont déclencher une granulopoïèse d'urgence correspondant à une libération accrue de neutrophiles et surtout de GI dans leur circulation sanguine pour répondre à l'infection (Cecconi et al., 2018; Hotchkiss et al., 2016). Les patients présentant un taux supérieur à 30 % de granulocytes sous forme immature ont de moins bonne chance de survie au cours des 28 jours d'hospitalisation (Daix et al., 2018b; Demaret et al., 2015). Le sepsis ne touche pas seulement les cellules de la réponse immunitaire innée, les cellules de la réponse immunitaire adaptative sont également impactées.

II.1.2. Les cellules du système immunitaire adaptatif affectées par le sepsis

Le système immunitaire adaptatif est principalement composé des LT et LB qui vont mettre en place une réponse spécifique du pathogène. Tout comme les cellules de la réponse innée, les LT et LB présentent également des fonctions altérées provoquant une absence de réponse et la destruction du pathogène responsable des dysfonctionnements au niveau des organes (Tableau X).

Tableau X : Fonctions des différentes cellules de l'immunité adaptative dans le sepsis (Girardot et al., 2017 ; Hotchkiss et al., 2013 ; Rubio et al., 2019 ; Venet and Monneret, 2018)
 ↑ : augmentation, ↓ : diminution

LT CD4⁺ et CD8⁺	↑Apoptose (surexpression Bim, Bak, Bid, Fas) ↓Production de cytokines (IL-2, IFN- γ) ↓Prolifération ↓Diversité du TCR ↑Expression PD1, CTLA4, TNFR
LT régulateur (LTreg)	↑Activité suppressive ↑Nombre dans le sang
LB	↑Apoptose ↑Production d'IL-10 ↓Expression CMH II ↓Production d'anticorps spécifique de l'antigène

Les LT ont un rôle important dans la réponse immunitaire face à un pathogène. Leur activation se fait principalement par la reconnaissance de l'antigène pathogénique via les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) qui provoquera la libération de l'IFN- γ par les LT et l'activation des LB (Stearns-Kurosawa et al., 2011). Néanmoins, les patients septiques présentent une forte diminution du nombre de LT CD4⁺/CD8⁺ et LB (lymphopénie) dû à une augmentation de leur apoptose (Girardot et al., 2017; Hotchkiss et al., 2016; Stearns-Kurosawa et al., 2011). A l'inverse, les patients septiques présentent une augmentation de LT

régulateurs (Treg), jouant un rôle dans le contrôle des LT CD4⁺ et CD8⁺ afin que les cellules n'activent pas une réponse immunitaire contre les antigènes du soi. Ainsi, par leur nombre conséquent, ils sont responsables de la diminution de prolifération des LT (Hotchkiss et al., 2013; Venet and Monneret, 2018). Ces Treg présentent une activité suppressive envers les cellules de l'immunité innée, puisqu'ils inhibent les fonctions des monocytes, des neutrophiles et la libération de l'IFN- γ par les LT $\gamma\delta$ (Hotchkiss et al., 2013).

Malgré ces altérations cellulaires, les patients septiques présentent une libération accrue de GI dans leur circulation sanguine afin d'éliminer le pathogène persistant, c'est ce l'on appelle la granulopoïèse d'urgence.

II.1.3. Granulopoïèse d'urgence

La granulopoïèse d'urgence est définie par la synthèse *de novo* de neutrophiles suite à une prolifération accrue de progéniteurs myéloïdes dans la moelle osseuse en réponse une infection grave. L'objectif principal est de remplacer et d'augmenter le nombre de neutrophiles présents sur le site infectieux dans le but d'éliminer le pathogène (Manz and Boettcher, 2014).

La granulopoïèse d'urgence est déclenchée lorsque la réponse immunitaire classique n'est plus suffisante pour contrôler l'infection devenue systémique. L'épuisement rapide des neutrophiles sur le site infectieux et la production en grande concentration de médiateurs pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-12, IL-15 et IL-18) produits par les macrophages résidents, les cellules dendritiques, les mastocytes et les cellules épithéliales vont faire rapidement augmenter le nombre de neutrophiles dans la circulation sanguine. Ces signaux, stimulent leur production par les progéniteurs (CMP et GMP) localisés dans la moelle osseuse, puis leur libération dans la circulation sanguine dans le but de détruire le pathogène (El-Benna et al., 2016; Kaymak et al., 2011; Manz and Boettcher, 2014; Rosales, 2017; Warnatsch et al., 2017) (Figure 23).

Ainsi, les patients septiques libèrent de la moelle osseuse vers la circulation sanguine jusqu'à 10 fois plus de neutrophiles qu'un individu sain. Cependant, cette augmentation s'accompagne d'une libération en grand nombre de GI caractérisés par la faible expression du récepteur CD16 et CD10 (band cells) (Ayres et al., 2019; Drifte et al., 2013). Ceci peut s'expliquer par le fait qu'il y a présence d'une dérégulation de la balance entre la mort des neutrophiles circulants et la forte demande de réponse aux pathogènes déclenchant une libération rapide de neutrophiles et de GI dans la circulation sanguine (Manz and Boettcher, 2014).

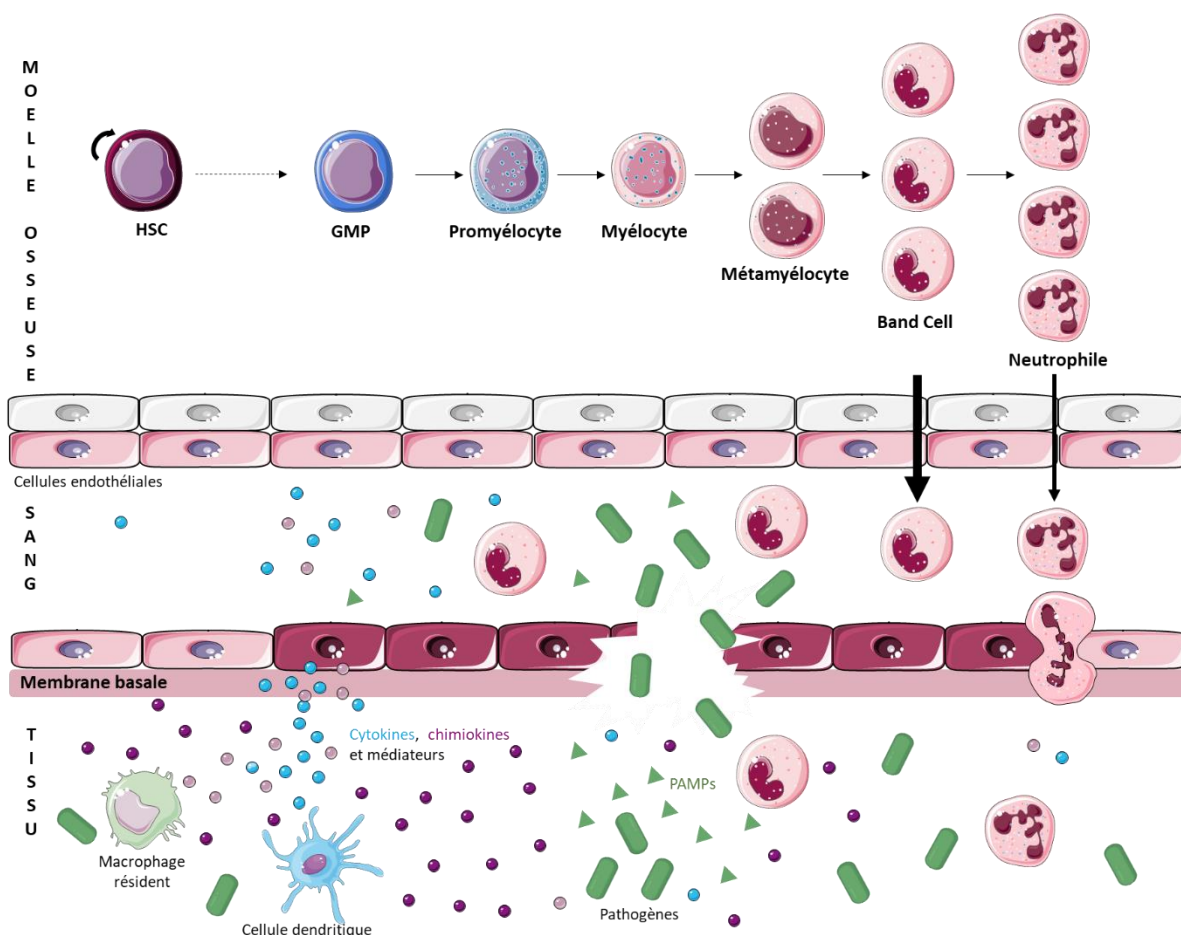


Figure 23 : Granulopoïèse d'urgence

La granulopoïèse d'urgence permet la synthèse en grande concentration de neutrophiles à partir des progéniteurs myéloïdes (GMP). Elle est activée par la présence systémique du pathogène, stimulant les cellules de la réponse immunitaire qui vont libérer des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. Ces signaux vont ainsi agir sur ces progéniteurs à se différencier en granulocytes, pour ensuite libérer de grandes quantités de granulocytes à la fois matures et immatures dans la circulation sanguine afin de détruire le pathogène. D'après Ayres et al., 2019 ; Drifte et al., 2013 ; Manz and Boettcher, 2014.

II.1.3.1. Les voies d'activation de la granulopoïèse d'urgence

La persistance du pathogène dans l'organisme est responsable de l'activation de la granulopoïèse d'urgence responsable de la libération de GI dans la circulation sanguine. Toutefois, cette granulopoïèse pourrait être activée via 2 voies : directe et indirecte (Manz and Boettcher, 2014; Rosales, 2020).

La **voie directe** passe par la reconnaissance du pathogène via les TLR exprimés à la surface des CSH. Effectivement, les CSH humains expriment à leur surface les TLR2 permettant de reconnaître les bactéries (De Luca et al., 2009). De plus, des études *in vitro* ont mis en évidence que les CSH après reconnaissance du pathogène par leur TLR induisent la production d'IL-6, leur prolifération et différenciation en granulocytes (Liu et al., 2015). Il semblerait qu'une petite proportion de CSH soit capable de quitter la moelle osseuse vers la

circulation sanguine et d'y revenir pour rencontrer le pathogène (Rosales, 2020) (Figure 24). Cependant la voie directe n'a pas donné l'objet de nombreuses études et reste encore à confirmer que la granulopoïèse d'urgence peut passer par cette voie.

La **voie indirecte** permet la différenciation des CSH en granulocytes via la présence des facteurs et cytokines telles que le G-CSF, GM-CSF, IL-3, IL-6 et FLT3 (Tyrosine kinase 3 de type FMS) présent en très forte concentration dans le sérum de l'hôte. Elle peut aussi passer via les TLR exprimés, soit à la surface des macrophages résidents de la moelle osseuse ou se trouvant sur le site de l'infection, soit par les cellules endothéliales vasculaires (Manz and Boettcher, 2014). Il semblerait que les macrophages résidents des tissus et les monocytes circulants après rencontre du pathogène via leur TLR, produisent le G-CSF, GM-CSF et IL-6 agissant sur la prolifération et différenciation des CSH en granulocytes, mais ceci n'a jamais fait l'étude *in vivo*. Les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins rencontrent le pathogène via les TLR4 activant la production de G-CSF agissant sur le progéniteur GMP, ce qui permet sa différenciation en granulocytes (Manz and Boettcher, 2014; Rosales, 2020) (Figure 24).

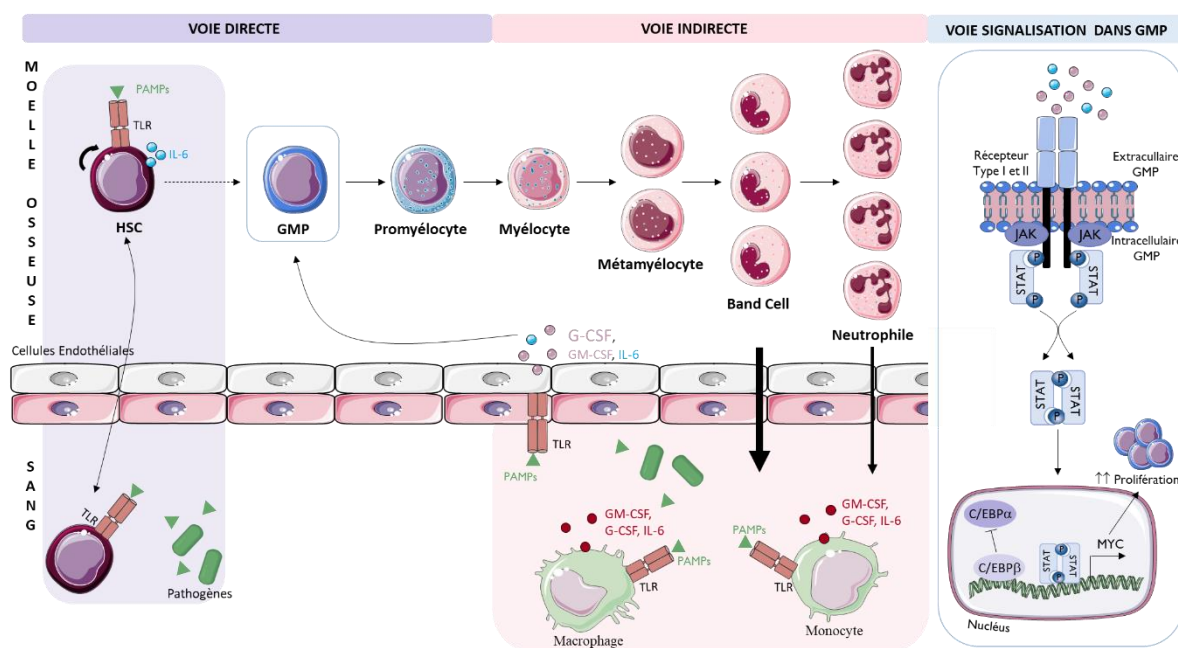


Figure 24 : Les deux voies d'induction de la granulopoïèse d'urgence et la voie de signalisation dans le GMP

Il semblerait que 2 voies existent afin d'activer la granulopoïèse d'urgence et augmenter le nombre de GI dans la circulation sanguine suite à une infection persistante : la voie directe où les CSH reconnaissent le pathogène ou une partie du pathogène (PAMPs), induisant la production d'IL-6 et leur différenciation en granulocytes. De plus, il semblerait que ces cellules soient capables de quitter et revenir dans la moelle osseuse à la rencontre du pathogène. La voie indirecte permet l'induction de la granulopoïèse d'urgence par la forte concentration en cytokines GM-CSF, G-CSF, IL-6 et FLT3 (Tyrosine kinase 3 de type FMS) présent dans le sérum des patients présentant une infection systémique. De plus les macrophages résidents de la moelle ou présent sur le site de l'infection produisent le GM-CSF, G-CSF et IL-6 après reconnaissance du pathogène via leur TLR. Enfin, les cellules endothéliales vasculaires peuvent reconnaître le pathogène via leur TLR, ce qui induit la production de G-CSF agissant sur les GMP. Ainsi, la forte concentration en GM-CSF, G-CSF et IL-6 reconnaissent leurs récepteurs, activent les protéines JAK puis STAT ce qui forme un dimère de STAT transloqué dans le noyau pour activer le facteur de transcription C/EBP β , réprimant ainsi le facteur C/EBP α . De cette façon la transcription du gène *Myc* a lieu, augmentant la prolifération de ces cellules. D'après Manz and Boettcher, 2014; Rosales,

II.1.3.2. Les facteurs déclenchant la granulopoïèse d'urgence

Les 3 principaux facteurs impliqués dans la granulopoïèse d'urgence sont le G-CSF, GM-CSF et IL-6. En effet, un modèle murin KO pour le G-CSF et GM-CSF présente une diminution de la granulopoïèse, laquelle peut être réduite plus drastiquement en absence de l'IL-6 (Walker et al., 2008). Les patients septiques présentent une production continue de cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17) par l'ensemble des cellules de l'immunité agissant sur les cellules endothéliales de la moelle osseuse ce qui augmente la production en G-CSF (Kovach and Standiford, 2012; Shen et al., 2017). Cette augmentation agit sur les progéniteurs CMP et GMP, augmentant leur différenciation en granulocytes (Manz and Boettcher, 2014). De plus, le GM-CSF, G-CSF et l'IL-3 provoquent l'expression du facteur de transcription C/EBP β dans le progéniteur GMP ce qui permet d'accélérer la granulopoïèse en réponse au pathogène (Borregaard, 2010; Manz and Boettcher, 2014). Lorsque le GM-CSF, G-CSF et l'IL-6 se fixent sur leurs récepteurs présents à la surface des progéniteurs granulocytaires, une cascade de signalisation s'active impliquant les protéines JAK-STAT. Dans des conditions de granulopoïèse normales, ces protéines activent le facteur de transcription C/EBP α permettant de réprimer l'expression du gène *MYC* et donc de limiter la prolifération des cellules myéloïdes. Cependant, dans des conditions d'infection systémique, la présence élevée de cytokines, déclenche une deuxième voie de signalisation réprimant l'expression de C/EBP α ce qui déclenche l'expression de C/EBP β , activant le gène *MYC* et une augmentation de la prolifération des cellules myéloïdes (Manz and Boettcher, 2014) (Figure 24). La libération des granulocytes hors de la moelle osseuse est rendue possible par la forte concentration en G-CSF qui inhibe la production de CXCL12 et augmente l'expression du récepteur CXCR2, ce qui permet leur libération dans la circulation sanguine (Kovach and Standiford, 2012; Shen et al., 2017).

II.2. Dysfonctionnement des neutrophiles

II.2.1. Une migration des neutrophiles vers le site infectieux altéré

Dans des conditions physiologiques, les neutrophiles migrent vers le site où se trouve le pathogène afin de le détruire. Lors d'un sepsis, les fonctions des cellules immunitaires peuvent être altérées et des défauts de recrutement des populations de granulocytes observés. Durant la réponse inflammatoire, des médiateurs inflammatoires (cytokines, chimiokines, PAMPs, DAMPs) vont provoquer une augmentation de l'expression des récepteurs P- et E-sélectine présents sur les cellules endothéliales vasculaires. Au contraire, les neutrophiles septiques vont eux internaliser leurs récepteurs CXCR2 nécessaires pour migrer dans les tissus après reconnaissance des sélectines (Kovach and Standiford, 2012; Shen et al., 2017; Sônego et al., 2016). Cette internalisation est due à l'activation répétitive ou prolongée de CXCR2. Celle-

ci permet le recrutement des protéines kinases GRK2 et GRK5 (GPCR kinase) à la membrane du neutrophile, phosphorylant le domaine intracellulaire de CXCR2 sur lequel la protéine arrestine se fixe. La petite protéine G se dissocie alors de CXCR2 et entraîne la désensibilisation et l'internalisation du récepteur (Alves-Filho et al., 2008; Shen et al., 2017; Sônego et al., 2016). Les TLR2, TLR4 et TLR9 participent aussi à l'internalisation de CXCR2 en augmentant l'expression des protéines GRK2 et GRK5 à la membrane du neutrophile responsable de la même cascade de signalisation que CXCR2 (Alves-Filho et al., 2010; Shen et al., 2017; Sônego et al., 2016). Les TLR4 et TLR2 sont également exposés de façon continue aux médiateurs inflammatoires. Ils vont provoquer dans un premier temps une suractivation du récepteur aux PAMPs, puis dans un deuxième temps des mécanismes de tolérance se mettent en place diminuant la production de cytokines pro-inflammatoires (Härter et al., 2003; Salomão et al., 2008).

L'augmentation de la stimulation des TLR est aussi responsable de plusieurs effets biologiques tels que l'activation de l'enzyme iNOS (oxyde nitrique synthase inductible) transformant l'acide aminé L-arginine en un autre acide aminé L-citrulline associé à la libération du NO par l'intermédiaire du NADPH (Spiller et al., 2019). L'enzyme iNOS peut également être activée en présence de différentes cytokines (IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-1 β et TNF- α), de chimiokines et de LPS responsable de la forte concentration de NO dans le sang des patients septiques (Alves-Filho et al., 2008). La stimulation importante des TLR provoque également une libération de TNF- α responsable d'une forte concentration dans le sang des patients septiques (Brown et al., 2006; Sônego et al., 2016). Lorsque le TNF- α se fixe sur son récepteur TNFR, celui-ci induit l'activation d'iNOS responsable de la production de NO. Après fixation du NO sur son récepteur GCs (Guanylate cyclase soluble), il y a transformation du GTP en GMPc (Guanosine monophosphate cyclique), responsable de la phosphorylation de PKG (Protéine kinase G) provoquant la surexpression de GRK2 (Shen et al., 2017; Sônego et al., 2016; Spiller et al., 2019) (Figure 25).

En absence de CXCR2 à la surface des neutrophiles, ils ne peuvent plus reconnaître les chimiokines présentes sur les cellules endothéliales vasculaires empêchant la transmigration vers le site d'infection (Alves-Filho et al., 2008). Néanmoins les neutrophiles ne restent pas bloqués dans la circulation sanguine puisqu'il a été mis en évidence que l'augmentation de l'activation des TLR induit l'expression du récepteur CCR2 à la surface des neutrophiles (Sônego et al., 2016) (Figure 25). Normalement réprimé dans des conditions physiologiques, CCR2 est responsable de l'infiltration et l'accumulation des neutrophiles dans les organes vitaux comme les poumons, le cœur et les reins, dans les maladies inflammatoires et dans le sepsis. Ainsi, il est courant de trouver des patients septiques avec des lésions pulmonaires causées par l'infiltration des neutrophiles libérant des particules bactéricides et des médiateurs

inflammatoires lésant les tissus pulmonaires responsables de la détresse respiratoire aiguë (Brown et al., 2006; Sônego et al., 2016). De plus, l'ensemble des neutrophiles ne se mobilisent pas dans les organes vitaux, certains restent dans les vaisseaux provoquant alors des thromboses et une destruction des tissus (Mishra et al., 2017).

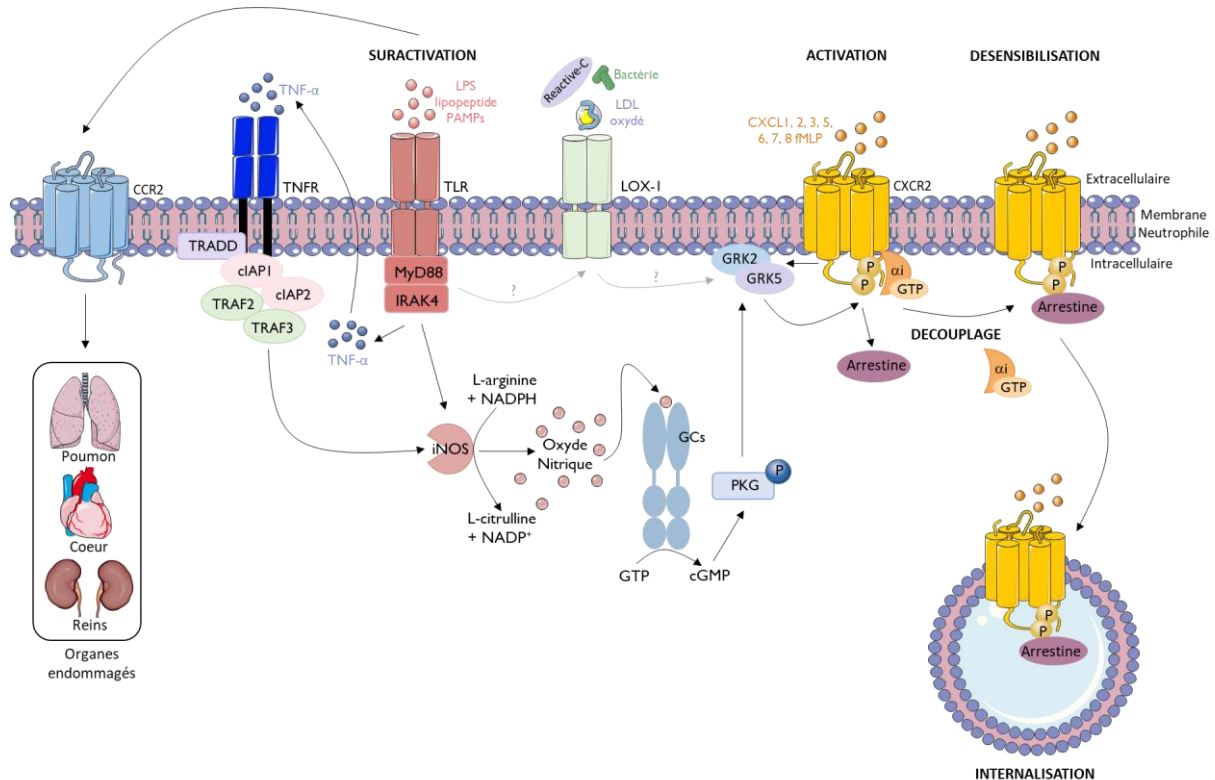


Figure 25 : Mécanisme d'internalisation du récepteur CXCR2 dans les neutrophiles septiques

L'activation prolongée de CXCR2 par ces ligands, recrute les protéines GPCR kinases GRK2 et GRK5 à la membrane du neutrophile, ainsi le domaine intracellulaire de CXCR2 est phosphorylé recrutant la protéine arrestine dissociant la protéine G de CXCR2 responsable de la désensibilisation et l'internalisation de celui-ci. Cette internalisation peut être provoquée via l'augmentation de l'activation des TLR où plusieurs voies sont activées : i) activation de l'enzyme iNOS hydrolysant l'acide aminé L-arginine en L-citrulline en présence de NADPH avec formation de l'oxyde nitrique (NO). Celui-ci se fixe sur son récepteur Guanylate cyclase soluble (GCs) transformant le GTP en GMPc (Guanosine monophosphate cyclique) puis phosphorylation de la protéine kinase G (PKG) surrégulant les protéines GRK2 et 5. ii) Production de TNF- α , se fixant sur son récepteur TNFR, activant l'enzyme iNOS. iii) Activation du récepteur CCR2 à la surface des neutrophiles septiques permettant de migrer dans les organes vitaux tels que les poumons, le cœur et les reins provoquant des lésions. iv) Il semblerait que la suractivation des TLR provoque l'activation d'un récepteur LOX-1 permettant de reconnaître des lipoprotéines oxydées et des produits inflammatoires (protéine C-réactive) responsable de l'internalisation de CXCR2. D'après Brown et al., 2006; Sônego et al., 2016 ; Kovach and Standiford, 2012; Wu et al., 2011.

Dans un modèle murin, un autre récepteur serait impliqué dans l'internalisation de CXCR2 et la migration des granulocytes après stimulation des TLR2 et TLR4, le récepteur LOX-1 (Récepteur-1 des lipoprotéines de basse densité oxydées de type lectine) (Kovach and Standiford, 2012; Wu et al., 2011). LOX-1 est un récepteur de type lectine-C permettant de reconnaître dans un premier temps le LDL (Lipoprotéine de faible densité) oxydé et dans un deuxième temps des produits inflammatoires tels que la protéine C-réactive (synthétisée par le foie et les tissus adipeux fixant les IgG et pouvant activer le complément), les cellules apoptotiques, les bactéries et les plaquettes activées. LOX-1 agirait comme médiateur dans

l'internalisation de CXCR2 (Kovach and Standiford, 2012; Shen et al., 2017; Wu et al., 2011). De plus, une forte expression du récepteur LOX-1 à la surface des neutrophiles murins est liée à une augmentation de la production de cytokines/chimiokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-1), une libération de production de ROS et une meilleure adhérence des granulocytes aux cellules endothéliales ce qui participe à une augmentation des dommages tissulaires (Al-Banna and Lehmann, 2013; Wu et al., 2011). Toutefois, bien que LOX-1 soit retrouvé aussi chez l'homme, son expression sur les neutrophiles humains et son mécanisme d'action précis reste encore à être étudiée.

D'autres molécules de surface impliquées dans la migration sont aussi dérégulées négativement comme CD62L (ou L-sélectine) (Demaret et al., 2015). Cette dernière permet normalement la migration des neutrophiles à travers la barrière endothéliale vasculaire en reconnaissant le récepteur P-sélectine présent à la surface de ces cellules (Borregaard, 2010; Brown et al., 2006; Caster et al., 2017). La diminution de CD62L est probablement corrélée à la forte expression d'ADAM17 qui va cliver CD62L, diminuant son expression à la surface des neutrophiles (Mishra et al., 2017). A l'inverse, l'intégrine CD11b, elle aussi impliquée dans la migration des neutrophiles vers le site d'infection, se retrouve augmentée. Néanmoins, malgré cette surexpression la migration des neutrophiles de patients septiques vers le site d'infection demeure peu efficace (Chishti et al., 2004; Demaret et al., 2015; Drifte et al., 2013; Mishra et al., 2017).

II.2.2. La phagocytose des neutrophiles septiques altérée

Pour neutraliser et détruire les pathogènes, les granulocytes vont principalement utiliser la phagocytose. Toutefois, les avis sont mitigés sur leur capacité à phagocyter. Ceci peut être expliqué par le fait que les auteurs n'utilisent pas les mêmes techniques d'études pour analyser la phagocytose. Certains auteurs ont montré une diminution de capacités des neutrophiles à phagocyter *E.coli* (gram-négatif) (Wenisch et al., 2001), tandis que d'autres ont montré qu'elle était inchangée en présence d'*E.coli* ou *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) (gram-positif) (Demaret et al., 2015 ; Drifte et al., 2013). Cependant, les auteurs n'utilisent pas le même nombre de bactéries par neutrophiles (10 :1 contre 3 :1), ainsi que le temps d'incubation entre les bactéries et les neutrophiles (30 min contre 10 min), rendant incomparables les résultats.

Les auteurs n'ont pas tous utilisé des bactéries, certains ont utilisé des particules de levure, le zymosan et ont trouvé 2 résultats opposés. En effet, certains ont montré que les neutrophiles avaient une diminution de capacités à phagocyter le zymosan (Kaufmann et al., 2006), tandis que d'autres ont montré pour être augmentées (Taneja et al., 2008) mais les techniques d'analyses sont également différentes. L'équipe de Kaufmann a analysé la capacité de

phagocytose par cytométrie en flux et représenté en pourcentage (Kaufmann et al., 2006). Tandis que l'équipe de Taneja, a compté le nombre de particules de zymosan par microscopie et exprimé par un index de phagocytose (nombre de zymosan par cellules sur le nombre total de cellules x 100) (Taneja et al., 2008).

Néanmoins, il a été mis en évidence que le récepteur CD16 principalement impliqué dans la phagocytose du pathogène et la production de ROS présente une diminution de son expression (Demaret et al., 2015; Drifte et al., 2013). Les neutrophiles septiques présentent une augmentation d'expression de la métalloprotéase ADAM17 causée par la persistance du pathogène. Cette persistance est responsable du clivage de CD16 diminuant sa présence à sa surface et par conséquent la phagocytose et la production de ROS (Mishra et al., 2017). Cependant, la grande concentration en G-CSF et IFN- γ produit par les cellules de l'immunité chez les patients septiques et encore plus chez les patients en chocs septiques, entraîne la surexpression du récepteur CD64, lui aussi impliqué dans la phagocytose et compense la perte du CD16 (Danikas et al., 2008; Dimoula et al., 2014; Qureshi et al., 2001).

Toutefois, la phagocytose n'est pas la seule fonction des neutrophiles septiques qui soit altérée, la nétose est également impactée.

II.2.3. La nétose des neutrophiles septiques altérée

Afin d'avoir une meilleure neutralisation et élimination du pathogène, les neutrophiles vont venir libérer leur chromatine en extracellulaire contenant les protéines antimicrobiennes, permettant de piéger et de détruire le pathogène dans son filet d'ADN, c'est la nétose (Zawrotniak et al., 2017). Cependant, chez les patients septiques l'augmentation de la nétose a pour conséquence la création d'importantes lésions tissulaires (Li and Tablin, 2018; Shen et al., 2017). De plus, les NET peuvent également piéger les globules rouges, plaquettes, fibrines et facteurs de coagulation formant un thrombus important et obstruant la circulation sanguine privant certains organes en oxygène (Denning et al., 2019; Li and Tablin, 2018; Rubio et al., 2019).

II.2.4. Production de ROS par les neutrophiles septiques

La production de ROS est tout aussi essentielle que la phagocytose et la formation de NET, puisque les ROS vont pouvoir détruire la membrane plasmique des pathogènes, oxyder les composants de leur ADN et donc d'induire sa mort. Peu d'études ont été réalisées pour analyser la production de ROS par les neutrophiles septiques. Néanmoins, il a été démontré dans un modèle murin que les neutrophiles d'animaux septiques produisaient moins de ROS que les neutrophiles d'animaux non septiques (Alves-Filho et al., 2010; Kovach and Standiford,

2012). Cette diminution de production de ROS est associée à une diminution de leur recrutement dans les tissus infectés entraînant une mauvaise clairance des bactéries (Hotchkiss et al., 2013). Chez l'Homme, concernant la production de ROS par les neutrophiles de patients septiques, les résultats diffèrent selon les études et les méthodes utilisées. En effet, certains auteurs montrent que la production de ROS par les neutrophiles septiques est diminuée en comparaison avec les neutrophiles de donneurs sains après stimulation avec *E.coli* (Demaret et al., 2015; Hampson et al., 2017). Au contraire, d'autres montrent que la production de ROS est inchangée quelle que soit la souche bactérienne utilisée (*E.coli* ou *S.aureus*), mais lorsque les neutrophiles sont stimulés avec le PMA (produit chimique induisant la production de ROS – Acétate de Méthoxypropanol), les neutrophiles septiques produisent moins de ROS que ceux des donneurs sains (Drifte et al., 2013). L'équipe de Kaufmann quant à elle, a mis en évidence que les neutrophiles septiques produisent moins de ROS que les neutrophiles de donneurs sains après phagocytose des particules de levures (zymosan). Mais ils sont capables de présenter une augmentation des ROS en présence de fMLP ou fMLP+TNF- α (Kaufmann et al., 2006). Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que la stimulation *ex vivo* et les méthodes d'analyses des ROS sont différentes entre chaque article rendant les résultats difficilement comparables entre eux.

Dans des conditions physiologiques, malgré la demi-vie courte des ROS, ils sont contrôlés par des antioxydants pour éviter leur persistance dans la cellule et induire des dommages cellulaires et tissulaires (Dharmaraja, 2017; Finkel and Holbrook, 2000). Chez les patients septiques, il a été observé une diminution d'expression de certains antioxydants comme la glutathion peroxydase et la vitamine A diminuant l'élimination des ROS. A l'inverse, une augmentation de peroxyde d'hydrogène est observée dans la cellule suite à l'augmentation de la SOD (Prauchner, 2017).

Après une réponse immunitaire, les cellules apoptotiques et sénescents doivent être éliminées. Or chez le patient septique, cette fonction est également altérée causant leur persistance dans l'organisme responsable de la lyse tissulaire.

II.2.5. Élimination des neutrophiles sénescents par apoptose

L'apoptose des neutrophiles permet lors d'une réponse immunitaire un retour à l'homéostasie en éliminant les neutrophiles inactifs, âgés ou ayant fait de la phagocytose (Geering et al., 2011; Simon, 2003). Chez les patients septiques l'apoptose des neutrophiles est dérégulée, entraînant leur accumulation dans la circulation sanguine et les tissus provoquant une augmentation des lésions tissulaires et des défaillances multi-organes (Härter et al., 2003).

Lors d'une réaction immunitaire, les neutrophiles ont une demi-vie augmentée retardant leur apoptose pour leur permettre d'éliminer correctement le pathogène (Ng et al., 2019). Certaines études ont ainsi mis en évidence que les neutrophiles de patients septiques ont une résistance à l'apoptose empêchant leur dégradation (Drifte et al., 2013). Cette résistance est due à l'implication de plusieurs facteurs et protéines tels que la protéine anti-apoptotique Mcl-1 retrouvée en grande concentration chez les patients septiques (Guo et al., 2006; Härter et al., 2003; Shen et al., 2017). Nous avons vu dans le chapitre 1, que la protéine Mcl-1 doit être liée à la protéine nucléaire MNDA pour être inactivée et déclencher l'apoptose or dans le cas du sepsis, MNDA a été retrouvée dans le nucléole des neutrophiles incapable de se lier à Mcl-1. Des études ayant utilisé des modèles de sepsis par injection de LPS, ont montré que la suractivation des TLR augmente la protéine Bcl-XL et favorise l'inhibition et la dégradation des caspases-8 et -3 via l'inhibiteur des caspases IAP (Mica et al., 2004; Milot et al., 2012; Shen et al., 2017) (Figure 26). L'inhibition des caspases provoque l'absence de clivage de la protéine MNDA responsable de l'accumulation de la protéine Mcl-1 et l'absence d'apoptose (Guo et al., 2006; Shen et al., 2017). De plus, le LPS est capable d'activer une voie de signalisation permettant la phosphorylation de la protéine anti-apoptotique Bad et donc son inactivation inhibant la libération du cytochrome C via PI3K/Akt (Shen et al., 2017) (Figure 26).

Un peptide inflammatoire produit à la suite de l'activation du complément, le facteur C5a est aussi impliqué dans le retard de l'apoptose (Perianayagam et al., 2004) et est retrouvé en grande concentration chez les patients septiques (Guo et al., 2006). Bien que l'expression de son récepteur C5aR soit fortement diminuée à la surface des neutrophiles de patients septiques, la liaison C5a à celui-ci provoque l'inhibition de l'apoptose via l'activation de PI3K et la phosphorylation d'ERK1/2 responsable de la phosphorylation d'Akt puis de Bad. Par conséquent, Bad ne peut plus lier Bcl-XL, ainsi la concentration de Bcl-XL est augmentée et celle de Bim diminuée inhibant la libération du cytochrome C de la mitochondrie (Guo et al., 2006; Perianayagam et al., 2004; Shen et al., 2017; Simon, 2003). L'activation de C5aR s'accompagne d'une production de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α , IL-1 β , IL-6 et IL-8 (Guo et al., 2006; Merle et al., 2015b). Pour finir, les facteurs de croissance GM-CSF et G-CSF présents en concentration élevée chez les patients septiques sont eux aussi capables d'activer la voie PI3K/Akt pour bloquer l'apoptose des neutrophiles et permettre leur survie et leur prolifération via la voie JAK-STAT (Simon, 2003) (Figure 26).

Néanmoins, les patients septiques ne présentent pas seulement des neutrophiles ayant des fonctions altérées. Nous avons vu précédemment que certains patients septiques présentaient des granulocytes immatures (GI) dans leur circulation sanguine.

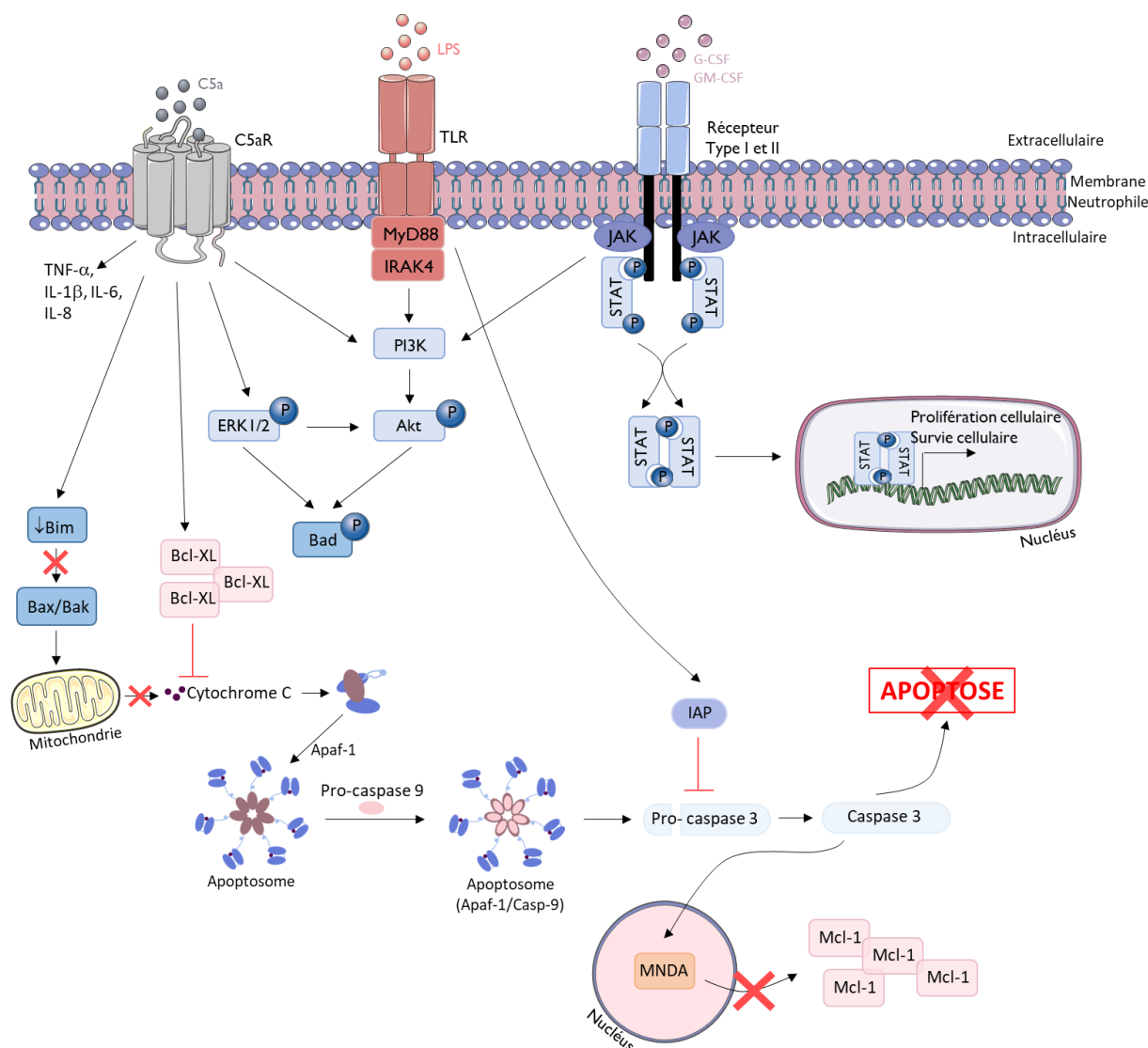


Figure 26 : Représentation schématique de la voie apoptotique du neutrophile septique

La résistance des neutrophiles de patients septiques à l'apoptose passe principalement par 3 récepteurs : i) Récepteur C5aR reconnaissant C5a étant en concentration élevée chez les patients septiques, responsable de l'activation de la voie PI3K et ERK1/2 phosphorylant Akt puis Bad. Ce dernier ne peut plus lier Bcl-XL, ainsi sa concentration est augmentée et celle de Bim diminuée inhibant la libération du cytochrome C hors de la mitochondrie. De plus, la liaison C5aR/C5a est responsable de la libération de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8). ii) Les récepteurs TLR sont suractivés suite à la fixation du LPS, activant les voies PI3K/Akt inhibant la protéine Bad par phosphorylation. L'activation des TLR, inactive la caspase-3 après activation de la protéine inhibitrice IAP qui dégrade les caspases-8 et 3. Ainsi, la protéine nucléaire MNDA ne peut plus être clivée, la bloquant dans le noyau et ne peut donc plus lier la protéine anti-apoptotique Mcl-1 dans le cytoplasme, responsable de son accumulation dans le neutrophile septique et inhibant leur apoptose. iii) Les récepteurs de type I et II fixant les facteurs G-CSF et GM-CSF étant en concentration élevée active les protéines JAK phosphorylant et dimérisant les protéines STAT pour être transloquées dans le noyau afin de transcrire les gènes responsables de la survie et la prolifération cellulaire. De plus, ce récepteur est capable d'inactiver l'apoptose en phosphorylant Bad via la voie PI3K. L'ensemble de ces voies ont pour but de retarder l'apoptose du neutrophile. D'après Guo et al., 2006 ; Perianayagam et al., 2004; Shen et al., 2017; Simon, 2003.

II.3. Les granulocytes immatures dans le sepsis

Comme nous l'avons vu au début du chapitre, au cours du sepsis une granulopoïèse d'urgence peut avoir lieu pour fournir en grand nombre de granulocytes pour la lutte contre l'infection

(Cecconi et al., 2018; Hotchkiss et al., 2016). Lors de cette granulopoïèse d'urgence de nombreux neutrophiles sont libérés associés à de nombreux GI. La présence de GI dans la circulation sanguine des patients peut être considérée comme un marqueur d'identification du sepsis. De plus, il a été démontré que les patients avec moins de 30 % de GI dans leur circulation sanguine ont une meilleure survie au bout de 28 jours d'hospitalisation (95 %), tandis que les patients ayant plus de 30 % de GI circulants ont plus de chances de décéder au cours des 28 jours d'hospitalisation (Daix et al., 2018b).

Ces GI présentent de nombreuses différences lorsqu'on les compare aux neutrophiles. Par exemple, leurs analyses cytologiques révèlent qu'ils correspondent au dernier stade d'immaturité (Band cells) ayant pour caractéristique un noyau unilobé, 3 types de granules contre 4 (primaires, secondaires et tertiaires) et sont identifiés comme étant CD16^{low} (Daix et al., 2018a; Drifte et al., 2013; Guérin et al., 2014) (Figure 27).

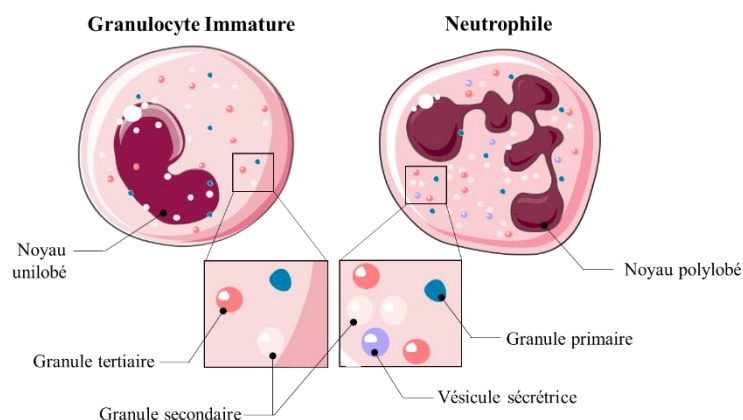


Figure 27 : Différence morphologique entre le GI et le neutrophile

Le GI présente un noyau unilobé et 3 types de granules bactéricides (primaires, secondaires et tertiaires), tandis que le neutrophile présente un noyau polylobé et en plus des 3 granules, une vésicule sécrétrice comportant certains récepteurs (CD14 et CD16). D'après (Cowland and Borregaard, 2016 ; Miralda et al., 2017 ; Rosales, 2020).

Les fonctions des GI dans le sepsis n'ont pas fait l'objet de nombreuses études alors que ce sont les cellules les plus nombreuses chez ces patients jouant un rôle primordial dans la clairance du pathogène. Les auteurs qui se sont intéressés aux GI dans le sepsis ont surtout regardé leur capacité à phagocyter avec des techniques d'études et d'analyses différentes. Néanmoins, il semblerait que les GI possèdent de faibles capacités à phagocyter *E.coli* (Drifte et al., 2013; Sun et al., 2022) ou des particules de levure (zymosan) (Taneja et al., 2008).

De plus, l'équipe de Drifte a mis en évidence que les GI de patients septiques ont un retard de leur apoptose et une diminution du chimiotactisme (Drifte et al., 2013), confirmé par les travaux de Sun (Sun et al., 2022). Cependant, une seule étude a mis en évidence la diminution de la production de ROS par les GI après stimulation avec *E.coli* pendant 10 min d'incubation en comparaison avec les neutrophiles de patients septiques et de donneurs sains. Mais lorsque

ces GI sont stimulés avec une autre bactérie telle que *S.aureus* pendant 10 min, la production de ROS par les GI est similaire à celles des neutrophiles septiques et de donneurs sains (Drifte et al., 2013). Ceci laisse penser que les bactéries gram-négatif (*E.coli*) et positif (*S.aureus*), ne doivent pas avoir les mêmes voies d'activation pour la production de ROS par les granulocytes, mais cette production de ROS par les GI reste à être confirmée.

Néanmoins, la technique de séparation des neutrophiles et GI principalement utilisée est basée sur leur densité, c'est ce que l'on appelle le Ficoll. Par cette technique, les neutrophiles se retrouveront en dessous de la solution de ficoll, nommée « *high density* » et au-dessus les GI, nommé « *low density* » (Rosales, 2018). Ainsi, dans certains articles les GI pourront être nommés LDG (Granulocytes de faible densité) ou LDN (Neutrophiles de faible densité) pouvant être confondu avec une autre population cellulaire, les MDSC (Cellules myéloïdes suppressives) également retrouvé chez les patients septiques et pouvant être apparentés aux GI (Gabrilovich, 2017; Hassani et al., 2020; Janols et al., 2014; Sagiv et al., 2015) (Figure 28).

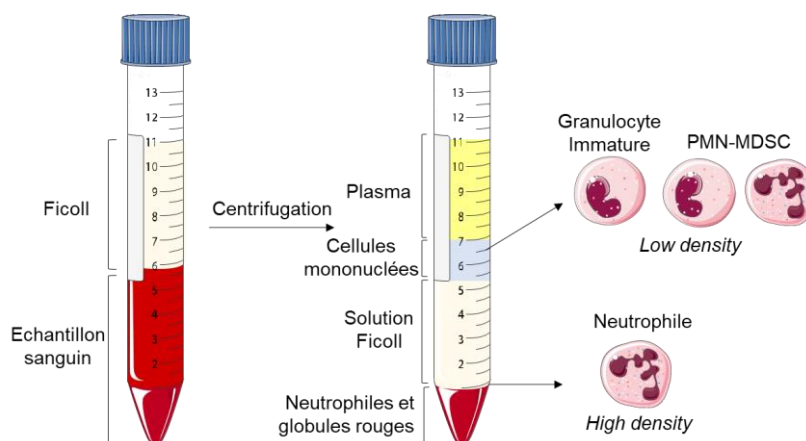


Figure 28 : Technique de séparation des granulocytes dans un échantillon sanguin

L'échantillon sanguin est mis en présence de la solution de Ficoll permettant de séparer les différentes populations cellulaires présentes dans le sang suivant leur densité. L'échantillon est centrifugé afin d'obtenir les différentes phases représentées sur le schéma de haut en bas : le plasma contenant toutes les protéines, les cellules mononucléées du sang dans lequel se trouvent les LT, LB, les granulocytes immatures (GI) et les MDSC étant des cellules pouvant s'apparenter aux GI, solution de Ficoll et enfin les neutrophiles avec les globules rouges. D'après Gabrilovich, 2017 ; Hassani et al., 2020 ; Janols et al., 2014 ; Sagiv et al., 2015.

II.4. Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC)

Depuis maintenant quelques années, alors que les granulocytes étaient considérés comme une population homogène de cellules, de nombreuses études ont démontré que cette population pouvait être hétérogène dans certaines situations comme les cancers et le sepsis (Griehaber-Bouyer and Nigrovic, 2019; Ng et al., 2019). En effet, des granulocytes avec un phénotype immature comme les GI se retrouvent dans la circulation sanguine mais sont capables de produire des cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 et d'inhiber la

prolifération des LT, ce sont les PMN-MDSC (Polymorphonucléaire-MDSC) (Hotchkiss et al., 2013; Venet et al., 2021).

Ces cellules ont été mises en évidence pour la première fois chez des patients atteints de cancer pour leurs fonctions suppressives de l'immunité adaptative, leur implication dans la progression tumorale et la formation de l'angiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux sanguins) créant des métastases (Gabrilovich, 2017). Puis, elles ont été découvertes dans d'autres types de maladies tels que les inflammations chroniques, maladies auto-immunes et le sepsis (Cassetta et al., 2019; Venet et al., 2021).

Les PMN-MDSC sont caractérisées comme des cellules myéloïdes immatures formant un groupe hétérogène ayant une morphologie et un phénotype proche des granulocytes (Bronte et al., 2016; Bruger et al., 2019; Cassetta et al., 2019; Gabrilovich, 2017). Chez un même individu, il peut être retrouvé à la fois, des PMN-MDSC présentant un noyau polylobé comme les neutrophiles ou un noyau unilobé comme les GI. Cependant, ces cellules ont été retrouvées pour exprimer faiblement CD16 et CD10 ce qui les différencie des neutrophiles « normaux ». Ainsi, elles sont identifiées pour être CD66b⁺ CD15⁺ CD14⁻ CD33^{low} HLA-DR⁻ (Cassetta et al., 2019; Coudereau et al., 2022; Gabrilovich, 2017). Il semblerait que ces PMN-MDSC expriment faiblement le marqueur myéloïde CD45 mais serait positif pour le récepteur LOX-1 (Coudereau et al., 2022).

L'origine des MDSC n'est pas totalement élucidée, ainsi quelques hypothèses ont été émises à partir des différentes populations de PMN-MDSC retrouvés chez les patients :

- Les PMN-MDSC pourraient être produites à la suite de la granulopoïèse d'urgence libérant des GI dans la circulation sanguine en réponse aux facteurs inflammatoires (GM-CSF, G-CSF, VEGF, SCF, les DAMPs et des chimiokines) pour ensuite migrer dans les tissus où elles vont acquérir des fonctions immunosuppressives suivant le microenvironnement (Bronte et al., 2016; Pillay et al., 2013; Roger, 2019; Tcyganov et al., 2018; Uhel et al., 2017).
- Les neutrophiles présents dans les tissus peuvent être reprogrammés en PMN-MDSC par la présence de facteurs inflammatoires (Pillay et al., 2013).

Cependant, il a été suggéré que les PMN-MDSC dans le sepsis étaient présents au moment du syndrome de la réponse anti-inflammatoire compensatoire (CARS), c'est-à-dire quand le mécanisme anti-inflammatoire se met en place, ceci reste à être prouvé (Venet et al., 2021).

Néanmoins, les PMN-MDSC possèdent des fonctions immunosuppressives vis-à-vis des cellules de l'immunité adaptative et en particulier pour les LT inhibant leur activation par plusieurs mécanismes :

- En consommant l'ensemble de la L-arginine présente dans l'environnement, étant un acide aminé essentiel pour l'expression de la chaîne ζ du CD3 constituant le TCR, induisant leur apoptose. (Darcy et al., 2014; Gabrilovich and Nagaraj, 2009; Scapini et al., 2016).

- Apoptose des LT après insertion de groupe nitro (NO_2) dans leur TCR produit à partir du NO hydrolysé par l'enzyme iNOS exprimée par les PMN-MDSC (Cassetta et al., 2019; Gabrilovich, 2017; Gabrilovich and Nagaraj, 2009; Janols et al., 2014; Pillay et al., 2013).

- Inhibition d'activation et apoptose des LT après fixation du récepteur PD-1 des LT avec le récepteur PDL-1 (Ligand de mort programmée 1) exprimé par les PMN-MDSC

- Arrêt du cycle cellulaire des LT après dégradation du tryptophane par l'enzyme IDO (indoleamine 2,3-dioxygénase) exprimé en concentration élevée par les PMN-MDSC (Cassetta et al., 2019; Gabrilovich, 2017; Gabrilovich and Nagaraj, 2009; Janols et al., 2014).

- Arrêt de la prolifération et apoptose des LT suite à une production de peroxyde d'hydrogène importante par les PMN-MDSC car elles présentent une augmentation de l'activité du complexe NADPH oxydase (Bronte et al., 2016; Pillay et al., 2013).

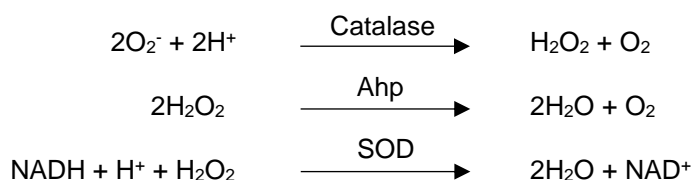
- Apoptose des LT via les cytokines IL-10 et TGF- β produit par les PMN-MDSC (Hotchkiss et al., 2016; Uhel et al., 2017).

Toutefois, comme nous l'avons vu précédemment, les infections les plus courantes responsables du sepsis sont causées par les bactéries gram-négatif telles qu'*Escherichia coli* (*E.coli*).

III. Impact de la réponse immunitaire sur la bactérie *Escherichia coli*

III.1. La bactérie *E.coli*

E.coli est l'une des bactéries les plus étudiées en laboratoire. Ainsi, l'ensemble de son génome et les conditions environnementales pour sa croissance sont très bien documentés. *E.coli* est une bactérie gram-négatif aéro-anaérobie facultative appartenant à la famille des *Enterobacterales*, en forme de bâtonnet, capable de se multiplier toutes les 20 min à des températures comprises entre 4 et 50°C, mais la température optimale est de 37°C (Jang et al., 2017). *E.coli* possède dans sa membrane plasmique une chaîne respiratoire qui permet de consommer l'oxygène via des réactions d'oxydoréduction. Cette chaîne est constituée de 3 domaines permettant le transfert d'électron et la production de ROS via l'oxygène extracellulaire. L'oxygène diffuse rapidement à travers les membranes bactériennes où il sera réduit en anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) par les donneurs d'électrons tels que les quinones (molécules organiques), atomes métalliques (fer, manganèse) ou des flavines (FAD). Ces ROS vont être ensuite dégradés par des enzymes en produit consommable (H_2O) par *E.coli* : SOD, catalase et l'enzyme Ahp (Alkyl hydroperoxyde réductase) (Imlay, 2013) :



E.coli est une bactérie commensale inoffensive colonisant 80 % de la flore intestinale de l'Homme. Cependant, certaines souches de *E.coli* peuvent être associées à des pathologies telles que les gastro-entérites, les infections urinaires, les méningites et le sepsis. L'infection par *E.coli* peut être causée suite à la pose de sonde urinaire, endotrachéale ou d'un cathéter pouvant être responsable du sepsis (Angus and van der Poll, 2013; who.int/fr/news-room/fact-sheets/details/e-coli).

Lors d'infections grave, les cliniciens administrent au patient des antibiotiques à large spectre agissant sur un grand nombre de bactéries tel que recommandé par Surviving Sepsis Campaign (Evans et al., 2021). Cependant, la prise d'antibiotiques à large spectre induit une pression de sélection des bactéries augmentant les risques de résistance aux antibiotiques, ce qui constitue un problème majeur de santé. En Europe, il a été reporté que 25% des souches de *E.coli* ont une résistance aux antibiotiques de type fluoroquinolone (inhibition de la réplication bactérienne) (European Centre for Disease Prevention and Control. and World Health Organization., 2022).

La résistance aux antibiotiques est la résultante de mutations génétiques ou d'acquisition de gènes par transfert horizontal via des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides (molécules d'ADN circulaire), les transposons (séquences d'ADN ayant la capacité de se déplacer de façon autonome dans le génome) ou des cassettes d'intégrons contenant des gènes de résistance aux antibiotiques (Hoeksema et al., 2018; Jang et al., 2017).

Lorsque l'ADN bactérien est lésé par les antibiotiques ou par les facteurs produits par les neutrophiles (cytokines, ROS), cela déclenche un système de réparation appelée la réponse SOS (Imlay, 2013; Van Acker and Coenye, 2017).

III.2. Système SOS

III.2.1. Impact des antibiotiques et des ROS sur *E.coli*

Durant la réponse immunitaire, les neutrophiles phagocytent *E.coli* et produisent de grandes quantités de ROS dans le but de ralentir la croissance bactérienne ou de détruire la bactérie par infiltration à travers ses membranes entraînant la destruction ou l'oxydation des protéines, des lipides comme les lipoprotéines responsables de la dégradation de l'ADN bactérien (Kaymak et al., 2011; Nguyen et al., 2017). Cependant, une partie des ROS produits par les neutrophiles va pouvoir agir sur des facteurs de transcription, entraînant la production des

enzymes détoxifiant les ROS. Ainsi, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) produit par les neutrophiles est capable de traverser les membranes bactériennes car c'est une petite molécule non chargée. Sa présence dans la bactérie va activer le facteur de transcription OxyR (Imlay, 2013; Winterbourn et al., 2016). Ce facteur est responsable de la transcription de la catalase et de l'enzyme Ahp afin de diminuer la concentration en peroxyde d'hydrogène.

A l'inverse, l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) extracellulaire est une molécule chargée et ne peut pas traverser les membranes bactériennes. Cependant, l'électron de l'anion superoxyde peut être récupéré par les quinones présentes à la membrane des bactéries et le transférer à l'oxygène intracellulaire pour former l'anion superoxyde. Cet anion pourra oxyder un autre facteur de transcription SoxRS. Ce facteur permet la transcription de plusieurs gènes dont les gènes de superoxyde dismutase (SOD) afin de réduire la présence de ROS. L'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène sont aussi capables d'oxyder les protéines Fer-Sulfure (Fe-S) responsable de la libération du Fe^{2+} dans la bactérie et de se complexer au peroxyde d'hydrogène pour former le radical hydroxyle ($\cdot OH$). Ce radical sera responsable de l'oxydation des bases et des riboses de l'ADN bactérien conduisant à une multitude de lésions (Imlay, 2013) (Figure 29).

La réponse SOS peut aussi être déclenchée par antibiotiques. Par exemple, les β -lactames inhibent la synthèse du peptidoglycane composant la paroi bactérienne, ce qui conduit à la mort de la bactérie. Une étude a mis en évidence que ces antibiotiques sont capables d'activer le cycle de Krebs chez *E.coli* par échange de protons, produisant l'anion superoxyde transformé en peroxyde d'hydrogène. Ce dernier sera transformé en radical hydroxyle par la présence d'un ion Fe^{2+} . Ce radical induira l'inactivation d'enzymes, la peroxydation des lipides, des mutations et/ou des modifications de l'ADN bactérien souvent irréversibles (Van Acker and Coenye, 2017) (Figure 29).

III.2.2. Mécanisme de la réponse SOS bactérienne

Si les dommages à son ADN sont trop importants, la bactérie peut choisir de se suicider, à l'inverse quand elle considère qu'ils sont peu importants, elle peut activer son système de réparation, la réponse SOS. Lorsque l'ADN bactérien est endommagé, un complexe présynaptique va venir reconnaître la lésion afin de mettre l'ADN sous forme simple brin (Baharoglu and Mazel, 2014). Ainsi, si l'ADN bactérien est endommagé sur un seul brin d'ADN, le complexe RecFOR sera engagé, à l'inverse, si les 2 brins d'ADN sont endommagés alors ça sera le complexe RecBCD. La protéine RecA est ensuite recrutée et se lie à l'ADN simple brin pour former un nucléofilament. Celui-ci va provoquer l'auto-protéolyse du répresseur LexA qui était fixé sur la séquence LexA box du promoteur de la réponse SOS induisant l'expression

de plus de 50 gènes de la réponse SOS chez *E.coli* impliqués dans la réparation de l'ADN (Maslowska et al., 2019).

Le système SOS présente 3 systèmes de réparation à l'ADN bactérien :

i) **Recombinaison homologue** faisant intervenir les protéines RecFOR (ADN lésé sur un seul brin) ou la protéine RecBCD (ADN lésé sur les 2 brins) impliquant la protéine RecA s'associant à l'ADN simple brin pour pouvoir réparer l'ADN suivant le chromosome homologue.

ii) **Excision des nucléotides** orchestrés par les protéines UvrAB, UvrC et UvrD permettant la reconnaissance, l'excision et la dégradation d'une partie du brin où se trouve la lésion puis synthèse du nouveau brin par l'ADN polymérase I.

iii) **Synthèse translésion** impliquant des polymérases dites de translésion permettant de remplacer les ADN polymérases qui sont bloquées sur l'ADN endommagé. La polymérase translésion permet d'incorporer des nucléotides dans l'ADN lésé et permet la réparation de l'ADN (Baharoglu and Mazel, 2014) (Figure 29).

En parallèle de la réparation de l'ADN bactérien, des éléments génétiques mobiles (plasmides et transposons) contenant des gènes de résistance aux antibiotiques peuvent être excisés, insérés ou réarrangés dans le génome bactérien, pouvant conduire à de la résistance aux antibiotiques (Jang et al., 2017).

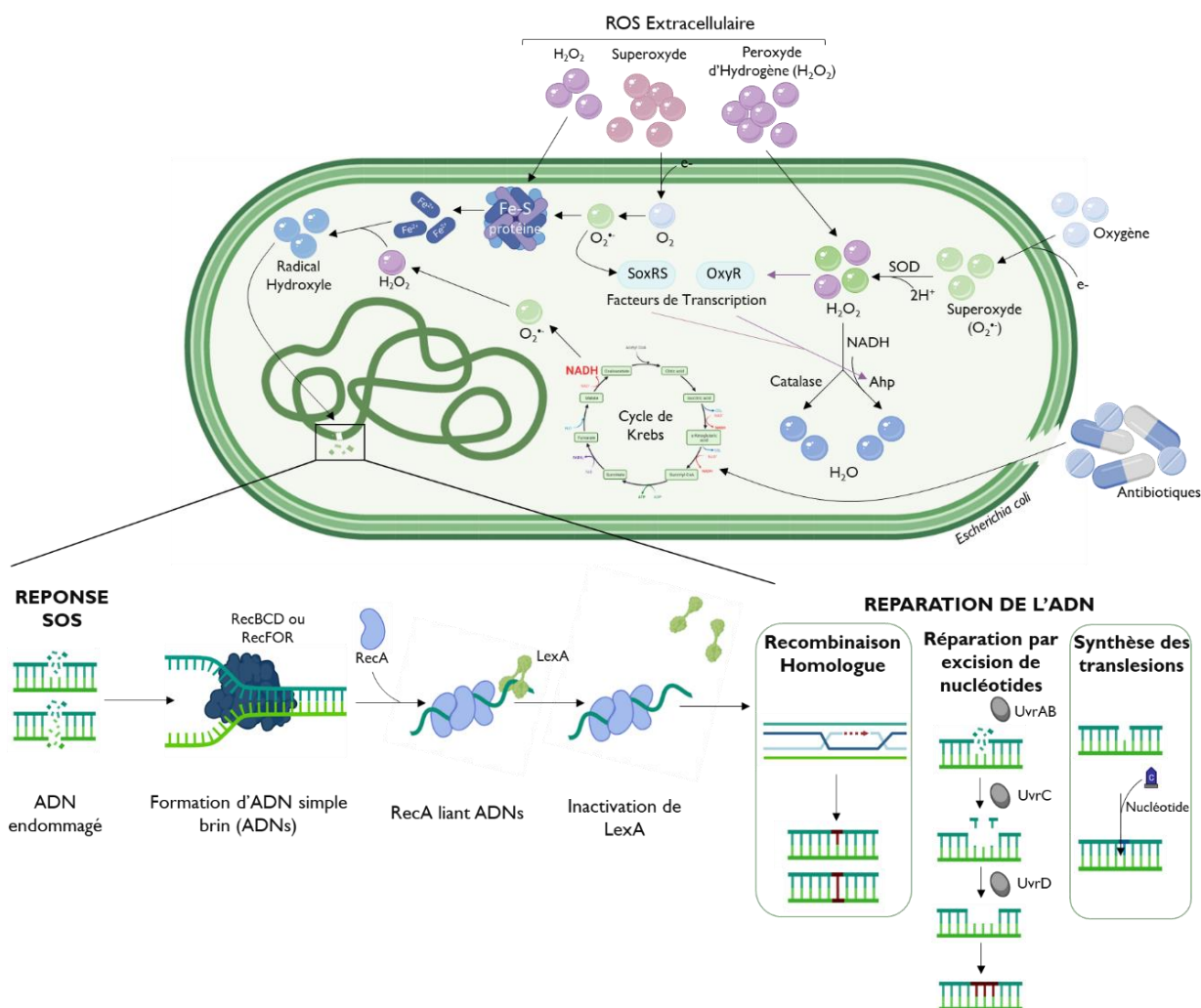


Figure 29 : Production de ROS et activation du système SOS chez *E.coli* après un stress oxydatif

E.coli possède une chaîne respiratoire afin de consommer l'oxygène. Ainsi, l'oxygène extracellulaire traverse les membranes bactériennes via sa chaîne respiratoire, le transformant en anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) puis en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) via la superoxyde dismutase (SOD). L' H_2O_2 est réduit en un produit consommable (H_2O) par *E.coli* soit par la catalase soit par l'enzyme Ahp (Alkyl hydroperoxyde réductase). Lors d'une réponse immunitaire l' H_2O_2 des neutrophiles traverse les membranes pour être réduit en H_2O et activer un facteur de transcription OxyR responsable de la transcription de la catalase et de l'enzyme Ahp. L'anion superoxyde produit par les neutrophiles, ne peut pas traverser les membranes bactériennes à cause de leur charge. Mais les quinones présentes dans la membrane bactérienne, peuvent transférer l'électron de l'anion superoxyde extracellulaire à l'oxygène intracellulaire pour former l'anion superoxyde. Ainsi, cet anion formé dans la bactérie activera le facteur de transcription SoxRS qui permettra la transcription de la catalase et de l'enzyme Ahp. $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 oxydent les protéines Fer-sulfure (Fe-S) libérant les ions fers se couplant avec l' H_2O_2 pour former le radical hydroxyle lysant l'ADN bactérien. Les antibiotiques détruisent les membranes pour activer le cycle de Krebs et former le radical hydroxyle.

Les lésions à l'ADN peuvent être réparées via l'activation de la réponse SOS : ouverture de l'ADN double brin par les enzymes RecBCD (lésion double brin) ou RecFOR (lésion simple brin) en ADN simple brin pris en charge par RecA formant un nucléofilament. La fixation de RecA induit l'autoprotéolyse de la protéine LexA, libérant le promoteur SOS, ce qui permet l'expression des gènes de la réponse SOS. Ainsi, 3 voies de réparation à l'ADN peuvent être activées : i) Recombinaison homologue : réparation de l'ADN suivant le chromosome homologue ; ii) Excision des nucléotides : les protéines UvrAB, C et D reconnaissent, clivent et dégradent la partie du brin lésé pour être synthétisé par des polymérases. iii) Synthèse translésion : ajout de nucléotide présent dans le cytoplasme afin de réparer l'ADN via des polymérases dites translésionnelles. D'après Baharoglu and Mazel, 2014 ; Jang et al., 2017.

Objectifs

Le sepsis est un problème de santé majeure concernant 48,9 millions de personnes (enfants et adultes) par an dans le monde (World Health Organization). Les patients atteints de sepsis présentent une dérégulation de leur réponse immunitaire causée par l'infection menaçant leur pronostic vital. Les infections les plus courantes responsables du sepsis sont causées par la persistance de bactéries gram-négatif dans l'organisme provoquant des défaillances multi-organes. Ainsi, afin de réduire rapidement la propagation de l'infection lors de l'arrivée du patient en réanimation, les cliniciens administrent des antibiotiques à large spectre avant de connaître la souche responsable de l'infection. Cette administration augmente les risques d'obtenir des bactéries résistantes aux antibiotiques, pouvant diminuer l'efficacité du traitement et augmenter le pronostic vital du patient.

L'utilisation des antibiotiques face à une infection bactérienne est nécessaire. Cependant, ces dernières années le nombre d'infections à bactéries gram-négatif résistantes a rapidement augmenté dans le monde causant un problème de santé publique (G20 research group). Toutefois les antibiotiques induisent un stress à la bactérie, lésant son ADN et se résultant par l'activation de son système de réparation, la réponse SOS, responsable de l'expression, du transfert ou de l'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques.

Durant un sepsis, le patient peut présenter dans les cas les plus graves en général une dérégulation des cellules de la réponse immunitaire. Le laboratoire dans lequel j'ai effectué ma thèse a mis en évidence une augmentation anormale du nombre de granulocytes immatures (GI) dans la circulation sanguine de ces patients. Lors de l'admission en réanimation, les patients qui présentent une augmentation supérieure à 30% de GI, leur chance de survie au bout de 28 jours d'hospitalisation est réduite (Daix et al., 2018b). Quelques études ont mis en évidence, que les GI de patients septiques possèdent des fonctions antimicrobiennes diminuées en comparaison avec des neutrophiles de donneurs sains tels que la phagocytose et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Drifte et al. 2013 ; Taneja et al. 2008). Or une forte production de ROS par les neutrophiles est nécessaire pour induire la mort des bactéries dans le phagosome en association avec les peptides microbiens contenus dans les granules.

Ainsi, nous avons émis l'hypothèse qu'une plus faible production de ROS par les GI pourrait quant à elle ne pas être suffisante pour induire la destruction des bactéries mais conduirait à mettre en place des mécanismes de réparation via la réponse SOS.

Afin de répondre à cette hypothèse, le premier objectif de ma thèse a été d'utiliser un modèle *in vitro* afin de mettre au point les techniques d'analyse des fonctions antimicrobiennes des GI et de valider notre hypothèse. Pour cela, la différenciation de la lignée promyélocytaire HL60 en GI et en neutrophiles a été déterminée afin d'obtenir un nombre conséquent de ces 2 populations cellulaires. A l'issue de cette différenciation, les HL60-GI et HL60-neutrophiles ont été incubées avec la souche bactérienne *Escherichia coli* (*E.coli* MG1656) à différents temps pour analyser la phagocytose, la production de ROS et l'induction de la réponse SOS bactérienne par diverses techniques. De plus, les voies de signalisation impliquées dans l'activation du complexe NADPH oxydase (p38MAPK et ERK1/2), responsable de la production de ROS dans le phagosome des GI et des neutrophiles, ainsi que l'expression des gènes (*NCF1*, *NCF2*, *NCF4*, *CYBA*, *CYBB*) et des protéines (p47^{phox} et gp91^{phox}) de ce même complexe, ont été analysées.

A l'issue de la mise au point des différentes techniques d'analyse, un modèle *ex vivo* a été mis en place, correspondant au deuxième objectif de ma thèse. Après tri des neutrophiles de donneurs sains et des GI de patients septiques, les mêmes analyses de la phagocytose, la production de ROS et la réponse SOS bactérienne ont été déterminés après stimulation avec *E.coli*. Ainsi que les gènes et les protéines du complexe NADPH oxydase associée aux protéines kinases (p38MAPK et ERK1/2) impliquées dans son activation.

Le troisième objectif a été de caractériser le phénotype des GI en présence et en absence de stimulation avec *E.coli* à différents temps d'incubation par analyse de différents marqueurs de surface impliqués dans l'identification des granulocytes (CD10, CD15), la phagocytose (CD16, CD64, CD32), la migration (CXCR2, CXCR4, CD11b) et d'autres fonctions (LOX-1, Fas-L).

Matériels et Méthodes

I. Différenciation de la lignée promyélocytaire HL60 en neutrophiles (HL60-neutrophile) et granulocytes immatures (HL60-GI)

I.1. La lignée promyélocytaire HL60

L'étude a été réalisée dans un premier temps sur la lignée promyélocytaire HL60 afin de mettre au point les techniques vérifiant notre hypothèse pour éviter d'utiliser des échantillons sanguins précieux. Les HL60 sont des cellules promyéloblastiques du sang périphérique issue d'une femme de 36 ans de type caucasien atteinte d'une leucémie promyéloblastique aiguë. Les HL60 possèdent une surexpression du proto-oncogène *c-myc* qui sera vite diminué au moment de l'induction de leur différenciation.

I.2. Culture cellulaire de la lignée promyélocytaire (HL60)

Les HL60 ont été mises en culture dans du RPMI 1640 (CM1RPM00-01, Eurobio) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF ; CVFSVF00-01, Eurobio) lequel a été inactivé à 56°C pendant 30 min, 1% d'acide aminé (11140-035, Gibco), de glutamine (25030-024, Gibco), de pyruvate (11360-039, Gibco), de vitamines (11120-037, Gibco) et de pénicilline/streptomycine (15070-63, Gibco) dans un incubateur humidifié à 5% de CO₂ à 37°C. La viabilité cellulaire a été vérifiée tous les 2 jours en comptant les cellules colorées avec du bleu trypan sur lame de Malassez, puis du RPMI 1640 supplémenté a été ajouté aux cellules afin d'avoir une concentration finale à 0,2.10⁶ cellules/mL pendant 6 semaines.

I.3. Différenciation des HL60 en granulocytes immatures et neutrophiles

La différenciation des HL60 a été réalisée après 7 jours de culture cellulaire afin d'avoir un nombre suffisant d'HL60 pour la réaliser. Ainsi, pour différencier les HL60 en granulocytes immatures (HL60-GI) et neutrophiles (HL60-neutrophile), les cellules ont été incubées avec 1µM d'acide rétinoïque (ATRA ; CE n°206-129-0, COOPER) pendant 2, 4, 6, 8, 10 et 12 jours réalisés en cinétique inverse dans un incubateur humidifié à 5% de CO₂ à 37°C. La viabilité cellulaire a été évaluée par le bleu trypan sur lame de Malassez tous les 3 à 4 jours et du RPMI 1640 supplémenté a été ajouté afin d'avoir une concentration finale à 0,2.10⁶ cellules/mL supplémenté avec 1µM d'ATRA.

La morphologie des HL60-GI et des HL60-neutrophiles a été évaluée après la réalisation d'une cytopspin avec 0,1.10⁶ cellules sur la cyto centrifuge EpreDia™ Cytospin 4 (Thermofisher) à une

vitesse de 300 rpm (rotor par minute) pendant 12 min. Les granulocytes ont été ensuite colorés avec le colorant May-Grünwald-Giemsa par le département d'hématologie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Limoges, puis les lames ont été scannées sur le NanoZoomer RS2 (Hamamatsu) et analysées par le logiciel NDP view. De plus, les marqueurs CD16 et CD11b ont été suivis par cytométrie en flux (Cytotflex, Beckman coulter) avec les anticorps anti-CD16-AlexaFluor647 (557710, BD Biosciences) et anti-CD11b-APCCy7 (557754, BD Biosciences).

I.4. Tri cellulaire des HL60-GI et HL60-GM

Dans cette partie, les HL60 ont été différenciées avec 1 μ M d'ATRA pendant 10 jours. La différenciation des HL60 en HL60-GI et HL60-neutrophiles étant un continuum, il est nécessaire de réaliser un tri sur l'expression des marqueurs CD16 et CD11b.

Le tri des HL60-GI et des HL60-neutrophiles a été réalisé avec 90.10⁶ HL60-différenciées et marquées avec 0,5 μ L d'anticorps anti-CD16-Vioblue® REAlease® (130-120-78, Miltenyi) et anti-CD11b-FITC REAlease® (130-125-254, Miltenyi) pour 1.10⁶ cellules dans 98 μ L de PBS (Phosphate buffered Saline ; CS1PBS01-01, Eurobio Scientific) pendant 10 min à 4°C. Après le marquage les HL60-différenciées ont été lavées par ajout de PBS, centrifugées à 300 x g pendant 5 min, le surnageant a été éliminé et les HL60-différenciées ont été mises à une concentration de 10.10⁶ cellules/mL dans du RPMI 1640 supplémenté. Le tri a été réalisé sur l'ARIA III (BD Biosciences), la pureté du tri a été vérifiée sur le même appareil (environ 98% de pureté) puis les anticorps ont été éliminés de la surface des HL60-GI et des HL60-neutrophiles à l'aide du kit REAlease® Support kit (130-120-675, Miltenyi) pendant 10 min (Figure 30). Les HL60-GI et les HL60-neutrophiles ont été centrifugés à 300 x g pendant 5 min, le surnageant éliminé et du RPMI 1640 sans antibiotiques mais supplémenté avec 10% de sérum de vœu fœtal inactivé, 1% d'acide aminé (11140-035, Gibco), de glutamine (25030-024, Gibco), de pyruvate (11360-039, Gibco) et de vitamines (11120-037, Gibco) a été ajouté au culot cellulaire à une concentration de 5.10⁶ cellules/mL.

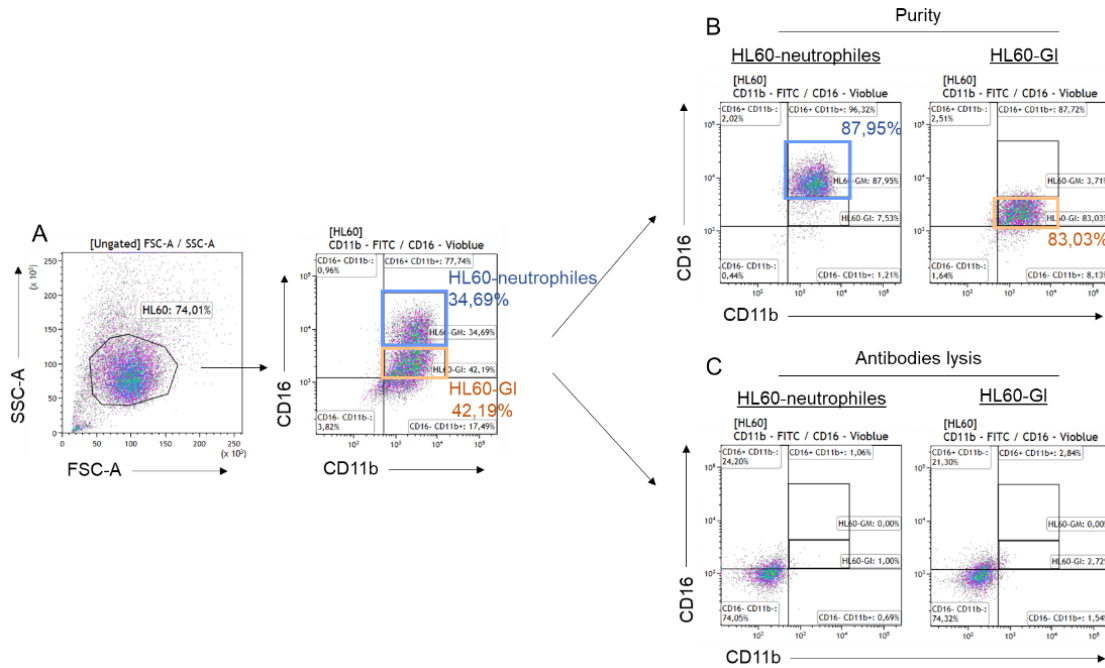


Figure 30 : Stratégie de fenêtrage pour le tri des HL60-GI et des HL60-neutrophiles

(A) Les HL60 ont été sélectionnées en fonction de leur taille (FSC-A) et de leur structure (SSC-A). Les fenêtres des HL60-neutrophiles ($CD16^{\text{high}} CD11b^+$) et HL60-GI ($CD16^{\text{low}} CD11b^+$) ont été réalisées par l'expression des récepteurs CD16 en fonction du CD11b. (B) La pureté a été vérifiée, (C) ainsi que la lyse des anticorps.

II. Echantillons de donneurs sains, de donneurs de cellules souches hématopoïétiques, de patient CGD (maladie granulomateuse chronique) et de patients septiques

II.1. Collecte des échantillons sanguins de donneurs sains, de donneurs de cellules souches hématopoïétiques, de patient CGD et de patients septiques

Les échantillons sanguins de l'ensemble des patients et des donneurs ont été collectés au CHU de Limoges suivant l'approbation du comité éthique (CPP numéro : 18.11.30.42116; Clinicaltrial.gov : NCT03846596). Les échantillons de donneurs de cellules souches hématopoïétiques proviennent de fonds de tubes collectés sur la plateforme de cytométrie en flux du CHU de Limoges. Ce sont des donneurs auxquels a été administrée des doses du facteur G-CSF permettant la libération dans la circulation sanguine de cellules souches $CD34^+$ dans le but de faire un don de moelle osseuse. Le sang de patients septiques a été collecté dans les 24h après admission du patient au service de réanimation du CHU de Limoges avec une majorité de GI dans leur sang (>80%).

II.2. Isolation des granulocytes de donneurs sains, de donneurs de cellules souches hématopoïétiques, de patient CGD et de patients septiques

Les granulocytes ont été obtenus par tri magnétique négatif avec le kit EasySep Direct Human Neutrophil Isolation (19666, STEMCELL). Un volume de sang compris entre 1 à 5 mL de chaque donneur ou de patient a été déposé dans un tube de 15 mL, sur lequel le cocktail d'anticorps monoclonal et de billes magnétiques (RapidSphere) fournis dans le kit ont été ajoutés et incubés 5 min à température ambiante. Du PBS a été ajouté à l'échantillon afin d'avoir un volume final de 12 mL puis le tube a été déposé dans l'aimant « The Big Easy » (18001, STEMCELL) pendant 10 min. Les granulocytes ont été obtenus par retournement du tube bloqué dans l'aimant et versés dans un nouveau tube de 15 mL. Ce nouveau tube a été placé dans l'aimant pour 10 min, en répétant 2 fois l'opération afin d'améliorer la pureté du tri. Un aliquot de 100 μ L des granulocytes triés a été prélevé afin de compter le nombre de granulocytes obtenus après tri par utilisation du Countess 3FL Automated cell Counter (Invitrogen). Puis les tubes contenant les granulocytes ont été centrifugés (5 min à 300 x g) et le culot cellulaire a été mis à une concentration de 5.10^6 cellules/mL avec du RPMI 1640 supplémenté mais sans antibiotiques. La pureté a été vérifiée en marquant 1.10^6 granulocytes triés, avec les anticorps cités dans le Tableau XI pendant 15 min, à l'obscurité à température ambiante. Un contrôle sur sang total a été utilisé pour pouvoir confirmer le tri, en marquant 1.10^6 granulocytes comme expliqué ci-dessus. Une étape supplémentaire de lyse des globules rouges a été réalisée par la solution de Lysis Buffer 1X (349202, BD Biosciences) pendant 15 min à l'obscurité à température ambiante. Les échantillons triés et sang total ont été lavés par ajout de PBS, centrifugés et re-suspendus dans 400 μ L de PBS. Puis l'acquisition des échantillons a été réalisée par cytométrie en flux (CytoFLEX LX, Beckman coulter) et analysée sur le logiciel Kaluza 2.1 (Beckman coulter) (Figure 31).

Tableau XI : Liste des anticorps utilisés pour réaliser le marquage et l'analyse par cytométrie en flux des granulocytes après tri

*anti-CD3, anti-CD14, anti-CD19, anti-CD20, anti-CD56

Anticorps	Fluorochrome	Clone	Référence, Fournisseur
Anti-CD45	AmCyan	2D1	339192, BD Biosciences
Anti-Lin*	FITC	NCAM16,2, M ϕ P9, SK7, SJ25C1, L27	643397, BD Biosciences
Anti-CD15	BV650	W6D3	323034, Biolegend
Anti-CD11b	APCCy7	ICRF44	557754, BD Biosciences
Anti-CD16	PECy7	3G8	302016, BD Biosciences
Fixable Vability Dye	Viakrome 808		C366228, Beckman coulter

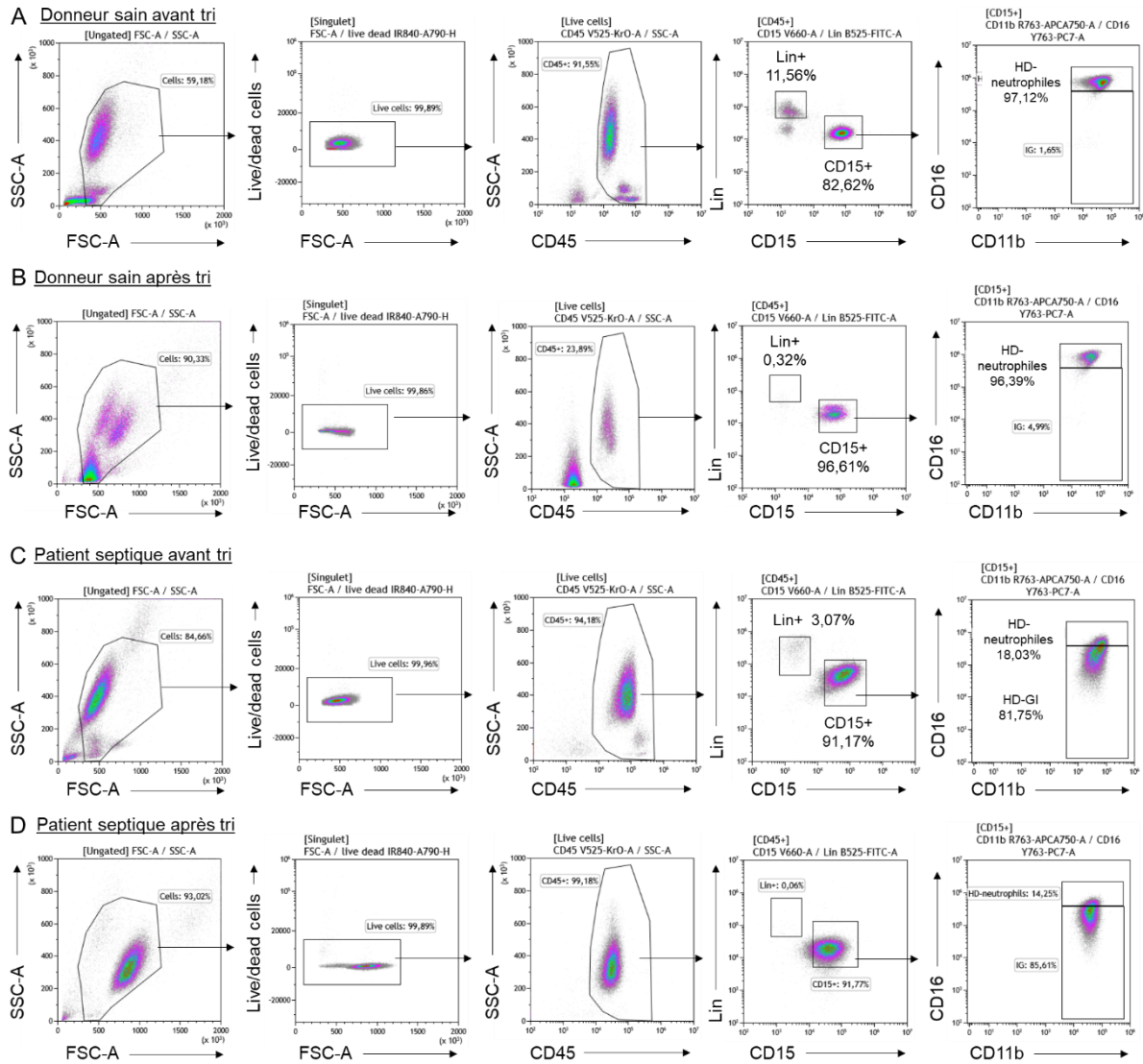


Figure 31: Vérification de la pureté des granulocytes de donneurs sains et de patients septiques après tri magnétique négatif par cytométrie en flux

(A, C) Le sang total de donneur sain et de patient septique a été marqué avec les anticorps anti-CD45 pour sélectionner les cellules myéloïdes, anti-Lin (CD3, CD14, CD19, CD20, CD56) pour éliminer les lymphocytes, les Natural killer et les macrophages, anti-CD15 pour sélectionner les granulocytes, anti-CD11b et anti-CD16 pour quantifier le nombre de granulocytes immatures et de neutrophiles. (B, D) Le même marquage a été réalisé après le tri des granulocytes et nous pouvons constater que nous avons éliminé les cellules positives pour le marqueur Lin et enrichi en cellules positives pour le CD15.

II.3. Analyse de la morphologie des granulocytes immatures de patients septiques

Après le tri cellulaire, un aliquot de granulocytes de patients septiques et de donneurs sains ($0,1 \cdot 10^6$ granulocytes dans $100 \mu\text{L}$) a été prélevé afin de réaliser une cytopspin sur la cyto centrifuge EpreDia™ Cytospin 4 (Thermofisher) à une vitesse de 300 rpm pendant 12 min. Après la cytopspin, les granulocytes ont été colorés avec le colorant May-Grünwald-Giemsa par

le département d'hématologie du CHU de Limoges et les lames ont été scannées sur le NanoZoomer RS2 (Hamamatsu) et analysés par le logiciel NDP view.

II.4. Immunophénotypage des granulocytes après stimulation avec *E.coli*

Les granulocytes triés de patients et de donneurs ont été mis en incubation avec la souche bactérienne *E.coli* (MG1656) à un ratio de 1 cellule pour 200 bactéries à différents temps (10, 30, 40, 60, 90 min). Puis les granulocytes ont été marqués avec les différents anticorps cités dans le Tableau XII pendant 15 min, à l'obscurité à 4°C en présence d'un marqueur de viabilité le Viakrome 808 Fixable Vability Dye (C366228, Beckman coulter) permettant d'éliminer les cellules mortes par coloration des membranes cellulaires. Ainsi les cellules vivantes n'auront que leur membrane plasmique de colorée, tandis que les cellules mortes auront à la fois leur membrane plasmique et nucléaire donnant une fluorescence plus intense. La stimulation des granulocytes a été stoppée par ajout d'une solution de formaldéhyde à une concentration finale de 2% (1.00496.5000, Merck), suivie de l'acquisition des échantillons réalisée par cytométrie en flux (CytoFLEX LX, Beckman coulter) et analysée sur le logiciel kaluza 2.1 (Beckman coulter). Le marquage a également été fait en absence de stimulation c'est-à-dire sans bactéries mais les cellules ont été incubées aux différents temps d'incubation.

Tableau XII : Liste des anticorps utilisés pour réaliser le marquage et l'analyse par cytométrie en flux des granulocytes de patients et de donneurs avant et après stimulation

*anti-CD3, anti-CD14, anti-CD19, anti-CD20, anti-CD56

Anticorps	Fluorochrome	Clone	Référence, Fournisseur
Anti-CD45	AmCyan	2D1	339192, BD Biosciences
Anti-Lin*	FITC	NCAM16,2, MφP9, SK7, SJ25C1, L27	643397, BD Biosciences
Anti-CD15	BV650	W6D3	323034, Biolegend
Anti-CD11b	APCCy7	ICRF44	557754, BD Biosciences
Anti-CD16	PECy7	3G8	302016, BD Biosciences
Anti-CD32	BUV661	FLI8.26	741611, BD Biosciences
Anti-CD64	BV605	10.1	305034, Biolegend
Anti-CD10	APC-R700	HI10a	563509, BD Biosciences
Anti-CD33	BV785	WM53	303428, Biolegend
Anti-PDL-1	PE-CF594	MIH1	563742, BD Biosciences
Anti-CXCR4	APC	12G5	306510, Biolegend
Anti-CXCR2 (CD182)	PECy5	6C6	551125, BD Biosciences
Anti-Fas-L (CD95L)	PE	NOK-1	564261, BD Biosciences

III. Analyses fonctionnelles des granulocytes en présence de la souche *E.coli*

III.1. Modèle d'incubation entre les granulocytes et *E.coli*

La souche bactérienne *E.coli* (*E.coli* MG1656 - λ att-Cherry Δ FRT/ pSU38-PsfiA-gfp ; mCherry-*E.coli*) a été génétiquement modifié par le laboratoire pour exprimer de façon constitutive le gène *mCherry* présent dans son chromosome ce qui permet de suivre la bactérie par cytométrie en flux et microscopie confocale. De plus, mCherry-*E.coli* porte un plasmide rapporteur de la GFP sous le contrôle du promoteur *sfiA* étant un des gènes régulant la réponse SOS et ce qui permet de suivre son induction.

Dans différents tubes à hémolyse, les granulocytes triés des HL60-différenciées, des donneurs et des patients, ont été incubés avec mCherry-*E.coli* dans du RPMI 1640 supplémenté mais sans antibiotiques à un ratio de 1 granulocyte pour 200 mCherry-*E.coli* pendant 10, 30, 40, 60 et 90 min à 37°C dans un bain marie.

III.2. Evaluation de la phagocytose des granulocytes

Après l'incubation des granulocytes (HL60-différenciées, donneurs et patients) avec mCherry-*E.coli*, les cellules ont été colorées avec un marqueur de viabilité, le DAPI (564907, BD Biosciences) pendant 5 min à 4°C, puis les échantillons ont été fixés avec une solution de formaldéhyde à une concentration finale de 2%. Seules les cellules mortes ont été marquées par le DAPI car il permet de colorer l'ADN accessible lorsque la cellule est morte. La phagocytose a été mesurée par l'expression du gène *mCherry* exprimé par les bactéries mCherry-*E.coli* par cytométrie en flux et analysée sur le logiciel Kaluza 2.1.

III.3. Evaluation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)

La production de ROS par les granulocytes (HL60-différenciées, donneurs et patients) incubés avec mCherry-*E.coli* pendant 10, 30 et 60 min a été détectée à l'aide du kit Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay (Deep Red ; ab186029, Abcam) pendant 30 min à 37°C dans le bain marie. De cette façon, 30 min ont dû être rajoutés pour le temps de contact estimé entre les granulocytes et les bactéries afin d'avoir une idée plus juste de la production de ROS par les granulocytes en présence des bactéries (Tableau XIII). La présence des ROS intracellulaires (superoxyde et le radical hydroxyle) a été détectée par oxydation de la sonde dès leur présence dans le granulocyte. De plus, la viabilité cellulaire a été évaluée par ajout du marqueur de viabilité, le DAPI pendant 5 min à 4°C. Les échantillons ont été fixés par la solution de formaldéhyde à une concentration finale de 2%, acquis par cytométrie en flux et analysés par le logiciel Kaluza 2.1. Un contrôle sans stimulation c'est-à-dire sans bactéries et un contrôle positif de la production de ROS par les granulocytes en absence de bactéries mais

en présence du Phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA ; P8139, Sima-Aldrich) à une concentration de 50 ng/mL a été réalisé aux différents temps d'incubation (10, 30, 40, 60, 90 min).

Tableau XIII : Indication des temps finaux d'incubation en présence du kit de détection des ROS

Temps initial d'incubation entre les granulocytes et les bactéries	Temps final
0min	30min
10min	40min
30min	60min
60min	90min

III.4. Evaluation de la réponse SOS bactérienne

L'induction de la réponse SOS bactérienne a été suivie par l'expression du gène rapporteur GFP présent dans un plasmide sous le contrôle du promoteur *sfiA* (gène de régulation de la réponse SOS) porté par la bactérie mChery-*E.coli* après incubation avec les granulocytes (HL60-différenciées, donneurs et patients) à différents temps. Comme expliqué précédemment, les granulocytes ont été marqués avec le DAPI, puis fixés avec la solution de formaldéhyde à une concentration finale de 2%. L'acquisition des échantillons a été faite par cytométrie en flux et analysé par le logiciel kaluza 2.1. Toutefois, afin de placer les fenêtres d'analyses, 2 contrôles bactériens d'*E.coli* exprimant le gène *mCherry* ont été utilisées. Une mChery-*E.coli* portant un plasmide dans lequel le gène de la GFP n'est sous le contrôle d'aucun promoteur, c'est le contrôle négatif. Une mChery-*E.coli* portant un plasmide dans lequel le gène de la GFP est sous le contrôle d'un promoteur *sfiA* muté permettant l'expression constitutive de la GFP.

III.5. Analyse par microscopie confocale

La microscopie confocale permet de visualiser à la fois, la phagocytose, la production de ROS et l'induction de la réponse SOS. Ainsi, après l'incubation des granulocytes (HL60-différenciées, donneurs et patients) avec les bactéries mChery-*E.coli* pendant, 10, 30 et 60 min à 37°C, les échantillons ont été incubés avec la sonde Deep Red pendant 30 min à 37°C dans le bain marie. Après une centrifugation (5min à 300 x g), le surnageant a été éliminé et les granulocytes ont été perméabilisés avec la solution de formaldéhyde à 4% pendant 10 min à 4°C. Après incubation, les échantillons ont été mis en présence avec le réactif CytoPainter Phalloidin-iFluor 405 Reagent (ab176752, abcam) pour 30 min à l'obscurité à 4°C, afin de colorer les filaments d'actines des granulocytes. Enfin, les échantillons ont été lavés par ajout de PBS, centrifugés, et le culot cellulaire a été repris avec 25 µL de PBS. Avant le passage au microscope, un cercle avec un stylo hydrophobe (Pink PAP Pen, ZUC064, Zytomed) a été

dessiné sur une lame de microscopie, 15 μL de l'échantillon ont été déposés dans le cercle et une lamelle a été déposée sur l'échantillon, puis fixée avec du vernis à ongles. Les images ont été capturées par le microscope confocal LSM880 (Zeiss) et analysées sur le logiciel IMARIS. Comme expliqué dans le point III.3, les temps d'incubation finaux sont 30, 40, 60 et 90 min.

III.6. Extraction de l'ARN des granulocytes triés et incubés avec *E.coli*

Après l'incubation de 1.10^6 granulocytes (HL60-différenciées, donneurs et patients) avec 2.10^8 bactéries mChery-*E.coli* pendant 10, 30, 40, 60 et 90 min à 37°C dans le bain marie, les tubes ont été centrifugés (5min à 300 x g), le surnageant éliminé et 350 μL de Buffer RLT Lysis buffer (74106, Qiagen) a été ajouté au culot cellulaire puis congelé à -80°C. Afin d'extraire l'ARN total des granulocytes, le kit RNeasy Mini kit (74106, Qiagen) a été utilisé suivant le protocole du fournisseur. En bref, les échantillons contenant le mélange de granulocytes et de bactéries présent dans le Buffer RLT, ont été décongelés, 350 μL d'éthanol à 70% a été ajouté, homogénéisé, 700 μL ont été placé sur une RNeasy spin colonne et centrifugé pendant 15 secondes à 8000 x g. La colonne contenant l'ARN a été lavée et centrifugé pendant 15 secondes à 8000 x g, avec la solution de Buffer RW1 (2 fois), puis 2 min à 8000 x g avec la solution de Buffer RPE. La colonne a été centrifugée sans solution pendant 1 min à 8000 x g afin d'éliminer au maximum les solutions précédentes pour obtenir de l'ARN pure. Enfin, 50 μL d'eau RNase-free a été ajouté dans la colonne contenue dans un tube de 1,5 mL dans lequel se trouvera l'ARN après centrifugation pendant 1 min à 8000 x g. L'ARN a été dosé à l'aide du Nanodrop™ (ThermoScientific) et conservé à -20°C.

III.7. Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

A l'issue de l'obtention de l'ARN des granulocytes incubés avec *E.coli*, celui-ci a été transcrit en ADN complémentaire par utilisation du kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (4368814, Thermofisher). A partir de l'ADNc, les gènes du complexe NADPH oxydase (*NCF1*, *NCF2*, *NCF4*, *CYBA*, *CYBB*) ont été détectés avec les différentes amorces CYBB TaqMan™ Hs00166163_m1 (4331182, Thermofisher), *CYBA* TaqMan™ Hs00609145_m1 (4331182, Thermofisher), *NCF1* TaqMan™ Hs00165362_m1 (4331182, Thermofisher), *NCF2* TaqMan™ Hs01084940_m1 (4331182, Thermofisher) and *NCF4* TaqMan™ Hs00241129_m1 (4331182, Thermofisher) par une PCR quantitative en utilisant le kit SensiFAST™ Probe Hi-ROX kit (BIO-82005, Biorline). Le gène GAPDH TaqMan™ Hs028991_g1 (4331182, Thermofisher) a été utilisé comme gène de ménage et l'ensemble des gènes ont été enregistrés dans

QuantStudio®3 Real-Time PCR Instrument (Applied biosystems by Thermofisher) et analysés sur Excel.

III.8. Western blot

Après l'incubation de 1.10^6 granulocytes (HL60-différenciées, donneurs et patients) avec 2.10^8 bactéries mChery-*E.coli* pendant 10, 30 et 60 min à 37°C dans le bain marie, les tubes ont été centrifugés (5min à 300 x g), le surnageant éliminé et le culot cellulaire a été congelé à -80°C. Pour la réalisation du Western blot, les échantillons ont été décongelés et lysés avec la solution de RIPA lysis buffer (sc-24948, Santa Cruz) supplémentée avec des inhibiteurs de protéases (sc-24948, Santa Cruz), de phosphatase (Na-Orthovanadate 100nM, sc-24948, Santa Cruz) et de sérines protéases (Phénylméthylsulfonyl Fluoride (PMSF), 200 mM, sc-24948, Santa Cruz) pendant 30 min dans la glace. Les tubes ont été centrifugés pendant 20 min à 18000 x g à 4°C, le surnageant contenant les protéines a été récupéré puis dosé par le réactif de Bradford en comparaison à une gamme étalon de sérum bovin albumine (BSA, 2mg/mL ; L008467A, BIO-RAD). Après le dosage, 30 µg de protéines/µL ont été prélevées, déposées dans une solution de 4X Laemmli sample buffer (1610747, BIO-RAD) supplémenté avec 10% de β-mercaptoéthanol (161-07-10, BIO-RAD) et chauffées 5 min à 95°C dans un bloc chauffant, puis les protéines ont été séparées par SDS-PAGE et transférées sur une membrane de transfert PVDF (PolyVinylidene Fluoride, BSP0161, Life Sciences). La membrane a été saturée avec une solution de BSA 5% (04-00-812C, Euromedex) dans du Trisma Base 10X (TBS ; T-6066, Sigma) supplémentée avec 0,1% d'une solution de Tween20 (P7949-500ML, Sigma) pendant 1h à température ambiante sous agitation. Puis, la membrane a été incubée avec les différents anticorps primaires : anti-gp91phox (bs-3889R, Thermofisher), anti-p47phox (4312, Cellsignaling) à une dilution de 1:1000 ; anti-Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (4370, Cellsignaling), p44/42 MAPK (Erk1/2) (4695, CellSignaling), anti-Phospho-p38MAPK (Thr180/Tyr182) (4511, Cellsignaling) et p38MAPK (8690, Cellsignaling) à une dilution de 1:2000 dans une solution de BSA-TBS-Tween20 sur la nuit à 4°C sous agitation. Les anticorps primaires ont été révélés à l'aide d'un anticorps secondaire anti-rabbit conjugué à la peroxydase de raifort (HRP ; 170-6515, BIO-RAD) à une dilution de 1:5000 dans du lait 5% (VM1001463, Millipore) supplémentée avec du TBS-Tween20 pendant 1h à température ambiante. L'anticorps β-actin polymerase (PA-59497, Invitrogen) à été utilisé comme protéine de ménage à une dilution de 1:2000 dans du lait-TBS-Tween20 pendant 1h à température ambiante et détecté avec l'anticorps secondaire anti-rabbit conjugué à l'HRP pendant 1h à température ambiante. Les membranes ont été recouvertes de la solution chimioluminescence HRP substrat (WBKLS500, Millipore) pour révéler les protéines par le

ChemiDoc™ touch Imaging System (BIO-RAD) et la quantification densitométrique a été réalisée sur le logiciel Image-lab v6.0 (BIO-RAD).

III.9. Pré-stimulation des granulocytes de donneurs sains et de donneurs de cellules souches hématopoïétiques

Après tri des granulocytes de donneurs sains et de donneurs de cellules souches hématopoïétiques, 1.10^6 granulocytes ont été mis en contact avec 100 μ L de plasma provenant de patients septiques pendant 10 min à 37°C dans le bain marie. Après l'incubation, les granulocytes ont été lavés par ajout de PBS, centrifugé (5min à 300 x g) et le culot cellulaire a été re-suspendu avec du RPMI 1640 sans antibiotiques supplémenté (SVF, acides aminés, glutamine, pyruvate, vitamines) à une concentration de 5.10^6 granulocytes/mL.

III.10. Analyse de la production de ROS extracellulaire par la lignée cellulaire HL60 par chimioluminescence

Après différenciation et tri de la lignée cellulaire HL60, les cellules ont été incubées avec la souche bactérienne *E.coli* (MG1656) à un ratio de 1 cellule pour 200 bactéries dans un volume final de 100 μ L de RPMI médium 1640 sans rouge de phénol (11835-063, Gibco) supplémenté avec 10% de SVF, 1% d'acides aminés, de pyruvate, de vitamines et de glutamine dans une microplaque blanche de 96 puits (655075, Greiner bio-one). Le luminol (I4506, Sigma-Aldrich) permettant de détecter les ROS totaux (intracellulaires et extracellulaires) a été ajouté au mélange bactéries-granulocytes à une concentration de 75 μ mol/L. Dans un autre puit l'isoluminol (4-Aminophtalhydrazide ; A8264-1G, Sigma-Aldrich) permettant de détecter les ROS extracellulaires a été ajouté au mélange à une concentration de 75 μ mol/L. La production de ROS a été mesurée en cinétique toutes les minutes à une vitesse de 0,1 seconde pendant 60 min sur Enspire Multimode Read spectrophotomer (PerkinElmer) et analysé sur Excel. En contrôle positif d'induction de la production de ROS, les granulocytes ont été mis en contact avec le PMA utilisé à une concentration de 50 ng/mL. De plus, 2 autres contrôles ont été réalisés : granulocytes et bactéries seuls en présence du luminol ou de l'isoluminol.

III.11. Analyse par l'imageur en flux (AMNIS) sur les HL60-différenciées

L'imageur en flux permet de coupler la microscopie et la cytométrie en flux permettant de visualiser en images et de quantifier la phagocytose, la production de ROS et l'induction de la réponse SOS bactérienne. Après le tri des HL60-GI et des HL60-neutrophiles, les granulocytes ont été incubées avec mChery-*E.coli* et avec la sonde Deep Red à différents temps comme

expliqué dans les parties III.1 et III.3. Les échantillons (granulocytes + bactéries) ont été incubés avec 20 μ L d'anticorps anti-CD11b-PE (IM2581U, Beckman coulter) pour 1.10⁶ cellules, pendant 10 min à l'obscurité dans le noir. Les échantillons ont été lavés par ajout de PBS, centrifugés (5 min à 300 x g) et fixés avec la solution de formaldéhyde à une concentration finale de 2%. L'acquisition des échantillons a été réalisée sur l'Amnis ImageStream^x (Luminex) et analysés par le logiciel IDEAS 6.4.

III.12. Analyses statistiques

Les résultats expérimentaux sont exprimés en moyenne \pm SEM (pour « Standard error of the mean »). Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel Graphpad prism version 8.4.3. par utilisation du test ANOVA ou Mann-Whitney avec une valeur seuil inférieure à 5% ($p < 0,05$).

Résultats

Nous avons vu précédemment que la persistance du pathogène dans l'organisme des patients septiques est associée à une augmentation du nombre de GI dans leur circulation sanguine, sans une meilleure clairance du pathogène. Nous avons donc émis l'hypothèse que la faible production de ROS produit par les GI serait capable d'induire le système de réparation bactérien, le système SOS.

La partie des résultats est consacrée à la vérification de notre hypothèse et se divise en 3 grands chapitres :

Le Chapitre 1 permet de répondre à notre premier objectif en utilisant la lignée promyélocytaire HL60 différenciée en GI (HL60-GI) et en neutrophiles (HL60-neutrophiles) après ajout de l'acide rétinoïque (ATRA) pendant 10 jours. Ce modèle *in vitro* a permis de mettre au point les techniques de manipulation afin d'évaluer les fonctions antimicrobiennes des GI.

Le Chapitre 2 permet de répondre à la fois au deuxième et au troisième objectif par l'utilisation de GI de donneurs de moelle osseuse et de patients septiques en comparaison avec les neutrophiles de donneurs sains. Ce modèle *ex vivo* a permis de visualiser la phagocytose et la production de ROS des GI, ainsi que de répondre à notre hypothèse.

Enfin, le Chapitre 3 présente le manuscrit de l'article que nous souhaitons soumettre dans le journal Science. Il permet de mettre en lien la production de ROS par les GI de patients septiques avec la réponse SOS bactérienne et la résistance aux antibiotiques, par comparaison avec les neutrophiles de donneurs sains.

Chapitre 1 Mise au point des expériences sur un modèle *in vitro* afin de caractériser les fonctions des granulocytes immatures dans un modèle d'infection

I. Détermination du temps de différenciation de la lignée promyélocytaire HL60 en granulocytes immatures (HL60-GI) et neutrophiles (HL60-neutrophiles)

Afin de mettre au point les techniques pour évaluer les fonctions des granulocytes immatures (GI) dans un contexte infectieux, la lignée cellulaire HL60 a été différenciée en granulocytes (HL60-granulocytes). Pour obtenir les différents stades de maturation des granulocytes et avoir un nombre conséquent de neutrophiles, les HL60 ont été incubées 12 jours en présence de l'acide rétinoïque (ATRA). Leur morphologie et l'expression des récepteurs ont été suivies par coloration May-Grünwald-Giemsa et cytométrie en flux, respectivement.

I.1. Suivi de la différenciation des HL60 en granulocytes par coloration May-Grünwald-Giemsa

Les différents états de maturations des granulocytes (promyélocytes, myélocytes/métamyélocytes, band cells et neutrophiles) sont obtenus à partir de la lignée cellulaire HL60 en présence d'ATRA. Afin de déterminer la meilleure durée de différenciation et avoir un nombre suffisant de neutrophiles, les HL60 ont été incubées jusqu'à 12 jours en présence d'1 μM d'ATRA. La différenciation a été suivie tous les 2 jours sur 12 jours en cinétique inverse par analyse de la morphologie des HL60-granulocytes après une cytopspin puis une coloration au May-Grünwald-Giemsa. Cette coloration permet de colorer les granules, le cytoplasme et le noyau avec différentes intensités dû à l'affinité des colorants (éosine et bleu de méthylène) pour les composants cellulaires.

Les résultats obtenus montrent un changement de forme du noyau passant d'un noyau rond (Jour 0) à un noyau polylobé (Jour 12) associé à un éclaircissement du cytoplasme et d'une diminution de taille des granulocytes. D'un point de vue morphologique, le jour 0 est caractéristique des promyélocytes avec un noyau imposant et rond. Son cytoplasme ayant une couleur foncée indique une faible présence de granules. Le noyau commence à s'incurver au jour 2 et 4 pouvant correspondre au stade de myélocytes et métamyélocytes. Tandis qu'au jour 6 de la différenciation, les HL60-granulocytes ont un éclaircissement de leur cytoplasme correspondant à la présence de nombreux granules et d'un noyau en forme de graine de haricot typique des Band cells. Enfin, les jours 8, 10 et 12 le cytoplasme des HL60-

granulocytes est devenu très clair et le noyau polylobé, caractéristique des neutrophiles (Figure 32).

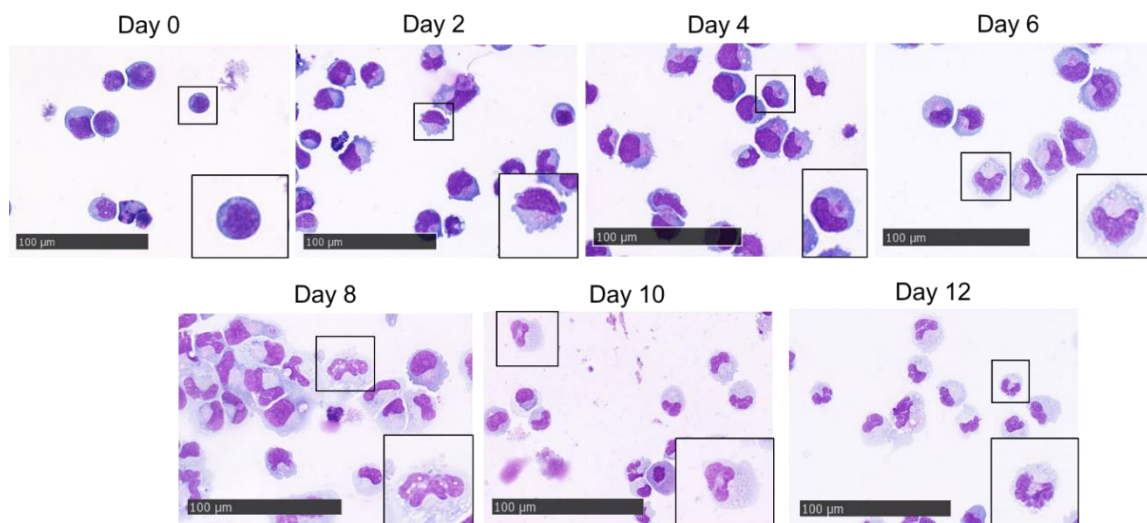


Figure 32 : Analyse morphologique de la lignée cellulaire HL60 différenciée en granulocyte par coloration May-Grünwald-Giemsa

La lignée cellulaire HL60 a été différenciée en granulocyte par ajout d'1 μM d'acide rétinoïque (ATRA). La morphologie a été analysée par coloration May-Grünwald-Giemsa tous les 2 jours pendant 12 jours en cinétique inverse. Cette coloration permet de colorer le noyau, les granules et le cytoplasme des HL60-granulocytes suivant l'affinité des colorants pour ces composants cellulaires. En effet, l'éosine permet de colorer les composants cellulaires basiques tels que le cytoplasme (rose), et le bleu de méthylène les composants acides tels que les granules (lilas) et le noyau (violet). Au jour 0 les HL60-différenciées ressemblent aux promyélocytes avec leur noyau rond et imposant. Aux jours 2 et 4, le noyau commence à s'incurver et le cytoplasme s'éclaircit pouvant correspondre au stade de myélocyte et métamyélocyte. Au jour 6, le noyau prend la forme d'une graine de haricot et le cytoplasme est clair, pouvant être le stade de Band cells. Enfin, les jours 8, 10 et 12 le noyau est polylobé avec un cytoplasme très clair caractéristique des neutrophiles.

Afin d'évaluer le pourcentage d'HL60-GI et d'HL60-neutrophiles obtenus après la différenciation des HL60, l'expression de leurs récepteurs de surface CD16 et CD11b ont été analysés par cytométrie en flux.

1.2. Suivi de la différenciation des HL60 en granulocytes par cytométrie en flux

Afin d'avoir une meilleure caractérisation des différents stades de granulocytes et d'évaluer le pourcentage de neutrophiles, les récepteurs CD16 et CD11b ont été analysés par cytométrie en flux. Pour rappel, les neutrophiles sont $\text{CD16}^{\text{high}} \text{CD11b}^+$ et les GI $\text{CD16}^{\text{low/+}} \text{CD11b}^+$.

Les représentations des density plots en cytométrie en flux montrent qu'en absence d'ATRA les HL60 ne sont pas capables de se différencier en granulocytes au cours du temps (Figure 33A). Tandis qu'en présence d'ATRA, les density plots n'ont pas le même aspect. En effet, au bout du 2ème et 4ème jour de différenciation, les HL60-granulocytes deviennent positifs pour le marqueur CD11b. Puis au 6ème jour de différenciation, elles commencent à exprimer le marqueur CD16, lequel sera fortement exprimé au 8ème, 10ème et 12ème jour (Figure 33B).

Cette expérience a été répétée au moins 5 fois et des représentations graphiques ont été réalisées afin de déterminer la durée de différenciation des HL60 pour avoir un nombre suffisant d'HL60-neutrophiles. Les résultats confirment ce que l'on observe en dotplot après traitement avec l'ATRA. A savoir, une diminution des HL60 doublement négatives pour CD16 et CD11b à partir du 2ème jour de différenciation (Figure 33C). Ceci est en accord avec l'augmentation du pourcentage d'HL60 positives pour CD11b (Figure 33D) puis CD16 (Figure 33E, F) aux 2ème et 6ème jour de différenciation, respectivement. Le dernier stade de GI, les Band cells ($CD16^{low} CD11b^{+}$) apparaissent au 6ème jour de différenciation pour avoir une diminution de leur nombre au bout du 12ème (Figure 33E). Tandis que la forme la plus mature, les neutrophiles ($CD16^{high} CD11b^{+}$) n'apparaissent seulement qu'au bout du 8ème jour de différenciation et leur nombre est en constante augmentation jusqu'au 12ème jour (Figure 33F).

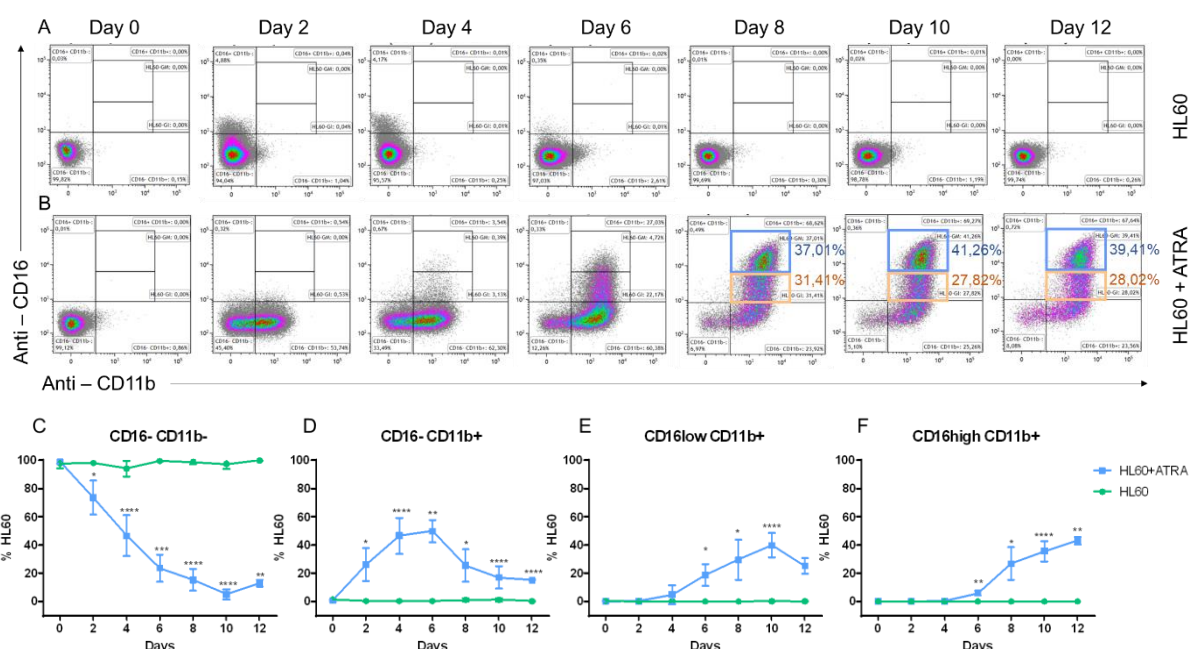


Figure 33 : Analyse par cytométrie en flux de l'expression des marqueurs CD11b et CD16 au cours de la différenciation de la lignée cellulaire HL60

(A, B) Density plots représentant l'expression du marqueur CD16 en fonction du marqueur CD11b au cours des différents jours de différenciation en absence (A) ou en présence de l'ATRA (B). (A) En absence de l'ATRA (vert, $n=5$) les HL60 sont incapables d'exprimer les récepteurs CD16 et CD11b. (B) Tandis qu'en présence de l'ATRA (bleu, $n=5$), les HL60 expriment CD11b à partir du 2ème jour, puis CD16 à partir du 6ème jour de différenciation. (C-F) Représentation graphique du pourcentage d'HL60 en fonction des différents temps d'incubation. (C) Les HL60 sans traitement à l'ATRA (vert) sont doublement négatives pour CD16 et CD11b au cours du temps. Tandis qu'en présence de l'ATRA (bleu), la population CD16- CD11b- diminue à partir du 2ème jour. (D) En accord avec le précédent résultat, le pourcentage d'HL60 positives pour CD11b augmente au 2ème jour puis diminue au 8ème jour. (E) Augmentation du pourcentage d'HL60 faiblement positive pour CD16 à partir du 6ème jour correspondant au dernier stade de GI, les Band cells. (F) Augmentation du pourcentage d'HL60 fortement positive pour CD16 à partir du 8ème jour correspondant aux neutrophiles. * Comparaison entre HL60 et HL60-ATRA, test ANOVA, * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$

Ces résultats sont en accord avec les colorations au May-Grünwald-Giemsa où on obtient une majorité de forme mature (neutrophiles) dans les derniers jours de différenciations. Néanmoins, nous voulons comparer les fonctions des HL60-GI avec les HL60-neutrophiles, donc il est nécessaire d'avoir un nombre suffisant à la fois d'HL60-GI et d'HL60-neutrophiles. Ainsi, d'après nos résultats, nous obtenons un pourcentage maximum de HL60-GI (CD16^{low} CD11b⁺) au bout de 10 jours de différenciation avec l'ATRA (Figure 33E). L'analyse des fonctions des HL60-GI en comparaison avec les HL60-neutrophiles sera donc réalisée par la suite à partir d'HL60-différenciées pendant 10 jours.

II. Etude des fonctions antimicrobiennes des HL60-GI en présence d'*E.coli*

Les GI sont absents d'un individu sain, mais peuvent apparaître lors d'une granulopoïèse d'urgence au cours de pathologie telle que le sepsis. Cependant, leurs fonctions antimicrobiennes dans un modèle infectieux sont très peu détaillées dans la littérature. Ainsi, la phagocytose et la production de ROS ont été étudiées à partir des HL60-GI triées comme expliqué dans la rubrique matériels et méthodes (I.4), puis incubées avec la bactérie *E.coli* à différents temps.

II.1. Comparaison de la capacité à phagocyter et produire des ROS intracellulaires des HL60-GI avec les HL60-neutrophiles

Afin d'étudier la capacité de phagocytose et de production de ROS intracellulaires des HL60-granulocytes, ils ont été incubés avec une lignée d'*E.coli* exprimant de façon constitutive le gène mCherry (mCherry-*E.coli*). Grâce à ce système, les HL60-granulocytes ayant réalisé la phagocytose vont se colorer en rouge et pourront être identifiés par cytométrie en flux. La fenêtre de phagocytose a été déterminée à partir de l'échantillon HL60-granulocytes en présence de mCherry-*E.coli* mais sans incubation (0min) (Figure 34A). La production de ROS des cellules phagocytaires a été évaluée à l'aide d'une sonde oxydative sensible au peroxyde d'hydrogène et au radical hydroxyle émettant ainsi de la fluorescence de couleur rouge profond (Figure 34B).

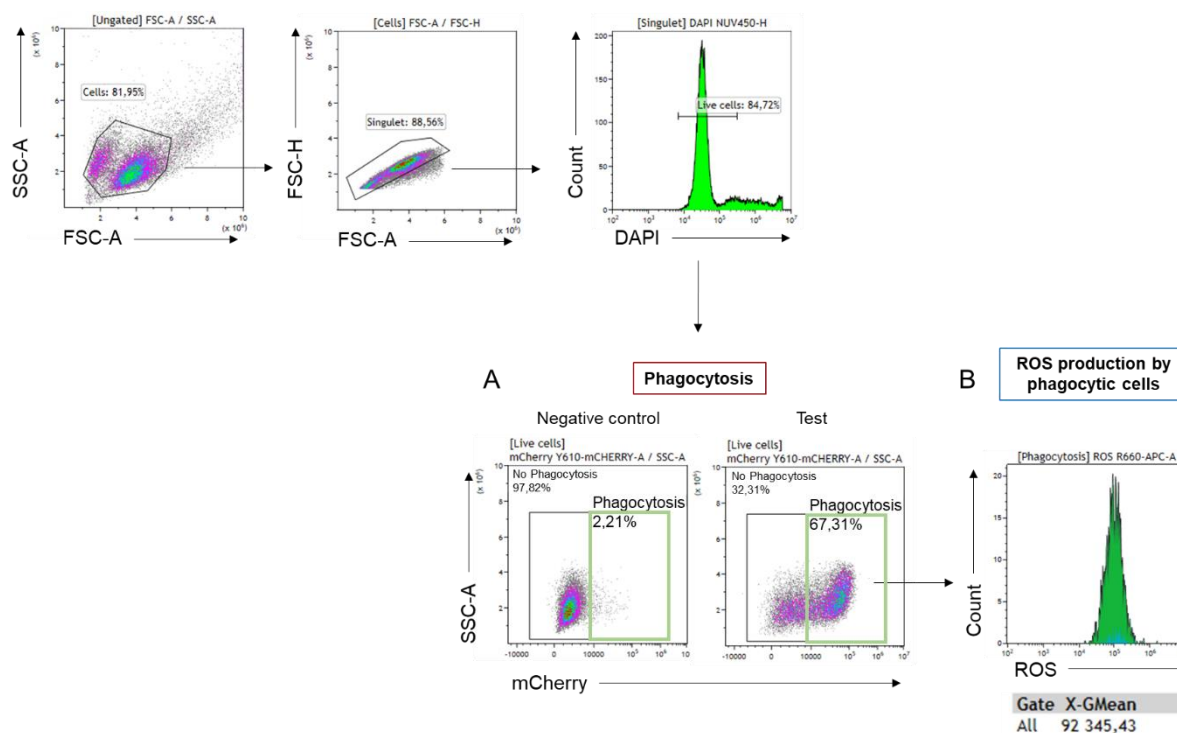


Figure 34 : Stratégie de fenêtrage pour analyser la phagocytose et la production de ROS des HL60-granulocytes

Représentation des Density plots à partir desquels les granulocytes ont été sélectionnés en fonction de leur taille (FSC-A) et de leur structure (SSC-A). Les débris cellulaires et doublets ont été éliminés afin de ne garder que les singulets (fenêtre FSC-H/FSC-A). A partir des cellules vivantes (fenêtre Count/DAPI), la phagocytose (A) a été analysée par l'expression du gène mCherry porté par les *E.coli* (mCherry-*E.coli*) en fonction de la structure (SSC-A) des granulocytes. La fenêtre de phagocytose a été déterminée à partir d'un contrôle négatif correspondant au temps 0 min (mCherry-*E.coli* + granulocytes). A partir de la fenêtre des cellules ayant fait de la phagocytose, la production de ROS (B) a été évaluée par la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI).

Les résultats montrent que les HL60-neutrophiles ont une meilleure capacité à phagocyter mCherry-*E.coli* que les HL60-GI au cours du temps, avec une significativité à 90 min d'incubation (71% contre (vs) 51%, $p < 0,05$) (Figure 35A). Lors de la mesure de la production de ROS par les HL60-granulocytes, nous avons constaté qu'elles étaient capables de produire des ROS à un niveau élevé à l'état basal (Figure 35B). Ainsi, les résultats de la production de ROS par les HL60-granulocytes ayant réalisé la phagocytose de mCherry-*E.coli*, ont été normalisés à partir de la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) des ROS produits à l'état basal (sans stimulation). Les résultats montrent une absence de différence significative entre la production de ROS par les HL60-neutrophiles et les HL60-GI. Toutefois, même si la différence n'est pas significative ($p = 0,06$), nous pouvons observer que les HL60-neutrophiles semblent produire plus de ROS à 30 min que les HL60-GI (2,34 vs 1,62, ns 0,06), pour ensuite décroître au cours du temps (Figure 35C).

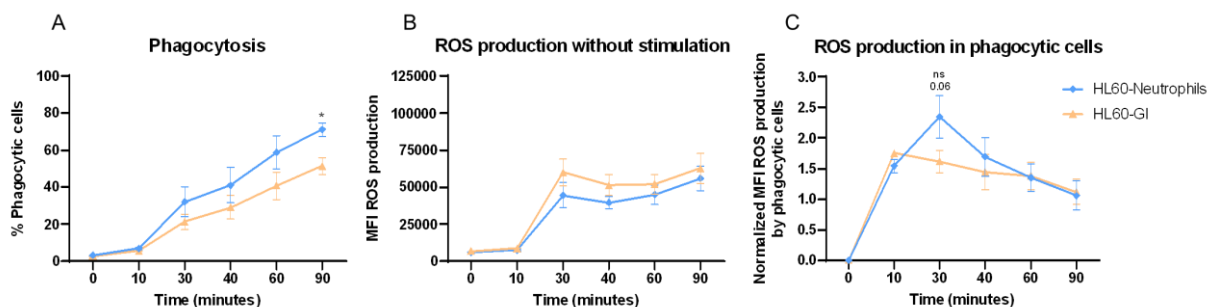


Figure 35 : Phagocytose et production de ROS par les HL60-granulocytes

Les HL60-neutrophiles et HL60-GI ont été incubées avec la bactérie mCherry-*E.coli* pendant différents temps (10, 30, 40, 60, 90 min). **(A)** La phagocytose a été suivie par l'expression du gène mCherry par mCherry-*E.coli* puis analysée par cytométrie en flux. Les HL60-neutrophiles (bleu, $n=5$) phagocytent mieux que les HL60-GI (jaune, $n=5$), avec une différence significative à 90min (71% contre (vs) 51%, $p<0,05$). **(B-C)** La production de ROS a été évaluée par une sonde oxydative sensible aux ROS (peroxyde d'hydrogène et radical hydroxyle) par les HL60-granulocytes à l'état basal (sans stimulation) **(B)** et dans les HL60-granulocytes ayant fait de la phagocytose **(C)**. **(B)** A l'état basal, les HL60-GI produisent plus de ROS que les HL60-neutrophiles au cours du temps. **(C)** La production de ROS a été normalisée à partir de la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) à l'état basal. Aucune différence significative n'a été mise en évidence, mais les HL60-neutrophiles semblent produire plus de ROS à 30min que les HL60-GI (2,34 vs 1,62, ns 0,06). * Comparaison entre les HL60-neutrophiles et les HL60-GI, test de Mann-Whitney, * $p<0,05$.

A partir de ces résultats, nous pouvons conclure que les HL60-GI possèdent une moins bonne capacité à phagocyter que les HL60-neutrophiles. Toutefois, aucune différence significative de production de ROS entre les 2 types cellulaires n'a pu être observée. Néanmoins, la sécrétion de ROS totale (intracellulaires et extracellulaires), peut être différente entre les HL60-GI et les HL60-neutrophiles. Pour répondre à cette hypothèse des sondes chimioluminescentes sont utilisées.

II.2. Etude de la production de ROS intracellulaires et extracellulaires des HL60-GI et des HL60-neutrophiles par chimioluminescence

L'analyse de la production de ROS par les HL60-granulocytes en cytométrie de flux n'a pas mis en évidence de différence significative entre les HL60-neutrophiles et HL60-GI. Les neutrophiles pouvant aussi sécréter des ROS, nous avons voulu vérifier si les HL60-GI avaient un défaut de sécrétion de ROS. Cette sécrétion a été dosée par le Luminol étant une sonde chimioluminescente qui permet de doser les ROS totaux (intracellulaires et extracellulaires). Mais les ROS extracellulaires ont également été visualisés à l'aide de la sonde Isoluminol après incubation des HL60-granulocytes avec mCherry-*E.coli*. Les mesures ont été réalisées en cinétique toutes les minutes pendant 1h, mais seulement les temps 10, 30, 40 et 60 min sont représentés. Les graphiques représentent l'absorbance des ROS détectés en coup par minute (cpm) en fonction du temps (Figure 36).

Les résultats montrent une meilleure différence de production de ROS entre les 2 types cellulaires avec un pic de production maximale à 30 min pour ensuite diminuer au cours du

temps. Cependant, aucune différence significative n'est mise en évidence pour la production de ROS totale (Figure 35A), même si à nouveau nous observons une tendance à 30 min. Cette technique permet aussi de déterminer la libération de ROS en extracellulaire. Lorsque les HL60-neutrophiles sont stimulées avec la bactérie mCherry-*E.coli*, une augmentation de ROS significative est observée à 30 min (6783 vs 1983, $p < 0,05$) et 40 min (5050 vs 1583, $p < 0,05$) en comparaison avec la courbe sans stimulation. De plus, une différence significative de production de ROS à 30 min et 40 min entre les HL60-neutrophiles et HL60-GI est constatée (6783 vs 3787 ; 5050 vs 2316, $p < 0,05$) (Figure 35B).

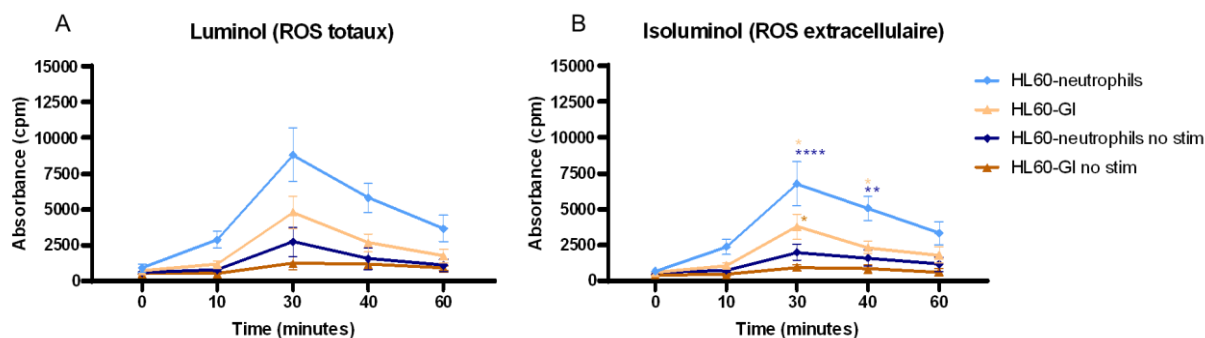


Figure 36 : Sécrétion des ROS par les HL60-granulocytes mesurée par chimioluminescence

Les HL60-granulocytes ont été mises en incubation avec la bactérie mCherry-*E.coli* en présence soit de la sonde luminol qui permet de mesurer les ROS totaux (intracellulaires et extracellulaires) (A), soit la sonde isoluminol qui permet de mesurer les ROS en extracellulaire (B). Les ROS ont été mesurées toutes les minutes pendant 1h, mais seulement les temps 10, 30, 40 et 60 min ont été représentés. Les résultats sont représentés en coups par minute (cpm) de l'absorbance des ROS détectées par la sonde en fonction du temps. (A) Les HL60-neutrophiles (bleu, $n=3$) sécrètent plus de ROS totaux que les HL60-GI (jaune, $n=3$) au cours du temps sans de différence significative. (B) Les HL60-neutrophiles présentent une augmentation de libération de ROS extracellulaires après stimulation avec mCherry-*E.coli* que sans stimulation à 30 min et 40 min (6783 vs 1983 ; 5050 vs 1583, $p < 0,05$). De plus, les HL60-neutrophiles libèrent plus de ROS en extracellulaire que les HL60-GI, avec une différence significative pour 30 min et 40 min d'incubation (6783 vs 3787 ; 5050 vs 2316, $p < 0,05$). * Comparaison entre HL60-neutrophiles et HL60-GI, * Comparaison entre HL60-neutrophiles et HL60-neutrophils no stim, * Comparaison entre HL60-GI et HL60-GI no stim, test ANOVA, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

De plus, si nous comparons l'isoluminol et le luminol, la libération de ROS en extracellulaire semble similaire à la production de ROS totaux (Figure 36). Néanmoins, les HL60-GI semblent produire moins de ROS que les HL60-neutrophiles. Les ROS des phagosomes étant principalement produits par le complexe NADPH oxydase, l'expression des gènes de ce complexe est peut-être régulée différemment entre les HL60-neutrophiles et HL60-GI.

II.3. Comparaison des différences d'expression des gènes du complexe NADPH oxydase entre les HL60-GI et HL60-neutrophiles

Les ROS sont principalement produits par le complexe NADPH oxydase localisée dans la membrane plasmique et des granules du neutrophile lorsque celui-ci est activé. En absence d'activation, le complexe ne peut pas produire de ROS car les protéines cytoplasmiques sont libres dans le cytoplasme, et pour fonctionner il faut que ces protéines soient liées aux

protéines membranaires. Ainsi, ce complexe est constitué de 2 protéines membranaires, gp91^{phox} et p22^{phox} transcrites par les gènes *CYBB* et *CYBA*, respectivement. Et de 3 protéines cytoplasmiques, p47^{phox}, p67^{phox} et p40^{phox} transcrites par les gènes *NCF1*, *NCF2* et *NCF4*, respectivement.

L'analyse de ces gènes a été effectuée par RTqPCR en absence (no stim) et en présence de la bactérie mCherry-*E.coli* à 3 temps d'incubation (10, 30, 60 min). Les résultats montrent d'une part que les gènes sans stimulation sont plus fortement exprimés qu'en présence de mCherry-*E.coli* où les gènes sont drastiquement diminués (Figure 37). D'autre part, les HL60-GI semblent moins exprimer les gènes *NCF1*, *NCF2*, *NCF4* et *CYBA* que les HL60-neutrophiles mais sans différence significative, mise à part pour *NCF2* à 10 min (0,15 vs 0,40, $p < 0,05$). Concernant le gène *CYBB*, les HL60-GI en absence de stimulation semblent l'exprimer plus fortement que les HL60-neutrophiles où leur expression diminue au cours du temps. Tandis que les HL60-GI ont une légère augmentation d'expression de *CYBB* à 30 min (Figure 37).

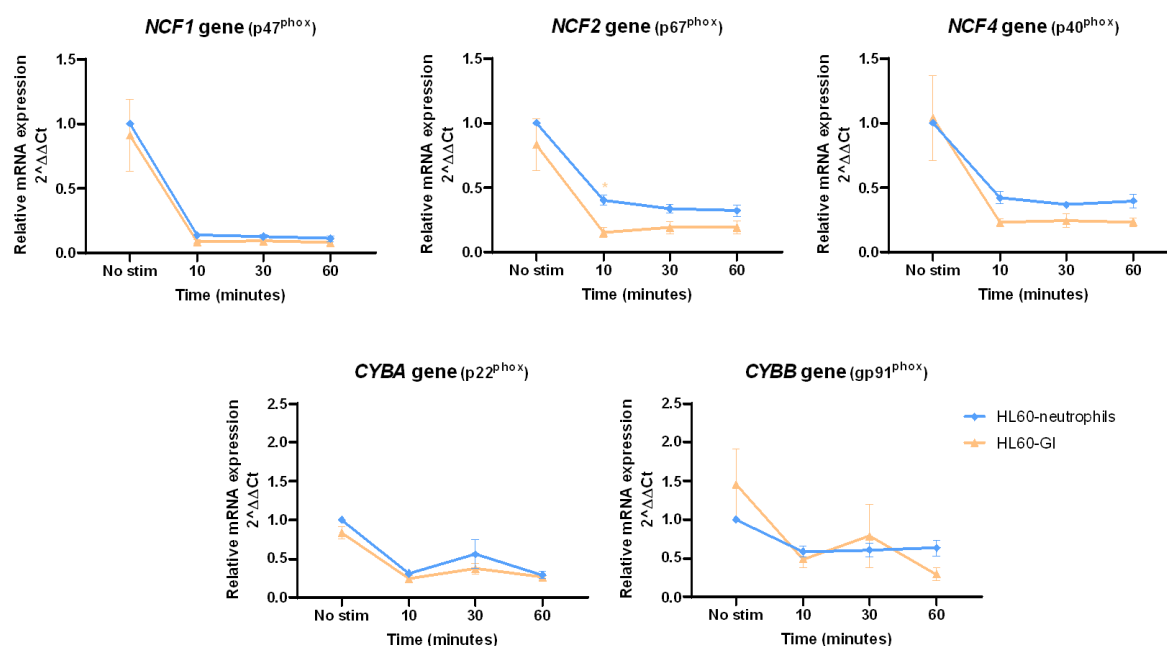


Figure 37 : Expression des gènes du complexe NADPH oxydase par les HL60-granulocytes en absence et en présence de stimulation

Le complexe NADPH oxydase est constitué de 3 protéines cytoplasmiques, p47^{phox}, p67^{phox} et p40^{phox} transcrites par les gènes *NCF1*, *NCF2* et *NCF4* respectivement. Ainsi que de 2 protéines membranaires, gp91^{phox} et p22^{phox} transcrites par les gènes *CYBA* et *CYBB* respectivement. L'analyse de ces gènes a été faite par RTqPCR en absence (no stim) et en présence de la bactérie mCherry-*E.coli*. Les HL60-granulocytes semblent exprimer plus fortement les gènes du complexe NADPH oxydase en absence de stimulation. Les HL60-GI (jaune, $n=3$) semblent moins exprimer les gènes *NCF1*, *NCF2*, *NCF4* et *CYBA* que les HL60-neutrophiles (bleu, $n=3$). Néanmoins, à l'état basal (No stim) les HL60-GI expriment plus fortement le gène *CYBB* que les HL60-neutrophiles où ils présentent une diminution de son expression au cours du temps. Tandis que les HL60-GI présentent une légère augmentation à 30 min d'incubation avec mCherry-*E.coli*. * Comparaison entre HL60-neutrophils et HL60-GI, test ANOVA, * $p < 0,05$.

Ces résultats pourraient expliquer la faible capacité de production de ROS par les HL60-GI en comparaison avec les HL60-neutrophiles. Si les HL60-GI expriment plus faiblement les gènes du complexe NADPH oxydase, ils pourraient exprimer moins de protéines de ce complexe, entraînant une capacité moindre à produire des ROS.

II.4. Comparaison des différences d'expression des protéines du complexe NADPH oxydase entre les HL60-GI et les HL60-neutrophiles

Afin de confirmer notre hypothèse, 2 protéines du complexe NADPH oxydase, gp91^{phox} et p47^{phox} ont été analysées par Western blot en absence (No stim) et en présence de la bactérie mCherry-*E.coli* pendant les temps 10, 30 et 60 min.

D'après les résultats de l'analyse de l'expression des gènes *NCF1* pour la protéine p47^{phox} et *CYBB* pour la protéine gp91^{phox}, nous nous attendons à avoir une expression diminuée de ces 2 protéines par les HL60-GI. Cependant, les résultats du Western blot montrent que les HL60-GI expriment le même niveau de protéines p47^{phox} que les HL60-neutrophiles (Figure 38A). Et plus surprenant, les HL60-GI semblent exprimer fortement la protéine gp91^{phox} après stimulation avec mCherry-*E.coli* pendant 10 et 30 min en comparant l'expression de cette protéine avec les HL60-neutrophiles mais sans de différence significative (Figure 38B).

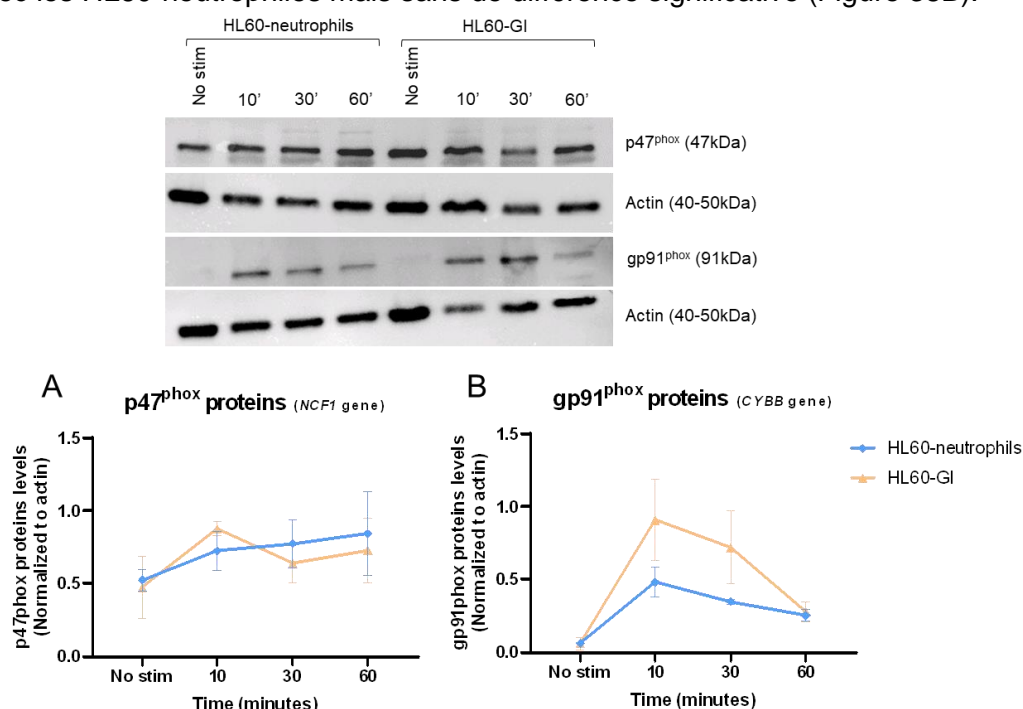


Figure 38 : Expression des protéines p47^{phox} et gp91^{phox} par les HL60-granulocytes en absence et en présence de stimulation

Deux protéines du complexe NADPH oxydase, p47^{phox} et gp91^{phox}, ont été analysées par Western blot dans les HL60-neutrophiles et HL60-GI, puis quantifiées en normalisant leur expression avec la protéine de ménage l'actine. **(A)** La protéine p47^{phox} est autant exprimée par les HL60-neutrophiles (bleu, $n=3$) que les HL60-GI (jaune, $n=3$) en absence (No stim) ou en présence de la bactérie mCherry-*E.coli*. **(B)** La protéine gp91^{phox} semble être plus fortement exprimée par les HL60-GI que les HL60-neutrophiles pendant 10 et 30 min de stimulation.

Ainsi, malgré une diminution d'expression des gènes codant les protéines du complexe NADPH oxydase, les HL60-GI expriment un niveau de protéine p47^{phox} similaires à celui des HL60-neutrophiles. Mais une expression augmentée de la protéine membranaire gp91^{phox}, ce qui laisse penser que la diminution de production de ROS est peut-être dû à une diminution d'activation des voies de signalisation, responsable de l'assemblage du complexe NADPH oxydase.

II.5. Comparaison des différences d'expression de la voie d'activation des sous-unités du complexe NADPH oxydase entre les HL60-GI et HL60-neutrophiles

Lorsque les neutrophiles sont au repos, les protéines cytoplasmiques du complexe NADPH oxydase sont libres dans le cytoplasme et la production de ROS ne peut pas avoir lieu. Durant une infection, le neutrophile reconnaît le pathogène via plusieurs récepteurs présents à sa surface (TLR, Fc γ R, CXCR...) activant une cascade protéique responsable de l'assemblage et de l'activation du complexe NADPH oxydase dans le but de produire des ROS afin de détruire le pathogène. Pour rappel nous avons vu précédemment que les HL60-GI sont CD16^{low} (Fc γ RIII) et les HL60-neutrophiles CD16^{high}. Les protéines connues pour être les plus impliquées dans l'activation du complexe NADPH oxydase, sont les protéines kinase ERK1/2 et p38MAPK. Ces protéines seront activées suite à leur phosphorylation par d'autres protéines kinases (MEK) qui pourront phosphoryler les protéines du complexe NADPH oxydase.

Les résultats montrent que les HL60-GI semblent exprimer de façon plus importante les protéines ERK1/2 et p38MAPK lors d'une stimulation avec la bactérie mCherry-*E.coli* que les HL60-neutrophiles. Cependant, la forme phosphorylée de la protéine ERK1/2 (p-ER1/2), correspondant à son activation diminue plus rapidement au cours du temps que celle des HL60-neutrophiles à partir de 30 min d'incubation bien qu'à nouveau sans différence significative (Figure 39A).

Tandis que l'expression de la forme phosphorylée de p38MAPK (p-p38) est inchangée (Figure 39). Ceci laisse penser que les HL60-GI ont une diminution d'activation de la voie de signalisation impliquant la phosphorylation de la protéine ERK1/2, pouvant avoir comme conséquence une diminution d'activation et d'assemblage des protéines du complexe NADPH oxydase, résultant à une diminution de production de ROS.

Maintenant que nous avons caractérisé notre modèle, nous pouvons vérifier notre hypothèse de départ qui est de déterminer si la faible production de ROS par les HL60-GI est capable d'induire la réponse SOS, le système de réparation bactérien.

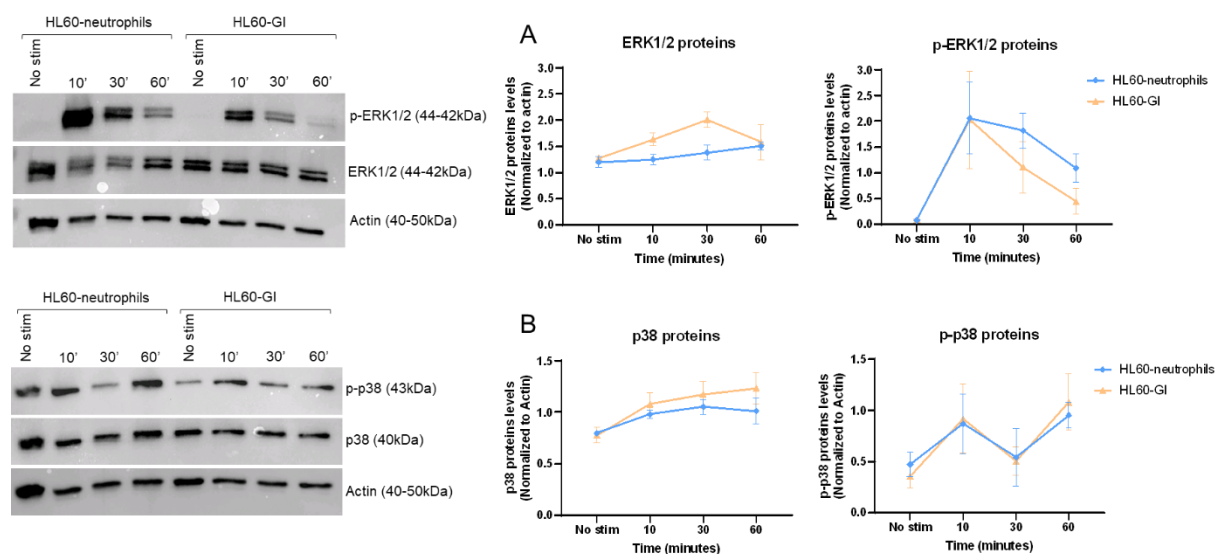


Figure 39 : Expression des protéines kinases ERK1/2 et p38MAPK par les HL60-granulocytes en absence et en présence de stimulation

Deux protéines kinases, ERK1/2 et p38MAPK impliquées dans l'activation des protéines du complexe NADPH oxydase, ont été analysées par Western blot dans les HL60-granulocytes, puis quantifiées en normalisant leur expression avec la protéine de ménage l'actine. La forme totale des protéines ERK1/2 et p38MAPK semble être plus fortement exprimée par les HL60-GI (jaune, $n=3$) que les HL60-neutrophiles (bleu, $n=3$) au cours du temps. Néanmoins, la forme phosphorylée de la protéine ERK1/2 (p-ERK1/2) correspondant à la forme active est moins exprimée à partir de 30 et 60 min que les HL60-neutrophiles. Mais aucune différence d'expression pour la protéine phosphorylé p38MAPK (p-p38).

II.6. Capacité des HL60-GI et des HL60-neutrophiles à induire la réponse SOS bactérienne de mCherry-*E.coli* dans leur phagosome

La réponse SOS est un ensemble de mécanismes mis en place par les bactéries pour réparer les dommages liés à leur ADN. Chez *E.coli*, 50 gènes font partie de la réponse SOS. Cette réponse peut aussi activer des mécanismes d'acquisition (par exemple mouvement de cassettes d'intégrons) et d'expression de gènes de résistance aux antibiotiques (par exemple gène de résistance à la ciprofloxacine *qnrB*).

Les HL60-granulocytes ont été incubées avec la bactérie mCherry-*E.coli* à plusieurs temps d'incubation (10, 30, 40, 60, 90 min). Cette bactérie porte un plasmide dans lequel se trouve le gène de la GFP sous le contrôle du promoteur *sfiA* qui est un des gènes impliqués dans la réponse SOS, mCherry-*E.coli*/pPsfIA ::*gfp*. Ainsi, avec cette fusion, nous pouvons suivre l'induction de la réponse SOS dans les HL60-granulocytes ayant fait de la phagocytose par cytométrie en flux. Afin de déterminer l'induction de la réponse SOS, 2 contrôles bactériens *E.coli* ont été utilisés pour la stratégie de fenêtrage. Le contrôle bactérien négatif porte un plasmide dans lequel le gène de la GFP n'est sous le contrôle d'aucun promoteur, donc la bactérie ne pourra pas exprimer la GFP. A l'inverse, le contrôle positif porte un plasmide dans lequel au niveau du promoteur P*sfiA* la boîte LexA, répresseur clé dans le déclenchement de

la réponse SOS, est muté permettant l'expression constitutive de la GFP. Ces bactéries, comme mCherry-*E.coli*, expriment aussi constitutivement le gène mCherry permettant de suivre la phagocytose. (Figure 40).

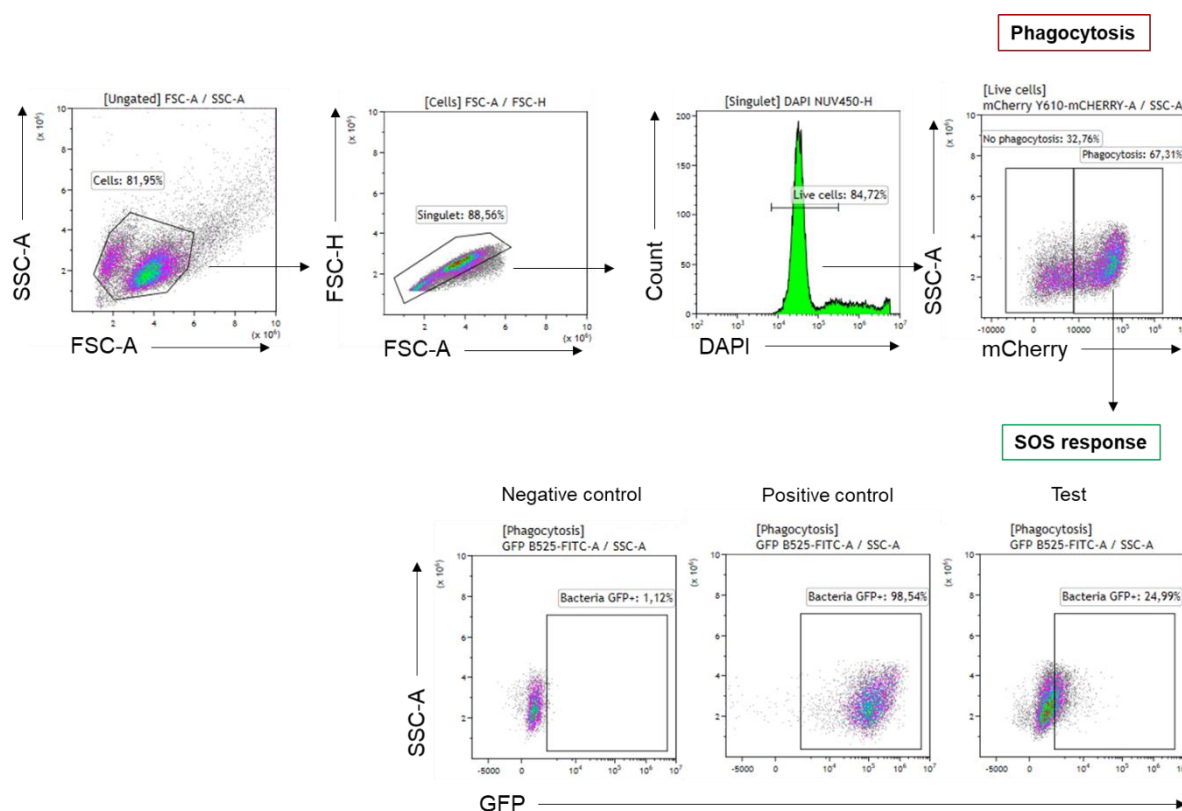


Figure 40 : Stratégie de fenêtrage pour suivre l'induction de la réponse SOS dans les HL60-granulocytes ayant fait de la phagocytose

Représentation des Density plots à partir desquels les granulocytes ont été sélectionnés en fonction de leur taille (FSC-A) et de leur structure (SSC-A). Les débris cellulaires et doublets ont été éliminés afin de ne garder que les singulets (fenêtre FSC-H/FSC-A). A partir des cellules vivantes (fenêtre Count/DAPI), la phagocytose a été analysée par l'expression du gène mCherry porté par les *E.coli* (mCherry-*E.coli*) en fonction de la structure (SSC-A) des granulocytes. Dans la fenêtre de phagocytose, l'induction de la réponse SOS a été analysée par expression du gène de la GFP présent dans un plasmide sous le contrôle du promoteur *sfiA* (un des gènes régulant la réponse SOS) porté par mCherry-*E.coli*. La fenêtre de l'induction de la réponse SOS a été déterminée à partir de 2 contrôles bactériens exprimant constitutivement mCherry pour suivre la phagocytose. Le contrôle négatif porte un plasmide dans lequel le gène de la GFP n'est sous le contrôle d'aucun promoteur, donc ne peut pas exprimer la GFP. A l'inverse, le contrôle positif porte un plasmide dans lequel le gène de la GFP est sous le contrôle d'un promoteur *sfiA* muté qui permet d'être exprimé en continu.

Les résultats sont représentés en pourcentage de bactéries GFP+ en fonction des différents temps d'incubation. Ils montrent que les 2 types cellulaires HL60-GI et HL60-neutrophiles sont capables d'induire la réponse SOS au cours du temps. Malgré une absence de différence significative, les HL60-GI semblent induire plus fortement la réponse SOS bactérienne que les HL60-neutrophiles, avec une induction croissante au cours du temps pour les 2 types cellulaires (Figure 41).

Ces résultats sont en accord avec notre hypothèse, où nous supposons que les granulocytes immatures produisent de faibles concentrations de ROS qui ne va pas être suffisante pour

détruire les bactéries mais suffisante pour induire la réponse SOS. Néanmoins, nous devons confirmer que l'induction de la réponse SOS ne se fait que sur les bactéries ayant été phagocytées par les granulocytes, car nous avons vu précédemment que les HL60-GI étaient capables de produire des ROS à la fois en intracellulaires et en extracellulaire.

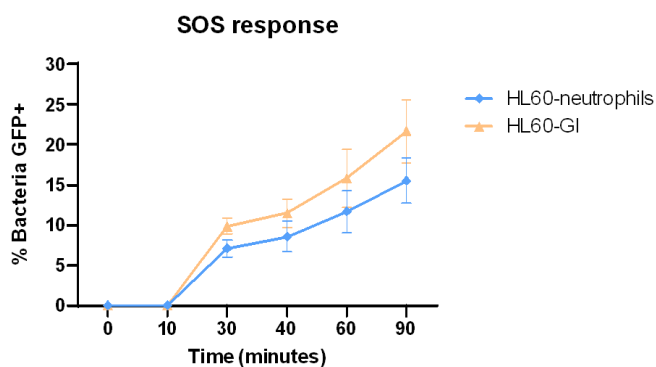


Figure 41 : Induction de la réponse SOS bactérienne dans les HL60-granulocytes après leur phagocytose

Les HL60-granulocytes ont été mis en incubation avec la bactérie mCherry-*E.coli* à différents temps (10, 30, 40, 60, 90 min) puis l'induction de la réponse SOS bactérienne a été analysée par cytométrie en flux. Le graphique représente le pourcentage de bactérie GFP+ en fonction du temps. Les résultats montrent que les 2 types cellulaires, HL60-neutrophiles (bleu, $n=5$) et HL60-GI (jaune, $n=5$) sont capables d'induire la réponse SOS bactérienne. En absence de différence significative, les HL60-GI semblent induire plus fortement la réponse SOS que les HL60-neutrophiles.

II.7. Visualisation de l'induction de la réponse SOS bactérienne à l'extérieur et intérieur des HL60-GI et HL60-neutrophiles

Afin de visualiser que l'induction de la réponse SOS bactérienne est présente à l'intérieur des HL60-granulocytes, les cellules ont été incubées comme précédemment avec la bactérie mCherry-*E.coli* à différents temps (30, 40, 60, 90 min) puis analysées par microscopie confocale. Afin de vérifier que l'induction de la réponse SOS bactérienne se localise dans les HL60-granulocytes, leurs filaments d'actines ont été colorés en bleu par la phalloïdine. Par cette technique, la phagocytose et la production de ROS sont également observées.

Les résultats confirment la faible capacité de phagocytose des HL60-GI au cours du temps, et tout particulièrement pour le temps 90 min où les mCherry-*E.coli* semblent moins nombreuses dans les HL60-GI contrairement aux HL60-neutrophiles. La différence de production de ROS ne peut être visualisée par cette technique, mais permet de voir qu'elle est principalement localisée à l'intérieur des HL60-granulocytes. Les images montrent la présence de bactéries mCherry-*E.coli* exprimant la GFP principalement à l'intérieur des HL60-GI. Ceci confirme que l'induction de la réponse SOS bactérienne se réalise à l'intérieur des HL60-granulocytes et que les ROS extracellulaires sont incapables d'induire cette réponse (Figure 42).

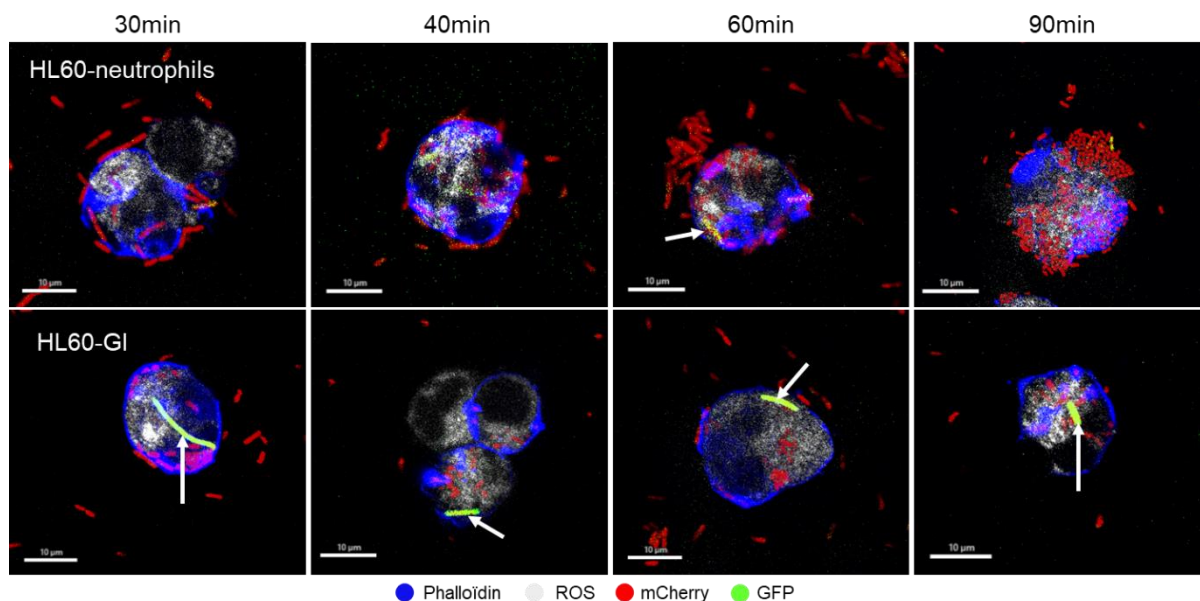


Figure 42 : Visualisation de la réponse SOS bactérienne à l'intérieur des HL60-granulocytes par microscopie confocale

Les HL60-granulocytes après incubation avec les mCherry-*E.coli* (rouge) à différents temps d'incubation (30, 40, 60, 90 min) ont été colorées avec la phalloïdine (bleu) afin de les visualiser au microscope confocal. Ces résultats montrent que la réponse SOS bactérienne (vert, flèches blanches) a bien lieu à l'intérieur des HL60-granulocytes, que les ROS (blanc) extracellulaires sont incapables d'induire la réponse SOS des bactéries non phagocyté et que celle-ci est plus intense dans les HL60-GI que les HL60-neutrophiles. De plus, nous confirmons que les HL60-GI ont une capacité diminuée à phagocyter les bactéries bien visibles à 90 min d'incubation.

Un imageur en flux, l'Amnis, couplant à la fois la cytométrie en flux et la microscopie a été utilisée pour montrer que la réponse SOS bactérienne a bien eu lieu à l'intérieur des HL60-granulocytes. Et par l'utilisation de cette imagerie cellulaire, la réponse SOS a pu être quantifiée en lien avec les images obtenues.

A partir de l'incubation des HL60-granulocytes avec la bactérie mCherry-*E.coli* (30, 40, 60, 90 min), les HL60-granulocytes ont été marquées avec un anticorps anti-CD11b afin de les visualiser et de réaliser la stratégie de fenêtrage (Figure 43). Comme pour la cytométrie en flux, la fenêtre de phagocytose a été réalisée à partir de l'échantillon HL60-granulocytes en présence de mCherry-*E.coli* sans incubation (0 min) (Figure 43A). Pour les fenêtres de l'induction de la réponse SOS, les mêmes contrôles bactériens ont été utilisés à savoir le contrôle négatif où le gène de la GFP ne possède pas de promoteur et le contrôle positif avec une expression constitutive de la GFP (Figure 43B).

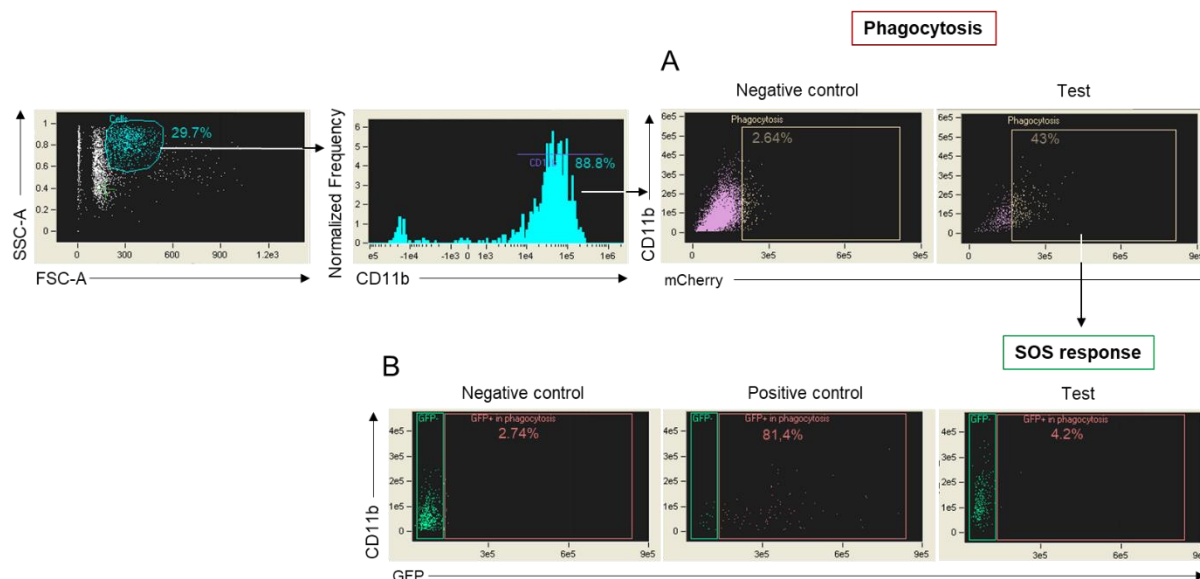


Figure 43 : Stratégie de fenêtrage pour visualiser l'induction de la réponse SOS bactérienne par l'Amnis

Les HL60-granulocytes après incubation avec la bactérie mCherry-*E.coli*, ont été marqués avec l'anticorps anti-CD11b afin de les suivre. Les HL60-granulocytes ont été sélectionnés en fonction de leur taille (FSC-A) et de leur structure (SSC-A). Afin d'éliminer les débris qui pourraient se trouver dans la fenêtre taille/structure, les HL60-granulocytes ont été sélectionnés sur l'expression de leur marqueur CD11b. **(A)** A partir des cellules CD11b positives, la phagocytose a été analysée par l'expression du gène mCherry porté par les *E.coli* (mCherry-*E.coli*) en fonction du marqueur CD11b. La fenêtre de phagocytose a été déterminée à partir d'un contrôle négatif correspondant au temps 0 min (mCherry-*E.coli* + granulocytes). **(B)** Dans la fenêtre de phagocytose, l'induction de la réponse SOS a été analysée par expression du gène de la GFP présent dans un plasmide sous le contrôle du promoteur *sfiA* porté par mCherry-*E.coli*. La fenêtre de l'induction de la réponse SOS a été déterminée à partir de 2 contrôles bactériens exprimant constitutivement mCherry. Le contrôle négatif porte un plasmide dans lequel le gène de la GFP n'est sous le contrôle d'aucun promoteur, donc ne peut pas exprimer la GFP. A l'inverse, le contrôle positif porte un plasmide dans lequel le gène de la GFP est sous le contrôle d'un promoteur *sfiA* muté qui permet son expression en continu.

Seules les images des HL60-GI sont représentés mais les mêmes résultats sont obtenus avec les HL60-neutrophiles. Les résultats montrent une colocalisation entre l'expression de mCherry et de GFP par les bactéries mCherry-*E.coli/pPsfia::gfp*. Ce qui prouve que les bactéries activant leur réponse SOS sont les mêmes exprimant mCherry. De plus, ces résultats confirment que l'induction de la réponse SOS est activée à l'intérieur des HL60-GI. Néanmoins, cette technique permet de montrer en plus, que les bactéries ayant leur réponse SOS d'activées sont colocalisés avec la production de ROS produite à l'intérieur des HL60-GI (Figure 44A).

Grâce à cette technique, la visualisation de l'induction de la réponse SOS par microscopie a pu être complétée par la quantification du pourcentage de bactérie GFP+ dans les HL60-granulocytes. Les résultats confirment ce qui a été observé par cytométrie en flux classique, les HL60-GI induisent plus fortement la réponse SOS que les HL60-neutrophiles (Figure 44B).

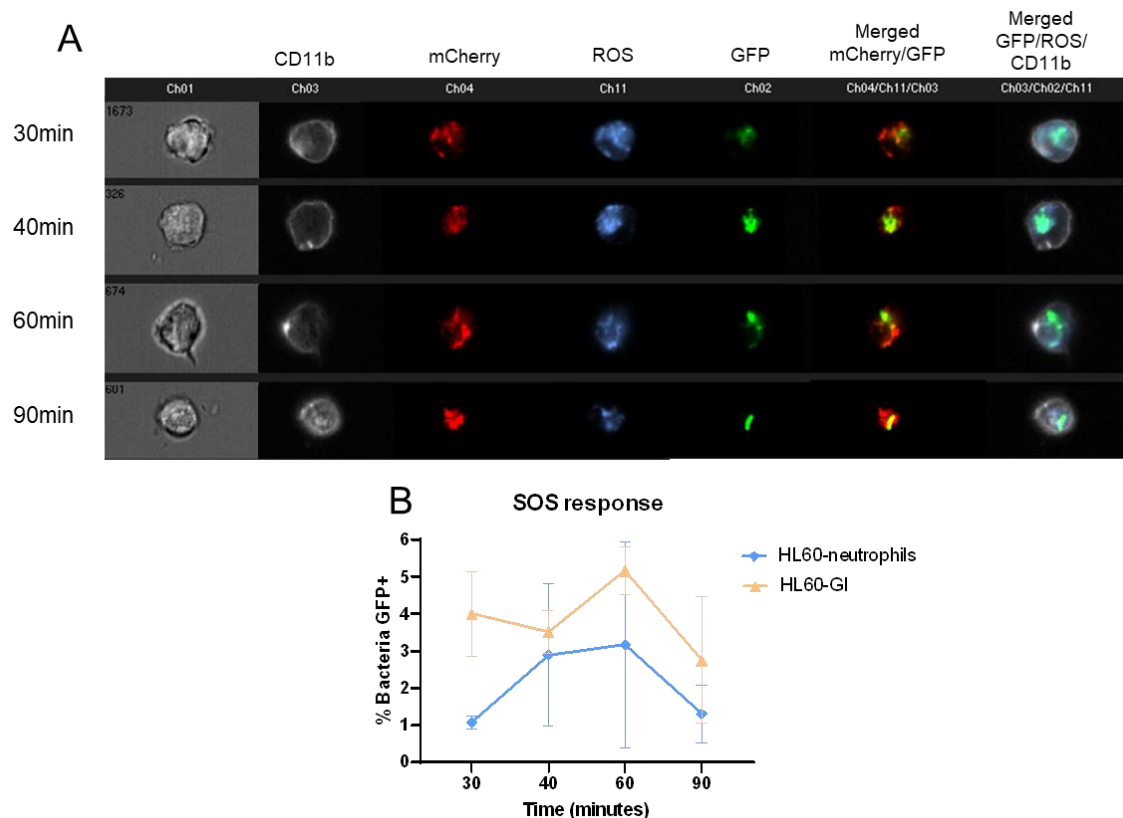


Figure 44 : Colocalisation de l'induction de la réponse SOS avec la production de ROS des HL60-GI

Les HL60-GI après incubation avec les mCherry-*E.coli* (rouge) à différents temps d'incubation (30, 40, 60, 90 min) ont été marqué avec l'anticorps anti-CD11b (blanc) afin de les visualiser. **(A)** Les images montrent que les HL60-GI (CD11b) produisent des ROS (bleu). Les ROS semblent être co-localisé avec l'induction de la réponse SOS bactérienne (GFP) se trouvant dans le granulocyte (Merged GFP/ROS/CD11b). De plus, les bactéries ayant leur réponse SOS d'activé sont les mêmes bactéries exprimant le gène mCherry (Merged mCherry/GFP). **(B)** Grâce à l'Amnis, le pourcentage de bactéries GFP+ a pu être quantifié en fonction du temps. Les HL60-GI (jaune, $n=3$) présentent un pourcentage plus important de bactéries GFP+ que les HL60-neutrophiles (bleu, $n=3$).

Grâce à la différenciation des HL60 en GI et en neutrophiles, nous avons pu dans un premier temps mettre au point toutes les techniques qui permettent d'évaluer les fonctions antimicrobiennes des GI. Dans un deuxième temps, bien que les HL60 soient une lignée cellulaire et que ces premiers résultats n'ont pas toujours donné de différence significative, ils répondent à notre hypothèse. En effet, nous avons pu mettre en évidence que les HL60-GI avaient une diminution de capacités à phagocyter les bactéries. Cependant, pour la production de ROS, nous n'avons pas observé de différence par cytométrie en flux, tandis qu'avec le luminol nous avons pu mettre en évidence que les HL60-GI produisaient de façon globale moins de ROS que les HL60-neutrophiles. Toutefois, nous avons pu mettre en évidence que les 2 types cellulaires sont capables d'induire la réponse SOS bactérienne nécessaire à la bactérie pour réparer son ADN dans le but de survivre mais étant plus important pour les HL60-GI. Cette réponse est localisée dans le phagosome des HL60-granulocytes et est colocalisée avec la production de ROS. Toutefois, il est nécessaire de confirmer ces résultats sur des granulocytes issus de donneurs sains et de patients septiques.

Chapitre 2 Etude des fonctions antimicrobiennes des granulocytes immatures (GI) infectieux et non-infectieux et leur capacité à induire la réponse SOS bactérienne

I. Etude des fonctions antimicrobiennes des GI infectieux et non-infectieux en présence de la bactérie mCherry-*E.coli*

Certains patients septiques présentent un nombre augmenté de GI dans leur circulation sanguine associée à une diminution de leur pronostic vitale. Malheureusement les fonctions antimicrobiennes de ces GI sont très peu détaillées dans la littérature et nécessitent une étude approfondie afin de comprendre leur incapacité à détruire le pathogène pour pouvoir trouver des traitements adaptés aux patients. Dans cette étude nous utiliserons deux types de GI, des granulocytes issus de donneurs de cellules souches hématopoïétiques ayant reçu une dose du facteur G-CSF et des granulocytes issus de patients septiques. Les GI de donneur de cellules souches hématopoïétiques n'ont en théorie jamais rencontré de pathogène et sont donc considérés comme des granulocytes non pré-stimulés ou Not-prime (NP-GI), au contraire des GI de patients septiques (Septic-GI). Les fonctions de ces granulocytes seront comparées aux fonctions des neutrophiles de donneurs sains (HD-neutrophiles) très bien documentées dans la littérature.

I.1. Comparaison de la capacité des GI avec les neutrophiles à phagocyter et produire des ROS intracellulaires

Afin d'étudier la phagocytose et la production de ROS intracellulaire des granulocytes, ceux-ci ont été isolés par un tri magnétique négatif pour pouvoir éliminer les globules rouges et les autres cellules du système immunitaire (lymphocytes, macrophages, cellules dendritiques) comme expliqué dans la rubrique matériels et méthodes (II.2). Les granulocytes triés ont été ensuite incubés avec la bactérie mCherry-*E.coli* exprimant constitutivement le gène *mCherry*, ce qui permet de suivre la phagocytose par cytométrie en flux. Les fenêtres de la phagocytose ont été déterminées à partir de l'échantillon contenant les granulocytes avec mCherry-*E.coli* au temps 0 min. Dans la fenêtre des granulocytes ayant phagocyté mCherry-*E.coli*, les ROS ont été analysés à l'aide d'une sonde oxydative sensible pour les ROS, la sonde Deep Red (Figure 45).

Dans un premier temps les fonctions antimicrobiennes des GI non pré-stimulés (NP-GI) provenant de donneurs de cellules souches hématopoïétiques ont été comparées aux neutrophiles de donneurs sains (HD-neutrophiles). Dans un deuxième temps, les fonctions des GI de patients septiques (Septic-GI) ont été comparées à la fois aux NP-GI et aux HD-neutrophiles.

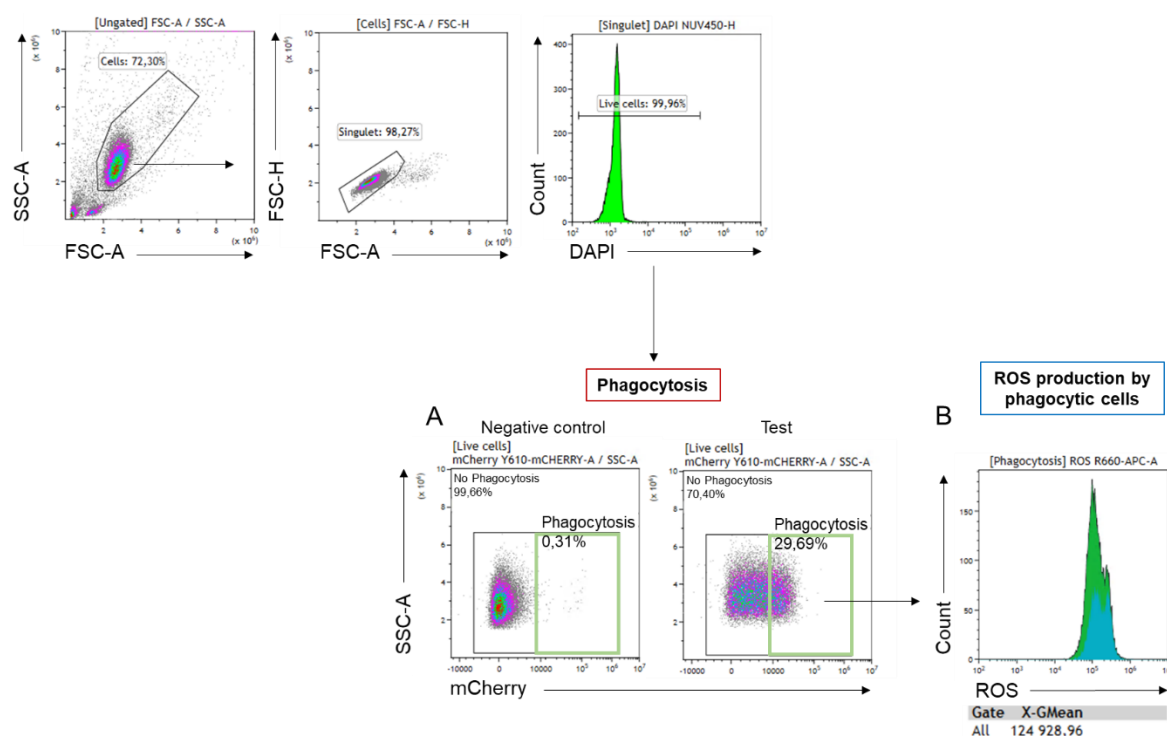


Figure 45 : Stratégie de fenêtrage d'analyse de la phagocytose et de la production de ROS des GI et des neutrophiles

Représentation des Density plots où les granulocytes ont été sélectionnés en fonction de leur taille (FSC-A) et de leur structure (SSC-A). Les débris cellulaires et doublets ont été éliminés afin de ne garder que les singulets (fenêtre FSC-H/FSC-A). A partir des cellules vivantes (fenêtre Count/DAPI), la phagocytose (A) a été analysée par l'expression du gène mCherry exprimé par les *E.coli* (mCherry-*E.coli*) en fonction de la structure (SSC-A) des granulocytes. La fenêtre de phagocytose a été déterminée à partir d'un contrôle négatif correspondant au temps 0 min (mCherry-*E.coli* + granulocytes). La production de ROS (B) a été évaluée à partir de la fenêtre des granulocytes ayant phagocyté mCherry-*E.coli*.

Les résultats montrent que les NP-GI phagocytent moins efficacement les bactéries que les HD-neutrophiles au cours du temps et ceux avec une différence significative (10 min : 1,99% vs 65,68%, $p < 0,002$; 30 min : 11,76% vs 90,26%, $p < 0,02$; 40 min : 20,02% vs 92,98%, $p < 0,02$; 60 min : 33,77% vs 90,81%, $p < 0,02$ et 90 min : 47,83% vs 95,13%, $p < 0,05$). De plus, nous pouvons constater qu'à 30 min, la phagocytose des bactéries par les HD-neutrophiles atteint rapidement un plateau par rapport aux NP-GI qui ne l'atteignent jamais (Figure 46A). Les résultats de la production de ROS n'ont pas été normalisés avec la production de ROS à l'état basal, car à la différence des HL60-granulocytes, les granulocytes humains produisent très peu de ROS en absence de stimulation (Figure 46B). Ainsi, la diminution de phagocytose est associée à une diminution significative de la production de ROS représenté en MFI, par les NP-GI lorsqu'ils sont comparés avec les HD-neutrophiles au cours du temps (30 min : 63 733 vs 229 780, $p < 0,02$; 40 min : 42 348 vs 220 641, $p < 0,0001$; 60 min : 32 558 vs 156 724, $p < 0,0001$ et 90 min : 26 462 vs 128 203, $p < 0,0001$). Cependant, pour les 2 types cellulaires la production de ROS est maximale à 30 min pour ensuite diminuer au cours du temps (Figure 46C).

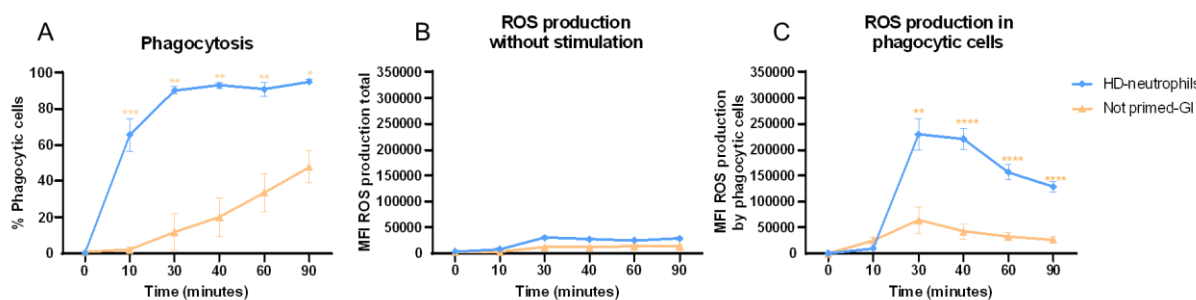


Figure 46 : Phagocytose et production de ROS par les non pré-stimulés GI

Les neutrophiles de donneurs sains (HD-neutrophiles) et les GI de donneurs de cellules souches hématopoïétiques (Not-primed (NP)-GI) ont été incubés avec la bactérie *mCherry-E.coli* à différents temps d'incubation (10, 30, 40, 60, 90 min). La phagocytose et la production de ROS ont été analysées par cytométrie en flux. **(A)** Les NP-GI (jaune, $n=5$) ont une moins bonne capacité à phagocyter que les HD-neutrophiles (bleu, $n=10$) au cours du temps. **(B)** A l'état basal, les granulocytes produisent de très faible concentration en ROS. **(C)** La diminution de phagocytose des NP-GI est associée à une diminution de production de ROS par les NP-GI en comparaison avec les HD-neutrophiles au cours du temps. La production de ROS présente un pic maximal à 30 min pour les 2 types cellulaires avec une diminution à partir de 40 min d'incubation. * Comparaison entre HD-neutrophils et Not-primed-GI pour le temps donné, test ANOVA, * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$.

Ces premiers résultats, contrairement au HL60-granulocytes, montrent une différence significative entre les NP-GI et les HD-neutrophiles. Toutefois, en condition septique, la persistance du pathogène associé à la forte présence de facteurs inflammatoires (cytokines, DAMPs) peuvent modifier le comportement des GI. Ainsi, la phagocytose et la production de ROS intracellulaire ont également été évaluées en présence de *mCherry-E.coli* à différents temps d'incubation par cytométrie en flux.

Les résultats montrent d'une part, que les GI de patients septiques (Septic-GI) présentent une diminution significative de la capacité à phagocyter *mCherry-E.coli* en comparaison avec les HD-neutrophiles au cours du temps (10 min : 1,99% vs 65,68%, $p<0,002$; 30 min : 12,09% vs 90,26%, $p<0,0001$; 40 min : 30,40% vs 92,98%, $p<0,02$; 60 min : 54,17% vs 90,81%, $p<0,05$). D'autre part, malgré une absence de différence significative, les Septic-GI semblent avoir une meilleure capacité à phagocyter que les NP-GI (Figure 47A).

Afin de donner un ordre d'idée du nombre de bactéries phagocytées par les GI, un calcul a été réalisé à partir des MFI des bactéries *mCherry* présent dans les granulocytes. Le calcul est basé sur le nombre maximal de bactéries phagocytées par les HD-neutrophiles. D'après la phagocytose des HD-neutrophiles (Figure 47A) et le ratio granulocyte/bactéries 1 :200, avec à 90 min 100% des HD-neutrophiles ayant phagocyté, nous estimons alors qu'un neutrophile a phagocyté 200 bactéries. Afin de déterminer la MFI d'une bactérie phagocytée, la MFI de *mCherry* obtenue dans la fenêtre de phagocytose a été divisée par 200. Puis afin d'obtenir le nombre relatif de bactéries phagocytées par neutrophiles, la MFI de *mCherry* à chaque temps d'incubation a été divisée par la MFI d'une bactérie. Ainsi, les résultats montrent une augmentation croissante du nombre de bactéries phagocytées par les HD-neutrophiles au

cours du temps (Figure 47B). En accord avec le pourcentage de granulocytes ayant fait la phagocytose, le nombre de bactéries phagocytées par les NP-GI et Septic-GI est significativement inférieur à celui des HD-neutrophiles pour les temps 30 min (37,42 et 28,42 vs 96,40, $p<0,05$ et $p<0,002$), 40 min (46,20 et 35,32 vs 129,31, $p<0,05$ et $p<0,02$), 60 min (55,47 et 50,97 vs 184,13, $p<0,0001$ et $p<0,02$) et 90 min (64,45 et 75,81 vs 200, $p<0,0001$) (Figure 47B).

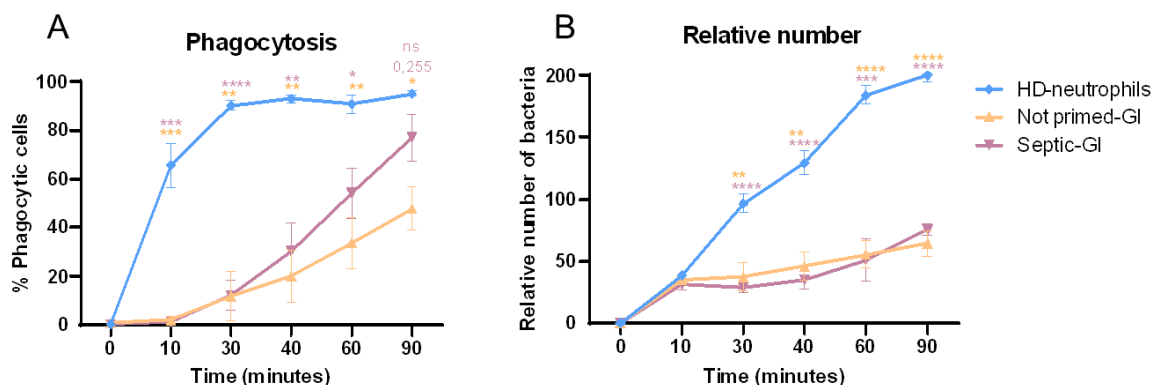


Figure 47 : Phagocytose et nombre relatif de bactérie phagocytée par les granulocytes

Les neutrophiles de donneurs sains (HD-neutrophiles), les GI de donneurs de cellules souches hématopoïétiques (Not-primed (NP)-GI) et les GI de patients septiques ont été incubées avec la bactérie mCherry-*E.coli* à différents temps d'incubation (10, 30, 40, 60, 90 min). La phagocytose a été analysée par cytométrie en flux. **(A)** Les Septic-GI (rose, $n=6$) et NP-GI (jaune, $n=5$) ont une moins bonne capacité à phagocyter que les HD-neutrophiles (bleu, $n=10$) au cours du temps. Malgré une absence de différence significative les Septic-GI présentent une meilleure phagocytose à partir de 40 min que les NP-GI. **(B)** Afin de calculer le nombre relatif de bactéries phagocytées par granulocytes, la MFI d'une bactérie a été calculée à partir des résultats obtenus par le pourcentage de cellules ayant fait la phagocytose. A 90 min, 100% des HD-neutrophiles ont réalisé la phagocytose. D'après notre ratio granulocytes par bactéries (1 :200), nous estimons qu'à 90 min les HD-neutrophiles ont phagocyté 200 bactéries. Ainsi, la MFI de mCherry obtenu dans la fenêtre de phagocytose a été divisée par 200 afin d'obtenir la MFI d'une bactérie. Puis, pour calculer le nombre de bactérie phagocytée au cours du temps par granulocyte, la MFI de mCherry à chaque temps d'incubation a été divisée par la MFI d'une bactérie. Les résultats montrent que le nombre de bactérie phagocytée par les NP-GI et Septic-GI est significativement inférieur à celui des HD-neutrophiles, qui lui augmentent de façon croissante au cours du temps. * Comparaison entre HD-neutrophils et Not-primed-GI ou * Septic-GI pour le temps donné, test ANOVA, * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$.

A l'état basal, les Septic-GI produisent de faibles quantités de ROS comme les 2 autres échantillons (Figure 48A). Comme pour les NP-GI, la diminution de phagocytose est associée à une diminution significative de la production de ROS intracellulaire par les Septic-GI lorsqu'elle est comparée aux HD-neutrophiles au cours du temps, avec un pic maximal à 30 min pour ensuite diminuer à partir de 40 min (30 min : 87 631 vs 229 780, $p<0,05$; 40 min : 58 471 vs 220 641, $p<0,0001$; 60 min : 38 649 vs 156 724, $p<0,0001$ et 90 min : 30 108 vs 128 203, $p<0,0001$). Toutefois, la production de ROS intracellulaire par les Septic-GI est similaire aux ROS produits par les NP-GI (Figure 48B).

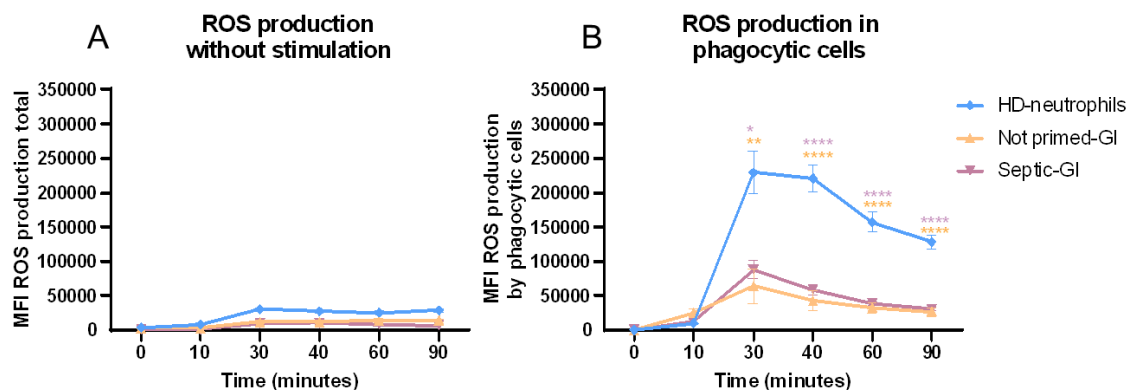


Figure 48 : Production de ROS par GI de patients septiques

Les neutrophiles de donneurs sains (HD-neutrophiles), les GI de donneur de cellules souches hématopoïétiques (Not-primed (NP)-GI) et les GI de patients septiques ont été incubées avec la bactérie mCherry-*E.coli* à différents temps d'incubation (10, 30, 40, 60, 90 min). La production de ROS a été analysée par cytométrie en flux. **(A)** A l'état basal, les granulocytes produisent de très faible concentration en ROS. **(B)** La diminution de phagocytose des Septic-GI (rose, $n=6$) et NP-GI (jaune, $n=5$) est associée à une diminution de production de ROS par ces GI en comparaison avec les HD-neutrophiles (bleu, $n=10$) au cours du temps. Les Septic-GI présentent la même capacité de production de ROS que les NP-GI avec un pic maximal à 30 min. * Comparaison entre HD-neutrophils et Not-primed-GI ou * Septic-GI pour le temps donné, test ANOVA, * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$.

Toutefois, la phagocytose des Septic-GI à 90 min rejoint celle des HD-neutrophiles (77,04% vs 95,13%, ns 0,255), tandis que celle des NP-GI reste inférieure à 60%. Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que les GI de patients septiques sont présents dans un environnement infectieux (PAMPs, DAMPs, cytokines) provoquant la pré-stimulation de ces GI. Alors que les GI de donneurs de cellules souches hématopoïétiques avant l'incubation avec mCherry-*E.coli* n'ont jamais rencontré de pathogènes et ne peuvent pas être pré-stimulés.

Afin de vérifier cette hypothèse, les NP-GI ont été incubés avec du plasma de patients septiques contenant les facteurs infectieux (cytokines, DAMPs, PAMPs), puis incubés avec les bactéries mCherry-*E.coli* afin d'analyser la phagocytose et la production de ROS par cytométrie en flux, comme précédemment. Ces NP-GI ont été comparés aux HD-neutrophiles ayant reçu la même pré-stimulation.

Les résultats montrent que la pré-stimulation des HD-neutrophiles avec le plasma de patients septiques (+priming) n'améliore pas leur capacité à phagocyter, ni à produire des ROS intracellulaires (Figure 49). Cependant, même s'il n'y a pas de différence significative, les NP-GI pré-stimulés avec le plasma de patients septiques présentent une amélioration de leur phagocytose au cours du temps (Figure 49A). A 90 min d'incubation, la phagocytose des NP-GI pré-stimulés est 2 fois plus importante que celle des NP-GI non pré-stimulés (81,2 vs 41,5, ns 0,06). De plus, la phagocytose des NP-GI pré-stimulés à 90 min tend à rejoindre le pourcentage des HD-neutrophiles (81,2 vs 98,67) (Figure 49A). Malgré une amélioration de la

capacité de phagocytose des NP-GI, celle-ci reste significativement inférieure à celle des HD-neutrophiles (30 min : 14,46% vs 76,42%, $p < 0,05$; 40 min : 32,03% vs 95,33%, $p < 0,002$; 60 min : 53,40% vs 156 724, $p < 0,05$). La pré-stimulation des NP-GI n'améliore pas leur capacité à produire des ROS intracellulaires qui restent inférieure à ceux produits par les HD-neutrophiles (Figure 49B). Toutefois, les HD-neutrophiles semblent avoir une production de ROS moins importante par rapport aux résultats obtenus précédemment (Figure 47B), ce qui montre la diversité des neutrophiles de donneurs sains.

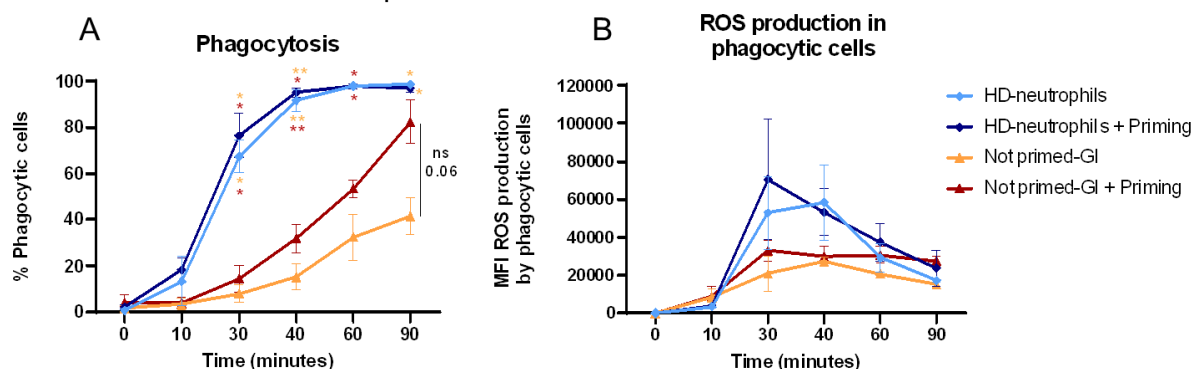


Figure 49 : Phagocytose et production de ROS par les NP-GI après une pré-stimulation avec du plasma de patients septiques

Les HD-neutrophiles et les NP-GI ont été pré-stimulés avec du plasma de patients septiques, puis incubés comme précédemment avec les bactéries mCherry-*E.coli* à différents temps (10, 30, 40, 60, 90min) et la phagocytose ainsi que la production de ROS ont été analysées par cytométrie en flux. **(A)** La phagocytose des HD-neutrophiles reste inchangée en absence (bleu clair, $n=3$) et en présence du plasma (bleu foncé, $n=3$). Alors que celle des NP-GI pré-stimulés (rouge, $n=3$) est augmentée en comparaison avec les NP-GI non pré-stimulés (jaune, $n=3$). Toutefois, la phagocytose des NP-GI en absence ou en présence de plasma reste inférieure à celle des HD-neutrophiles au cours du temps, même-ci les NP-GI pré-stimulés tendent à rejoindre la courbe des HD-neutrophiles à 90 min. **(B)** La production de ROS est inchangée en présence d'une pré-stimulation à la fois sur les HD-neutrophiles et sur les NP-GI. De plus, les NP-GI présentent une production de ROS inférieure à celle des HD-neutrophiles. * Comparaison entre HD-neutrophils ou HD-neutrophils + Priming avec Not primed-GI ou * Not primed-GI + Priming pour le temps donné, test ANOVA, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Lorsque l'on compare les NP-GI pré-stimulés avec les Septic-GI, les résultats montrent que les 2 courbes se superposent suggérant que les GI de patients septiques sont pré-stimulés par la persistance du pathogène dans l'organisme (Figure 50).

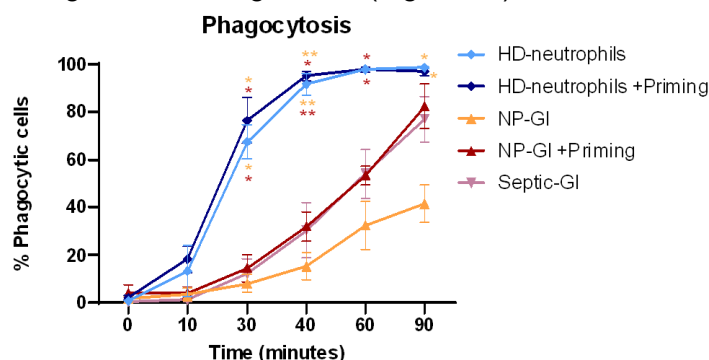


Figure 50 : Comparaison de la phagocytose des NP-GI pré-stimulés avec celle des Septic-GI

La courbe de phagocytose des NP-GI pré-stimulés est superposée avec celle des Septic-GI, prouvant que les Septic-GI (rose, $n=6$) présentent une pré-stimulation de leurs granulocytes dus à la persistance du pathogène et des facteurs infectieux (cytokines, DAMPs). * Comparaison entre HD-neutrophils ou HD-neutrophils + Priming avec Not primed-GI ou * Not primed-GI + Priming pour le temps donné, test ANOVA, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Ces résultats montrent que malgré une pré-stimulation des Septic-GI leur production de ROS est similaire à des GI qui n'ont jamais rencontré de pathogène (NP-GI, Figure 47B), responsable d'une mauvaise clairance du pathogène. Ainsi, la faible quantité de ROS par les GI de patients septiques est peut-être due à un dysfonctionnement au niveau des voies de signalisation, des gènes ou des protéines du complexe NADPH oxydase permettant l'activation et la production de ROS par ce complexe.

1.2. Comparaison des différences d'expression de la voie d'activation des sous-unités du complexe NADPH oxydase entre les GI et les neutrophiles

Durant une infection, les neutrophiles vont venir reconnaître le pathogène via leurs récepteurs (Fc γ R, TLR, CXCR, cytokines) exprimés à leur surface. La fixation pathogène/récepteurs déclenche une cascade d'activation protéique responsable de la phosphorylation, l'activation et l'assemblage du complexe NADPH oxydase afin de produire des ROS. Plusieurs voies d'activations sont activées par ces récepteurs pour l'induction des ROS, mais 2 protéines se retrouvent systématiquement activées par chaque récepteur, ce sont les protéines kinases ERK1/2 et p38MAPK.

Afin de comprendre la diminution de production de ROS par les GI après leur stimulation avec la bactérie mCherry-*E.coli*, 2 protéines kinases (ERK1/2 et p38MAPK) impliquées dans l'activation des protéines du complexe NADPH oxydase ont été analysées par Western blot (Figure 51A, D) et leur expression a été quantifiée par normalisation avec la protéine de ménage, l'actine.

Les résultats montrent une absence de différence d'expression de la forme non phosphorylée de la protéine ERK1/2 (ERK1/2), correspondant à la forme non activée entre les 3 groupes de granulocytes (HD-neutrophiles, NP-GI et Septic-GI) (Figure 51A, B). Malgré une absence de différence significative, les Septic-GI semblent exprimer plus fortement la forme phosphorylée d'ERK1/2 (p-ERK1/2) qui est la forme active, que les NP-GI et HD-neutrophiles au cours du temps, avec un pic maximal d'expression à 30 min (3,80 vs 1,50 et 1,78, ns 0,05 et 0,10) (Figure 51A, C). L'expression de p-ERK1/2 dans les NP-GI est similaire à celle exprimée par les HD-neutrophiles au cours du temps. Toutefois, en absence de stimulation (No stim) aucun granulocyte exprime p-ERK1/2 (Figure 51C).

Concernant la forme non phosphorylée de la protéine p38MAPK (p38), celle-ci est fortement exprimée au cours du temps par les NP-GI et Septic-GI en comparaison avec les HD-neutrophiles (Figure 51D, E). Le même résultat est observé pour la forme phosphorylée de p38MAPK (p-p38) avec une expression plus importante par les NP-GI en comparaison avec les Septic-GI et les HD-neutrophiles sans différence significative (Figure 51D, F).

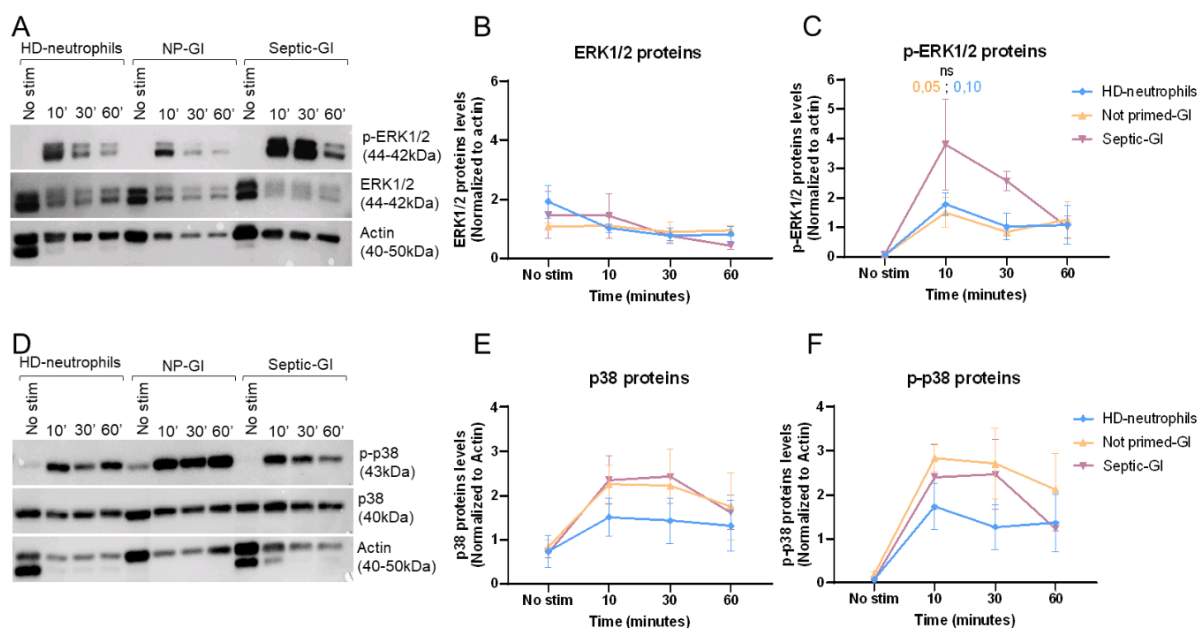


Figure 51 : Expression des protéines kinases ERK1/2 et p38MAPK par les NP-GI et Septic-GI

Deux protéines kinases, ERK1/2 et p38MAPK impliquées dans l'activation des protéines du complexe NADPH oxydase, ont été analysées par Western blot dans les GI, puis quantifié en normalisant leur expression avec la protéine de ménage l'actine. (A) Représentation des blots pour la protéine ERK1/2 dans sa forme phosphorylée ou non, avec la protéine de ménage, l'actine sur les échantillons HD-neutrophiles, NP-GI et Septic-GI à 3 temps d'incubation avec mCherry-*E.coli* (10, 30, 60 min). (B) Aucune différence d'expression de la forme non phosphorylée étant la forme non active de la protéine ERK1/2 pour les 3 groupes d'échantillons. (C) La forme phosphorylée de la protéine ERK1/2 (p-ERK1/2) semble être plus fortement exprimée par les Septic-GI (rose, $n=3$) que les NP-GI (jaune, $n=3$) et les HD-neutrophiles (bleu, $n=3$) au cours du temps avec un pic maximal d'expression à 30 min. (D) Représentation des blots pour la protéine p38MAPK dans sa forme non phosphorylée et phosphorylée, avec la protéine de ménage, l'actine sur les échantillons HD-neutrophiles, NP-GI et Septic-GI à 3 temps d'incubation avec mCherry-*E.coli* (10, 30, 60 min). (E) La forme non phosphorylée de la protéine p38MAPK (p38) est plus exprimée par les Septic-GI et les NP-GI que les HD-neutrophiles au cours du temps. (F) La forme phosphorylée de la protéine p38MAPK (p-p38) est plus fortement exprimée par les NP-GI, puis les Septic-GI en comparaison avec les HD-neutrophiles. Test ANOVA.

D'une part, ces résultats informent que les Septic-GI possèdent des voies de signalisations suractivées via les protéines ERK1/2 et p38MAPK, et seulement via p38MAPK pour les NP-GI. D'autre part, ceci informe que la diminution de capacités à produire des ROS par les GI ne passe pas par l'activation des voies de signalisation, mais peut-être par les gènes du complexe NADPH oxydase.

I.3. Comparaison des différences d'expression des gènes du complexe NADPH oxydase entre les GI et les neutrophiles

Comme expliqué précédemment (Chapitre 1, II.3), les protéines ($gp91^{phox}$, $p22^{phox}$, $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ et $p40^{phox}$) du complexe NADPH oxydase en absence de stimulation sont séparées et elles s'assemblent lorsque le neutrophile est stimulé par la présence des facteurs inflammatoires (PAMPs, DAMPS, cytokines). L'expression des gènes de ces 5 protéines exprimées par les granulocytes a été analysée par RTqPCR après leur stimulation avec

mCherry-*E.coli* à différents temps (10, 30, 60 min) et normalisée avec le gène de ménage GAPDH.

L'expression des gènes codant pour les protéines cytoplasmiques (*NCF1*, *NCF2* et *NCF4*) est très faiblement exprimée, voire quasi absents des NP-GI, et cette expression ne varie pas au cours du temps lorsqu'ils sont comparés aux gènes exprimés par les Septic-GI et HD-neutrophiles (Figure 52A). Toutefois, l'expression de ces mêmes gènes par les Septic-GI est plus exprimée que les NP-GI mais leur expression est inférieure à celle des HD-neutrophiles avec une légère diminution à 90 min pour les Septic-GI et HD-neutrophiles (Figure 52A). A l'inverse, les NP-GI présentent une expression augmentée du gène *CYBB*, suivie par les Septic-GI en comparaison avec les HD-neutrophiles (Figure 52C). Aucune différence d'expression du gène *CYBA* est visualisée entre les Septic-GI, NP-GI et HD-neutrophiles et au cours du temps (Figure 52B).

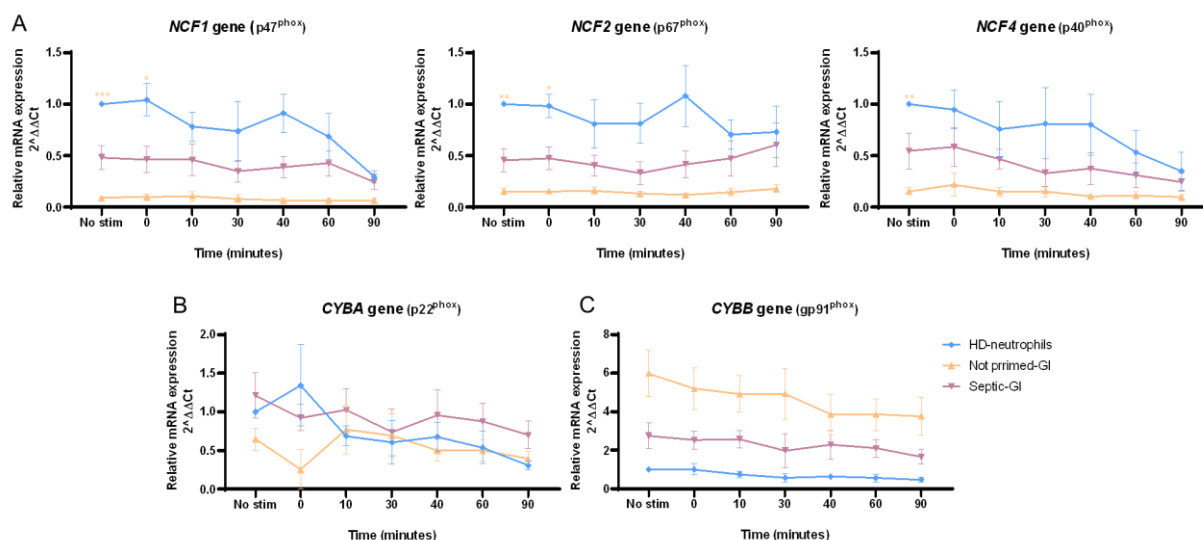


Figure 52 : Expression des gènes du complexe NADPH oxydase par les GI et neutrophiles en présence de *mCherry-E.coli*

Les gènes du complexe NADPH oxydase *NCF1*, *NCF2*, *NCF4*, *CYBA* et *CYBB* codent respectivement pour les protéines $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$, $gp91^{phox}$ et $p22^{phox}$, ont été analysés dans les GI de patients septiques et de donneurs de moelle osseuse, ainsi que dans les neutrophiles de donneurs sains par RTqPCR avant et après stimulation avec la bactérie *mCherry-E.coli* à différents temps d'incubation. (A) L'expression des gènes codant pour les protéines cytoplasmiques est quasi absente des NP-GI sans variation de leur expression au cours du temps. L'expression de ces mêmes gènes par les Septic-GI est plus exprimée que les NP-GI mais leur expression reste inférieure à celle des HD-neutrophiles. (B) Aucune différence d'expression du gène *CYBA* au cours du temps entre les NP-GI, Septic-GI et HD-neutrophiles. (C) A l'inverse, les Septic-GI expriment plus fortement le gène *CYBB* que les HD-neutrophiles mais leur expression est inférieure à celle des NP-GI. * Comparaison entre HD-neutrophils et Not primed-GI pour le temps donné, test ANOVA, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Ces résultats montrent que les NP-GI et Septic-GI expriment fortement le gène *CYBB* codant pour la protéine $gp91^{phox}$, et à l'inverse faiblement les gènes *NCF1*, *NCF2* et *NCF4* codant respectivement pour les protéines $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ et $p40^{phox}$. D'après ces résultats, les NP-GI et Septic-GI présentent des différences de régulation de l'expression des gènes du complexe

NADPH oxydase mais n'informe pas sur la fonctionnalité de celui-ci. Ainsi, afin de mieux comprendre la diminution de production de ROS, la quantité protéique de gp91^{phox} et p47^{phox} va être vérifiée.

1.4. Comparaison des différences d'expression des protéines du complexe NADPH oxydase entre les GI et neutrophiles

Les protéines gp91^{phox} et p47^{phox} des NP-GI, Septic-GI et HD-neutrophiles ont été analysées par Western Blot avant et après différentes périodes de stimulation avec des bactéries mCherry-*E.coli* (10, 30 et 60 min). Comme précédemment, les protéines ont été quantifiées et normalisées par rapport au gène de ménage, l'actine.

Les résultats montrent qu'en absence de stimulation (No stim), les Septic-GI semblent avoir une quantité de protéines p47^{phox} plus importantes que les NP-GI et HD-neutrophiles. Néanmoins, alors que les 2 types de GI vont faiblement répondre à la stimulation bactérienne, une augmentation nette et rapide de p47^{phox} dans les HD-neutrophiles est observée pendant les 30 premières minutes (Figure 53A).

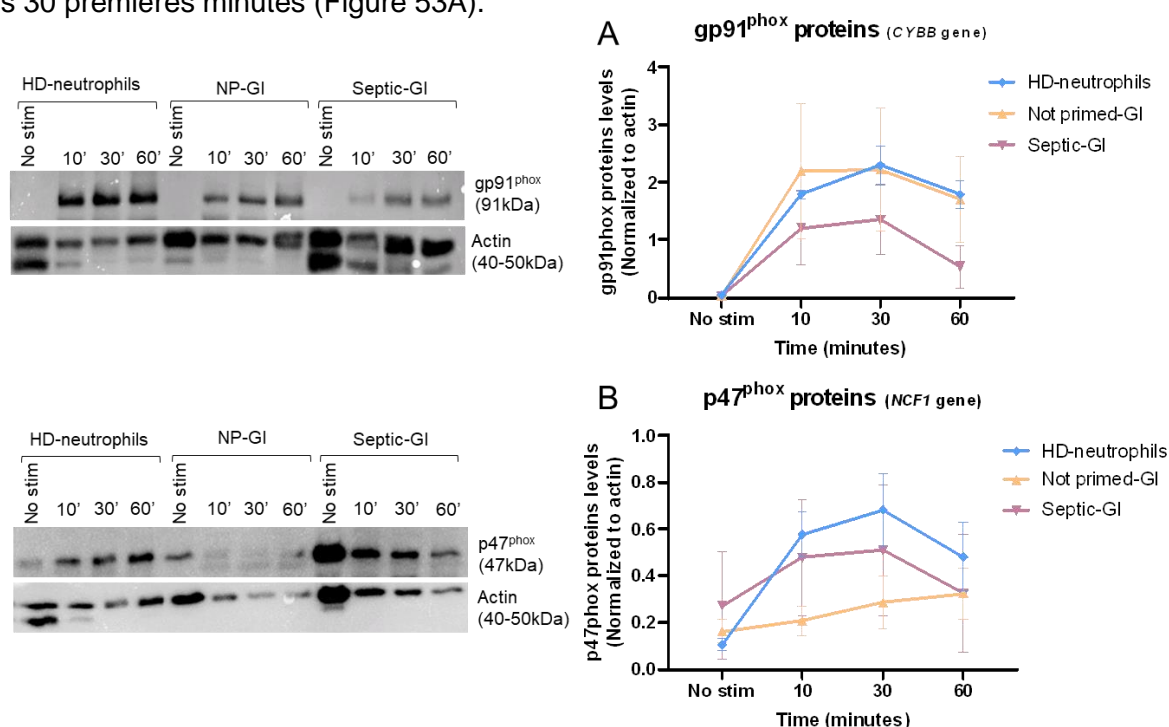


Figure 53 : Expression des protéines p47^{phox} et gp91^{phox} par les NP-GI, Septic-GI et HD-neutrophiles

Deux protéines du complexe NADPH oxydase, p47^{phox} et gp91^{phox}, ont été analysées par Western blot dans les GI et les neutrophiles, puis quantifiées en normalisant leur expression avec la protéine de ménage l'actine. **(A)** La protéine p47^{phox} est fortement exprimée par les Septic-GI (rose, n=3) en absence de stimulation (no stim) que les HD-neutrophiles (bleu, n=3). Après stimulation, les Septic-GI et NP-GI (jaune, n=3) expriment moins de protéines p47^{phox} que les HD-neutrophiles au cours du temps. **(B)** La protéine gp91^{phox} semble être exprimée de façon similaire par NP-GI que les HD-neutrophiles, mais les Septic-GI expriment moins cette protéine. Les HD-neutrophiles présentent un pic d'expression des 2 protéines à 30min pour ensuite diminuer à 60 min.

L'étude de la seconde protéine du complexe NADPH oxydase montre que la protéine gp91^{phox} n'est pas détectable à l'état basal. Toutefois, après 10min d'incubation, les résultats montrent que les NP-GI expriment la même quantité de protéines gp91^{phox} que les HD-neutrophiles. A l'inverse, les Septic-GI expriment une quantité diminuée au cours du temps de cette protéine en comparant avec les HD-neutrophiles et NP-GI. Cependant, en absence de stimulation, les granulocytes semblent ne pas exprimer gp91^{phox} (Figure 53B).

Ces résultats indiquent que la régulation du complexe NADPH oxydase est rapide dans le temps. De plus, l'expression de la protéine p47^{phox} est diminuée chez les Septic-GI et NP-GI en comparaison avec les HD-neutrophiles. Malgré une forte expression du gène *CYBB* par les Septic-GI et NP-GI, l'expression de la protéine gp91^{phox} est diminuée seulement dans les Septic-GI. Ces résultats sont en accord avec ce que l'on a observé par cytométrie en flux, à savoir une diminution de production de ROS par les Septic-GI. En effet, si une protéine du complexe NADPH oxydase est manquante ou en faible concentration, peu de complexes NADPH oxydase peuvent se former, se résultant par une diminution de production de ROS. L'expression de ces 2 protéines par les HD-neutrophiles présente un profil similaire à la production de ROS observée dans la partie I.1, à savoir un pic maximal d'expression à 30 min pour ensuite diminuer à 60 min (Figure 53).

Nous avons vu dans le chapitre 1 que les HL60-GI étaient capables d'induire plus fortement la réponse SOS bactérienne que les HL60-neutrophiles en lien avec leur faible production de ROS. Nous avons vu également que les NP-GI et les Septic-GI produisaient de faibles concentrations de ROS, ainsi l'induction de la réponse SOS bactérienne doit être confirmée.

I.5. Capacité des GI et neutrophiles à induire la réponse SOS bactérienne de mCherry-*E.coli* dans leur phagosome

Comme nous l'avons vu précédemment, lors d'un stress oxydatif, les bactéries peuvent induire leur réponse SOS ce qui leur permet de survivre. Au cours de cette réponse des éléments génétiques mobiles contenant des gènes de résistances aux antibiotiques peuvent s'insérer ou se réarranger responsable de la survie des bactéries malgré la présence d'antibiotiques. L'induction de la réponse SOS a pu être suivie par cytométrie en flux dans les granulocytes ayant fait de la phagocytose, grâce à l'expression de la GFP portée par un plasmide dans la bactérie mCherry-*E.coli*/pPsfIA ::gfp.

Les fenêtres pour évaluer l'induction de la réponse SOS ont été déterminées à partir de 2 contrôles : un contrôle négatif étant une mCherry-*E.coli* portant le plasmide avec le gène de la GFP mais sans promoteur, et un contrôle positif (mCherry-*E.coli*) portant un plasmide dans

lequel le gène de la GFP est sous le contrôle du promoteur *PsfIA* dont la boîte LexA est mutée permettant son expression constitutive (Figure 54).

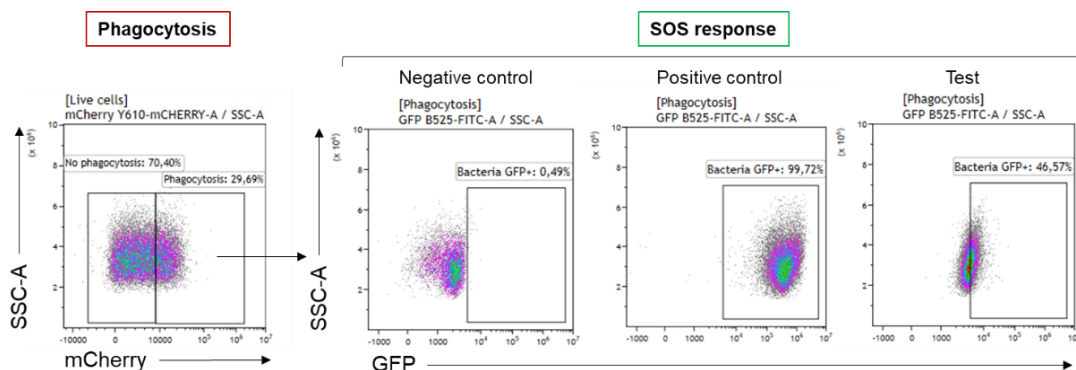


Figure 54 : Stratégie de fenêtrage pour analyser l'induction de la réponse SOS par les granulocytes

L'induction de la réponse SOS bactérienne dans les granulocytes réalisant la phagocytose a été déterminée à partir de 2 contrôles bactériens : un contrôle négatif correspondant à une bactérie mCherry-*E.coli* exprimant un plasmide dans lequel se trouve le gène de la GFP sous aucun promoteur, et un contrôle positif étant aussi une mCherry-*E.coli* avec un plasmide contenant le gène de la GFP mais sous le contrôle d'un promoteur muté responsable de l'induction de la GFP en continu.

Les résultats de la réponse SOS sont représentés graphiquement par le pourcentage de bactérie GFP+ en fonction des différents temps d'incubation. Les résultats montrent que les NP-GI et les HD-neutrophiles sont capables d'induire la réponse SOS bactérienne au cours du temps. Mais les NP-GI induisent plus rapidement et de façon plus importante la réponse SOS avec une différence significative du pourcentage de bactéries GFP+ phagocytées par les NP-GI à 30 min que les HD-neutrophiles (62,23% vs 19,14%, $p < 0,05$) (Figure 55).

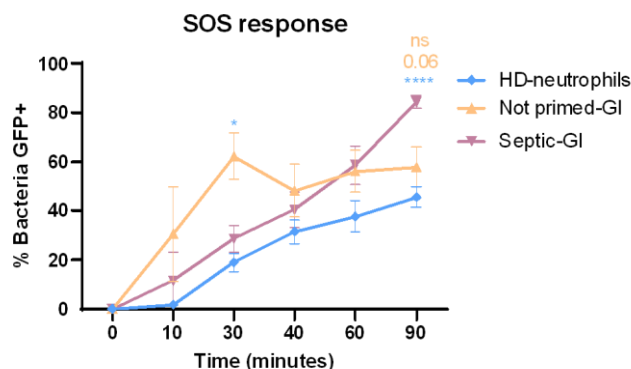


Figure 55 : Représentation graphique de la réponse SOS bactérienne dans les NP-GI et Septic-GI

L'induction de la réponse SOS bactérienne est représentée par le pourcentage de bactéries GFP+ en fonction du temps. Les NP-GI induisent plus rapidement et de façon plus intense la réponse SOS que les HD-neutrophiles avec une différence significative à 30 min (62,23% vs 19,14%, $p < 0,05$) pour ensuite former un plateau à partir de 40 min. Les Septic-GI induisent une réponse SOS plus rapidement que les HD-neutrophiles avec une différence significative à 90 min (84,46% vs 45,62%, $p < 0,0001$), mais moins que les NP-GI jusqu'à 40 min, puis les Septic-GI présentent un pourcentage de bactérie GFP+ plus importante que les NP-GI sans différence significative (84,46% vs 55,76%, ns 0,06). * Comparaison entre HD-neutrophils et Not primed-GI ou Septic-GI pour le temps donné, test ANOVA, * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$.

Ainsi, ces résultats montrent que les GI non pré-stimulés (NP-GI) sont capables d'induire la réponse SOS bactérienne à partir de 10 min d'incubation avec un pic maximal à 30 min en accord avec le pic maximal de la production de ROS (Figure 46B), pour ensuite former un plateau à partir de 40 min (Figure 55). La réponse SOS bactérienne induite par les Septic-GI est moins importante que les NP-GI dans les 30 premières minutes mais plus importantes que les HD-neutrophiles au cours du temps (Figure 55). Toutefois, cette induction par les Septic-GI augmente continuellement au cours du temps avec une différence significative à 90 min d'incubation en comparaison avec les HD-neutrophiles (84,46% vs 45,62%, $p < 0,0001$), mais également en comparaison avec les NP-GI sans toutefois montrer de différence significative (84,46% vs 55,76%, ns 0,06) (Figure 55). Cette différence peut s'expliquer par le fait que les Septic-GI phagocytent mieux que les NP-GI donc un plus grand nombre de bactéries activent cette réponse via la faible quantité de ROS dans le granulocyte.

Cependant, afin de vérifier que la réponse SOS est induite par les ROS produits par le complexe NADPH oxydase, des neutrophiles provenant d'un patient atteint de la maladie chronique granulomateuse (CGD) sont utilisés. Les neutrophiles de patients CGD ne peuvent pas produire des ROS via le complexe NADPH oxydase car ils présentent une mutation du gène *CYBB* codant pour la protéine gp91^{phox}, rendant le complexe inactif. Cependant, ces patients peuvent produire des ROS via d'autres mécanismes cellulaires tels que la mitochondrie. Ainsi, les neutrophiles de patient CGD (CGD-neutrophiles) ont été incubés en présence de la bactérie mCherry-*E.coli/pPsfIA::gfp* où la phagocytose, la production de ROS et la réponse SOS ont été analysées par cytométrie en flux (Figure 56).

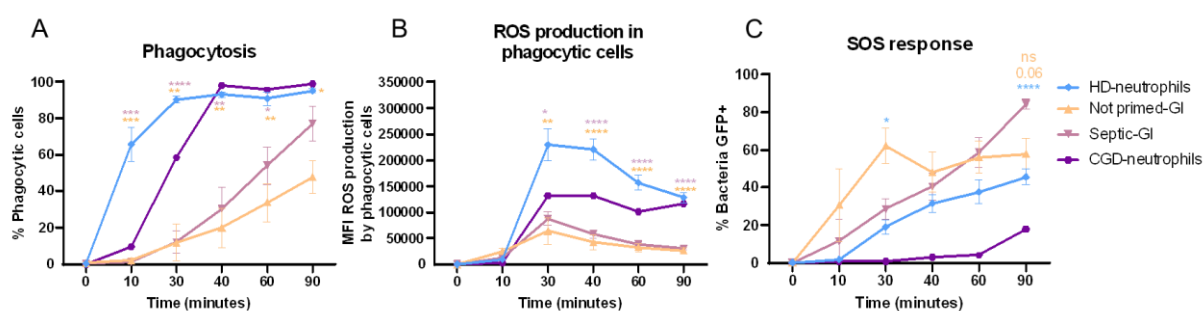


Figure 56 : Phagocytose, production de ROS et induction de la réponse SOS par les CGD-neutrophiles

Les neutrophiles de patients atteints de la maladie chronique granulomateuse (CGD) ont été incubés avec la bactérie mCherry-*E.coli*, afin de vérifier que ce sont les ROS du complexe NADPH oxydase qui induit la réponse SOS bactérienne. Ces neutrophiles présentent un dysfonctionnement du complexe NADPH oxydase incapable de produire des ROS via ce complexe. (A) Les neutrophiles de patients CGD (CGD-neutrophiles, violet, $n=1$) ont la même capacité de phagocytose que les HD-neutrophiles. (B) Les CGD-neutrophiles produisent moins de ROS que les HD-neutrophiles mais plus que les NP-GI et Septic-GI, probablement dû aux ROS produit par la mitochondrie. (C) Faible induction de la réponse SOS, voire quasi absente par les CGD-neutrophiles en comparaison avec les 3 autres types cellulaires. * Comparaison entre HD-neutrophils et * Not primed-GI ou * Septic-GI pour le temps donné, test ANOVA, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Les résultats montrent que les CGD-neutrophiles n'ont pas de problème de phagocytose des bactéries, puisqu'ils phagocytent autant que les HD-neutrophiles avec un plateau à 40 min

(Figure 56A). Toutefois, la sonde oxydative sensible aux ROS a mis en évidence une production de ROS inférieure à celle des HD-neutrophiles mais plus importante que celle des Septic-GI et NP-GI (Figure 56B). La visualisation de cette production de ROS peut s'expliquer par le fait que la sonde ne cible pas spécifiquement les ROS produits par le complexe NADPH oxydase mais qu'elle est oxydée par la présence de l'ensemble des ROS produits par d'autres systèmes (mitochondrie, enzymes) qui ne sont pas altérés. Cependant, une légère induction de la réponse SOS bactérienne est visualisée étant inférieure aux HD-neutrophiles, Septic-GI et NP-GI (Figure 56C), pouvant être causée par la présence des peptides antimicrobiens induisant un stress à la bactérie.

Ces résultats prouvent d'une part que ce sont principalement les ROS produits par le complexe NADPH oxydase qui induisent la réponse SOS bactérienne, et d'autre part qu'elle s'active en présence de faible concentration de ROS. L'ensemble de ces résultats est en accord avec ce que l'on a démontré avec les HL60-GI de la lignée cellulaire, à savoir une faible capacité à phagocyter, une diminution de production de ROS et une induction de la réponse SOS. Pour confirmer ces résultats, les capacités de phagocytoses, production de ROS et d'induction de la réponse SOS bactérienne par les HD-neutrophiles et les Septic-GI ont été analysées par microscopie confocale.

1.6. Visualisation de la phagocytose, production de ROS et induction de la réponse SOS bactérienne à l'intérieur des GI de patients septiques et de donneurs cellules souches hématopoïétiques

Afin de confirmer que la réponse SOS a lieu à l'intérieur des granulocytes, les Septic-GI et HD-neutrophiles ont été incubés avec la bactérie mCherry-*E.coli/pPsfIA::gfp* à différents temps d'incubation (30, 40, 60, 90 min), puis leurs filaments d'actine ont été colorés avec la phalloïdine et analysés par microscopie confocale.

Les résultats mettent en évidence que les NP-GI présentent moins de bactéries (rouges) intracellulaires que les Septic-GI et les HD-neutrophiles au cours du temps. Tandis que les Septic-GI semblent avoir un nombre plus augmenté de bactéries intracellulaires que les NP-GI, mais plus faible que les HD-neutrophiles pendant les 60 premières minutes d'incubation. A 90 min d'incubation, comme les résultats de cytométrie en flux le montrent (Figure 47A), les Septic-GI semblent présenter un nombre s'approchant de celui des neutrophiles de donneurs sains. Toutefois, la microscopie confocale permet de montrer d'une part que les GI induisent de façon plus importante la réponse SOS que les HD-neutrophiles par l'absence de bactéries vertes. D'autre part, ces images mettent en évidence que les bactéries activant la réponse

SOS (vertes) sont localisées à l'intérieur des granulocytes au cours du temps, et aucune bactérie verte n'est localisée en extracellulaire (Figure 57).

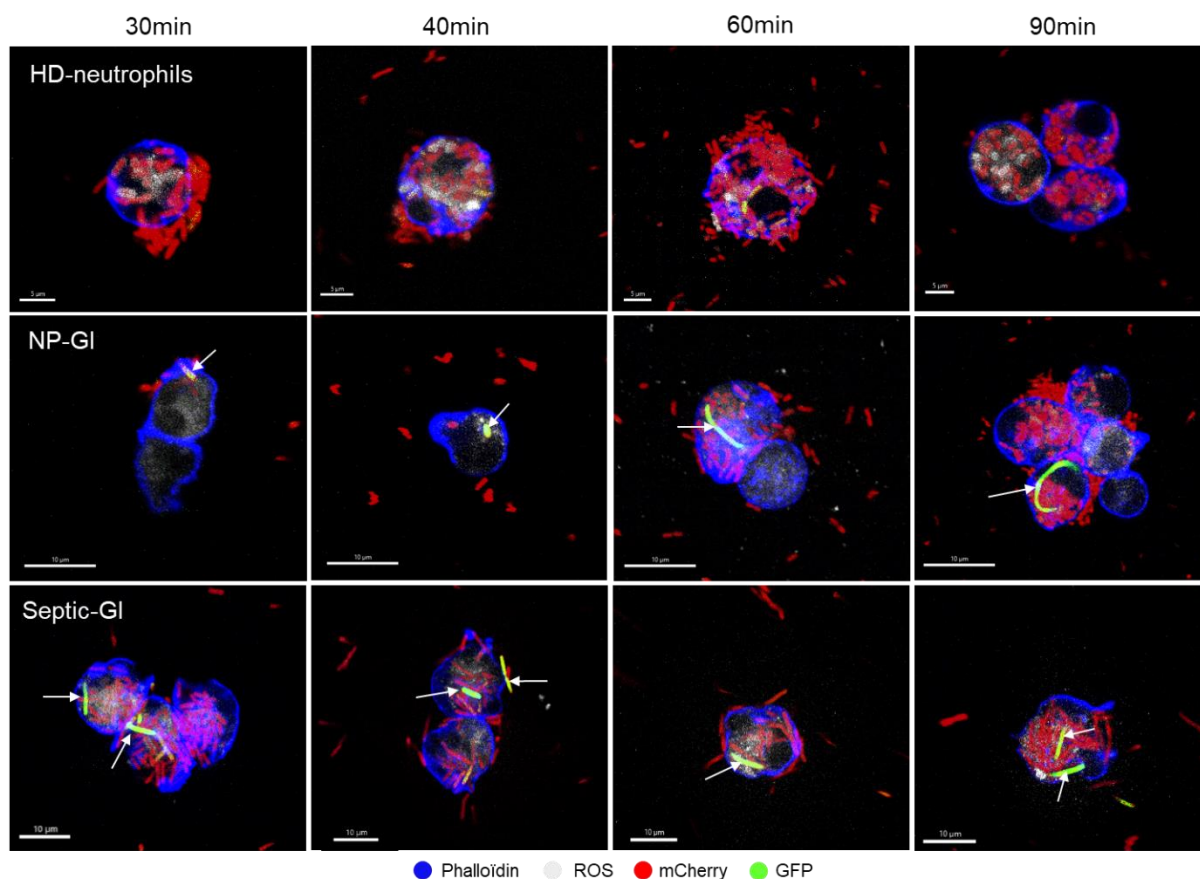


Figure 57 : Visualisation de l'induction de la réponse SOS bactérienne à l'intérieur de GI par microscopie confocale

Les granulocytes de l'ensemble des donneurs et patients ont été incubés avec la bactérie mCherry-*E.coli* (rouge) à différents temps d'incubation (30, 40, 60, 90 min) puis colorés avec la phalloïdine (bleu) afin de colorer les filaments d'actine des granulocytes. Ces résultats montrent que la réponse SOS bactérienne (vert, flèches blanches) est principalement induite par les NP-GI et Septic-GI, et ces bactéries se trouvent localisés à l'intérieur des granulocytes. De plus, les NP-GI et Septic-GI phagocytent moins que les HD-neutrophiles. Mais à 90 min les Septic-GI semblent avoir un nombre de bactéries qui s'approche de celui des HD-neutrophiles.

En conclusion, ces résultats confirment ce que l'on a pu voir avec les HL60-GI, à savoir une diminution des fonctions antimicrobiennes (phagocytose et production de ROS) au cours du temps des GI provenant à la fois de donneurs de cellules souches hématopoïétiques et de patients septiques. Toutefois, les GI de patients septiques présentent une meilleure capacité à phagocyter que ceux des donneurs de cellules souches hématopoïétiques dues à la pré-stimulation des Septic-GI, mais n'améliorant pas la production de ROS au cours du temps. Ceci peut s'expliquer par le fait que ces GI expriment faiblement 2 protéines du complexe NADPH oxydase ($gp91^{phox}$ et $p47^{phox}$) limitant la formation du complexe et donc la production de ROS malgré des voies de signalisation suractivées. De plus, tout comme les HL60-GI, les Septic-GI et NP-GI induisent la réponse SOS sur un plus grand nombre de bactéries se trouvant dans les granulocytes que les HD-neutrophiles.

Cependant, les GI présents dans la circulation sanguine des patients septiques sont associés à une diminution de leur pronostic vital. Toutefois, leur phénotype reste peu décrit et son étude pourrait apporter des précisions sur les fonctions antimicrobiennes des GI.

II. Caractérisation des GI infectieux, non-infectieux et neutrophiles en présence de la souche bactérienne mCherry-*E.coli*

Nous avons fait le choix de caractériser les granulocytes par l'expression des récepteurs présents à leur surface. L'identification des récepteurs permettrait de savoir si les GI sont une population homogène ou hétérogène, permettrait de mieux les identifier qui pour le moment sont identifiés comme étant CD11b⁺ CD16^{-low}, afin de déceler l'état septique du patient plus rapidement. Mais cela permettrait également un meilleur tri des GI avec la forme mature et les autres granuleux (éosinophiles, basophiles) afin de mieux les étudier pour trouver de potentiels traitements qui les rendraient plus fonctionnels dans la clairance des bactéries.

Plusieurs récepteurs impliqués dans l'identification et la fonction des granulocytes ont été visualisés avant et après leur incubation avec la bactérie *E.coli* à différents temps et analysés par cytométrie en flux. Les GI de donneurs de moelle osseuse (NP-GI) et de patients septiques (Septic-GI) ont été comparés avec les neutrophiles de donneurs sains (HD-neutrophiles). Le phénotype du patient CGD (CGD-neutrophiles) a aussi été étudié et comparés aux autres échantillons de l'étude. Les résultats sont exprimés en moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) de chaque récepteur en fonction des temps d'incubation.

II.1. Expression des récepteurs caractéristiques des granulocytes

Les granulocytes sont issus d'une succession de différenciation à partir des cellules myéloïdes progénitrices (CMP). Ces cellules immatures, lorsqu'elles s'engagent à se différencier en granulocytes vont exprimer le marqueur CD15.

Les résultats montrent que malgré une absence de différence significative, l'expression de CD15 par les HD-neutrophiles diminue drastiquement à 90 min d'incubation. Le même profil d'expression est observé pour les CGD-neutrophiles. Malgré une absence de différence significative, les NP-GI et les Septic-GI semblent moins exprimer le récepteur CD15 sans variation d'expression au cours du temps en comparaison à la fois avec les HD-neutrophiles et les CGD-neutrophiles. De plus, il ne semble pas y avoir de différence d'expression du CD15 entre les GI provenant de donneur de cellules souches hématopoïétiques et les GI de patients septiques étant pré-stimulés. Toutefois l'expression de ce marqueur par les GI prouve que ce

sont des granulocytes et que l'expression ne change pas en présence de bactéries (Figure 58).

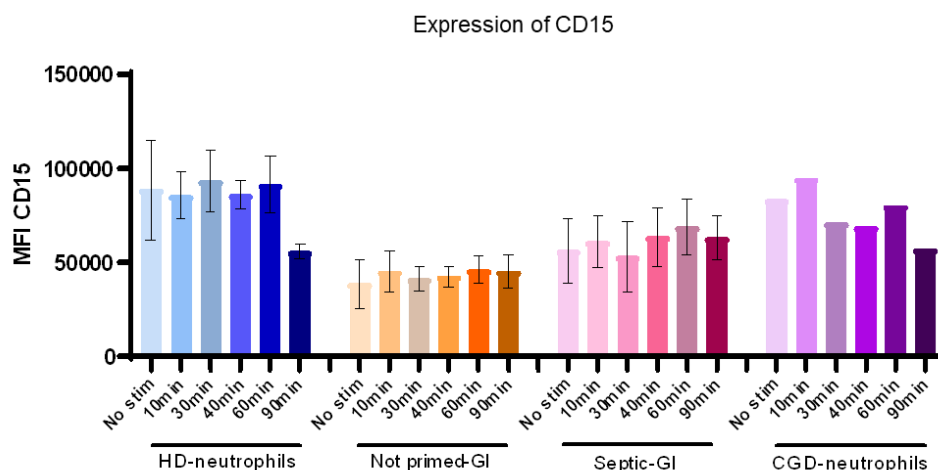


Figure 58 : Expression du marqueur myéloïde CD15 par les GI

Le marqueur CD15 est présent sur l'ensemble de la lignée granulocytaire, de la forme immature à la plus mature. En absence de différence significative, les NP-GI (jaune/orange, $n=5$) et Septic-GI (rose/rouge, $n=5$) semblent moins exprimer le CD15 que les neutrophiles de donneurs sains (HD-neutrophiles, bleu, $n=6$) et de patient CGD (CGD-neutrophiles, violet, $n=1$) sans de variation d'expression au cours du temps. Tandis que celle-ci diminue drastiquement à 90 min pour les neutrophiles. De plus, les Septic-GI malgré leur pré-stimulation semblent exprimer de façon similaire le marqueur CD15 à leur surface que les NP-GI.

La forme mature des granulocytes, les neutrophiles sont connus pour exprimer un autre marqueur d'identification des granulocytes, c'est le marqueur CD10. Cependant, il est connu que les formes immatures des granulocytes n'expriment pas ou faiblement ce marqueur.

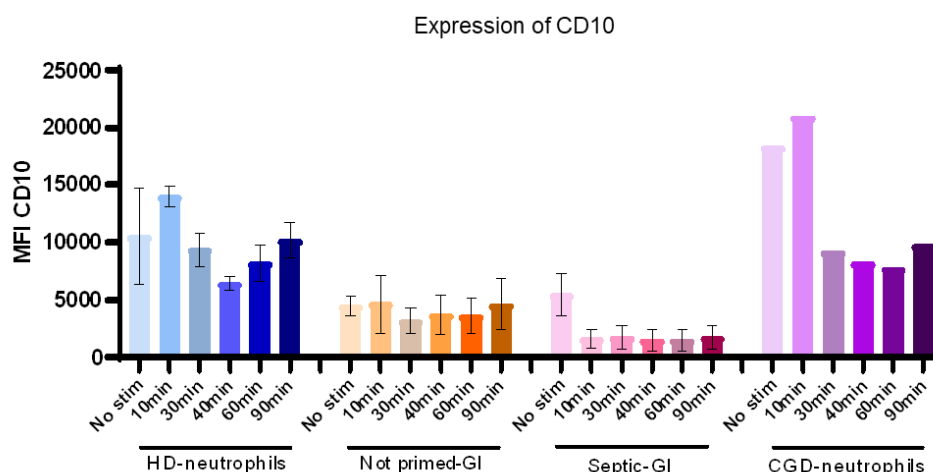


Figure 59 : Expression du marqueur CD10 par les granulocytes

Les neutrophiles expriment le marqueur CD10 tandis que la forme immature ne l'exprime pas. Les HD-neutrophiles (bleu $n=6$) et CGD-neutrophiles (violet $n=1$) présentent une augmentation non significative d'expression de CD10 après stimulation avec les bactéries à 10 min, suivie d'une diminution avec de nouveau une augmentation d'expression à 90 min. Les NP-GI (jaune/orange, $n=5$) expriment faiblement CD10 en comparaison avec les HD-neutrophiles et CGD-neutrophiles, mais sans variation d'expression au cours du temps. Les Septic-GI (rose/rouge, $n=5$) expriment faiblement CD10 en comparaison aux neutrophiles, avec une diminution rapide de CD15 après stimulation avec les bactéries.

Les résultats montrent que les HD-neutrophiles présentent une expression très variée de CD10 au cours du temps. En effet, d'après la représentation graphique, l'expression de CD10 augmente à 10 min d'incubation suivie d'une diminution de son expression à 30 et 40 min, avec un retour à la normale à 90 min (Figure 59, en bleu). L'expression de CD10 par les CGD-neutrophiles est similaire à celle des HD-neutrophiles mais son expression continue de diminuer jusqu'à 60 min d'incubation avec une légère augmentation à 90 min (Figure 59, en violet). Les NP-GI expriment faiblement le marqueur CD10 et ne présentent pas de variation au cours du temps (Figure 59, en jaune/orange). Tandis que les Septic-GI, expriment plus faiblement CD10 en absence de stimulation (No stim) en comparaison avec les HD-neutrophiles et les CGD-neutrophiles. Lorsque les Septic-GI sont stimulés l'expression de CD10 diminue drastiquement à 10 min pour rester stable au cours du temps (Figure 59, en rose).

II.2. Expression d'un récepteur impliqué dans la migration des granulocytes

Durant une infection, les neutrophiles circulants doivent migrer de la circulation sanguine vers les tissus infectés, et un des récepteurs impliqués dans cette migration, est l'intégrine CD11b. Comme pour le CD15 et le CD10, l'expression de cette intégrine a été étudiée en absence et en présence de la bactérie *E.coli* à différents temps d'incubation.

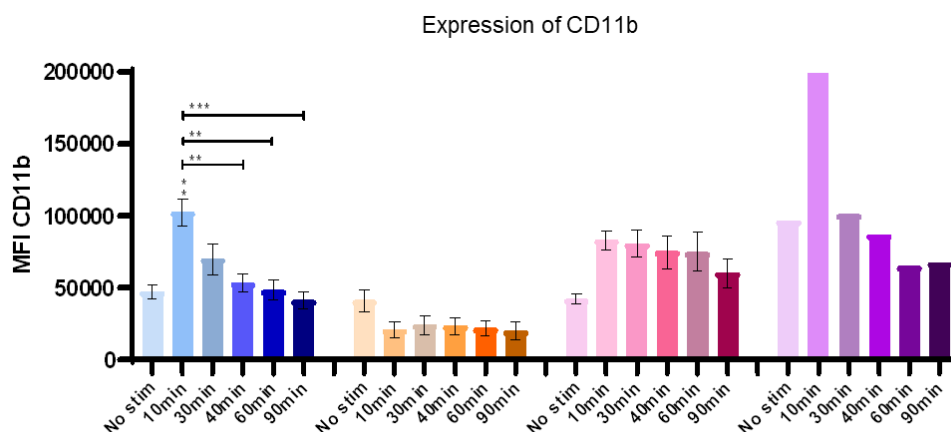


Figure 60 : Expression de CD11b étant un récepteur impliqué dans la migration des granulocytes

Le récepteur CD11b est une intégrine impliquée dans la migration des neutrophiles circulant vers les tissus infectés. Les HD-neutrophiles (bleu, $n=6$) et les CGD-neutrophiles (violet, $n=1$) présentent une augmentation de CD11b à 10 min d'incubation suivie d'une diminution de CD11b au cours du temps. Les NP-GI (jaune/orange, $n=5$) présentent une faible expression de ce récepteur avant et après stimulation en comparaison avec les HD-neutrophiles. Les Septic-GI (rose, $n=5$) présentent une augmentation d'expression de ce récepteur à 10 min de stimulation pour ensuite diminuer seulement à 40 min d'incubation. * Comparaison entre « No stim » des HD-neutrophils et le temps X de chaque conditions, test ANOVA, ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

Les résultats montrent qu'après stimulation les HD-neutrophiles et les CGD-neutrophiles présentent une augmentation d'expression de ce récepteur à 10 min suivie d'une diminution au cours du temps (Figure 60, bleu et violet). A l'inverse, les NP-GI ne présentent pas

d'augmentation d'expression de CD11b, mais diminue à 10 min d'incubation et ne varie pas au cours du temps (Figure 60, jaune/orange). Le profil d'expression de CD11b par les Septic-GI est similaire à celui des neutrophiles avec une augmentation de son expression à 10 min restant stable jusqu'à 60 min d'incubation pour ensuite diminuer légèrement à 90 min (Figure 60, rose). Toutefois, les NP-GI expriment très faiblement le récepteur CD11b en comparaison avec les neutrophiles et les Septic-GI. Ces résultats montrent que malgré leur forme immature, les GI peuvent exprimer différemment le récepteur CD11b.

II.3. Expression des récepteurs de phagocytose

La phagocytose des bactéries par les neutrophiles est améliorée lorsque les bactéries sont osponisées (entourées par les IgG) reconnues par 3 récepteurs $Fc\gamma$ ($Fc\gamma R$) : CD64 ($Fc\gamma RI$), CD32 ($Fc\gamma RII$) et CD16 ($Fc\gamma RIII$). L'analyse de ces récepteurs pourrait expliquer la capacité diminuée des GI.

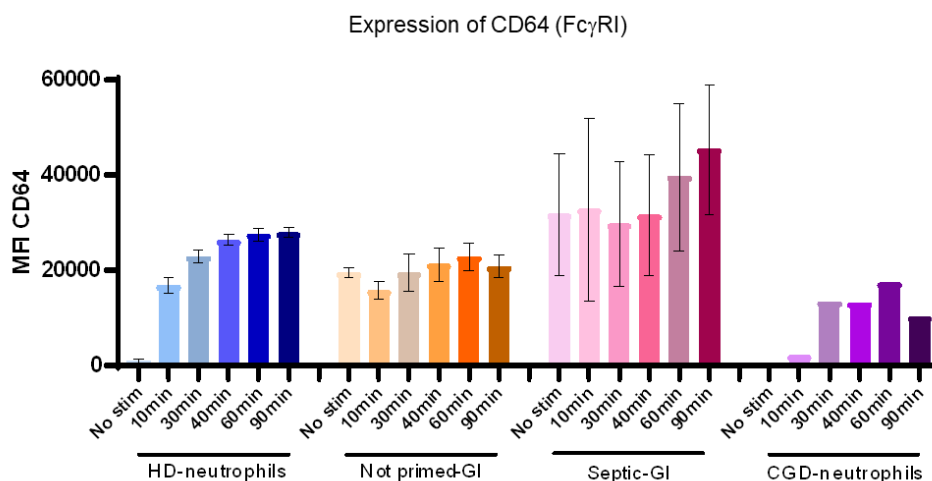


Figure 61 : Expression du récepteur $Fc\gamma RI$, CD64

Ce récepteur est exprimé à la surface des neutrophiles après stimulation avec le pathogène. Ces résultats montrent qu'en absence de stimulation les HD-neutrophiles (bleu, $n=6$) et CGD-neutrophiles (violet, $n=1$) n'expriment pas le récepteur. Les HD-neutrophiles, à 10 min d'incubation avec *E.coli* expriment rapidement CD64 pour atteindre un plateau à 60 min. L'expression de CD64 par les CGD-neutrophiles augmente à 30 min d'incubation suivie d'une diminution à 90 min. Toutefois, les NP-GI (jaune/orange, $n=5$) et Septic-GI (rose, $n=5$) expriment fortement ce récepteur sans stimulation pour garder le même niveau d'expression après stimulation. Malgré une absence significative, les Septic-GI semblent exprimer plus fortement CD64 que les neutrophiles et les NP-GI.

Le récepteur CD64 est exprimé sur les neutrophiles seulement après stimulation par le pathogène. Ces résultats sont en lien avec la littérature puisque les HD-neutrophiles et CGD-neutrophiles n'expriment pas CD64 en absence de stimulation (No stim). Toutefois à partir de 10 min d'incubation avec *E.coli* son expression augmente rapidement et atteint un plateau à 60 min d'incubation pour les HD-neutrophiles (Figure 61, bleu). Alors que l'expression de CD64

par les CGD-neutrophiles augmente plus fortement à partir de 30 min d'incubation et diminue légèrement à 90 min (Figure 61, violet). Cependant, pour les NP-GI et les Septic-GI, en absence de stimulation, ces GI expriment très fortement le CD64 pour garder le même niveau d'expression après stimulation. Ceci peut s'expliquer par le fait que les donneurs de cellules souches hématopoïétiques reçoivent le facteur G-CSF qui régule positivement l'expression de ce récepteur, et que les GI de patients septiques sont pré-stimulés activant son expression. Malgré une différence significative, l'expression de CD64 par les Septic-GI semble être plus importante que les neutrophiles et les NP-GI (Figure 61).

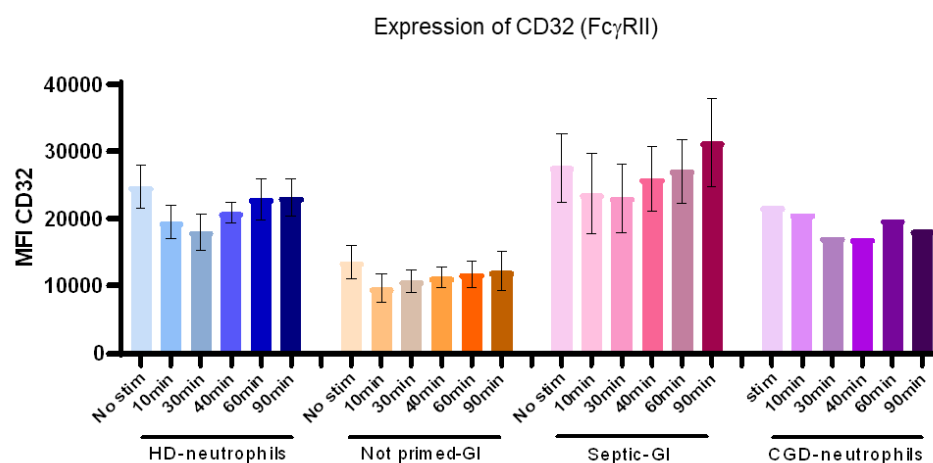


Figure 62 : Expression du récepteur Fc γ RI, CD32

Le récepteur CD32 est constitutivement exprimé à la surface des neutrophiles, ce que montrent ces résultats puisqu'il n'y a aucune différence en absence ou en présence de stimulation pour les 4 échantillons. Toutefois les NP-GI (jaune/orange, $n=5$) semblent moins exprimer CD32 que les Septic-GI (rose, $n=5$) qui l'expriment plus fortement que les HD-neutrophiles (bleu, $n=6$) et CGD-neutrophiles (violet, $n=1$).

Le récepteur CD32 est constitutivement exprimé à la surface des neutrophiles. Ainsi, les résultats montrent que l'expression de ce récepteur n'est pas influencée par les différents temps de stimulation pour les 4 échantillons. Cependant, les NP-GI semblent moins l'exprimer que les Septic-GI qui eux expriment très fortement ce récepteur en comparaison avec les HD-neutrophiles et les CGD-neutrophiles (Figure 62).

Le récepteur CD16 est lui aussi exprimé constitutivement à la surface des neutrophiles et d'après des études, c'est celui qui est principalement utilisé pour la phagocytose.

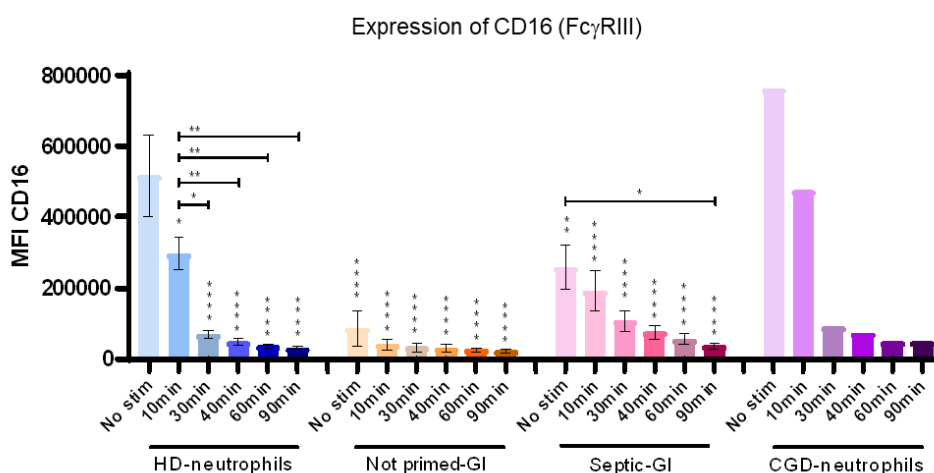


Figure 63 : Expression du récepteur Fc γ RIII, CD16

Le récepteur CD16 est constitutivement exprimé à la surface des neutrophiles. Les HD-neutrophiles (bleu, $n=6$) et CGD-neutrophiles (violet, $n=1$) expriment fortement CD16 en absence de stimulation (No stim), mais à partir de 10 min son expression décroît rapidement au cours du temps. Les NP-GI (jaune/orange, $n=5$) et Septic-GI (rose, $n=5$) présentent une diminution significative d'expression de ce récepteur en comparaison avec les neutrophiles de donneurs sains et de patients CGD en absence de stimulation. Les NP-GI ne présentent pas de variation d'expression de CD16 au cours du temps, tandis que les Septic-GI présentent une diminution de son expression comme les neutrophiles. * Comparaison entre « No stim » des HD-neutrophils et le temps X de chaque conditions, test ANOVA, * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$.

Les résultats montrent qu'en absence de stimulation les HD-neutrophiles et CGD-neutrophiles expriment fortement le récepteur CD16. Dès stimulation avec *E.coli* à 10 min, son expression diminue dans le temps et n'est pratiquement plus exprimée au bout de 90 min d'incubation (Figure 63, bleu et violet). Les NP-GI semblent exprimer plus faiblement CD16 que les Septic-GI, ce qui pourrait expliquer leur plus faible capacité à phagocyter. Les NP-GI et Septic-GI expriment plus faiblement ce récepteur en comparaison avec les HD-neutrophiles et les CGD-neutrophiles. Toutefois, les NP-GI et Septic-GI présentent également une diminution d'expression de CD16 dès incubation avec *E.coli* (Figure 63).

Deux isoformes de CD16 peuvent être retrouvés chez l'Homme, le CD16a exprimé principalement à la surface des NK et le CD16b exprimé seulement par les neutrophiles. L'activité cytotoxique du neutrophile passe principalement par le récepteur CD16b, au vu des précédents résultats sur les fonctions antimicrobiennes des GI, ce récepteur a été analysé sur les GI de donneurs de cellules souches hématopoïétiques et de patients septiques.

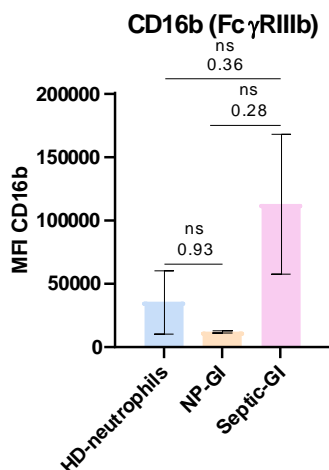


Figure 64 : Expression de l'isoforme de CD16, CD16b

Le récepteur CD16 présente 2 isoformes, CD16a et CD16b. Le récepteur CD16b est responsable de la fonction cytotoxique des neutrophiles. Ainsi, ce récepteur a été analysé à la surface des GI. Il semblerait que les Septic-GI (rose, $n=4$) expriment plus fortement l'isoforme CD16b que les HD-neutrophiles (bleu, $n=5$) et NP-GI (jaune, $n=3$).

Les résultats mettent en évidence que les Septic-GI semblent exprimer plus fortement le récepteur CD16b que les NP-GI et les HD-neutrophiles (Figure 64).

Pour finir, il est connu dans la littérature, que le récepteur CD16 peut être clivé par une métalloprotéase durant une infection. Afin de vérifier que les GI de patients septiques ne sont pas des neutrophiles ayant perdu leur récepteur CD16 à cause de la persistance du pathogène dans leur organisme mais bien des GI exprimant faiblement le CD16, une coloration May-Grünwald-Giemsa a été réalisée.

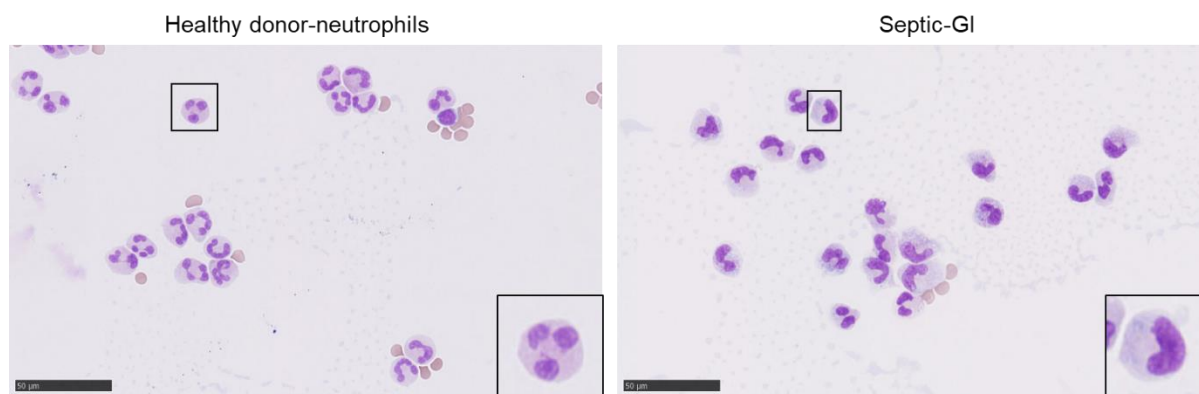


Figure 65 : Analyse de la forme mature ou immature des granulocytes de patients septiques

Le récepteur CD16 est connu pour être clivé lors d'une infection. Afin de vérifier que les granulocytes de patients septiques ne sont pas des neutrophiles ayant perdu l'expression du CD16, une coloration May-Grünwald-Giemsa a été réalisée. Les granulocytes de patients septiques présentent un noyau bilobé avec un cytoplasme plus foncé que les HD-neutrophiles qui eux présentent un noyau polylobé et un cytoplasme clair. Ainsi, les granulocytes de patients septiques sont des GI.

Les résultats de l'analyse cytologique des cystopin montrent que les granulocytes de patients septiques présentent un noyau bilobé avec un cytoplasme plus foncé que les neutrophiles de donneurs sains présentant un noyau polylobé et un cytoplasme très clair. Un noyau bilobé est caractéristique de la forme des granulocytes immatures ou band cells, donc les granulocytes de patients septiques sont bien majoritairement des GI (Figure 65).

Ces résultats mettent en évidence que les GI de patients septiques, malgré une forte expression des récepteurs CD64 et CD32, ces granulocytes présentent une diminution de capacités à phagocyter, probablement dû à la forte diminution d'expression du récepteur CD16.

II.4. Expression des récepteurs aux chimiokines

Les récepteurs aux chimiokines (CXCR) sont importants d'une part pour la libération des neutrophiles dans la circulation sanguine et d'autre part pour le recrutement sur le site infectieux. Les 2 récepteurs impliqués dans la libération des neutrophiles dans le sang, sont CXCR4 qui permet aux formes immatures d'être retenues dans la moelle osseuse et CXCR2 exprimé par le neutrophile permettant sa libération dans la circulation. De plus, le récepteur CXCR2 joue un rôle important dans la migration des neutrophiles vers le site infectieux.

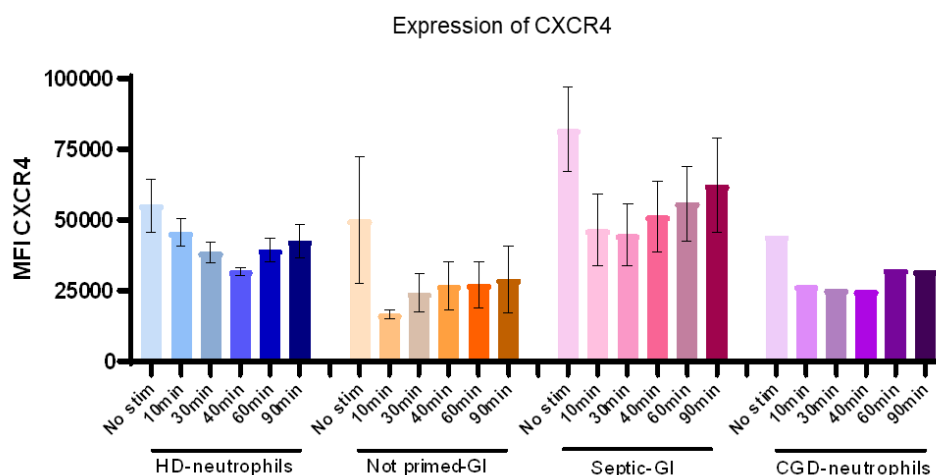


Figure 66 : Expression du récepteur aux chimiokines CXCR4

CXCR4 est normalement exprimé sur les GI afin de les retenir dans la moelle osseuse. Les HD-neutrophiles (bleu, $n=6$) et CGD-neutrophiles (violet, $n=1$) présentent une diminution d'expression de CXCR4 à 10 min suivie d'une augmentation à 60 min. Les NP-GI (jaune/orange, $n=5$) présentent une diminution d'expression de CXCR4 à 10 min suivie d'une augmentation dès 30 min d'incubation et restent stable dans le temps. Les Septic-GI (rose, $n=5$) présentent également une diminution d'expression de CXCR4 à 10 min suivie d'une augmentation à 40 min d'incubation. En absence de stimulation, les NP-GI expriment similairement CXCR4 que les HD-neutrophiles. Les Septic-GI expriment plus fortement CXCR4 que les HD-neutrophiles, CGD-neutrophiles et NP-GI.

Les résultats montrent que l'expression de CXCR4 par les HD-neutrophiles et les CGD-neutrophiles diminuent à partir de 10 min d'incubation suivie d'une augmentation d'expression à 40 et 90 min (Figure 66, bleu). Tandis que l'expression de CXCR4 par les NP-GI et les Septic-GI diminuent à 10 min d'incubation suivie d'une augmentation à 30 min et 40 min respectivement (Figure 55, jaune/orange et rose). Toutefois, les NP-GI expriment le même niveau de CXCR4 que les HD-neutrophiles en absence de stimulation. A l'inverse, les GI de

patients septiques expriment fortement le récepteur CXCR4 en absence de stimulation en comparaison avec les NP-GI, HD-neutrophiles et CGD-neutrophiles (Figure 66).

Le deuxième récepteur aux chimiokines, CXCR2 est essentiel dans la libération des neutrophiles de la moelle osseuse vers le sang mais également du sang vers les tissus infectés.

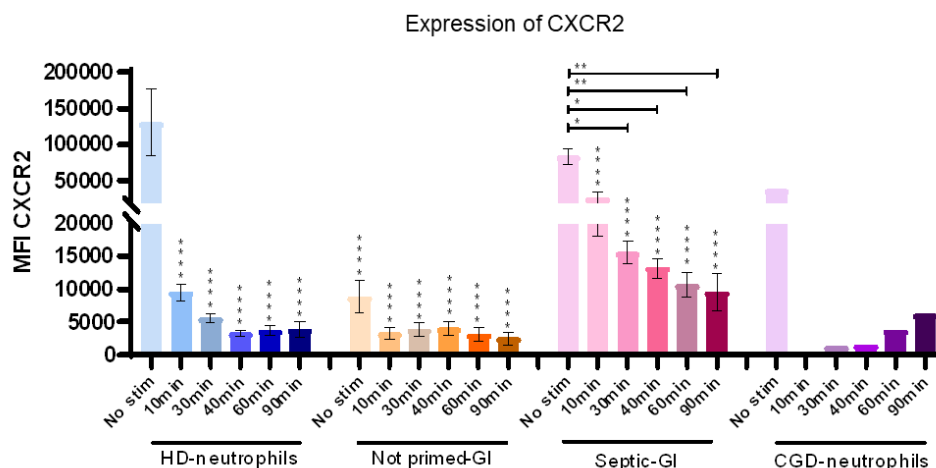


Figure 67 : Expression du récepteur aux chimiokines CXCR2

CXCR2 est normalement exprimé sur les neutrophiles ce qui permet leur libération dans la moelle osseuse. Les HD-neutrophiles (bleu, $n=6$) expriment fortement CXCR2 à l'état basal mais après stimulation avec *E.coli* l'expression diminue rapidement au cours du temps. A l'inverse, les CGD-neutrophiles (violet, $n=1$) présentent une absence d'expression de CXCR2 à 10 min suivie d'une augmentation d'expression de 30 min à 90 min d'incubation. Les NP-GI (jaune/orange, $n=5$) expriment très faiblement CXCR2 en absence et en présence de stimulation contrairement au Septic-GI (rose, $n=5$) qui l'expriment fortement mais moins que les HD-neutrophiles. Les Septic-GI présentent une diminution de CXCR2 plus faible que les neutrophiles de 10 à 90 min. * Comparaison entre « No stim » des HD-neutrophils et le temps X de chaque conditions, test ANOVA, * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$.

Les HD-neutrophiles expriment fortement le récepteur CXCR2 à l'état basal (No stim), mais lorsqu'ils sont stimulés avec *E.coli* l'expression de CXCR2 diminue drastiquement à 10 min pour ne pratiquement plus être exprimé à 90 min (Figure 67, bleu). Tandis que l'expression de CXCR2 par les CGD-neutrophiles n'est plus présente à 10 min et augmente progressivement de 30 à 90 min (Figure 67, violet). En absence de stimulation, les NP-GI expriment faiblement ce récepteur, mais en présence d'*E.coli* ce récepteur diminue pour ensuite rester stable dans le temps (Figure 67, jaune/orange). A l'inverse, les Septic-GI présentent un profil similaire à celui des HD-neutrophiles, avec une diminution progressive de CXCR2 au cours du temps après stimulation avec *E.coli* (Figure 67, rose). Cependant, NP-GI et Septic-GI à l'état basal expriment plus faiblement CXCR2 que les HD-neutrophiles, mais les Septic-GI expriment plus fortement ce récepteur de 10 à 90 min que les HD-neutrophiles et CGD-neutrophiles (Figure 67). Toutefois, cette diminution d'expression au cours de l'infection, diminue le recrutement ou la mobilisation des granulocytes sur le site infectieux.

Ces résultats mettent en évidence que les GI de patients septiques expriment à la fois le récepteur CXCR4 et CXCR2 ce qui pourrait expliquer leur libération dans la circulation sanguine alors qu'ils n'ont pas fini leur maturation. Tandis que les GI de donneurs de cellules souches hématopoïétiques expriment faiblement le récepteur CXCR2, mais par l'injection du facteur G-CSF, ceci précipite leur libération dans le sang sans avoir le temps d'exprimer CXCR2.

II.5. Expression de récepteur de mort

Afin de retourner à l'homéostasie, les neutrophiles vont exprimer des récepteurs de morts tels que Fas-L afin d'induire l'apoptose des autres cellules de l'immunité innée.

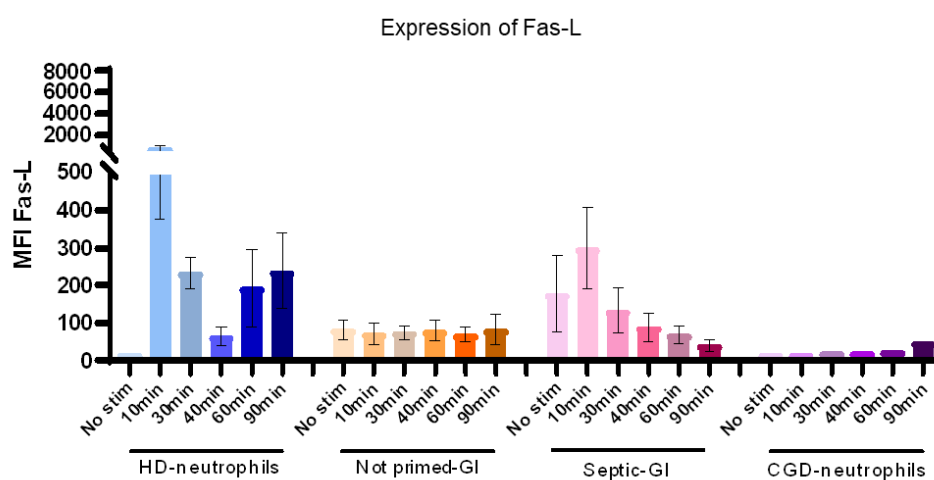


Figure 68 : Expression du récepteur de mort, Fas-L

L'expression de Fas-L permet aux neutrophiles d'induire l'apoptose des cellules de la réponse immunitaire pour retourner à l'homéostasie. Les HD-neutrophiles (bleu, $n=6$) à l'état basal n'expriment pas Fas-L, alors que son expression est fortement augmentée à 10 min d'incubation avec *E.coli* pour ensuite diminuer à 30 et 40 min et augmenter de nouveau à 60 min. Les CGD-neutrophiles (violet, $n=1$) expriment très faiblement ce récepteur et une légère augmentation à 90 min est visualisée. Les NP-GI (jaune/orange, $n=5$) ne présentent pas de variations d'expression de Fas-L au cours du temps. Tandis que les Septic-GI (rose, $n=5$) présentent une forte expression à l'état basal et encore plus fortement à 10 min d'incubation pour ensuite diminuer au cours du temps.

Les résultats montrent qu'à l'état basal (No stim), les HD-neutrophiles expriment faiblement le récepteur Fas-L, mais en présence de stimulation, ils présentent une augmentation de son expression à 10 min suivie d'une diminution à 30 et 40 min puis une augmentation à 60 et 90 min (Figure 68, bleu). De façon intéressante, les neutrophiles de patients CGD expriment très faiblement le récepteur Fas-L à l'état basal et malgré une stimulation avec *E.coli* l'expression reste faible (Figure 68, violet). Les NP-GI ne présentent pas de variations d'expression de Fas-L en absence et en présence de stimulation (Figure 68, jaune/orange). Tandis que les Septic-GI expriment à l'état basal une expression de Fas-L plus importante que les HD-neutrophiles et CGD-neutrophiles. Les Septic-GI présentent également une augmentation d'expression de Fas-L pour diminuer à partir de 30 min jusqu'à 90 min d'incubation. (Figure 68, rose).

Ces résultats mettent en évidence que sans infection les neutrophiles n'expriment pas Fas-L car ils n'ont pas besoin d'induire l'apoptose des cellules de l'immunité (lymphocytes), mais il sera exprimé après contact avec *E.coli*. Toutefois, les GI de donneurs de cellules souches hématopoïétiques et de patients septiques expriment ce récepteur en absence et en présence d'*E.coli*.

II.6. Expression du récepteur LOX-1

Le récepteur LOX-1 est connu pour être exprimé à la surface des neutrophiles murins mais sur les neutrophiles humains son expression est incertaine. Il a pour rôle la production de cytokines/chimiokines, de ROS et améliore l'adhésion des granulocytes aux cellules endothéliales durant une infection.

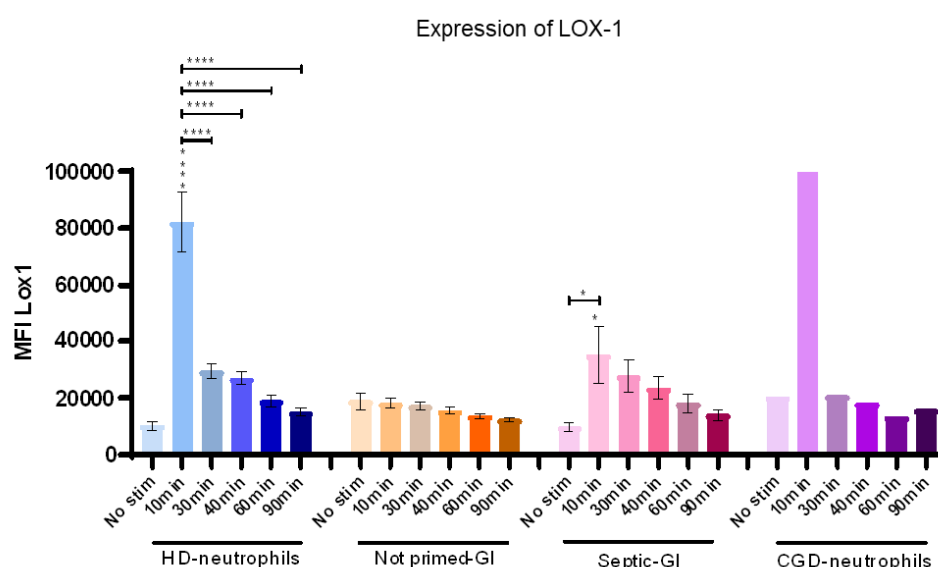


Figure 69 : Expression du récepteur LOX-1

Le récepteur LOX-1 est connu pour être exprimé à la surface des neutrophiles murins mais très peu de connaissance sur les neutrophiles humains. Les HD-neutrophiles (bleu, $n=6$), CGD-neutrophiles (violet, $n=1$) et Septic-GI (rose, $n=5$) expriment faiblement LOX-1 en absence de stimulation (No stim) mais en présence de 10 min d'incubation avec *E.coli* l'expression de LOX-1 augmente pour ensuite diminuer au cours du temps. Les NP-GI (jaune/orange, $n=5$) n'ont pas de variation d'expression de ce récepteur au cours du temps. * Comparaison entre « No stim » des HD-neutrophils et les temps X de chaque conditions, test ANOVA, * $p<0,05$; **** $p<0,0001$.

Les résultats montrent qu'à l'état basal (no stim) tous les neutrophiles expriment faiblement ce récepteur. Toutefois, après 10 min d'incubation avec *E.coli* une forte expression de ce récepteur apparaît pour chez les HD-neutrophiles, CGD-neutrophiles et Septic-GI pour ensuite diminuer au cours du temps. Aucune observation de variation de LOX-1 n'est observée chez les NP-GI et la plus forte augmentation est notée chez les HD-neutrophiles à 10 min (Figure 69).

L'expression de LOX-1 est surexprimée à 10 min d'incubation avec les bactéries probablement pour que les granulocytes puissent traverser les cellules endothéliales vasculaires afin d'aller sur le site infectieux et produire les cytokines et chimiokines pour recruter d'autres types cellulaires et détruire les bactéries.

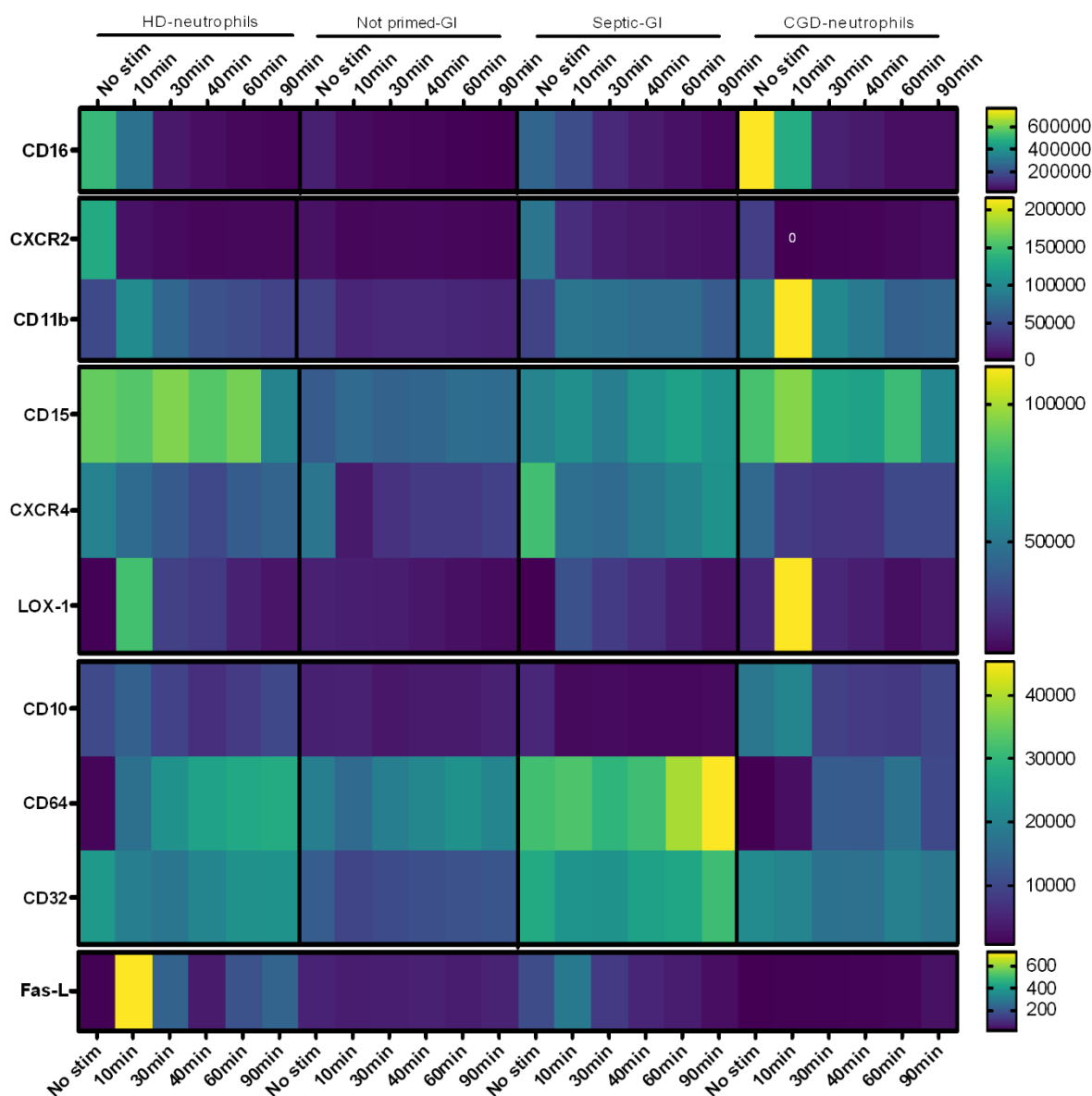


Figure 70 : Expression de l'ensemble des récepteurs par les GI et les neutrophiles en absence et en présence d'*E.coli*

Représentation en heatmap de l'expression des récepteurs par les neutrophiles de donneurs sains (HD-neutrophiles), les GI de donneurs de cellules souches (Not-primed-GI), les GI de patients septiques (Septic-GI) et les neutrophiles d'un patient CGD (CGD-neutrophiles) en présence et en absence de stimulation avec *E.coli* à différents temps d'incubation. Jaune = très fortement exprimé ; vert = moyennement exprimé ; bleu = faiblement exprimé ; bleu foncé = très faiblement exprimé

L'analyse de ces différents récepteurs permet dans un premier temps de mettre en évidence que les neutrophiles du patient CGD, malgré un manque de production de ROS, cela n'impacte pas l'expression des différents récepteurs impliqués dans les fonctions antimicrobiennes. Dans un deuxième temps, ces résultats confirment que les GI sont CD15⁺, CD11b⁺ et CD10^{low}.

Ils présentent une faible expression du récepteur CD16 pouvant expliquer la faible capacité de phagocytose des GI malgré une expression normale des 2 autres récepteurs impliqués dans la phagocytose du pathogène (CD64 et CD32). Les GI de patients septiques expriment fortement Fas-L à l'état basal tandis que les neutrophiles de donneurs sains ne l'expriment pas. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les GI de patients septiques sont en contact permanents avec le pathogène induisant l'expression de Fas-L (Figure 70).

Chapitre 3 Article

Une partie des résultats de la thèse ont été présentés dans un article scientifique lequel sera soumis dans le journal scientifique Science et dont je suis en co-premier auteur.

Dans cet article nous avons cherché à évaluer la capacité des granulocytes de donneurs sains et de patients septiques à induire la résistance aux antibiotiques (AMR) lié à la réponse SOS bactérienne suivant la maturité des granulocytes. La phagocytose, la production de ROS par les granulocytes et l'induction de la réponse SOS bactérienne ont été évaluées simultanément dans un modèle *ex vivo*. Les granulocytes immatures (GI) de patients septiques ont d'avantage induit la réponse SOS que les neutrophiles de donneurs sains en raison de leur production de ROS limitée via le complexe NADPH oxydase. La faible production de ROS par les GI peut être liée à la diminution d'expression des protéines de ce complexe (gp91^{phox} et p47^{phox}) associé à la faible expression du récepteur impliqué dans la reconnaissance du pathogène (CD16). Les bactéries phagocytées par les granulocytes ont augmenté l'expression de qnrB2, un gène plasmidique régulé par la réponse SOS codant la résistance aux fluoroquinolones. Nous avons donc conclu qu'en l'absence de pression antimicrobienne, la réponse immunitaire peut favoriser l'expression de l'AMR.

Title: Phagosomal granulocytic ROS in septic patients induce the bacterial SOS response

Authors: Stecy Chollet ^{1†}, Ana C. Hernandez Padilla^{1†}, Thomas Daix^{1,2,3}, Margaux Gaschet¹, Bruno François^{1,2,3}, Christophe Piguet⁵, Nathalie Gachard^{4,6}, Sandra Da Re¹, Robin Jeannet^{3,6*} ‡, Marie-Cécile Ploy^{1**} ‡

Affiliations:

1. Inserm UMR1092, Université de Limoges, Limoges, France
2. CHU Limoges, Service de Réanimation Polyvalente, Limoges, France
3. Inserm CIC 1435, Limoges, France
4. CHU Limoges, Laboratoire d'hématologie, Limoges, France
5. CHU Limoges, Département de pédiatrie médicale, Limoges, France
6. CNRS UMR 7276, Inserm UMR 1262, Université de Limoges, Limoges, France

Corresponding authors:

* robin.jeannet@unilim.fr

** marie-cecile.ploy@unilim.fr

Abstract:

Bacteria encounter high ROS concentrations in granulocytes' phagosomes during the innate immune response to sepsis. Reactive oxygen species (ROS) induce the SOS response allowing bacterial adaptation to stress and expression of antimicrobial resistance (AMR). Sepsis patients with increased circulating immature granulocytes (IG) displaying limited pathogen-killing functions have a worst clinical prognosis. We assessed the capacity of human granulocytes to induce bacterial SOS-related AMR and the effect of granulocyte maturity in this induction in an *ex vivo* model. We discovered that compared to mature granulocytes, Sepsis's IG induced more the SOS response due to their limited NADPH oxidase-dependent ROS production, explained by its decreased activation and expression. Phagocytosed bacteria increased expression of *qnrB2*, a plasmid-borne SOS-regulated gene coding fluoroquinolones resistance. In the absence of antimicrobial pressure, the sepsis immune response may promote AMR expression.

One-Sentence Summary: Granulocytes' ROS production in septic patients can induce bacterial SOS response and antimicrobial resistance expression.

Main Text

Mature granulocytes (MG) are the most abundant cell effectors of the innate immune response. MG specialize in pathogen recognition and phagocytosis through the Fc γ receptors (CD32, CD64, CD16) (1). Pathogen internalization activates the production of reactive oxygen species (ROS) by the NADPH oxidase complex (1,2). This complex assembles 2 membrane (gp91phox and p22phox) and 3 cytoplasmic proteins (p40phox, p67phox and p47phox). A functional NADPH oxidase complex is necessary to achieve bacterial clearance. A deficiency of this complex, mainly due to gp91phox or p47phox mutations, leads to a primary immunodeficiency named chronic granulomatous disease (CGD). CGD granulocytes conserve phagocytic activity but fail to produce phagosomal ROS by the NADPH oxidase complex, leading to recurrent invasive bacterial infections (3).

Sepsis, defined as a dysregulated immune response to infection, is a major cause of health loss worldwide, affecting up to 50 million people annually and reaching 20% attributable mortality (4). Sepsis is characterized by an emergency granulopoiesis leading to the acute liberation of immature granulocytes (IG) from the bone marrow triggered by the infectious-related cytokine storm and the acute consumption of MG (5). IG's phagocytosis function and ROS production are less effective than those of MG (6,7), and the increase of IG in peripheral blood is associated with a worst short-term prognosis and increased mortality in sepsis (8).

Most bacteria adapt to environmental stress through the bacterial SOS response (9), activated by DNA damages. In *Escherichia coli*, more than 50 genes are part of the SOS regulon, encoding diverse functions related to DNA repair, translesion DNA replication and cell division arrest (*sfiA*) (9,10). This coordinated cellular response is regulated by the repressor, LexA, and the activator, RecA. LexA binds to a LexA-box sequence located in the promoter region of the regulated genes (11). During infection and the associated immune response, bacteria are phagocytosed by granulocyte and encounter ROS in phagosomes (1,2), potential bacterial stressors leading to DNA damage (12).

Our research hypothesis was that the low-level of ROS production by IG in the early steps of sepsis might promote the induction of the bacterial SOS response. We report herein that ROS produced in granulocytes from septic patients induce the bacterial SOS response inside the phagosome, resulting in increased expression of antibiotic resistance genes.

First, we developed an *ex-vivo* incubation model of human granulocytes (MG from healthy donors (HD-MG) or IG from septic patients (Sepsis-IG)) with *E. coli* derivatives (Table S1) to analyze the granulocyte-bacteria interaction. To evidence the bacterial SOS induction, mCherry-*E. coli* was transformed with a plasmid containing a transcriptional fusion between the promoter of the SOS-regulated *sfiA* gene (PsfiA) and the *gfp* gene encoding a green fluorescent protein (Fig. 1B). Flow cytometry analyzes showed that both HD-MG and Sepsis-IG phagocytosed mCherry-*E. coli* bacteria (Fig. 1A) and induced the expression of the PsfiA::*gfp* fusion (Fig. 1C), suggesting an SOS response induction. Interestingly, this induction increased over time in Sepsis-IG, reaching a significantly higher induction after 90 min of incubation than in HD-MG (84.5% \pm 2.46 vs 45.6% \pm 4.15, $p < 0.0001$) (Fig. 1C). To assess if PsfiA::*gfp* expression was induced by the ROS produced by the NADPH oxidase complex, MG from a CGD patient (CGD-MG) with a mutation in the gp91phox, were added as a negative control for the ROS-producing NADPH oxidase pathway. We observed that CGD-MG did not induce PsfiA::*gfp* expression (Fig. 1C). Conversely, we detected a high level of GFP, whatever the granulocyte subset, with the mCherry-*E. coli*/pPsfiA*::*gfp* strain where the GFP expression is constitutive. No GFP expression was observed with the mCherry-*lexAInd3*/pPsfiA::*gfp* unable to activate the SOS response or with the mCherry-*E. coli*/p-*gfp* strain without the PsfiA

promoter (Fig. S1 and Fig. S2, Table S1). Altogether, these results confirmed that the induction of *pPsfIA::gfp* was SOS-dependent. We also verified that the SOS induction was not due to the use of the oxidation-sensitive probe to detect ROS produced by granulocytes (Fig. S3). As granulocytes are also able to release ROS towards the extracellular compartment (13,14), we assessed the SOS induction on the non-phagocytosed extracellular bacteria (Fig. 1D). The SOS induction of these bacteria was comparable to that of bacteria grown alone ($10.38\% \pm 17.65$ vs $2.93\% \pm 1.74$) (Fig. 1E). In contrast, incubation with ciprofloxacin, an inducer of the SOS response, strongly induced the GFP expression, showing that the bacterial SOS response was still inducible.

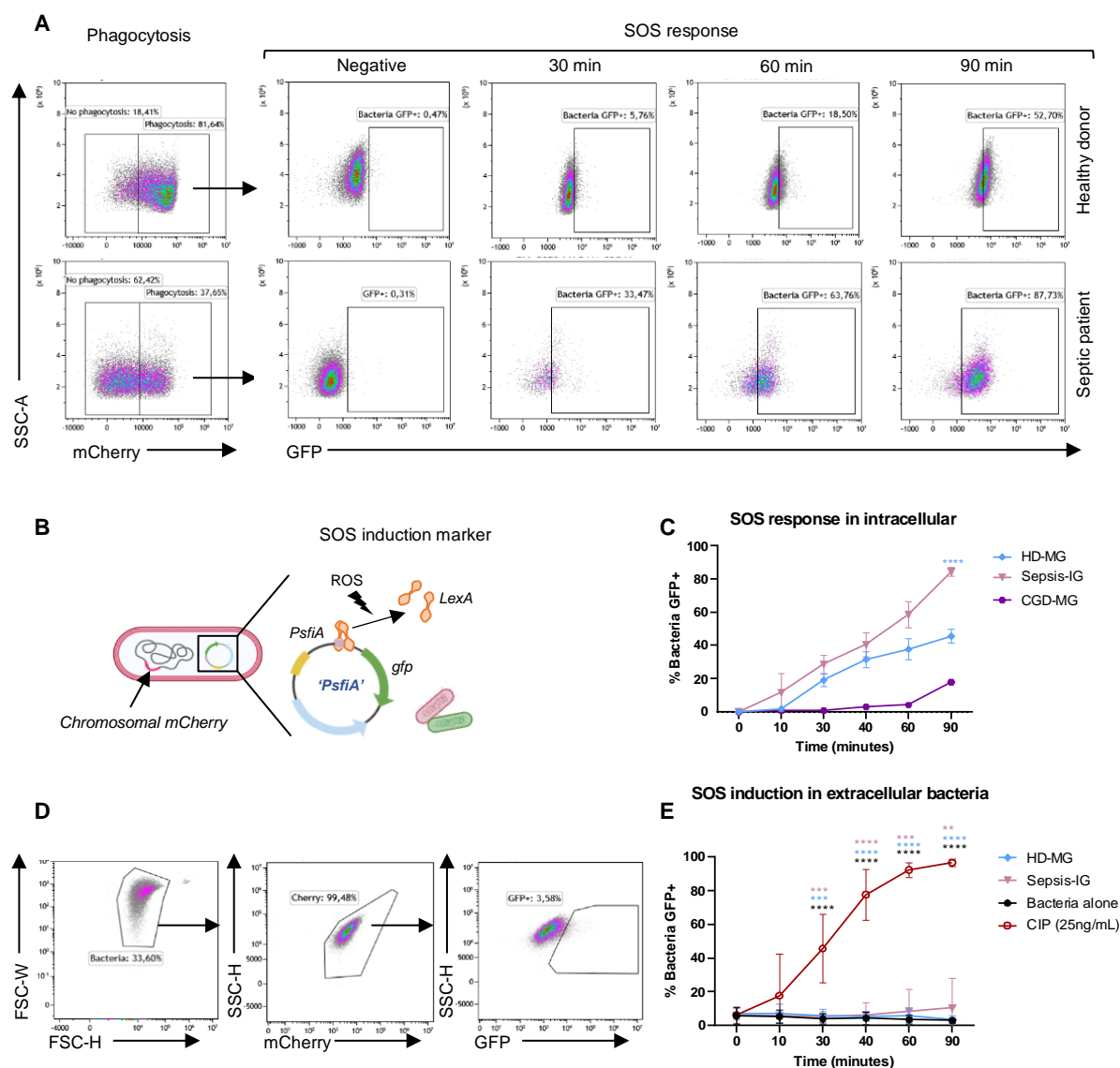


Fig. 1. Bacterial SOS response evidenced after phagocytosis by granulocytes. (A, B, C) Mature granulocytes (MG) from Healthy donors (HD-MG, n=10), immature granulocytes from septic patients (Sepsis-IG, n=5) and MG from a patient with chronic granulomatous disease (CGD-MG, n=1) were incubated with *mCherry-E.coli/pPsfIA::gfp* to assess the SOS induction by flow cytometry. (A) Representative flow cytometry density plots to follow i) granulocytes having performed phagocytosis identified by the *mCherry* fluorescence expressed by phagocytosed bacteria (left panel); ii) SOS response induction by *GFP* fluorescence in phagocytic cells over time. (B) The plasmid used to follow SOS induction carries the *gfp* gene under the control of the *sfiA* promoter repressed by *LexA* and induced upon SOS induction. It is carried by a bacteria with a chromosomal *mCherry* gene constitutively expressed. (C) Induction of SOS response quantified as the percentage of granulocytes containing

bacteria GFP+ among phagocytic granulocytes. (D) Representative density plot of the SOS induction in extracellular bacteria by GFP expression among mCherry-*E. coli*/pPsfA::gfp. (E) Induction of SOS response quantified as the percentage of extracellular GFP+ bacteria. As a control, bacteria were grown alone (black) or in the presence of ciprofloxacin (a known SOS inducer at 25ng/ml, $n=12$) to assess the capacity of the system to measure SOS induction. Error bars represent mean \pm SEM. Each color star was compared with the corresponding color curve and was calculated using ANOVA test, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

Then, we quantified Sepsis-IG, HD-MG and CGD-MG phagocytosis capacities and ROS production by flow cytometry (Fig. 2A). mCherry fluorescence among granulocytes informed about the number of cells performing phagocytosis (Fig. 2B) and the mean fluorescence intensity for mCherry inside phagocytic cells provides information on the quantity of bacteria phagocytosed (Fig. 2C). Sepsis-IG showed significantly lower phagocytosis capacities when compared to HD-MG and CGD-MG (Fig. 2B and C). ROS production peaked at 30 min incubation among granulocytes performing phagocytosis and then decreased, in line with the known timing of ROS production within the early phagosome (15). Phagocytic Sepsis-IG produced significantly less ROS than phagocytic HD-MG (7.6 times lower, $p<0.02$) over time (Fig. 2D). Surprisingly, the production of ROS in the CGD-MG was higher than in Sepsis-IG (Fig. 2D). As CGD patients are unable to produce ROS with the NADPH oxidase complex (3,16), these results likely reflect the oxidative stress induced by the granulocyte's metabolism (17). Confocal microscopy imaging of bacteria incubated with granulocytes showed GFP+ mCherry-*E. coli* preferentially inside the cell (Fig. 2E, white arrows and Fig. S4) and colocalized with ROS. These observations indicate that Sepsis-IG induce the PsfA::gfp fusion expression within the phagosome and that the bacterial SOS induction is related to the IG's low level of ROS produced by the NADPH oxidase complex. Indeed, the absence of phagosomal ROS leads to an absence of SOS signal (CGD-MG), while a comparatively higher ROS production has a limited SOS induction (HD-MG) (Fig.2D and Fig.1C).

Although IG are typically absent in peripheral blood, their liberation from the bone marrow is not exclusive to sepsis (systemic lupus erythematosus, cancer) (18). Therefore, we explored whether the SOS induction was related to the IG status or the septic-related immune dysregulation. We thus used IG recovered from leftover samples of hematopoietic stem cell donors who received Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF). G-CSF promotes the production and release of CD34+ stem cells from the bone marrow, including IG. These IG, comparatively to those released during sepsis, have not encountered the cytokine storm or pathogen-related inflammatory markers, and are thus considered to be non-primed (non-primed-IG). We observed that the phagocytosis capacities and ROS production of non-primed-IG and Sepsis-IG were not significantly different (Fig. S5, A and B). However, the maximum of phagocytosis reached only 47.8% at 90 min for non-primed-IG, whereas it was 77% for Sepsis-IG. Non-primed-IG showed a strong early SOS response induction that peaked at 30 min but then reached a plateau under 60% (Fig. S5C). This suggests that IG induce the SOS response regardless of the source. The higher SOS induction, obtained at 90 min with Sepsis-IG, is likely due to the higher phagocytosis of this cell subset compared to non-primed-IG (Fig. S5A). Although Sepsis-IG displayed weaker phagocytosis than HD-MG, they improved their phagocytic activity over time, reaching a percentage of phagocytic cells similar to that of HD-MG after 90 min incubation (Fig. 2B). This functional 'recovery' may be related to the granulocyte activation in peripheral blood by the pro-inflammatory mediators increased in sepsis (19). To assess the effect of granulocyte priming by soluble plasmatic proteins, non-primed-IG were primed using plasma from septic patients before incubation with mCherry-*E. coli*. We found that, as expected, the priming increased the phagocytosis levels close to those

of Sepsis-IG. However, it did not affect ROS production, suggesting that ROS production may be dependent of the differentiation status of the granulocyte (Fig. S6, A and B). Interestingly, SOS induction increased in primed IG compared to non-primed-IG (Fig. S6C), suggesting that the increased SOS induction with Sepsis-IG depends both on phagocytic activity and ROS production.

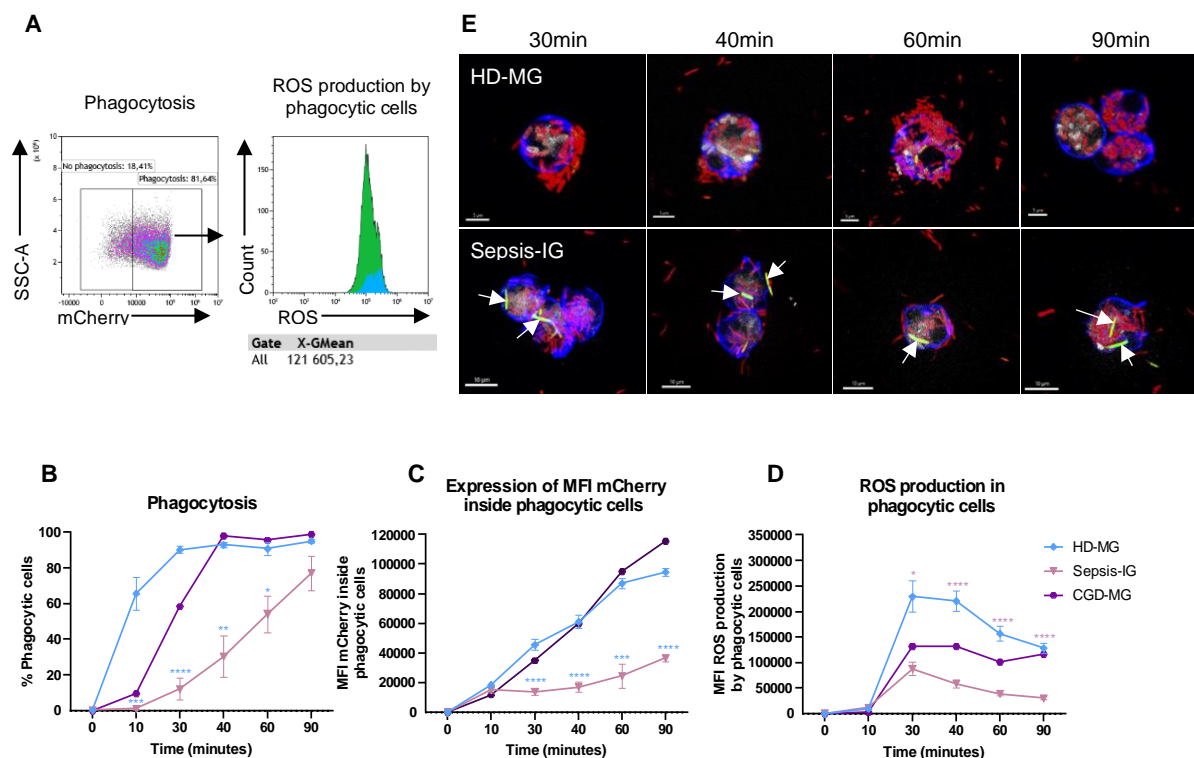


Fig. 2. Granulocyte phagocytosis and ROS production. mCherry-*E. coli*/pPsfIA::gfp were incubated with granulocytes over time and acquired by flow cytometry (A) and confocal microscopy (E). (A) Representative density plot of phagocytosis of mCherry-*E. coli* and histogram on ROS produced by phagocytic HD-MG. Two readouts were measured by flow cytometry: (B) percentage of granulocytes containing bacteria and (C) the mean fluorescence intensity for mCherry corresponding to the fluorescence emitted by the bacteria inside phagocytic cells for HD-MG (n=10), Sepsis-IG (n=5) and CGD-MG (n=1) as function of incubation time. (D) ROS production was detected in phagocytic cells using the CellRox Deep Red probe and expressed as mean fluorescence intensity (MFI). (E) The actin filaments of granulocytes were stained with phalloidin (blue), the ROS produced by granulocytes were identified with the CellRox Deep Red probe (white). The phagocytosis of bacteria was followed by the detection of mCherry (red) and the SOS induction was evidenced by GFP expression (green and white arrows). Error bars represent mean \pm SEM. Each color star was compared with the corresponding color curve and represented the result of an ANOVA test, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Then, we assessed the expression of two subunits of the NADPH oxidase complex, gp91phox and p47phox, by Western blot at 30, 60 and 90 minutes of incubation with mCherry-*E. coli*. Both proteins were less expressed in Sepsis-IG, in line with their lower ROS production (Fig. 3, A, B and C). NADPH oxidase activity depends not only on its expression but also on its assembly as an active membrane-bound complex in response to Fc γ receptor-triggered pathways (Fc γ R) (Fig. 3G). We thus quantified the expression of these receptors by flow cytometry. We did not observe a significant difference in the expression level of CD64 (Fc γ RI) and CD32 (Fc γ RII) at baseline or after stimulation (Fig. 3, D and E). However, results showed a significant decrease of CD16 (Fc γ RIII) for all subsets from 10 minutes of incubation with the

bacteria (Fig. 3F). CD16 is responsible for pathogen attachment, a step needed for both phagocytosis and triggering of one of the phosphorylation cascade pathways required to assemble the active NADPH oxidase complex (Fig. 3G) (20,21). Granulocyte phagocytosis induces CD16 cleavage, causing its loss (22). IG are phenotypically characterized by the surface expression of receptors CD11b⁺, CD62L^{high}, CD10^{low}, and CD16^{low} (23).

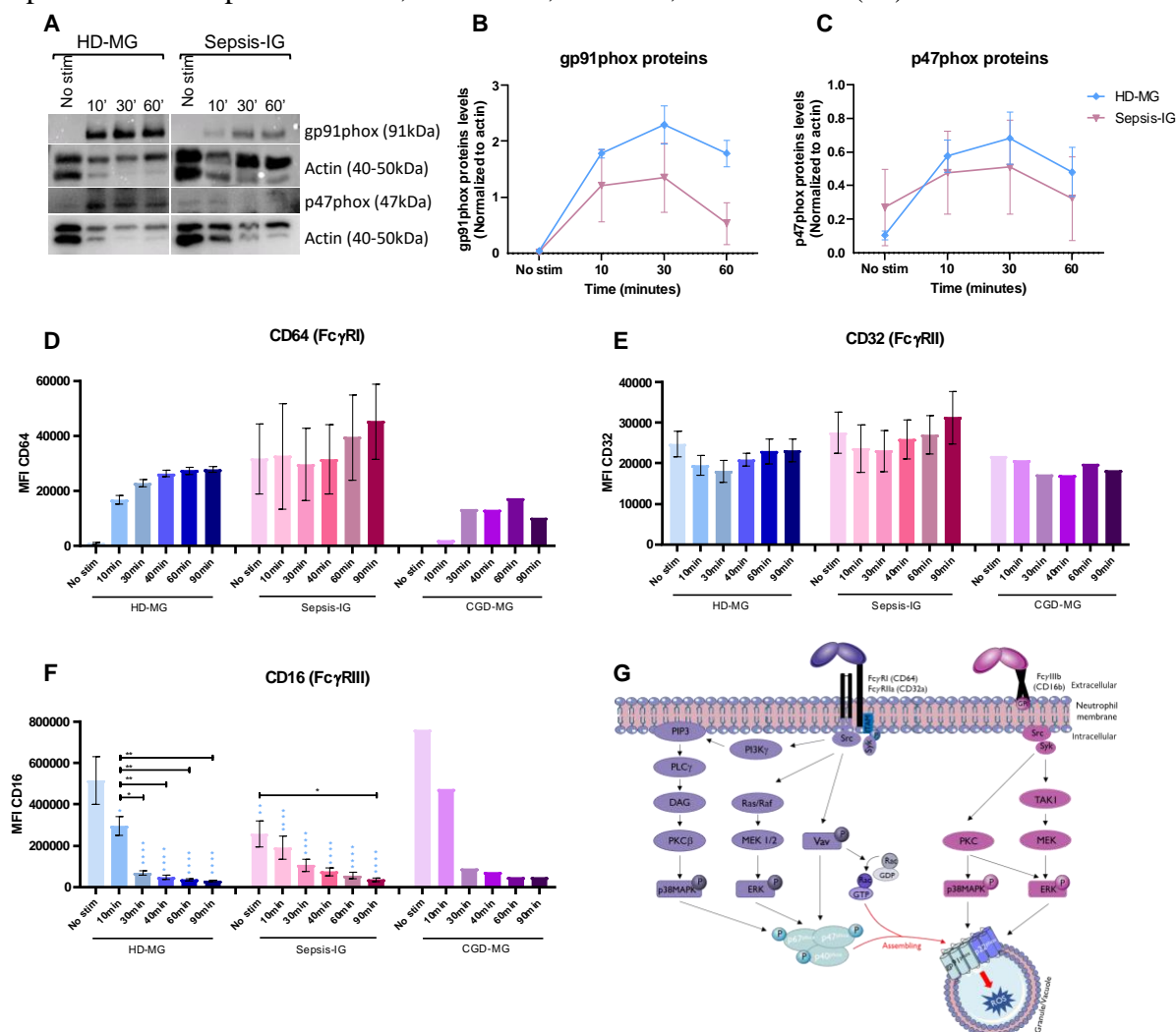


Fig. 3. Expression of NADPH oxidase complex subunits and membrane receptors implicated in phagocytosis and ROS production (A) Representative Western Blot (WB) of two subunits of the NADPH oxidase complex, gp91phox and p47phox, after incubation of granulocytes with mCherry-*E. coli* for different times (10, 30, 60 min). (B) Relative quantification of protein expression gp91phox and p47phox using ChemiDoc™ touch Imaging System and Image-lab softwares. HD-MG (n=3) and Sepsis-IG (n=3). (D-F) Expression of membrane receptors implicated in phagocytosis and ROS production were analyzed by flow cytometry over time and represented in expression of (D) MFI CD64, (E) MFI CD32 and (F) MFI CD16 receptors for HD-MG (n=6), Sepsis-IG (n=5) and CGD-MG (n=5). (G) Schematic summary of the NADPH oxidase complex assembly after phosphorylation by p38MAPK and ERK1/2 through stimulated Fcγ receptors (CD64, CD32, CD16) by pathogen recognition. Error bars represent mean ± SEM. For (F), * difference between HD-MG without bacteria (no stim) and HD-MG or Sepsis-IG for each time. ANOVA test, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Altogether, our results confirm the limited antimicrobial activity of Sepsis-IG by converging mechanisms, i.e. weaker bacterial phagocytosis, limited NADPH complex expression and activation, leading to a lower ROS production.

We then explored the potential biological impact of the SOS induction by Sepsis-IG. For this, we used the plasmid-borne *qnrB2* gene, conferring resistance to ciprofloxacin, which is SOS-regulated (24). HD-MG and Sepsis-IG were incubated for 90 min with *E. coli* MG1656 strains (WT and *lexAInd3*) carrying the P_{qnrB}-*qnrB2* plasmid (Table S1). *qnrB2* transcript copy number was quantified by RT-qPCR and normalized to the copy number of the constitutively expressed chromosomal housekeeping gene *rpoB* and the kanamycin resistance gene *aph(3')-IIa*, located on the P_{qnrB}-*qnrB2* plasmid.

Incubation with HD-MG and Sepsis-IG led to a 3.34-fold ($p=0.018$) and 2.98-fold ($p=0.02$) increase in *qnrB2* expression, respectively, compared to bacteria incubated alone. These results are close to the value previously observed for a de-repressed P_{qnrB} promoter with mutated LexA-box (3.6-fold increase reported for a pP_{qnrB}-lexA**-qnrB2*) (24). This expression was not increased in the *lexAInd3*/pP_{qnrB}-*qnrB2* strain, confirming that *qnrB2* expression is SOS-dependent (Fig. 4).

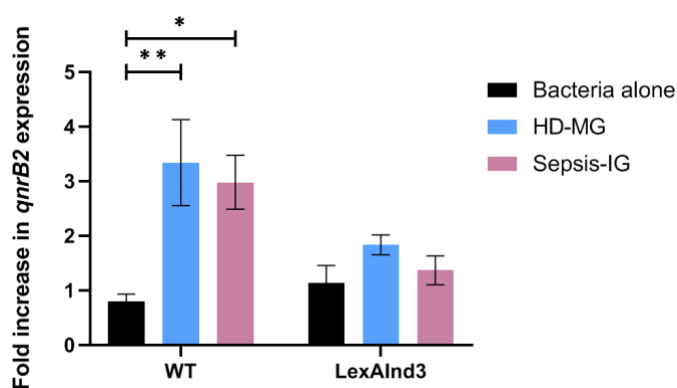


Fig. 4. Expression of *qnrB2* in phagocytic HD-MG and Sepsis-IG. *E. coli* MG1656 (WT) or expressing a mutated non-cleavable LexA (*LexAInd3*) carrying the pP_{qnrB}-*qnrB2* plasmid were incubated with granulocytes. Phagocytosed bacteria were recovered after 90 min incubation with HD-MG or Sepsis-IG. Bacteria alone were used as a control for the basal *qnrB2* expression. Results are expressed as the fold-change in *qnrB2* expression. *qnrB2* transcript copy number was normalized to the copy number of the constitutively expressed chromosomal housekeeping gene *rpoB* and the kanamycin resistance gene, *aph(3')-IIa* gene, located on the P_{qnrB}-*qnrB2* plasmid, under its constitutive promoter. Error bars represent mean \pm SEM ANOVA test, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

Although all granulocytes induced *qnrB2* expression, the biological impact would not be the same for all subsets. Indeed, as IG have lower phagocytosis and bactericidal activity than MG (Fig.2, B, C and D), the probability of having SOS-induced viable bacteria expressing *qnrB2* in Sepsis-IG is higher than in MG in which almost all bacteria are phagocytosed and non-viable (6,16).

In sepsis, antibiotic resistance has been reported in up to 26% of community-acquired sepsis (25), and inappropriate antibiotic treatment is significantly associated with increased severity and mortality (26). Besides the *qnrB2* expression, the bacterial SOS response has several impacts in bacterial virulence and antimicrobial resistance. The SOS response participates in antibiotic resistance gene acquisition and expression (27,28) through additional mechanisms such as increased mutation rate (29) or shuffling of resistance gene cassettes via the induction of the integron integrase (30). The expression of the phage-carried fibronectin binding protein (*fbp*) by *Staphylococcus aureus*, or the toxins colicine and cholera (CTX) by *E. coli* and *Vibrio cholerae* respectively, are SOS inducible. Furthermore, the activation of the SOS response can induce the dissemination of virulence genes like the CTX carried by *V. cholerae*, and the toxic

shock syndrome toxin by *S. aureus* (28), which could potentially turn innocuous colonizing bacteria into pathogenic ones.

Our work shows that the low-level of ROS production and lower phagocytosis of IG in sepsis could be beneficial for the pathogen via the SOS induction, allowing bacteria to enhance an adaptive response. The capacity of the innate immune response in sepsis to trigger the expression and dissemination of more resistant and virulent bacteria during infection ought further evaluation.

References

1. Nordenfelt P, Tapper H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*. 2011 Aug;90(2):271–84.
2. Piacenza L, Trujillo M, Radi R. Reactive species and pathogen antioxidant networks during phagocytosis. *Journal of Experimental Medicine*. 2019 Mar 4;216(3):501–16.
3. Arnold DE, Heimall JR. A Review of Chronic Granulomatous Disease. *Adv Ther*. 2017 Dec;34(12):2543–57.
4. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet*. 2020 Jan;395(10219):200–11.
5. Manz MG, Boettcher S. Emergency granulopoiesis. *Nat Rev Immunol*. 2014 May;14(5):302–14.
6. Drifte G, Dunn-Siegrist I, Tissières P, Pugin J. Innate Immune Functions of Immature Neutrophils in Patients With Sepsis and Severe Systemic Inflammatory Response Syndrome*: *Critical Care Medicine*. 2013 Mar;41(3):820–32.
7. Taneja R, Sharma AP, Hallett MB, Findlay GP, Morris MR. IMMATURE CIRCULATING NEUTROPHILS IN SEPSIS HAVE IMPAIRED PHAGOCYTOSIS AND CALCIUM SIGNALING. *Shock*. 2008 Dec;30(6):618–22.
8. Daix T, Guerin E, Tavernier E, Mercier E, Gissot V, Hérault O, et al. Multicentric Standardized Flow Cytometry Routine Assessment of Patients With Sepsis to Predict Clinical Worsening. *Chest*. 2018 Sep;154(3):617–27.
9. Erill I, Campoy S, Barbé J. Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiol Rev*. 2007 Nov;31(6):637–56.
10. Courcelle J, Khodursky A, Peter B, Brown PO, Hanawalt PC. Comparative Gene Expression Profiles Following UV Exposure in Wild-Type and SOS-Deficient *Escherichia coli*. *Genetics*. 2001 May 1;158(1):41–64.
11. Fernández de Henestrosa AR, Ogi T, Aoyagi S, Chafin D, Hayes JJ, Ohmori H, et al. Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*: Novel LexA-regulated genes in *E. coli*. *Molecular Microbiology*. 2002 Jan 18;35(6):1560–72.
12. Dwyer DJ, Kohanski MA, Hayete B, Collins JJ. Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol*. 2007 Jan;3(1):91.
13. Winterbourn CC, Kettle AJ, Hampton MB. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annu Rev Biochem*. 2016 Jun 2;85(1):765–92.
14. Warnatsch A, Tsourouktsoglou TD, Branzk N, Wang Q, Reincke S, Herbst S, et al. Reactive Oxygen Species Localization Programs Inflammation to Clear Microbes of Different Size. *Immunity*. 2017 Mar;46(3):421–32.
15. Valenta H, Erard M, Dupré-Crochet S, Nüße O. The NADPH Oxidase and the Phagosome. In: Hallett MB, editor. *Molecular and Cellular Biology of Phagocytosis* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020 [cited 2022 Jul 3]. p. 153–77.

(Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 1246). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-40406-2_9

16. Leliefeld PHC, Wessels CM, Leenen LPH, Koenderman L, Pillay J. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. *Crit Care*. 2016 Dec;20(1):73.
17. The Critical Role of Cell Metabolism for Essential Neutrophil Functions. *Cell Physiol Biochem*. 2020 Jun 27;54(4):629–47.
18. Ui Mhaonaigh A, Coughlan AM, Dwivedi A, Hartnett J, Cabral J, Moran B, et al. Low Density Granulocytes in ANCA Vasculitis Are Heterogenous and Hypo-Responsive to Anti-Myeloperoxidase Antibodies. *Front Immunol*. 2019 Nov 7;10:2603.
19. Kovach MA, Standiford TJ. The function of neutrophils in sepsis: Current Opinion in Infectious Diseases. 2012 Jun;25(3):321–7.
20. Alemán OR, Mora N, Rosales C. The Antibody Receptor Fc Gamma Receptor IIIb Induces Calcium Entry via Transient Receptor Potential Melastatin 2 in Human Neutrophils. *Front Immunol*. 2021 May 13;12:657393.
21. Belambri SA, Rolas L, Raad H, Hurtado-Nedelec M, Dang PMC, El-Benna J. NADPH oxidase activation in neutrophils: Role of the phosphorylation of its subunits. *Eur J Clin Invest*. 2018 Nov;48:e12951.
22. Wang Y, Wu J, Newton R, Bahaie NS, Long C, Walcheck B. ADAM17 cleaves CD16b (FcγRIIIb) in human neutrophils. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2013 Mar;1833(3):680–5.
23. Grieshaber-Bouyer R, Nigrovic PA. Neutrophil Heterogeneity as Therapeutic Opportunity in Immune-Mediated Disease. *Front Immunol*. 2019 Mar 4;10:346.
24. Da Re S, Garnier F, Guérin E, Campoy S, Denis F, Ploy M. The SOS response promotes *qnrB* quinolone-resistance determinant expression. *EMBO Rep*. 2009 Aug;10(8):929–33.
25. Rhee C, Klompas M. Sepsis trends: increasing incidence and decreasing mortality, or changing denominator? *J Thorac Dis*. 2020 Feb;12(S1):S89–100.
26. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*. 2022 Feb;399(10325):629–55.
27. Baharoglu Z, Mazel D. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol Rev*. 2014 Nov;38(6):1126–45.
28. Fornelos N, Browning DF, Butala M. The Use and Abuse of LexA by Mobile Genetic Elements. *Trends in Microbiology*. 2016 May;24(5):391–401.
29. Crane JK, Alvarado CL, Sutton MD. Role of the SOS Response in the Generation of Antibiotic Resistance *In Vivo*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021 Jun 17;65(7):e00013-21.
30. Guerin É, Cambray G, Sanchez-Alberola N, Campoy S, Erill I, Da Re S, et al. The SOS Response Controls Integron Recombination. *Science*. 2009 May 22;324(5930):1034–1034.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank C. Ouk and C. Carrion for technical assistance with flow cytometry and confocal microscopy. We also thank E. Pinaud and L Tlili for comments on the manuscript and helpful discussions.

Fundings: This work was supported by the region Nouvelle-Aquitaine and the University hospital of Limoges. A.C.H.P. was supported by a fellowship from Fondation pour la Recherche Médicale (FRM ECO201906009178) and S.C. by a fellowship from région Nouvelle-Aquitaine.

Authors contributions: S.C., A.C.H.P., R.J. and M.C.P. designed experiments. S.C. and A.C.H.P. performed the experiments and data analysis. T.D., B.F., C.P. and N.G. recruit patients and donors. M.G. contributed to the experiments shown in Fig.4. S.D.R. helped to design the bacteria model. S.C., A.C.H.P., R.J. and M.C.P. wrote the manuscript. All authors commented on previous versions of the manuscript. R.J. and M.C.P. revised and edited the manuscript.

Competing interests: The authors declare no competing interest.

Data and materials availability: All other data needed to evaluate the conclusions in this paper are available in the main text or supplementary materials.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Materials and Methods

Figs S1 – S7

Tables S1 – S4

References (1 – 7)

Supplementary information

MATERIALS AND METHODS

Septic patients, Chronic Granulomatous Disease (CGD) patient and healthy donors

Peripheral blood (PB) samples from all patients and donors were collected at the University Hospital Center of Limoges (CHU of Limoges), France, in accordance with the ethical principles of the Declaration of Helsinki and with the approval of the local ethical committee (CPP number: 18.11.30.42116; Clinicaltrial.gov: NCT03846596). Blood samples from septic patients were collected only if the patient filled the following criteria: Having a diagnosis of sepsis within the last 24h, being admitted at the ICU, and having >80% of IG in peripheral blood as quantified by flow cytometry (Fig.S7, A and B).

Immature granulocytes (IG) are absent from PB in healthy donors. However, hematopoietic stem cell donors receive multiple doses of Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) to induce the release of CD34+ stem cells from bone marrow in PB. During the process, IG are also release in the PB. A leftover aliquot was collected with the donor consent (Number CODECOH AC-2021-4790), in the Center for biological resources of the CHU of Limoges, to isolate IGs. Compared to IG from septic patients, whose liberation is secondary to the infectious signal, mediated by proinflammatory cytokines and pathogen associated molecular patterns (1), IG liberated by G-CSF are considered non-primed. Therefore, this cell subset will be further called non-primed-IG (NP-IG).

Isolation of granulocytes

Immature and Mature granulocytes were obtained by negative magnetic sorting from collected peripheral blood (PB) using the EasySep Direct Human Neutrophil Isolation kit (STEMCELL). 5 mL of peripheral blood was incubated for 5 min at RT with isolation cocktail and RapidSphere at a concentration of 50 μ L/mL according to manufacturer's instruction in 15 mL polypropylene tubes. Phosphate buffered saline (PBS) (Eurobio Scientific) was added to top up to 12 mL and the tube was placed in the "The Big Easy" magnet (STEMCELL) for 10 min. The granulocytes in suspension were obtained by pouring in a new tube. The process was repeated twice to achieve a high purity of the granulocytic population. The lower cutoff of granulocytes (IG/MG) concentration was set at 90 % among total cells collected as quantified by flow cytometry. The final concentration of isolated granulocytes was counted using Countess 3FL Automated cell Counter (Invitrogen). Purity was checked by flow cytometry (Figure S7,A and B) after labeling the cells with antibodies summarized in Table S2.

Priming of Non-primed-IG

The granulocytes from stem cells donors were incubated with plasma from septic patients at a concentration of $10 \cdot 10^6$ cells/mL for 10 min at 37°C. Then, the granulocytes were washed with PBS, centrifuged and resuspended in RPMI 1640 medium (Eurobio) to reach a concentration of $1 \cdot 10^6$ cells/mL.

Morphology analysis of IG

After isolation, the granulocytes from septic patients and healthy donors were suspended in RPMI 1640 medium to reach a concentration of 1.10^6 cells/mL. Then, 100 μ L was centrifuged over a microscope slide using the EpreDia™ cytocentrifuge Cytospin 4 (Thermofischer). The slides were stained with May-Grünwald-Giemsa dyes (CellaVision) and acquired with the NanoZoomer RS2 (Hamamatsu). Images were analyzed with the NDP view software (Hamamatsu) (Fig. S7,C and D).

E. coli strains and plasmids

Bacterial strains and plasmids used in this study are summarized in the Supplementary Table 1. Plasmids schemes and associated phenotype of GFP expression as assessed by flow cytometry are shown in Fig. 1B and Fig. S1.

Construction of the mCherry-lexAInd3 strain

The mCherry-lexAInd3 strain, expressing constitutively mCherry protein, was constructed by transduction of a P1 lysate carrying the *km-~~frt~~-mcherry* cassette (2) at the λ att of an *E. coli* MG1656-lexAInd3 receiver strain. The kanamycin resistance was removed in a second step using a FLP recombinase, as previously described (3). Product colonies were screened by Sanger sequencing for the presence of the *mcherry* gene (primers IATT-ext5 and IATT-ext3 listed in the Table S3). Then, mCherry expression was verified by flow cytometry.

Construction of the p-gfp plasmid

The p-gfp plasmid was constructed starting from the pP(*sfiA*)*::gfp plasmid by the deletion of the P*sfiA** sequence, using the primers DelP*sfiA*Rev and DelP*sfiA*Fwd (Table S3), using the In-Fusion HD cloning kit (Clontech). Deletion was confirmed by Sanger sequencing using the primers Km-verif-3 and MRVD-2 (listed in the Table S3), and by the loss of green fluorescence assessed by flow cytometry.

Bacterial culture

Strains were grown overnight at 37°C under agitation at 300 rpm in Luria-Bertani (LB) medium supplemented with kanamycin (Km 25 μ g/ml) when required. A 1:100 dilution was incubated under the same conditions until it reached an OD₆₀₀ of 0.6-0.8. The measured OD₆₀₀ was used to calculate the volume required for a final concentration of 5.10^8 bacteria per mL (OD₆₀₀ of 1) for incubation with granulocytes.

Incubation of granulocytes with bacteria

The isolated granulocytes were incubated for the indicated time (0-10-30-60 and 90 min) with the mCherry-*E. coli* strains at a ratio of 200 bacteria per 1 granulocyte at 37°C in a water bath. Incubation was performed in hemolysis tubes with RPMI 1640 medium, supplemented with 10% fetal bovine serum (Eurobio) heat-inactivated at 56°C, 1% amino acid (Gibco), glutamine (Gibco), pyruvate (Gibco) and vitamins (Gibco). After each incubation time, samples were removed from the water bath and placed on ice until processing.

Clearance of extracellular bacteria

To recover phagocyte bacteria for gene expression experiments we used a sucrose gradient. After incubation, tubes were placed in ice to stop phagocytosis. To eliminate extracellular bacteria, a density gradient centrifugation was performed using ice-cold sucrose 50% and a 300 x g centrifugation for 8 min at 4°C (4). The upper phase suspension containing the extracellular bacteria was discarded, and the sucrose phase diluted with 1x volume of cold PBS. After a second centrifugation at 250 x g for 5 min, the pellet containing the granulocytes with the phagocytes bacteria was recovered.

Cytometry analyses

Immunophenotyping, phagocytosis, ROS production and SOS response measurements described below were acquired by flow cytometry (CytoFLEX LX, Beckman coulter) and analyzed using Kaluza 2.1 software (Beckman).

Immunophenotyping of IG

Granulocytes were incubated with *E. coli* MG1656 at a 200:1 ratio at different times (10, 30, 40, 60, 90 min). Then, the mix was stained with the antibodies summarized in the Table S4 for 15 min at 4°C. After a washing step, the samples were analyzed by flow cytometry.

Phagocytosis measurement

Incubation of each granulocyte subset with the mCherry-*E. coli* strains was performed as explained before, for 10, 30, 40, 60 and 90 min. After incubation, samples were split in 2, one for flow cytometry analysis and one for confocal microscopy. For flow cytometry, granulocytes were stained with the viability marker DAPI (BD Biosciences) and the samples were fixed with a formaldehyde solution (Merck) at a final concentration of 2% in PBS. For confocal microscopy, granulocytes were fixed and permeabilized using a formaldehyde solution 4% (Merck) for 10 min at 4°C. After incubation, the samples were stained with CytoPainter Phalloidin-iFluor 405 Reagent (Abcam) for 30 min at 4°C in the dark in order to stain granulocytes' actin filaments. After a washing step with PBS, the pellet was resuspended with 25µL of PBS and deposited on microscope slide (SUPERFROST® PLUS, Thermofisher). Pictures were acquired by confocal microscopy (LSM880 Zeiss) and analyzed using IMARIS 9.6 software (Bitplane). In both experiments, the presence of phagocytosed bacteria was determined by the presence of mCherry-*E. coli* (red fluorescent bacteria).

Reactive Oxygen Species measurement

After incubation with mCherry-*E. coli* (for 10, 30, 60 min), granulocytes' ROS were detected using the Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit (Abcam) as described in the supplier protocol. In brief, 1µL of oxidation-sensitive probe was added at 1 million cells/mL and incubated for another 30 min at 37°C in a water bath. The probe detects intracellular ROS such as superoxide and hydroxyl radical in live cells. DAPI dye (BD Biosciences) was added in the sample for 5 min at 4°C and samples were fixed with a solution of PBS 2% formaldehyde (Merck) to stop any further ROS production. Data were acquired by flow cytometry. DAPI positive cells were considered dead and excluded from the analysis.

Assessment of the Bacterial SOS response induction

Induction of SOS response was analyzed by flow cytometry and confocal microscopy. For flow cytometry, the fixed granulocytes were incubated with bacteria were acquired with the flow cytometer (CytoFLEX LX, Beckman coulter) and analyzed for GFP expression. A parallel condition incubating mCherry-*E. coli* with granulocytes was performed adding culture media instead of the oxidation-sensitive probe, to make sure the SOS induction results were replicable to those with the probe, independently from the presence of the oxidation-sensitive probe.

For confocal microscopy, after incubation with Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit, the granulocytes incubated with mCherry-*E. coli*/pP(*sfiA*)::gfp were centrifuged 5 min at 200 x g and permeabilized with a solution of 4% formaldehyde (Merck) for 10 min at 4°C. After incubation, the samples were stained with CytoPainter Phalloidin-iFluor 405 Reagent (Abcam) for 30 min at 4°C in the dark in order to stain granulocytes' actin filaments. After a washing step with PBS, the pellet was resuspended with 25µL of PBS and deposited on microscope slide (SUPERFROST® PLUS, ThermoFisher). Pictures were acquired by confocal microscopy (LSM880 Zeiss) and analyzed using IMARIS 9.6 software (Bitplane).

Quantification of *qnrB2* transcripts

Sample preparation

E. coli MG1656/pPqnrB-*qnrB2* and MG1656/*lexA*Ind3/pPqnrB-*qnrB2* were incubated at a 200:1 ratio with granulocytes from healthy donors ($n=5$), stem cells donors ($n=5$), or septic patients ($n=4$) for 90 min at 37°C in a water bath. An additional condition of bacteria incubated alone was performed in parallel to quantify the basal expression of *qnrB2*. Granulocytes and extracellular bacteria were separated as described above.

RNA extraction

The cellular pellet was resuspended in 1mL ice-cold sterile water and incubated for 10 min on ice. Then, a 15 min incubation with RNase A at room temperature (Macherey-Nagel) was performed to eliminate contaminating eukaryotic RNA. RNase A was cleared out by centrifugation ($>12000 \times g$ for 10 min, RT), and the pellet washed in filtered PBS. The final product was immediately processed with the RNeasy Mini Kit (Qiagen), following manufacturer's instructions to recover bacterial RNA. Contaminating DNA was removed from RNA samples using the Turbo-DNAfree kit (ThermoFisher Scientific). Purified RNA were dosed using a Nanodrop ND1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

Retro-transcription (RT) was performed following indications of the PrimeScript RT Reagent Kit (Perfect Real Time, Takara), in a final volume of 60 µL. RNA concentrations were all adjusted to a final quantity equivalent to that of the less concentrated sample (32 ng). A matching negative control of each sample without the RT enzyme mix was added.

Samples were then incubated at 37°C for 15 min to allow retro-transcription, followed by 5 seconds at 85°C to inactivate the RT. cDNA were quantified with the Perfecta fastmix II (QuantaBio), following manufacturer's instructions with appropriate primers (10 µM) and a FAM-probe (10 µM) (Table S3). Samples were processed in technical triplicates. A standard curve was done using a range of 10^8 to 10^2 copies of a plasmid containing the targeted genes. Each gene (chromosomal *rpoB* and plasmidic *qnrB2* and *aph(3')-IIa*) was targeted separately.

The chromosomal housekeeping *rpoB* gene was used for normalization. To account for the multiple plasmid copies per bacteria, the plasmidic gene conferring constitutive expression of kanamycin resistance (*aph(3')-IIa*) was used for normalization of the *qnrB2* expression.

The number of cDNA gene copies considered was a product of the subtraction of the mean between each triplicate Sq, and the Sq measured for the corresponding RT negative control

Western blot

Granulocytes were incubated with mCherry-*E. coli* for 10, 30 and 60 min at 37°C in a water bath, the tubes were centrifuged for 5 min at 300 x g. The granulocyte pellets were lysed with RIPA lysis buffer (Santa Cruz) supplemented with a protease (PMSF 200mM, Santa Cruz) and phosphatase inhibitor (Na-Orthovanadate 100nM, Santa Cruz) for 30 min in ice, centrifuged for 20 min at 18000 x g and the supernatant containing proteins was kept. Protein concentration was estimated from standard range of BSA (2 mg/mL, BIO-RAD) with the addition of Bradford's reagent (BIO-RAD) and then the protein concentration was measured with Multiskan FC at 595 nm (Thermofisher).

Proteins (30 µg/µL) were boiled for 5 min at 95°C with 4X Laemmli buffer (BIORAD) supplemented with 10 % β-mercaptoethanol (BIORD), separated by SDS-PAGE and transferred to the PolyVinylidene Fluoride (PVDF) transfer membrane (Life Sciences). Membranes were blocked using 5 % BSA (Euromedex) in Trisma Base 10X (TBS, Sigma) supplemented with 0.1 % Tween20 solution (Sigma) for 1 h at room temperature and incubated with primary antibodies: anti-gp91phox (Thermofisher) and anti-p47phox (Cellsignaling) at a dilution of 1:1000 in 5 % BSA in TBS-Tween20 overnight at 4°C. The primary antibodies were detected with HRP-conjugated secondary antibody anti-rabbit (BIORAD) at a dilution of 1:5000 in 5 % skin milk (Millipore) in TBS-Tween20 for 1 h at RT. β-actin polymerase Antibody (Invitrogen) was used as control at a dilution of 1:2000 with 5% skin milk in TBS-Tween20 for 1 h at RT and was detected with secondary antibody anti-rabbit at a dilution of 1:5000 in 5% skin milk for 1 h at RT. A chemiluminescent HRP substrate was used for signal detection (Millipore) on ChemiDoc™ touch Imaging System (BIO-RAD). Densitometric quantification was performed using Image-lab software v6.0 (BIO-RAD).

Statistical analysis

All graphs were created using Graphpad prism 8.4.3 software. The geometric mean (MFI of mCherry, MFI of CD64, CD32 and CD16, MFI of ROS production by phagocytic cells, % phagocytic cells, % bacteria GFP+ production and SOS induction) of each variable measured by flow cytometry was compared between each condition and the results of incubation between mCherry-*E. coli* and HD-MG at the matching time-point using the two-way ANOVA test. Statistical significance was defined as a p<0.05, and significant p-values represented for each point as follows: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

SUPPLEMENTARY FIGURES

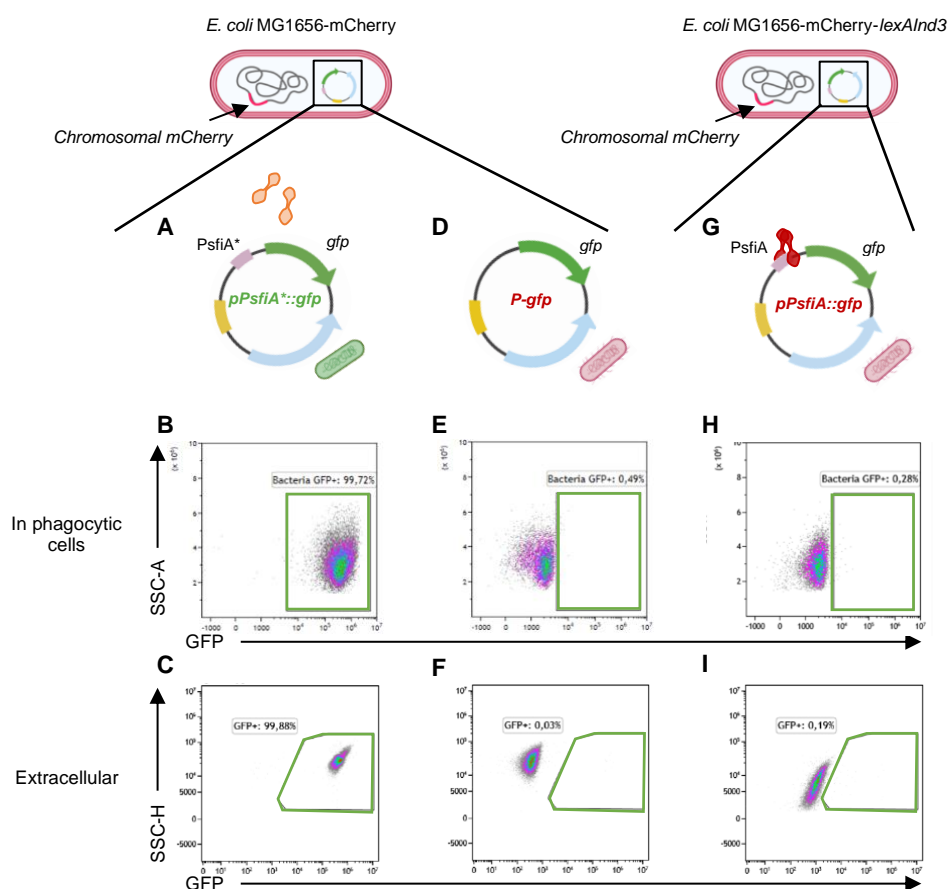


Fig. S1. Bacterial controls of SOS induction model. An *mCherry-E. coli* strain expressing constitutively the *mCherry* was used, allowing bacterial identification by flow cytometry and confocal microscopy. SOS induction was followed by the expression of the *gfp* gene under the control of the *sfiA* promoter (*PsfIA*), carrying a LexA box, and thus SOS inducible. **(A)** A mutation of the LexA box in *PsfIA* prevents LexA binding and SOS repression of *gfp* expression (*pPsfIA*::gfp* plasmid) resulting in a constitutive green fluorescence expression, identifiable both in phagocytosed **(B)** and extracellular free bacteria **(C)**. A negative control for GFP fluorescence was created by deleting the *psfIA* fragment from the *PsfIA*::gfp* plasmid (*p-gfp*) **(D)** The lack of GFP expression is evidenced in phagocytosed **(E)** and free bacteria **(F)**. To control for SOS dependence of GFP expression in this model, the “*pP(sfiA)::gfp*” reporter plasmid was transformed in a *mCherry-LexAInd3* mutant **(G)**, expressing a non-cleavable LexA protein, and thus SOS negative. *LexAInd3* mutation was related to a continuous repression of the *gfp* expression, as evidenced by flow cytometry **(H and I)**.

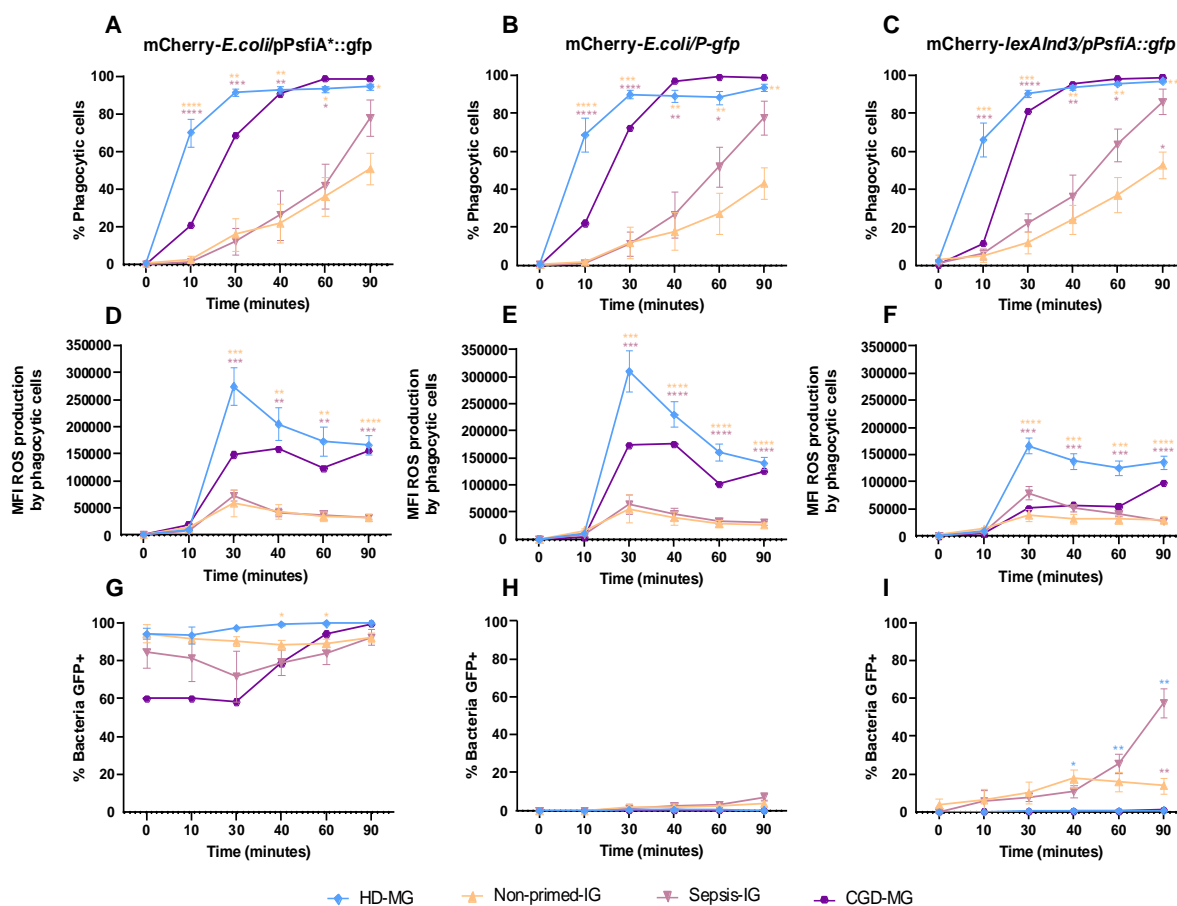


Fig. S2. Phagocytosis, ROS production and SOS response in control bacteria. The different granulocyte subsets (HD-MG, Non-primed-IG, Sepsis-IG and CGD-MG) were incubated in parallel with “*mCherry-E. coli/p-gfp*” (Negative control for GFP expression, **A, D, G**), “*mCherry-lexAInd3/pP(sfiA)::gfp*” (negative control for SOS induction, **B, E, H**), and “*mCherry-E. coli/pP(sfiA)*::gfp*” (positive control for GFP expression, **C, F, I**), and followed over time for: phagocytosis (**A – C**), ROS production (detected by oxidation-sensitive probe and expressed as median fluorescence intensity (MFI); **D – F**) and induction of SOS response (quantified as percentage of granulocytes containing GFP+ bacteria among phagocytic granulocytes; **G – I**). Sepsis-IG (pink, $n=5$), Non-primed-IG (yellow, $n=5$), HD-MG (blue, $n=10$) and CGD-MG (purple, $n=1$). ANOVA test, * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; **** $p<0.0001$.

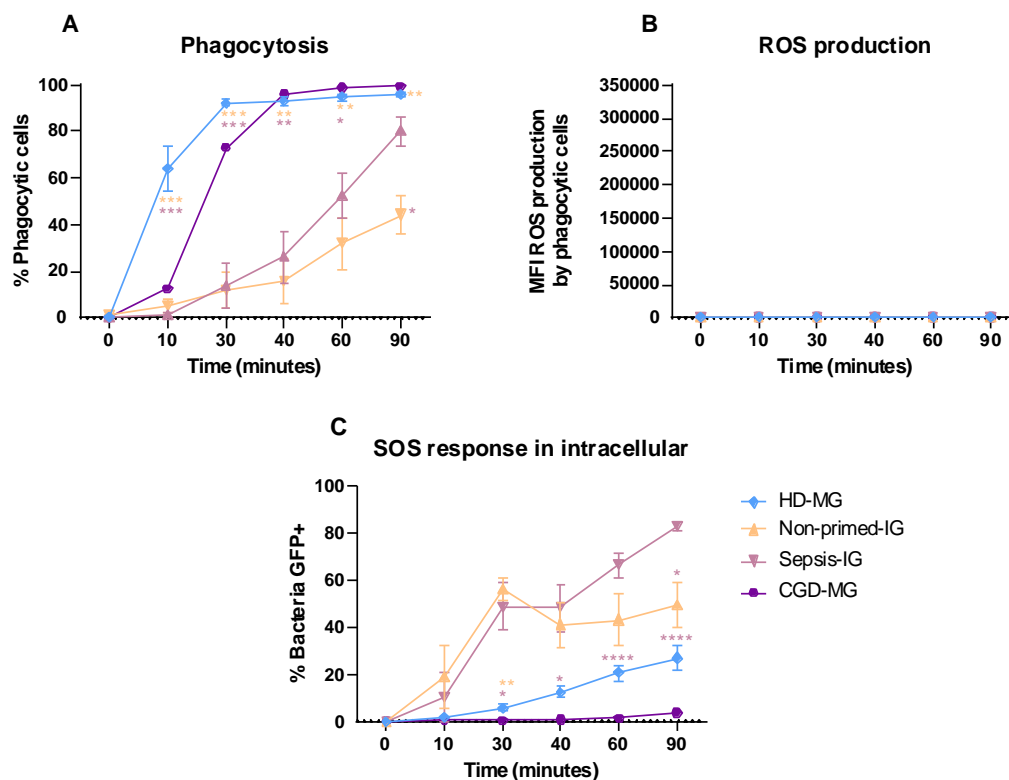


Fig. S3. Phagocytosis, ROS production and SOS response without Deep Red probe. Granulocytes were incubated with mCherry-*E. coli*/pSU38-P(*sfiA*)::*gfp* in the absence of the Deep-red probe for 0, 10, 30, 40, 60 and 90 minutes. **(A)** Proportion of phagocytic cells over time. Sepsis-IG (pink, $n=6$), H D-MG (blue, $n=10$), Non-primed-IG (yellow, $n=5$) and CGD-MG (purple, $n=1$). **(B)** ROS production in phagocytic cells estimated by Deep Red probe detection, No fluorescence was detected in the 650/675nm channel, used to detect the Deep red probe. **(C)** Induction of SOS response quantified as percentage of granulocytes containing bacteria GFP+. Error bars represent mean \pm SEM. Each color star is compared with the corresponding color curve by used ANOVA test, * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; **** $p<0.0001$.

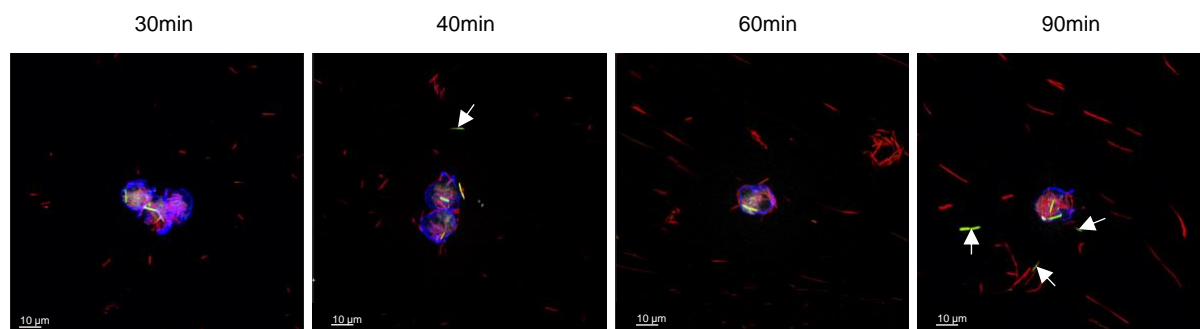


Fig. S4. SOS response induction on the extracellular environment with Sepsis-IG. mCherry-*E.coli*/pP(*sfiA*)::*gfp* were incubated with Sepsis-IG granulocytes over time and visualized by confocal microscopy. Granulocytes' actin filaments were stained using phalloidin (blue) and ROS presence identified by addition of an oxidation sensitive probe (white). SOS induction in bacteria was evidenced as green fluorescence (expression from pP(*sfiA*)::*gfp*) and presence of green fluorescent bacteria outside granulocyte indicated with a white arrows.

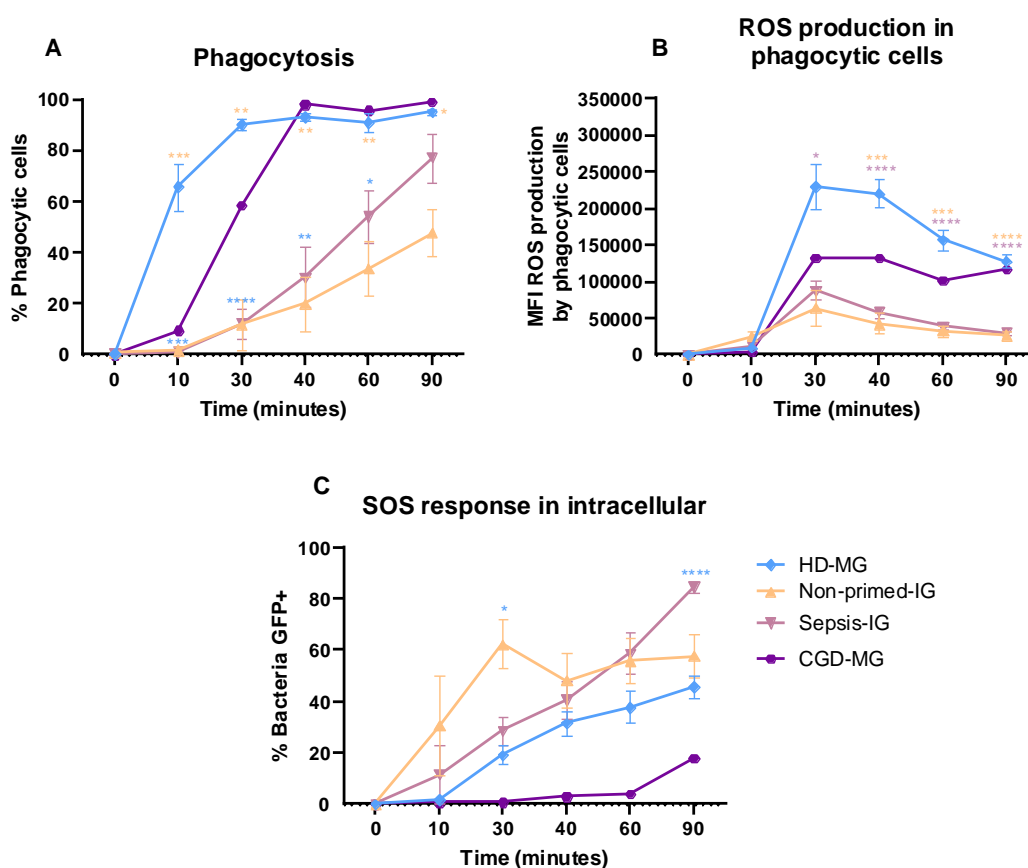


Fig. S5. Phagocytosis, ROS production and SOS response of Non-primed-IG vs HD-MG, Sepsis-IG or CGD-MG. Granulocytes (HD-MG, Non-primed-IG, Sepsis-IG and CGD-MG) incubated with mCherry-*E. coli*/pP(*sfiA*)::*gfp* were analyzed for (A) phagocytosis (% of granulocytes containing red bacteria); (B) ROS production (detected by oxidation-sensitive probe and expressed as median fluorescence intensity (MFI) and (C) SOS response induction (% of granulocytes containing GFP+ bacteria among phagocytic granulocytes) over time by flow cytometry. Error bars represent mean \pm SEM. Each color star is compared with the corresponding color curve by used ANOVA test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Sepsis-IG (pink, $n=5$), Non-primed-IG (yellow, $n=5$), HD-MG (blue, $n=10$) and CGD-MG (purple, $n=1$).

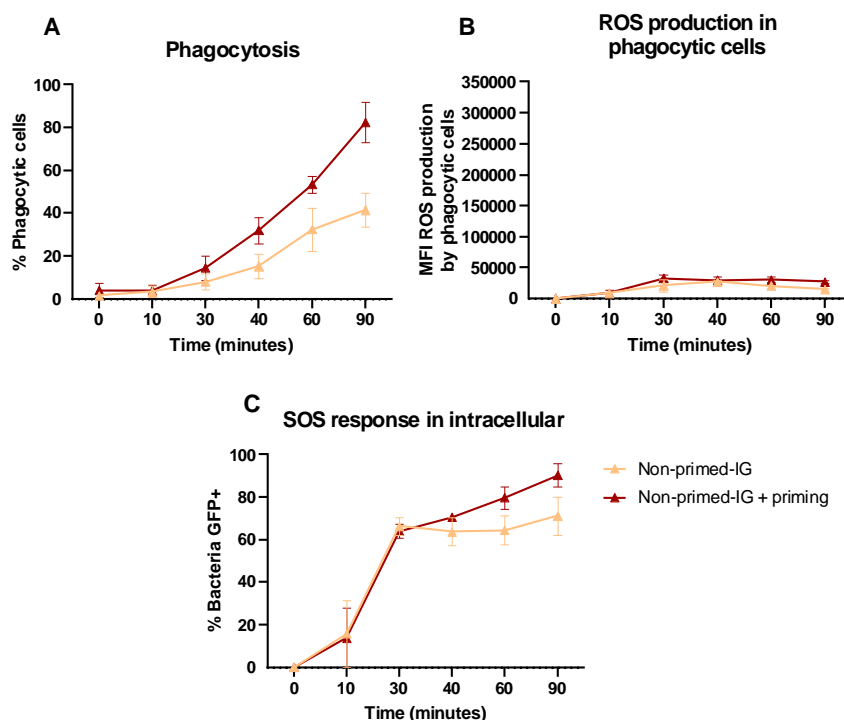


Fig. S6. Phagocytosis, ROS production and SOS response after priming of Non-primed-IG. Granulocytes from stem cells donors were incubated with plasma from septic patients during 10 min (Non-primed-IG + priming; red) or not (Non-primed-IG; yellow) before being incubated with mCherry-*E. coli/pP(sfiA)::gfp* over time. Samples were analyzed for **(A)** phagocytosis (% of granulocytes containing red bacteria); **(B)** ROS production (detected by oxidation-sensitive probe and expressed as median fluorescence intensity (MFI) and **(C)** SOS response induction (% of granulocytes containing GFP+ bacteria among phagocytic granulocytes) by flow cytometry. Non-primed-IG + priming (red, $n=3$), Non-primed-IG (yellow, $n=3$). Error bars represent mean \pm SEM. All matching timepoints were compared between Non-primed IG and Non-primed IG + priming using the ANOVA test and results were non significant.

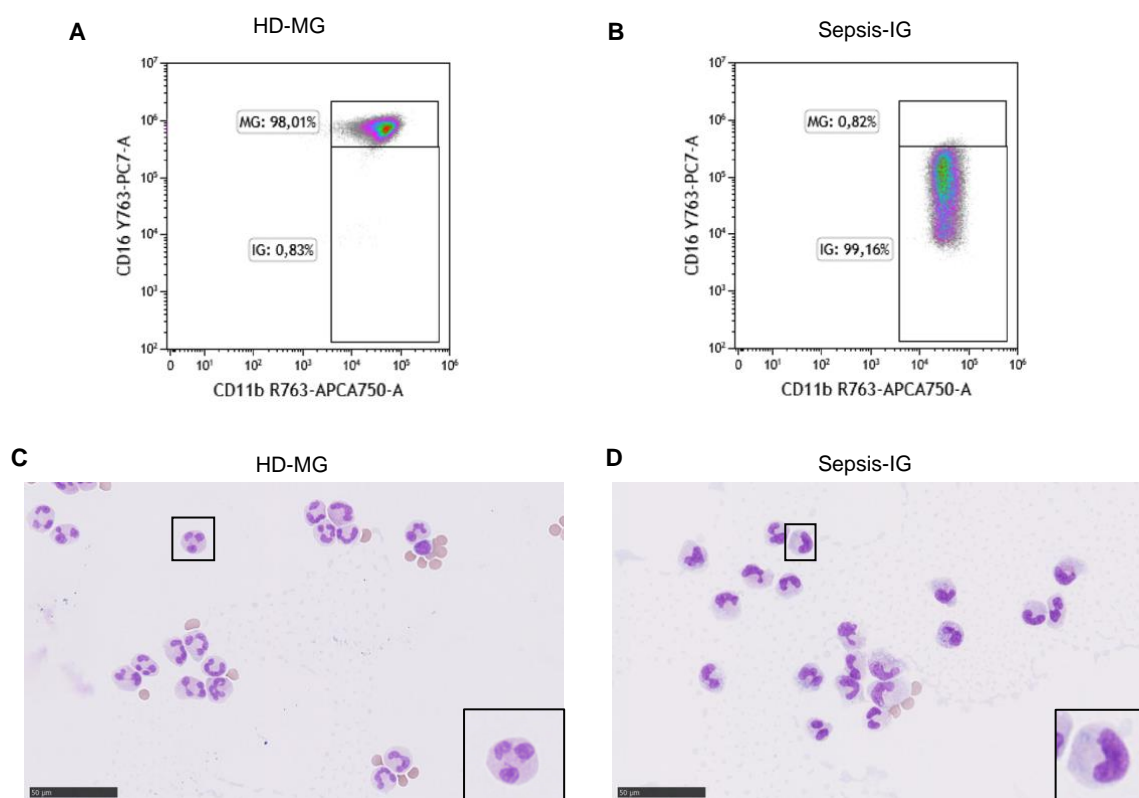


Fig. S7. Characterization of mature and immature granulocytes by flow cytometry and May-Grünwald-Giemsa staining. All patients and donor samples were screened by flow cytometry to quantify the proportion of mature (MG) and immature (IG) granulocytes. A sample of whole blood was stained with the antibodies anti-CD16-PECy7 and anti-CD11b-APCCy7. **(A)** MG were CD11b+CD16high, **(B)** while IG were defined as CD11b+ CD16low . To confirm that CD16low staining was accompanied by an IG phenotype, cells were additionally stained with May-Grünwald-Giemsa for cytological characterization. **(C)** MG are characterized by poly-lobed nucleus and **(D)** IG from Septic patient are mainly band cells, with bean shape nucleus compared to **(C)** .

SUPPLEMENTARY TABLES

Supplementary Table 1. *E. coli* strains and plasmids

<i>E. coli</i> strains		
Name in this study	Description	Reference
WT	MG1656 <i>lacZ</i> - derivative of <i>E. coli</i> MG1655	(5)
<i>LexAInd3</i>	MG1656- <i>lexAInd3</i> , strain expressing a LexA mutant unable of autoproteolysis leading to constitutive repression of the SOS response	Laboratory collection
mCherry- <i>E. coli</i>	MG1656 carrying the <i>mcherry</i> gene at the λ att site, constitutive expression of mCherry.	(2)
mCherry- <i>lexAInd3</i>	MG1656- <i>lexAInd3</i> carrying the <i>mcherry</i> gene at the λ att, constitutive expression of mCherry	This study
Plasmids		
pPsfIA:: <i>gfp</i>	pSU38 Δ tot/ <i>lacZ</i> carrying a transcriptional fusion of the <i>sfiA</i> promoter, PsfIA, with a <i>gfp</i> gene; KmR	Laboratory collection
pPsfIA*:: <i>gfp</i>	pPsfIA:: <i>gfp</i> in which a mutation in the LexA-box was introduced leading to derepressed PsfIA*; KmR	Laboratory collection
p- <i>gfp</i>	pSU38 Δ tot/ <i>lacZ</i> carrying the <i>gfp</i> gene without promoter; KmR	This study
pPqnrB2- <i>qnrB2</i>	<i>qnrB2</i> promoter (PqnrB) and gene cloned into pSU38 Δ tot/ <i>lacZ</i> ; KmR	(6)
pPqnrB2lexA*- <i>qnrB2</i>	pPqnrB2- <i>qnrB2</i> with <i>qnrB2</i> promoter mutated in the LexA-box (PqnrBlexA*); KmR	(6)

Supplementary Table 2. Fluorescent-labeled antibodies to assess granulocyte purity

Antibodies	Species	Target species	Concentration	Dilution	Conjugate	Clone	Company
Anti-CD45	Mouse	Human	100 μ g/mL	1:80	AmCyan	2D1	BD Biosciences
Anti-Lin*		Human	40.6 μ g/mL	1:40	FITC	NCAM16,2, M ϕ P9, SK7, SJ25C1, L27	BD Biosciences
Anti-CD15	Mouse	Human	50 μ g/mL	1:80	BV650	W6D3	Biolegend
Anti-CD11b	Mouse	Human	200 μ g/mL	1:80	APCCy7	ICRF44	BD Biosciences
Anti-CD16	Mouse	Human	200 μ g/mL	1:80	PECy7	3G8	BD Biosciences
Fixable Viability Dye				1:160	Viakrome 808		Beckman coulter

Supplementary Table 3. Primers and probes

Construction	Primer name	Primer sequence (5'→ 3')	Reference
mCherry-lexAInd3	λATT-ext5	GGCGATAAATTGCCGCATCG	(2)
	λATT-ext3	TGCCACCATCAAGGGAAAGCCC	(2)
p-gfp	DelPsfIARev	GATCCATTATTTTCGTAGTTAAGAATTCGAT	This study
	DelPsfIAFwd	CGAAAATAATGGATCCTAAAGGAGAAGAAGCT	This study
	Km-verif-3	GGATTCATCGACTGTGGCCG	Laboratory collection
	MRVD-2	TTCTGCTGACGCACCGGTG	Laboratory collection
RT-qPCR			
	rpoB-R1	GTTTGGTACGCGCAGAGAAG	(2)
	rpoB-L2	CCGGTATCGTTTACATTGGTG	(2)
	kana R1	GTAGCCGGATCAAGCGTATG	(2)
	kana L1	GAAGGGACTGGCTGCTATTG	(2)
	qnrB2 LC1	CGGCGAGTTTTCGACTTT	(6)
	qnrB2 LC2	ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	(6)
	rpoB-probe	[6FAM]CTGGTTGGTAAGGTAACGCCGAAAGGT [TAM]	(2)
	kana-probe	[6FAM]TCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGC[BHQ1]	(2)
	qnrB2-probe	[6FAM]TGGGTGACTTAGATATTCCGGCGCGTT(Tamra)	(6)

Supplementary Table 4. Fluorescent-labeled antibodies for surface makers

Antibodies	Species	Target Species	Concentration	Dilution	Conjugate	Clone	Company
Anti-CD45	Mouse	Human	100 µg/mL	1:80	AmCyan	2D1	BD Biosciences
Anti-Lin*		Human	40.6 µg/mL	1:40	FITC	NCAM16,2, MφP9, SK7, SJ25C1, L27	BD Biosciences
Anti-CD15	Mouse	Human	50 µg/mL	1:80	BV650	W6D3	Biolegend
Anti-CD11b	Mouse	Human	200 µg/mL	1:80	APCCy7	ICRF44	BD Biosciences
Anti-CD16	Mouse	Human	200 µg/mL	1:80	PECy7	3G8	BD Biosciences
Anti-CD32	Mouse	Human	200 µg/mL	1:80	BUV661	FLI8.26	BD Biosciences
Anti-CD64	Mouse	Human	100 µg/mL	1:80	BV605	10.1	Biolegend
Fixable Viability Dye				1:160	Viakrome 808		Beckman coulter

REFERENCES

1. Manz MG, Boettcher S. Emergency granulopoiesis. *Nat Rev Immunol*. 2014 May;14(5):302–14.
2. Tlili L, Ploy MC, Da Re S. Microniches in biofilm depth are hot-spots for antibiotic resistance acquisition in response to *in situ* stress [Internet]. *Microbiology*; 2021 Nov [cited 2022 Oct 12]. Available from: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.11.03.467100>
3. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000 Jun 6;97(12):6640–5.
4. Drevets DA, Canono BP, Campbell PA. Measurement of Bacterial Ingestion and Killing by Macrophages. *Current Protocols in Immunology* [Internet]. 2015 Apr [cited 2022 Oct 18];109(1). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142735.im1406s109>
5. Rasmussen LJ, Møller PL, Atlung T. Carbon metabolism regulates expression of the *pfl* (pyruvate formate-lyase) gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1991 Oct;173(20):6390–7.
6. Da Re S, Garnier F, Guérin E, Campoy S, Denis F, Ploy M. The SOS response promotes *qnrB* quinolone-resistance determinant expression. *EMBO Rep*. 2009 Aug;10(8):929–33.
7. Wang Y, Wu J, Newton R, Bahaie NS, Long C, Walcheck B. ADAM17 cleaves CD16b (FcγRIIIb) in human neutrophils. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2013 Mar;1833(3):680–5.

Discussion et Perspectives

L'hypothèse de ces travaux était que la faible concentration d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites par les granulocytes immatures (GI) n'était pas capable d'induire la mort des bactéries mais au contraire d'induire la réponse SOS bactérienne. Cette réponse permet aux bactéries de survivre suite à la réparation de leur ADN endommagé par les ROS. Ainsi, dans un premier temps, un modèle *in vitro* a été utilisé afin de mettre au point les techniques de manipulation pour ne pas utiliser les échantillons sanguins précieux, et par la même occasion de valider notre hypothèse. Dans un deuxième temps, ces mêmes expériences ont été confirmées par un modèle *ex vivo* en utilisant les GI de donneurs de cellules souches hématopoïétiques et de patients septiques en comparaison avec des neutrophiles de donneurs sains et d'un patient atteint de la maladie chronique granulomateuse (CGD).

Pour répondre à notre hypothèse, la lignée cellulaire HL60 a été différenciée en présence d'acide rétinoïque (ATRA) pendant 10 jours. Nos premiers résultats de suivi de la différenciation avec l'ATRA sur 12 jours a permis de déterminer d'après la coloration au May-Grünwald-Giemsa et l'expression des marqueurs de granulocytes (CD16, CD11b) le meilleur temps de culture pour obtenir un nombre suffisant de GI (HL60-GI) et de neutrophiles (HL60-neutrophiles). Ces résultats ne sont pas en lien avec ce qui est connu dans la littérature, puisque les auteurs ont mis en évidence que les HL60 pouvaient être différenciées en neutrophiles seulement pendant 5 (Imaizumi et al., 1987; Manda-Handzlik et al., 2018) ou 7 jours de culture (Guo et al., 2021) en présence de l'ATRA. Ces analyses n'ont été déterminées qu'à partir de coloration May-Grünwald-Giemsa, une technique où la quantification des cellules est difficile et le choix du champ au microscope assez facile pour n'avoir que des neutrophiles (Imaizumi et al., 1987). De plus, certains articles ont analysé séparément l'expression des marqueurs CD11b et CD16 à la surface des HL60 différenciées par cytométrie en flux, empêchant de différencier les GI étant CD16^{low} CD11b⁺ et les neutrophiles CD16^{high} CD11b⁺ (Guo et al., 2021; Manda-Handzlik et al., 2018; Wang et al., 2020).

A l'issue de cette différenciation, nous avons un mélange hétérogène de cellules HL60 plus ou moins différenciées. Les HL60-GI et les HL60-neutrophiles ont donc été triées afin d'étudier avec précision la phagocytose et la production de ROS des HL60-GI en comparaison avec les HL60-neutrophiles. Nos résultats ont mis en évidence que les HL60-GI avaient une diminution de capacité à phagocyter *E.coli* que les HL60-neutrophiles au cours du temps. Mais la différence de production de ROS entre les 2 types cellulaires n'a pas pu être visualisée par

cytométrie en flux. Ce problème peut être expliqué par le fait que les HL60 sont une lignée cellulaire cultivée dans un milieu de culture pouvant induire un stress aux cellules et activer leur production de ROS. Il est documenté que les HL60 non différenciées ne possèdent pas le complexe NADPH oxydase mais que les protéines de ce complexe en particulier p47^{phox}, sont produites à partir du 6^{ème} jour de différenciation avec l'ATRA associée à une production de ROS importante (Levy et al., 1990). Cette information peut expliquer le fait que nous n'observons pas de différence d'expression de la protéine p47^{phox} entre les HL60-GI et HL60-neutrophiles. De plus, l'ajout d'ATRA sur les HL60 active la voie de signalisation via la protéine MEK responsable de l'activation des protéines kinases présentes dans cette voie, telle que ERK1/2 (Tasseff et al., 2017). Ce qui pourrait expliquer l'absence de différence significative entre les HL60-GI et les HL60-neutrophiles pour les protéines ERK1/2 et p38MAPK. Toutefois, en utilisant le luminol qui permet de doser les ROS totaux, nous avons pu observer une meilleure différence bien que non significative, des ROS produits par les HL60-GI en comparaison avec les HL60-neutrophiles. Bien que la production totale de ROS soit importante nous nous intéressons plus précisément à la production de ROS du phagosome, afin de savoir s'ils sont capables d'induire la réponse SOS bactérienne. La lignée cellulaire a été utile pour mettre au point les techniques de manipulation, mais ce n'est pas un bon modèle d'étude pour analyser les fonctions antimicrobiennes des HL60-GI en comparaison avec leur homologue les HL60-neutrophiles.

En absence de réponse sur les fonctions antimicrobiennes des GI, nous avons décidé de créer un modèle *ex vivo* en utilisant des échantillons sanguins de donneurs sains, de cellules souches hématopoïétiques et de patients septiques. A l'aide de ce modèle nous avons pu confirmer que les GI de patients septiques avaient une diminution de capacité à phagocyter par rapport aux neutrophiles de donneurs sains confirmant les données de la littérature (Drifte et al., 2013; Sun et al., 2022; Taneja et al., 2008). Nous avons aussi montré que les GI de donneurs de cellules souches hématopoïétiques avaient une plus faible capacité à phagocyter que les GI de patients septiques, probablement dus à une pré-stimulation des GI de patients septiques.

Lors d'une infection, les neutrophiles circulants sont en contact avec les facteurs infectieux (cytokines, DAMPs, PAMPs) qui permettent de pré-stimuler (priming) les neutrophiles afin d'améliorer la phagocytose du pathogène, la production de cytokines et de ROS (Metzemaekers et al., 2020; Miralda et al., 2017; Vogt et al., 2018). Afin d'être au plus proche de la réalité, nous avons ajouté du plasma de patients septiques dans lequel se trouvent les facteurs infectieux, aux neutrophiles de donneurs sains et aux GI de donneurs de cellules souches hématopoïétiques. Nos résultats ne montrent pas d'amélioration de phagocytose et

de production de ROS par les neutrophiles de donneurs sains probablement parce que sans pré-stimulation nous observons déjà une capacité maximale des neutrophiles qui ne peut donc pas être améliorée. Cependant, la pré-stimulation des GI de donneurs de cellules souches hématopoïétiques améliore leur capacité à phagocyter qui est similaire à celle des GI de patients septiques. Ce résultat confirme que les GI de patients septiques sont pré-stimulés par la persistance du pathogène dans l'organisme, ce qui améliore leur capacité à phagocyter mais pas leur production de ROS. Toutefois, cette pré-stimulation ne semble pas suffisante car ils possèdent une capacité à phagocyter qui reste inférieure à celle des neutrophiles.

Afin de phagocyter le pathogène, les neutrophiles possèdent 3 récepteurs $Fc\gamma R$, CD16 ($Fc\gamma RIII$), CD64 ($Fc\gamma RI$) et CD32 ($Fc\gamma RII$) qui permettent de reconnaître le pathogène, de le capturer et de former le phagosome dans lequel il sera dégradé. Nos résultats ont montré que les GI possèdent une faible expression du récepteur CD16 ($Fc\gamma RIII$) à leur surface, ce qui peut expliquer leur faible capacité à phagocyter. Ces résultats sont en accord avec la littérature, puisque les GI sont connus pour être $CD16^{low}$ (Drifte et al., 2013; Grieshaber-Bouyer and Nigrovic, 2019; Manz and Boettcher, 2014; Pillay et al., 2013). De plus, nous avons pu observer, qu'au cours de l'incubation avec *E.coli*, l'expression de ce récepteur était en constante diminution au cours du temps à la fois pour les neutrophiles et les GI. L'explication de ce phénomène a été mise en évidence sur les neutrophiles de donneurs sains au cours d'une infection, où ce récepteur est clivé par une métalloprotéase ADAM17, activée après la phagocytose du pathogène (Rosales, 2017; Wang et al., 2013). Ainsi, cela montre que malgré leur forme immature, les GI de patients septiques tendent à adopter les mêmes fonctions que les neutrophiles. Toutefois, les GI de donneurs de cellules souches hématopoïétiques expriment moins le récepteur CD16 que ceux des patients septiques, probablement dus soit à leur forme très immature, soit par le manque de pré-stimulation qui pourrait augmenter l'expression de CD16. Ainsi, cette hypothèse pourrait être vérifiée après une pré-stimulation des GI de donneurs de cellules souches hématopoïétiques avec le plasma de patients septiques puis incubé avec *E.coli* aux différents temps d'incubation où le CD16 serait de nouveau analysé par cytométrie en flux.

La phagocytose peut également avoir lieu via les $Fc\gamma R$, CD64 ($Fc\gamma RI$) et CD32 ($Fc\gamma RII$), mais les GI de patients septiques n'ont pas de modification d'expression de ces 2 récepteurs laissant penser que la phagocytose se réalise principalement via le récepteur CD16. Une étude a montré que les neutrophiles exprimaient 1000 fois plus le récepteur CD16 que CD32 mais n'a fait aucun lien avec la phagocytose et leurs travaux n'ont pas été vérifiés (Coxon et al., 2000). D'après nos résultats, les neutrophiles du patient CGD présentent une augmentation du récepteur CD16 en comparaison avec ceux des donneurs sains. Le fait que les neutrophiles

de ce patient ne peuvent pas produire de ROS, augmente probablement son expression pour détruire les bactéries.

Lors d'une infection, les neutrophiles reconnaissent le pathogène via ces récepteurs (TLR, Fc γ R, CXCR) et activent des voies de signalisation impliquant principalement 2 protéines kinases, ERK1/2 et p38MAPK (Belambri et al., 2018; Nguyen et al., 2017). Toutefois, la faible production de ROS par les GI n'est pas en lien avec l'activation des voies de signalisation, car les GI de patients septiques présentent une forte activation des protéines kinases ERK1/2 et p38MAPK. La forte activation de ces protéines kinases peut être due à la persistance du pathogène et la présence des facteurs infectieux en concentration importante dans l'organisme pouvant sur-activer les granulocytes (Cecconi et al., 2018). Les ROS produits par les GI de patients septiques n'ont pas fait l'objet de nombreuses études et leurs mécanismes précis telles que l'analyse des voies de signalisations, activité mitochondriale ou protéines du complexe NADPH oxydase n'a pas été étudiée. Toutefois, un article a mis en évidence que les GI de patients septiques produisaient moins de ROS que leurs neutrophiles homologues et ceux de donneurs sains en accord avec nos résultats (Drifte et al., 2013).

Les ROS sont principalement formés via le complexe NADPH oxydase constitué de 2 protéines membranaires (p22^{phox} et gp91^{phox}) et de 3 protéines cytoplasmiques (p47^{phox}, p67^{phox} et p40^{phox}) (El-Benna et al., 2016; Nguyen et al., 2017). La production de ROS via le complexe NADPH oxydase, ne pourra se faire que si l'ensemble des protéines du complexe sont assemblées et fonctionnelles. Une protéine non fonctionnelle provoque la diminution ou l'absence de production de ROS (Roos et al., 2003). Ainsi, notre étude a pu mettre en évidence que si les GI de patients septiques produisaient moins de ROS. Cette diminution est probablement due à leur faible expression de 2 protéines du complexe NADPH oxydase, p47^{phox} et gp91^{phox}. Ces résultats sont en partie corrélés au niveau transcriptionnel avec une faible expression du gène *NCF1* codant pour p47^{phox}. A l'inverse, une augmentation d'expression du gène *CYBB* codant pour gp91^{phox} a été détectée. Or, la protéine gp91^{phox} est synthétisée sous forme de précurseur (gp65) puis glycosylée dans le réticulum endoplasmique pour être ensuite exprimée à la membrane des plasmiques et la membrane des granules du neutrophile (DeLeo et al., 2000). Durant le sepsis, les protéines synthétisées dans le RE peuvent être mal repliées ou dépliées causant un stress du réticulum endoplasmique responsable de la dégradation de ces protéines (Khan et al., 2015). Ainsi, peut-être que la protéine gp91^{phox} est bloquée ou dégradée dans le réticulum endoplasmique des GI de patients septiques empêchant l'expression de cette protéine à la membrane du GI se résultant par une diminution de formation du complexe NADPH oxydase et une diminution de production de

ROS. Malheureusement nous n'avons pas pu confirmer notre hypothèse et ceci reste à être vérifié par une immunoprécipitation pour détecter la forme gp65.

Un autre récepteur retrouvé exprimé sur les neutrophiles murins permettrait la production de ROS, c'est le récepteur LOX-1 (Al-Banna and Lehmann, 2013). Nous avons pu mettre en évidence pour les neutrophiles et les GI, que ce récepteur est fortement exprimé après 10min d'incubation avec *E.coli*. Puis, son expression diminue rapidement au cours du temps. Ce récepteur semble être moins exprimé à la surface des GI à 10 min de stimulation que les neutrophiles, ce qui ne favorise pas une augmentation de production de ROS. De plus, LOX-1 a été mis en évidence pour venir diminuer l'expression de CXCR2 sur les neutrophiles murins au cours du sepsis (Kovach and Standiford, 2012; Shen et al., 2017; Wu et al., 2011).

Le récepteur CXCR2 permet à la fois de libérer les neutrophiles produits dans la moelle osseuse vers la circulation sanguine, et il permet de recruter les neutrophiles sur le site infectieux. A l'inverse, CXCR4 va être un récepteur aux chimiokines important pour retenir les GI dans la moelle osseuse (Cowland and Borregaard, 2016). Celui-ci est également impliqué dans le retour des neutrophiles âgés dans la moelle osseuse pour être dégradés par les macrophages résidents (Ng et al., 2019).

Après marquage des GI de patients septiques, nous avons mis en évidence qu'ils exprimaient à la fois CXCR4 et CXCR2. L'expression de ce dernier diminue au cours du temps et cette diminution peut s'expliquer par l'activation de la métalloprotéase ADAM17 qui clive le récepteur CXCR2. Durant une infection, ce clivage permet le recyclage de CXCR2 pour qu'il soit exprimé de nouveau à la surface (Mishra et al., 2017). D'autres mécanismes de rétrocontrôle de l'expression de CXCR2 existent. Chez les patients septiques, la suractivation de CXCR2 va induire son internalisation dans la membrane des neutrophiles, bloquant ces derniers dans la circulation sanguine (Alves-Filho et al., 2008; Shen et al., 2017; Sônego et al., 2016). De plus, la double expression de CXCR2 et CXCR4 peut être due à la persistance du pathogène dans l'organisme des patients septiques qui doit être rapidement éliminé. Ainsi, les GI sont libérés de la moelle osseuse vers la circulation sanguine, sans avoir terminé leur maturation due à la présence du facteur G-CSF. Ce facteur est fortement présent chez les patients septiques et permet d'induire l'expression de CXCR2 à leur surface (Brown et al., 2006; Rosales, 2020).

La migration des neutrophiles de la circulation sanguine vers le site infectieux est rendue possible par les récepteurs aux chimiokines (CXCR2) associé à une intégrine, CD11b. Nous avons mis en évidence que les GI de patients septiques exprimaient plus fortement CD11b puis reste stable dans le temps que ceux des neutrophiles de donneurs sains. Au contraire, les GI de donneurs de cellules souches hématopoïétiques présentent une faible expression

de ce récepteur au cours du temps, pouvant confirmer l'état très immature de ces GI. Cet état d'immaturité des GI pourrait être vérifié par la technique ChIP-Seq (Séquençage de l'immunoprécipitation de la chromatine). Cette technique permettrait de visualiser la conformation de l'ADN et de ces histones en comparaison avec les neutrophiles de donneurs sains et les GI de patients septiques.

Toutefois, les avis sont mitigés sur l'expression de CD11b par les granulocytes de patients septiques. Certains auteurs ont mis en évidence que CD11b était surexprimé sur les granulocytes de ces patients (Chishti et al., 2004), d'autres ont montré que l'expression de CD11b était diminuée (Demaret et al., 2015). Ceci peut être expliqué par le fait que ces auteurs n'ont pas séparé les GI et les neutrophiles pouvant fausser les résultats si ces patients présentent un nombre différent de GI dans leur circulation sanguine. Mais l'ensemble de ces auteurs ont mis en évidence que les granulocytes de patients septiques avaient une diminution de migration vers le site infectieux probablement dû à une diminution d'expression de CXCR2 (Chishti et al., 2004; Demaret et al., 2015; Drifte et al., 2013). Il pourrait être intéressant de mettre en évidence que malgré une surexpression de CD11b, les GI de patients septiques présentent une diminution de migration. Ceci pourrait être réalisé en utilisant une chambre de Boyen dans laquelle nous pourrions visualiser le chimiotactisme des GI pour des cytokines et/ou chimiokines (IL-8, fMLP).

Grâce à ces résultats, nous avons pu répondre à la première partie de notre hypothèse et démontrer que les GI possèdent des fonctions antimicrobiennes diminuées par rapport aux neutrophiles de donneurs sains. La deuxième partie de notre hypothèse est de savoir si la faible concentration de ROS produit par les GI est capable d'induire la réponse SOS bactérienne.

La résistance aux antibiotiques est un problème majeur de santé publique. Lors de leur arrivée en réanimation, les patients septiques sont soumis à la prise d'antibiotiques à large spectre (www.sccm.org). Toutefois, la prise de ces antibiotiques favorise la sélection des bactéries par induction d'un stress, lesquelles vont pouvoir déclencher la réponse SOS, augmentant par la même occasion leurs chances d'acquérir ou d'exprimer des gènes de résistances aux antibiotiques (Hoeksema et al., 2018; Jang et al., 2017). Dans cette étude, nous avons mis en évidence que les neutrophiles et les GI sont capables d'induire la réponse SOS bactérienne au cours du temps. Mais les GI induisent plus rapidement et de façon plus importante la réponse SOS bactérienne que les neutrophiles, confirmant les résultats obtenus avec la lignée cellulaire HL60. Nous avons ainsi pu confirmer que cette induction était liée à la production de ROS via le complexe NADPH oxydase et non par d'autres mécanismes cellulaires (ROS mitochondriaux ou produit via des enzymes). En effet, les résultats obtenus grâce au patient

CGD porteur d'une mutation sur le gène codant pour la protéine gp91^{phox}, nous permettent de conclure que sans le complexe NADPH fonctionnel, la réponse SOS n'est pas engagée.

Cependant, un des principaux rôles des neutrophiles est de détruire les bactéries présentes dans l'organisme hôte. Ainsi, il serait intéressant de comparer le nombre de bactéries ayant survécu dans le phagosome des GI en comparaison avec les neutrophiles de donneurs sains. Le nombre de bactéries survivantes pourrait être quantifié après lyse des granulocytes afin de récupérer les bactéries intracellulaires et de les cultiver sur une gélose. Mais ceci pourrait être également visualisé par microscopie confocale après avoir incubé les granulocytes et les bactéries ensemble puis suivi d'une coloration avec un marqueur de viabilité bactérien.

Durant ma thèse, je me suis attachée à étudier les fonctions des GI en me basant sur leur phénotype. Toutefois, cette population peut être hétérogène et plusieurs populations de GI pourraient cohabiter. Par exemple les PMN-MDSC qui arborent aussi un phénotype immature à leur surface sont connus pour avoir des fonctions immunosuppressives. Ces PMN-MDSC sont des granulocytes très hétérogènes car ils peuvent avoir l'aspect et le phénotype d'un neutrophile ou d'un GI mais avec des fonctions immunosuppressives, tels que la production de cytokine immunosuppressive, l'IL-10 et l'inhibition de la prolifération des LT (Hotchkiss et al., 2016). Ces cellules sont retrouvées chez certains patients septiques, ainsi, les GI de notre étude pourraient être confondus avec les PMN-MDSC. Afin, de vérifier que les GI que l'on observe chez les patients septiques ne sont pas des PMN-MDSC, l'expression de l'IL-10 après stimulation avec *E.coli* pourrait être analysée par ELISA ou cytométrie en flux.

De plus, nous avons mis en évidence qu'à l'état basal, les GI de patients septiques expriment fortement Fas-L pour rapidement diminuer après stimulation. Tandis que les neutrophiles de donneurs sains ne vont pas l'exprimer à l'état basal mais sera exprimé au cours de leur stimulation. Ce récepteur est connu pour être impliqué dans l'induction de l'apoptose des autres cellules de l'immunité telles que les LT (Dupont and Warrens, 2007). Toutefois, la diminution de l'expression de Fas-L par les GI de patients septiques indique qu'ils ne sont pas potentiellement des PMN-MDSC. Afin de confirmer cette hypothèse, les GI de patients septiques, pourront être mis en coculture avec les LT de donneurs sains afin d'analyser la prolifération des LT par cytométrie en flux.

Afin d'aller plus loin dans l'étude des GI de patients septiques, un modèle *in vivo* pourrait être utilisé en prenant le modèle *zebrafish* par exemple. C'est un modèle de plus en plus utilisé en recherche, de par son coût peu élevé et sa reproduction rapide (100 à 200 œufs par semaine). De plus le poisson zèbre présente 70% d'homologie avec les gènes humains et les embryons sont transparents ce qui permet de suivre le développement du poisson (Völkel et al., 2018).

Ainsi, ce modèle permettrait de suivre par transparence, la différenciation des neutrophiles et la phagocytose d'*E.coli* par les différents stades de maturation des granulocytes associé à l'induction de la réponse SOS bactérienne par microscopie.

Conclusion

Au cours de ma thèse, j'ai pu répondre à nos hypothèses de départ qui étaient de savoir si d'une part les GI produisaient de faible concentration de ROS et d'autre part si cette diminution de ROS était capable d'induire la réponse SOS bactérienne.

Ainsi, nous avons pu montrer que les GI ont une capacité diminuée à phagocyter *E.coli*, associée à une diminution du nombre de protéines du complexe NADPH oxydase ce qui résulte à une diminution de production de ROS. Néanmoins, les bactéries se trouvant dans le phagosome des GI vont subir un stress entraînant des dommages à l'ADN. Ce stress n'étant pas suffisant pour induire des dommages trop importants et la destruction de la bactérie, celle-ci va mettre en place des mécanismes de réparation pour survivre dont l'activation de la réponse SOS (Figure 71). L'activation de ce système peut être associée entre autres à l'acquisition ou l'expression de gène de résistances aux antibiotiques pouvant diminuer l'efficacité du traitement.

En parallèle, les différents marqueurs de surface impliqués dans l'identification des granulocytes (CD10, CD15), la phagocytose (CD16, CD64, CD32), la migration (CXCR2, CXCR4, CD11b) et d'autres fonctions (LOX-1, Fas-L) ont été étudiés. J'ai pu confirmer que ces GI étaient CD15⁺ CD10^{low} CD11b⁺ et CD16^{low}. Mais qu'ils exprimaient également CXCR4, CXCR2, LOX-1 et qu'ils avaient une diminution d'expression de Fas-L au cours de l'incubation avec *E.coli*.

Pour conclure ces 3 années de thèse, l'ensemble des résultats obtenus durant ma thèse sont résumés dans la Figure 71.

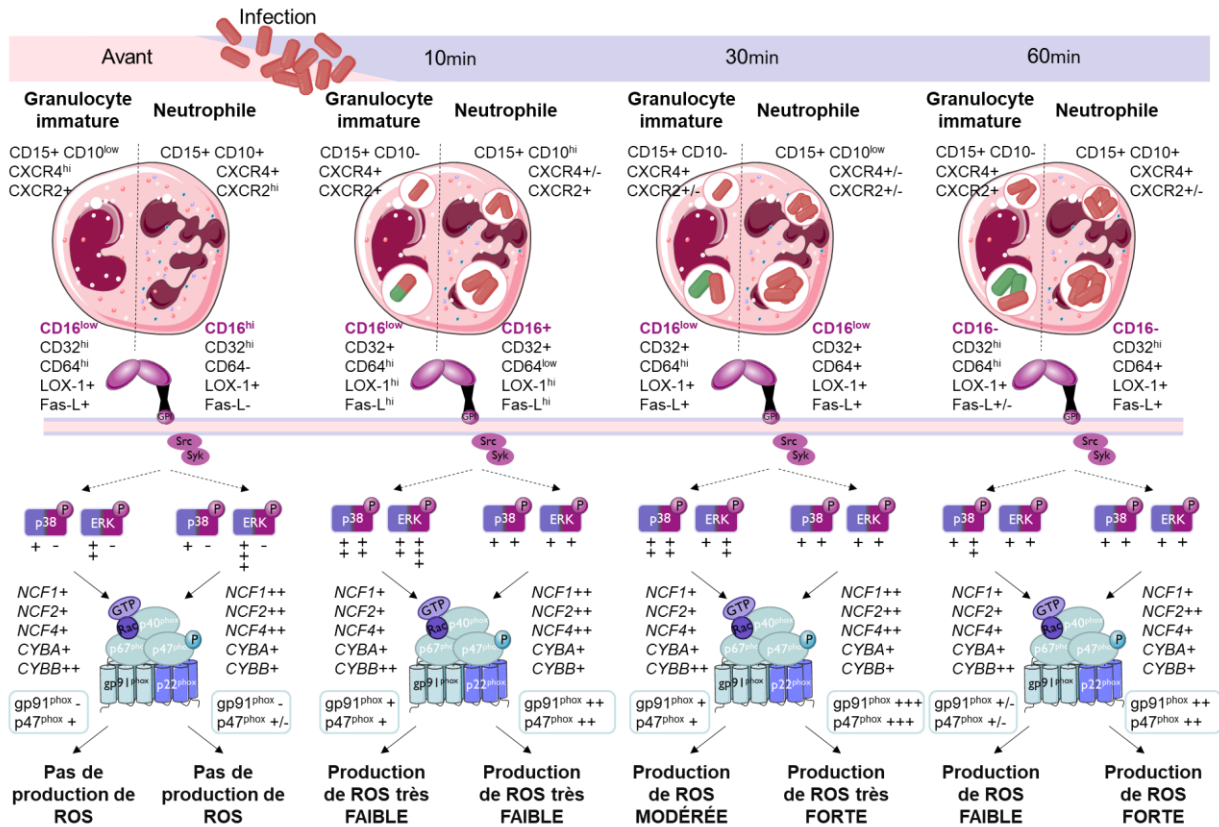


Figure 71 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus au cours de la thèse

Expression des marqueurs CD15, CD10, CD11b, CD16, CD32, LOX-1 et Fas-L avant et après incubation avec la bactérie *E.coli* à différents temps de stimulation (- = non exprimé ; +/- = faiblement exprimé ; + = exprimé ; hi = très exprimé).

Suivi de la représentation de la phagocytose des granulocytes immatures (GI) et des neutrophiles au cours du temps après incubation avec *E.coli* exprimant mCherry (rouge) et le gène de la GFP pour suivre l'induction de la réponse SOS (vert) qui a lieu principalement dans les GI.

Une fois le pathogène reconnu par les récepteurs CD16, CD32 et CD64, les protéines kinases p38 et ERK sont phosphorylées pour induire l'activation des protéines du complexe NADPH oxydase nécessaire pour induire la production de ROS. Les protéines kinases non phosphorylées (violet) et phosphorylées (rose) sont représentées avec leur niveau d'expression au cours du temps (- = non exprimé ; +/- = faiblement exprimé ; + = exprimé ; ++ = très exprimé).

Les gènes codant pour les protéines du complexe NADPH oxydase ont été analysés avant et après incubation à différents temps de stimulation : *NCF1* codant pour p47^{phox}, *NCF2* codant pour p67^{phox}, *NCF4* codant pour p40^{phox}, *CYBA* codant pour p22^{phox} et *CYBB* codant pour gp91^{phox} (- = non exprimée ; +/- = faiblement exprimée ; + = exprimée ; ++ = fortement exprimée).

L'expression de 2 protéines du complexe NADPH oxydase avant et après stimulation est représentée, gp91^{phox} et p47^{phox} (- = non exprimée ; +/- = faiblement exprimée ; + = exprimée ; ++ = fortement exprimée).

Références bibliographiques

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Masson, P.L., 2008. Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique, Campus référence. Elsevier-Masson, Issy-les-Moulineaux.
- Al-Banna, N., Lehmann, C., 2013. Oxidized LDL and LOX-1 in Experimental Sepsis. *Mediators Inflamm.* 2013, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2013/761789>
- Alemán, O.R., Mora, N., Cortes-Vieyra, R., Uribe-Querol, E., Rosales, C., 2016. Transforming Growth Factor- β -Activated Kinase 1 Is Required for Human Fc γ RIIIb-Induced Neutrophil Extracellular Trap Formation. *Front. Immunol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00277>
- Alemán, O.R., Mora, N., Rosales, C., 2021. The Antibody Receptor Fc Gamma Receptor IIIb Induces Calcium Entry via Transient Receptor Potential Melastatin 2 in Human Neutrophils. *Front. Immunol.* 12, 657393. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.657393>
- Alves-Filho, J.C., de Freitas, A., Spiller, F., Souto, F.O., Cunha, F.Q., 2008. THE ROLE OF NEUTROPHILS IN SEVERE SEPSIS. *Shock* 30, 3–9. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181818466>
- Alves-Filho, J.C., Spiller, F., Cunha, F.Q., 2010. NEUTROPHIL PARALYSIS IN SEPSIS. *Shock* 34, 15–21. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181e7e61b>
- Angus, D.C., van der Poll, T., 2013. Severe Sepsis and Septic Shock. *N. Engl. J. Med.* 369, 840–851. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1208623>
- Annane, D., Bellissant, E., Cavaillon, J.-M., 2005. Septic shock. *The Lancet* 365, 63–78. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17667-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17667-8)
- Arock, M., Schneider, E., Boissan, M., Tricottet, V., Dy, M., 2002. Differentiation of human basophils: an overview of recent advances and pending questions 8.
- Aviello, G., Knaus, U.G., 2018. NADPH oxidases and ROS signaling in the gastrointestinal tract. *Mucosal Immunol.* 11, 1011–1023. <https://doi.org/10.1038/s41385-018-0021-8>
- Ayres, L.S., Sgnaolin, V., Munhoz, T.P., 2019. Immature granulocytes index as early marker of sepsis. *Int. J. Lab. Hematol.* 41, 392–396. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12990>
- Baharoglu, Z., Mazel, D., 2014. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 1126–1145. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12077>
- Bedard, K., Krause, K.-H., 2007. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87, 245–313. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>
- Belambri, S.A., Rolas, L., Raad, H., Hurtado-Nedelec, M., Dang, P.M.-C., El-Benna, J., 2018. NADPH oxidase activation in neutrophils: Role of the phosphorylation of its subunits. *Eur. J. Clin. Invest.* 48, e12951. <https://doi.org/10.1111/eci.12951>
- Beutler, B., 2004. Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol.* 40, 845–859. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.10.005>
- Bonilla, F.A., Oettgen, H.C., 2010. Adaptive immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S33–S40. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>
- Borregaard, N., 2010. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity* 33, 657–670. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.011>
- Branzk, N., Lubojemska, A., Hardison, S.E., Wang, Q., Gutierrez, M.G., Brown, G.D., Papayannopoulos, V., 2014. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat. Immunol.* 15, 1017–1025. <https://doi.org/10.1038/ni.2987>
- Bronte, V., Brandau, S., Chen, S.-H., Colombo, M.P., Frey, A.B., Greten, T.F., Mandruzzato, S., Murray, P.J., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., Rodriguez, P.C., Sica, A., Umansky, V., Vonderheide, R.H., Gabrilovich, D.I., 2016. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat. Commun.* 7, 12150. <https://doi.org/10.1038/ncomms12150>

- Brown, K., Brain, S., Pearson, J., Edgeworth, J., Lewis, S., Treacher, D., 2006. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *The Lancet* 368, 157–169. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69005-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69005-3)
- Bruger, A.M., Dorhoi, A., Esendagli, G., Barczyk-Kahlert, K., van der Bruggen, P., Lipoldova, M., Perecko, T., Santibanez, J., Saraiva, M., Van Ginderachter, J.A., Brandau, S., 2019. How to measure the immunosuppressive activity of MDSC: assays, problems and potential solutions. *Cancer Immunol. Immunother.* 68, 631–644. <https://doi.org/10.1007/s00262-018-2170-8>
- Capucetti, A., 2020. Multiple Roles for Chemokines in Neutrophil Biology. *Front. Immunol.* 11, 9.
- Cassetta, L., Baekkevold, E.S., Brandau, S., Bujko, A., Cassatella, M.A., Dorhoi, A., Krieg, C., Lin, A., Loré, K., Marini, O., Pollard, J.W., Roussel, M., Scapini, P., Umansky, V., Adema, G.J., 2019. Deciphering myeloid-derived suppressor cells: isolation and markers in humans, mice and non-human primates. *Cancer Immunol. Immunother.* 68, 687–697. <https://doi.org/10.1007/s00262-019-02302-2>
- Caster, D.J., Powell, D.W., Miralda, I., Ward, R.A., McLeish, K.R., 2017. Re-Examining Neutrophil Participation in GN. *J. Am. Soc. Nephrol.* 28, 2275–2289. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016121271>
- Cecconi, M., Evans, L., Levy, M., Rhodes, A., 2018. Sepsis and septic shock. *The Lancet* 392, 75–87. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30696-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30696-2)
- Chishti, A.D., Shenton, B.K., Kirby, J.A., Baudouin, S.V., 2004. Neutrophil chemotaxis and receptor expression in clinical septic shock. *Intensive Care Med.* 30, 605–611. <https://doi.org/10.1007/s00134-004-2175-y>
- Clark, R.A., 1999. Activation of the Neutrophil Respiratory Burst Oxidase. *J. Infect. Dis.* 179, S309–S317. <https://doi.org/10.1086/513849>
- Colucci-Guyon, E., Tinevez, J.-Y., Renshaw, S.A., Herbomel, P., 2011. Strategies of professional phagocytes in vivo: unlike macrophages, neutrophils engulf only surface-associated microbes. *J. Cell Sci.* 124, 3053–3059. <https://doi.org/10.1242/jcs.082792>
- Coudereau, R., Waeckel, L., Cour, M., Rimmelé, T., Pescarmona, R., Fabri, A., Jallades, L., Yonis, H., Gossez, M., Lukaszewicz, A., Argaud, L., the RICO study group, Venet, F., Monneret, G., 2022. Emergence of immunosuppressive LOX-1+ PMN-MDSC in septic shock and severe COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *J. Leukoc. Biol.* 111, 489–496. <https://doi.org/10.1002/JLB.4COVBCR0321-129R>
- Cowland, J.B., Borregaard, N., 2016. Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunol. Rev.* 273, 11–28. <https://doi.org/10.1111/imr.12440>
- Coxon, P.Y., Rane, M.J., Powell, D.W., Klein, J.B., McLeish, K.R., 2000. Differential Mitogen-Activated Protein Kinase Stimulation by Fcγ Receptor IIa and Fcγ Receptor IIIb Determines the Activation Phenotype of Human Neutrophils. *J. Immunol.* 164, 6530–6537. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6530>
- Daix, T., Guérin, E., Tavernier, E., Marsaud, J., Hacan, A., Gauthier, F., Piccardo, A., Vignon, P., Feuillard, J., François, B., 2018a. Immature Granulocytes: A Risk Factor of Infection after Cardiac Surgery. *Cytometry B Clin. Cytom.* 94, 887–894. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21739>
- Daix, T., Guerin, E., Tavernier, E., Mercier, E., Gissot, V., Hérault, O., Mira, J.-P., Dumas, F., Chapuis, N., Guitton, C., Béné, M.C., Quenot, J.-P., Tissier, C., Guy, J., Piton, G., Roggy, A., Muller, G., Legac, É., de Prost, N., Khellaf, M., Wagner-Ballon, O., Coudroy, R., Dindinaud, E., Uhel, F., Roussel, M., Lafon, T., Jeannet, R., Vargas, F., Fleureau, C., Roux, M., Allou, K., Vignon, P., Feuillard, J., François, B., Di Vittorio, A., Lachot, S., Georget, M.-T., Hanna, J., Bretonnière, C., Zambon, O., Nicolet, L., Brule, N., Debord, C., Le Bris, Y., Robillard, N., Dargent, A., Bretagnol, A., Mathonnet, A., Boulain, T., Barbier, F., Benzekri, D., Runge, I., Kamel, T., Cecchini, J., Bouyer, S., Robert, R., Ouattara, A., 2018b. Multicentric Standardized Flow Cytometry Routine Assessment of Patients With Sepsis to Predict Clinical Worsening. *Chest* 154, 617–627. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.03.058>

- Dang, P.M.-C., 2006. A specific p47^{phox} -serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *J. Clin. Invest.* 116, 2033–2043. <https://doi.org/10.1172/JCI27544>
- Danikas, D.D., Karakantza, M., Theodorou, G.L., Sakellaropoulos, G.C., Gogos, C.A., 2008. Prognostic value of phagocytic activity of neutrophils and monocytes in sepsis. Correlation to CD64 and CD14 antigen expression. *Clin. Exp. Immunol.* 154, 87–97. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03737.x>
- Darcy, C.J., Minigo, G., Piera, K.A., Davis, J.S., McNeil, Y.R., Chen, Y., Volkheimer, A.D., Weinberg, J., Anstey, N.M., Woodberry, T., 2014. Neutrophils with myeloid derived suppressor function deplete arginine and constrain T cell function in septic shock patients. *Crit. Care* 18, R163. <https://doi.org/10.1186/cc14003>
- De Luca, K., Frances-Duvert, V., Asensio, M.-J., Ihsani, R., Debien, E., Taillardet, M., Verhoeyen, E., Bella, C., Lantheaume, S., Genestier, L., Defrance, T., 2009. The TLR1/2 agonist PAM3CSK4 instructs commitment of human hematopoietic stem cells to a myeloid cell fate. *Leukemia* 23, 2063–2074. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.155>
- DeLeo, F.R., Burritt, J.B., Yu, L., Jesaitis, A.J., Dinauer, M.C., Nauseef, W.M., 2000. Processing and Maturation of Flavocytochrome b 558 Include Incorporation of Heme as a Prerequisite for Heterodimer Assembly. *J. Biol. Chem.* 275, 13986–13993. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.18.13986>
- DeLeo, F.R., Renee, J., McCormick, S., Nakamura, M., Apicella, M., Weiss, J.P., Nauseef, W.M., 1998. Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. *J. Clin. Invest.* 101, 455–463. <https://doi.org/10.1172/JCI949>
- Demaret, J., Venet, F., Friggeri, A., Cazalis, M.-A., Plassais, J., Jallades, L., Malcus, C., Poitevin-Later, F., Textoris, J., Lepape, A., Monneret, G., 2015. Marked alterations of neutrophil functions during sepsis-induced immunosuppression. *J. Leukoc. Biol.* 98, 1081–1090. <https://doi.org/10.1189/jlb.4A0415-168RR>
- Denning, N.-L., Aziz, M., Gurien, S.D., Wang, P., 2019. DAMPs and NETs in Sepsis. *Front. Immunol.* 10, 2536. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02536>
- Dewas, C., Fay, M., Gougerot-Pocidallo, M.-A., El-Benna, J., 2000. The Mitogen-Activated Protein Kinase Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Pathway Is Involved in formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine-Induced p47^{phox} Phosphorylation in Human Neutrophils. *J. Immunol.* 165, 5238–5244. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.9.5238>
- Dharmaraja, A.T., 2017. Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in Therapeutics and Drug Resistance in Cancer and Bacteria. *J. Med. Chem.* 60, 3221–3240. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01243>
- Dimoula, A., Pradier, O., Kassenger, Z., Dalcomune, D., Turkan, H., Vincent, J.-L., 2014. Serial Determinations of Neutrophil CD64 Expression for the Diagnosis and Monitoring of Sepsis in Critically Ill Patients. *Clin. Infect. Dis.* 58, 820–829. <https://doi.org/10.1093/cid/cit936>
- Drifte, G., Dunn-Siegrist, I., Tissières, P., Pugin, J., 2013. Innate Immune Functions of Immature Neutrophils in Patients With Sepsis and Severe Systemic Inflammatory Response Syndrome*. *Crit. Care Med.* 41, 820–832. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318274647d>
- Dumas, A., Pouliot, M., 2009. Le neutrophile : ennemi ou ami ? *médecine/sciences* 25, 699–704. <https://doi.org/10.1051/medsci/2009258-9699>
- Dupont, P.J., Warrens, A.N., 2007. Fas ligand exerts its pro-inflammatory effects via neutrophil recruitment but not activation. *Immunology* 120. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02504.x>
- Düsterhöft, S., Babendreyer, A., Giese, A.A., Flasshove, C., Ludwig, A., 2019. Status update on iRhom and ADAM17: It's still complicated. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1866, 1567–1583. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.06.017>
- Edmisson, J.S., Tian, S., Armstrong, C.L., Vashishta, A., Klaes, C.K., Miralda, I., Jimenez-Flores, E., Le, J., Wang, Q., Lamont, R.J., Uriarte, S.M., 2018. *Filifactor alocis*

- modulates human neutrophil antimicrobial functional responses. *Cell. Microbiol.* 20, e12829. <https://doi.org/10.1111/cmi.12829>
- El-Benna, J., Hurtado-Nedelec, M., Marzaioli, V., Marie, J.-C., Gougerot-Pocidalò, M.-A., Dang, P.M.-C., 2016. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunol. Rev.* 273, 180–193. <https://doi.org/10.1111/imr.12447>
- El-Benna, J., My, P., Dang, C., Gougerot, A., Elbim, C., 2005. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp* 8.
- European Centre for Disease Prevention and Control., World Health Organization., 2022. Antimicrobial resistance surveillance in Europe: 2022 : 2020 data. Publications Office, LU.
- Evans, L., Rhodes, A., Alhazzani, W., Antonelli, M., Coopersmith, C.M., French, C., Machado, F.R., Mcintyre, L., Ostermann, M., Prescott, H.C., Schorr, C., Simpson, S., Wiersinga, W.J., Alshamsi, F., Angus, D.C., Arabi, Y., Azevedo, L., Beale, R., Beilman, G., Belley-Cote, E., Burry, L., Cecconi, M., Centofanti, J., Coz Yataco, A., De Waele, J., Dellinger, R.P., Doi, K., Du, B., Estenssoro, E., Ferrer, R., Gomersall, C., Hodgson, C., Hylander Møller, M., Iwashyna, T., Jacob, S., Kleinpell, R., Klompas, M., Koh, Y., Kumar, A., Kwizera, A., Lobo, S., Masur, H., McGloughlin, S., Mehta, S., Mehta, Y., Mer, M., Nunnally, M., Oczkowski, S., Osborn, T., Papatheanassoglou, E., Perner, A., Puskarich, M., Roberts, J., Schweickert, W., Seckel, M., Sevransky, J., Sprung, C.L., Welte, T., Zimmerman, J., Levy, M., 2021. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2021. *Crit. Care Med.* 49, e1063–e1143. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000005337>
- Fan, J., Li, Y., Levy, R.M., Fan, J.J., Hackam, D.J., Vodovotz, Y., Yang, H., Tracey, K.J., Billiar, T.R., Wilson, M.A., 2007. Hemorrhagic Shock Induces NAD(P)H Oxidase Activation in Neutrophils: Role of HMGB1-TLR4 Signaling. *J. Immunol.* 178, 6573–6580. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.10.6573>
- Faurschou, M., Borregaard, N., 2003. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* 5, 1317–1327. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.09.008>
- Finkel, T., Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239–247. <https://doi.org/10.1038/35041687>
- Frazão, J.B., Thain, A., Zhu, Z., Luengo, M., Condino-Neto, A., Newburger, P.E., 2015. Regulation of *CYBB* Gene Expression in Human Phagocytes by a Distant Upstream NF- κ B Binding Site: UPSTREAM NF- κ B SITE REGULATES *CYBB* EXPRESSION. *J. Cell. Biochem.* 116, 2008–2017. <https://doi.org/10.1002/jcb.25155>
- Futosi, K., Fodor, S., Mócsai, A., 2013. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int. Immunopharmacol.* 17, 638–650. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.06.034>
- Gabrilovich, D.I., 2017. Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol. Res.* 5, 3–8. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0297>
- Gabrilovich, D.I., Nagaraj, S., 2009. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 162–174. <https://doi.org/10.1038/nri2506>
- García-García, E., Nieto-Castañeda, G., Ruiz-Saldaña, M., Mora, N., Rosales, C., 2009. Fc γ RIIA and Fc γ RIIIB Mediate Nuclear Factor Activation through Separate Signaling Pathways in Human Neutrophils. *J. Immunol.* 182, 4547–4556. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801468>
- Geering, B., Gurzeler, U., Federzoni, E., Kaufmann, T., Simon, H.-U., 2011. A novel TNFR1-triggered apoptosis pathway mediated by class IA PI3Ks in neutrophils. *Blood* 117, 5953–5962. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-322206>
- Girardot, T., Rimmelé, T., Venet, F., Monneret, G., 2017. Apoptosis-induced lymphopenia in sepsis and other severe injuries. *Apoptosis* 22, 295–305. <https://doi.org/10.1007/s10495-016-1325-3>
- Glennon-Alty, L., Hackett, A.P., Chapman, E.A., Wright, H.L., 2018. Neutrophils and redox stress in the pathogenesis of autoimmune disease. *Free Radic. Biol. Med.* 125, 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.049>

- Grieshaber-Bouyer, R., Nigrovic, P.A., 2019. Neutrophil Heterogeneity as Therapeutic Opportunity in Immune-Mediated Disease. *Front. Immunol.* 10, 346. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00346>
- Grötzinger, J., Lorenzen, I., Düsterhöft, S., 2017. Molecular insights into the multilayered regulation of ADAM17: The role of the extracellular region. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1864, 2088–2095. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.05.024>
- Guérin, E., Orabona, M., Raquil, M.-A., Giraudeau, B., Bellier, R., Gibot, S., Béné, M.-C., Lacombe, F., Droin, N., Solary, E., Vignon, P., Feuillard, J., François, B., 2014. Circulating Immature Granulocytes With T-Cell Killing Functions Predict Sepsis Deterioration*. *Crit. Care Med.* 42, 2007–2018. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000344>
- Guo, R.-F., Sun, L., Gao, H., Shi, K.X., Rittirsch, D., Sarma, V.J., Zetoune, F.S., Ward, P.A., 2006. In vivo regulation of neutrophil apoptosis by C5a during sepsis. *J. Leukoc. Biol.* 80, 1575–1583. <https://doi.org/10.1189/jlb.0106065>
- Guo, Y., Gao, F., Wang, Q., Wang, K., Pan, S., Pan, Z., Xu, S., Li, L., Zhao, D., 2021. Differentiation of HL-60 cells in serum-free hematopoietic cell media enhances the production of neutrophil extracellular traps. *Exp. Ther. Med.* 21, 353. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.9784>
- Hampson, P., Dinsdale, R.J., Wearn, C.M., Bamford, A.L., Bishop, J.R.B., Hazeldine, J., Moiemmen, N.S., Harrison, P., Lord, J.M., 2017. Neutrophil Dysfunction, Immature Granulocytes, and Cell-free DNA are Early Biomarkers of Sepsis in Burn-injured Patients: A Prospective Observational Cohort Study. *Ann. Surg.* 265, 1241–1249. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000001807>
- Härter, L., Mica, L., Stocker, R., Trentz, O., Keel, M., 2003. Mcl-1 correlates with reduced apoptosis in neutrophils from patients with sepsis. *J. Am. Coll. Surg.* 197, 964–973. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2003.07.008>
- Hashiba, M., Huq, A., Tomino, A., Hirakawa, A., Hattori, T., Miyabe, H., Tsuda, M., Takeyama, N., 2015. Neutrophil extracellular traps in patients with sepsis. *J. Surg. Res.* 194, 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2014.09.033>
- Hassani, M., Hellebrekers, P., Chen, N., Aalst, C., Bongers, S., Hietbrink, F., Koenderman, L., Vrisekoop, N., 2020. On the origin of low-density neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 107, 809–818. <https://doi.org/10.1002/JLB.5HR0120-459R>
- Hidalgo, M.A., Carretta, M.D., Teuber, S.E., Zárate, C., Cárcamo, L., Concha, I.I., Burgos, R.A., 2015. fMLP-Induced IL-8 Release Is Dependent on NADPH Oxidase in Human Neutrophils. *J. Immunol. Res.* 2015, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2015/120348>
- Hoeksema, M., Jonker, M.J., Bel, K., Brul, S., ter Kuile, B.H., 2018. Genome rearrangements in *Escherichia coli* during de novo acquisition of resistance to a single antibiotic or two antibiotics successively. *BMC Genomics* 19, 973. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5353-y>
- Hotchkiss, R.S., Moldawer, L.L., Opal, S.M., Reinhart, K., Turnbull, I.R., Vincent, J.-L., 2016. Sepsis and septic shock. *Nat. Rev. Dis. Primer* 2, 16045. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.45>
- Hotchkiss, R.S., Monneret, G., Payen, D., 2013. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 862–874. <https://doi.org/10.1038/nri3552>
- Imaizumi, M., Uozuini, J., Breitman, T.R., 1987. Retinole Acid-induced Monocytic Differentiation of HL60/MRI, a Cell Line Derived from a Transplantable HL60 Tumor 8.
- Imlay, J.A., 2013. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 443–454. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3032>
- Jang, J., Hur, H.-G., Sadowsky, M.J., Byappanahalli, M.N., Yan, T., Ishii, S., 2017. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *J. Appl. Microbiol.* 123, 570–581. <https://doi.org/10.1111/jam.13468>
- Janols, H., Bergenfelz, C., Allaoui, R., Larsson, A.-M., Rydén, L., Björnsson, S., Janciauskiene, S., Wullt, M., Bredberg, A., Leandersson, K., 2014. A high frequency of MDSCs in

- sepsis patients, with the granulocytic subtype dominating in gram-positive cases. *J. Leukoc. Biol.* 96, 685–693. <https://doi.org/10.1189/jlb.5HI0214-074R>
- Kaufmann, I., Hoelzl, A., Schliephake, F., Hummel, T., Chouker, A., Peter, K., Thiel, M., 2006. POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTE DYSFUNCTION SYNDROME IN PATIENTS WITH INCREASING SEPSIS SEVERITY. *Shock* 26, 254–261. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000223131.64512.7a>
- Kaymak, C., Basar, H., Sardas, S., 2011. Reactive Oxygen Species (Ros) Generation in Sepsis 8.
- Kennedy, A.D., DeLeo, F.R., 2009. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol. Res.* 43, 25–61. <https://doi.org/10.1007/s12026-008-8049-6>
- Khan, M.M., Yang, W.-L., Wang, P., 2015. ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS IN SEPSIS. *Shock* 44, 294–304. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000425>
- Kolar, S.L., Liu, G.Y., 2017. RAS and ROS—A Story of Pseudomonas Survival. *Cell Host Microbe* 21, 551–552. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.04.009>
- Kovach, M.A., Standiford, T.J., 2012. The function of neutrophils in sepsis: *Curr. Opin. Infect. Dis.* 25, 321–327. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3283528c9b>
- Lacy, P., 2006. Mechanisms of Degranulation in Neutrophils. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* 2, 98. <https://doi.org/10.1186/1710-1492-2-3-98>
- Leliefeld, P.H.C., Wessels, C.M., Leenen, L.P.H., Koenderman, L., Pillay, J., 2016. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. *Crit. Care* 20, 73. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1250-4>
- Levy, R., Rotrosen, D., Nagauker, O., Leto, T.L., Malech, H.L., 1990. Induction of the respiratory burst in HL-60 cells. Correlation of function and protein expression. 8.
- Ley, K., Hoffman, H.M., Kubes, P., Cassatella, M.A., Zychlinsky, A., Hedrick, C.C., Catz, S.D., 2018. Neutrophils: New insights and open questions. *Sci. Immunol.* 3, eaat4579. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat4579>
- Li, R.H.L., Tablin, F., 2018. A Comparative Review of Neutrophil Extracellular Traps in Sepsis. *Front. Vet. Sci.* 5, 291. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00291>
- Lipińska-Gediga, M., 2017. Neutrophils, NETs, NETosis — old or new factors in sepsis and septic shock? 49, 6.
- Lischke, T., Heesch, K., Schumacher, V., Schneider, M., Haag, F., Koch-Nolte, F., Mittrücker, H.-W., 2013. CD38 Controls the Innate Immune Response against *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 81, 4091–4099. <https://doi.org/10.1128/IAI.00340-13>
- Liu, A., Wang, Y., Ding, Y., Baez, I., Payne, K.J., Borghesi, L., 2015. Cutting Edge: Hematopoietic Stem Cell Expansion and Common Lymphoid Progenitor Depletion Require Hematopoietic-Derived, Cell-Autonomous TLR4 in a Model of Chronic Endotoxin. *J. Immunol.* 195, 2524–2528. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501231>
- Lu, T., Kobayashi, S.D., Quinn, M.T., DeLeo, F.R., 2012. A NET Outcome. *Front. Immunol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00365>
- Mackey, J.B.G., Coffelt, S.B., Carlin, L.M., 2019. Neutrophil Maturity in Cancer. *Front. Immunol.* 10, 1912. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01912>
- Manda-Handzlik, A., Bystrzycka, W., Wachowska, M., Siczekowska, S., Stelmaszczyk-Emmel, A., Demkow, U., Ciepiela, O., 2018. The influence of agents differentiating HL-60 cells toward granulocyte-like cells on their ability to release neutrophil extracellular traps. *Immunol. Cell Biol.* 96, 413–425. <https://doi.org/10.1111/imcb.12015>
- Manz, M.G., Boettcher, S., 2014. Emergency granulopoiesis. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 302–314. <https://doi.org/10.1038/nri3660>
- Masłowska, K.H., Makiela-Dzbenka, K., Fijałkowska, I.J., 2019. The SOS system: A complex and tightly regulated response to DNA damage. *Environ. Mol. Mutagen.* 60, 368–384. <https://doi.org/10.1002/em.22267>
- Merle, N.S., Church, S.E., Fremeaux-Bacchi, V., Roumenina, L.T., 2015a. Complement System Part I: “Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front. Immunol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00262>

- Merle, N.S., Noe, R., Halbwachs-Mecarelli, L., Fremeaux-Bacchi, V., Roumenina, L.T., 2015b. Complement System Part II: Role in Immunity. *Front. Immunol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00257>
- Metzemaekers, M., Gouwy, M., Proost, P., 2020. Neutrophil chemoattractant receptors in health and disease: double-edged swords. *Cell. Mol. Immunol.* 17, 433–450. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0412-0>
- Mica, L., Härter, L., Trentz, O., Keel, M., 2004. Endotoxin reduces CD95-induced neutrophil apoptosis by cIAP-2-mediated caspase-3 degradation. *J. Am. Coll. Surg.* 199, 595–602. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2004.05.272>
- Milot, E., Fotouhi-Ardakani, N., Filep, J.G., 2012. Myeloid nuclear differentiation antigen, neutrophil apoptosis and sepsis. *Front. Immunol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00397>
- Miralda, I., Uriarte, S.M., McLeish, K.R., 2017. Multiple Phenotypic Changes Define Neutrophil Priming. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 217. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00217>
- Mishra, H.K., Ma, J., Walcheck, B., 2017. Ectodomain Shedding by ADAM17: Its Role in Neutrophil Recruitment and the Impairment of This Process during Sepsis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 138. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00138>
- Mócsai, A., 2013. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J. Exp. Med.* 210, 1283–1299. <https://doi.org/10.1084/jem.20122220>
- Nathan, C., Ding, A., 2010. SnapShot: Reactive Oxygen Intermediates (ROI). *Cell* 140, 951–951.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.008>
- Nauseef, W.M., Borregaard, N., 2014. Neutrophils at work. *Nat. Immunol.* 15, 602–611. <https://doi.org/10.1038/ni.2921>
- Ng, L.G., Ostuni, R., Hidalgo, A., 2019. Heterogeneity of neutrophils. *Nat. Rev. Immunol.* 19, 255–265. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0141-8>
- Nguyen, G.T., Green, E.R., Meccas, J., 2017. Neutrophils to the ROScue: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 373. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00373>
- Nordenfelt, P., Tapper, H., 2011. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 90, 271–284. <https://doi.org/10.1189/jlb.0810457>
- Nunes, P., Demarex, N., Dinauer, M.C., 2013. Regulation Of The NADPH Oxidase And Associated Ion Fluxes During Phagocytosis. *Traffic* n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/tra.12115>
- Panigrahi, A.K., Pati, D., 2012. Higher-order orchestration of hematopoiesis: Is cohesin a new player? *Exp. Hematol.* 40, 967–973. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2012.09.010>
- Pérez-Figueroa, E., Álvarez-Carrasco, P., Ortega, E., Maldonado-Bernal, C., 2021. Neutrophils: Many Ways to Die. *Front. Immunol.* 12, 631821. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.631821>
- Perianayagam, M.C., Balakrishnan, V.S., Pereira, B.J.G., Jaber, B.L., 2004. C5a delays apoptosis of human neutrophils via an extracellular signal-regulated kinase and Bad-mediated signalling pathway. *Eur. J. Clin. Invest.* 34, 50–56. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2004.01273.x>
- Pillay, J., Tak, T., Kamp, V.M., Koenderman, L., 2013. Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 3813–3827. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1286-4>
- Pinegin, B., Vorobjeva, N., Pashenkov, M., Chernyak, B., 2018. The role of mitochondrial ROS in antibacterial immunity. *J. Cell. Physiol.* 233, 3745–3754. <https://doi.org/10.1002/jcp.26117>
- Prauchner, C.A., 2017. Oxidative stress in sepsis: Pathophysiological implications justifying antioxidant co-therapy. *Burns* 43, 471–485. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2016.09.023>
- Prince, L.R., Whyte, M.K., Sabroe, I., Parker, L.C., 2011. The role of TLRs in neutrophil activation. *Curr. Opin. Pharmacol.* 11, 397–403. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2011.06.007>

- Qureshi, S.S., Lewis, S.M., Gant, V.A., Treacher, D., Davis, B.H., Brown, K.A., 2001. Increased distribution and expression of CD64 on blood polymorphonuclear cells from patients with the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Clin. Exp. Immunol.* 125, 258–265. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2001.01596.x>
- Ribot, J.C., Lopes, N., Silva-Santos, B., 2021. $\gamma\delta$ T cells in tissue physiology and surveillance. *Nat. Rev. Immunol.* 21, 221–232. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00452-4>
- Rider, N.L., Jameson, M.B., Creech, C.B., 2018. Chronic Granulomatous Disease: Epidemiology, Pathophysiology, and Genetic Basis of Disease. *J. Pediatr. Infect. Dis. Soc.* 7, S2–S5. <https://doi.org/10.1093/jpids/piy008>
- Roberts, J.T., Barb, A.W., 2018. A single amino acid distorts the Fc γ receptor IIIb/CD16b structure upon binding immunoglobulin G1 and reduces affinity relative to CD16a. *J. Biol. Chem.* 293, 19899–19908. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005273>
- Roger, T., 2019. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Sepsis. *Front. Immunol.* 10, 10.
- Roos, D., van Bruggen, R., Meischl, C., 2003. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect.* 5, 1307–1315. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.09.009>
- Rosales, C., 2020. Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J. Leukoc. Biol.* 108, 377–396. <https://doi.org/10.1002/JLB.4MIR0220-574RR>
- Rosales, C., 2018. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front. Physiol.* 9, 113. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00113>
- Rosales, C., 2017. Fc γ Receptor Heterogeneity in Leukocyte Functional Responses. *Front. Immunol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00280>
- Rosazza, T., Warner, J., Sollberger, G., 2021. NET formation – mechanisms and how they relate to other cell death pathways. *FEBS J.* 288, 3334–3350. <https://doi.org/10.1111/febs.15589>
- Rubio, I., Osuchowski, M.F., Shankar-Hari, M., Skirecki, T., Winkler, M.S., Lachmann, G., La Rosée, P., Monneret, G., Venet, F., Bauer, M., Brunkhorst, F.M., Kox, M., Cavillon, J.-M., Uhle, F., Weigand, M.A., Flohé, S.B., Wiersinga, W.J., Martin-Fernandez, M., Almansa, R., Martin-Loeches, I., Torres, A., Giamarellos-Bourboulis, E.J., Girardis, M., Cossarizza, A., Netea, M.G., van der Poll, T., Scherag, A., Meisel, C., Schefold, J.C., Bermejo-Martín, J.F., 2019. Current gaps in sepsis immunology: new opportunities for translational research. *Lancet Infect. Dis.* 19, e422–e436. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30567-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30567-5)
- Sagiv, J.Y., Michaeli, J., Assi, S., Mishalian, I., Kisos, H., Levy, L., Danti, P., Lumbroso, D., Polyansky, L., Sionov, R.V., Ariel, A., Hovav, A.-H., Henke, E., Fridlender, Z.G., Granot, Z., 2015. Phenotypic Diversity and Plasticity in Circulating Neutrophil Subpopulations in Cancer. *Cell Rep.* 10, 562–573. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.039>
- Salomão, R., Martins, P.S., Brunialti, M.K.C., Fernandes, M. da L., Martos, L.S.W., Mendes, M.E., Gomes, N.E., Rigato, O., 2008. TLR SIGNALING PATHWAY IN PATIENTS WITH SEPSIS. *Shock* 30, 73–77. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e318181af2a>
- Sasaki, H., Kurotaki, D., Tamura, T., 2016. Regulation of basophil and mast cell development by transcription factors. *Allergol. Int.* 65, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2016.01.006>
- Scapini, P., Marini, O., Tecchio, C., Cassatella, M.A., 2016. Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions. *Immunol. Rev.* 273, 48–60. <https://doi.org/10.1111/imr.12448>
- Schett, G., Dayer, J.-M., Manger, B., 2016. Interleukin-1 function and role in rheumatic disease. *Nat. Rev. Rheumatol.* 12, 14–24. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.166>
- Segal, A.W., 2005. HOW NEUTROPHILS KILL MICROBES. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 197–223. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653>
- Serteyn, D., Grulke, S., Franck, T., Mouithys-Mickalad, A., Deby-Dupont, G., 2003. La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. 15.
- Shen, X.-F., Cao, K., Jiang, J., Guan, W.-X., Du, J.-F., 2017. Neutrophil dysregulation during sepsis: an overview and update. *J. Cell. Mol. Med.* 21, 1687–1697. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13112>

- Sheshachalam, A., Srivastava, N., Mitchell, T., Lacy, P., Eitzen, G., 2014. Granule Protein Processing and Regulated Secretion in Neutrophils. *Front. Immunol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00448>
- Simon, H.-U., 2003. Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation: Simon · Regulation of neutrophil apoptosis. *Immunol. Rev.* 193, 101–110. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2003.00038.x>
- Singer, M., Deutschman, C.S., Seymour, C.W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G.R., Chiche, J.-D., Coopersmith, C.M., Hotchkiss, R.S., Levy, M.M., Marshall, J.C., Martin, G.S., Opal, S.M., Rubenfeld, G.D., van der Poll, T., Vincent, J.-L., Angus, D.C., 2016. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315, 801. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>
- Smith, S.M., 2014. Role of Toll-like receptors in *Helicobacter pylori* infection and immunity. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 5, 133. <https://doi.org/10.4291/wjgp.v5.i3.133>
- Sônego, F., Castanheira, F.V. e S., Ferreira, R.G., Kanashiro, A., Leite, C.A.V.G., Nascimento, D.C., Colón, D.F., Borges, V. de F., Alves-Filho, J.C., Cunha, F.Q., 2016. Paradoxical Roles of the Neutrophil in Sepsis: Protective and Deleterious. *Front. Immunol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00155>
- Spiller, F., Oliveira Formiga, R., Fernandes da Silva Coimbra, J., Alves-Filho, J.C., Cunha, T.M., Cunha, F.Q., 2019. Targeting nitric oxide as a key modulator of sepsis, arthritis and pain. *Nitric Oxide* 89, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.04.011>
- Stearns-Kurosawa, D.J., Osuchowski, M.F., Valentine, C., Kurosawa, S., Remick, D.G., 2011. The Pathogenesis of Sepsis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 6, 19–48. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130327>
- Summers, C., Rankin, S.M., Condliffe, A.M., Singh, N., Peters, A.M., Chilvers, E.R., 2010. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* 31, 318–324. <https://doi.org/10.1016/j.it.2010.05.006>
- Sun, R., Huang, J., Yang, Y., Liu, L., Shao, Y., Li, L., Sun, B., 2022. Dysfunction of low-density neutrophils in peripheral circulation in patients with sepsis. *Sci. Rep.* 12, 685. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04682-x>
- Taneja, R., Sharma, A.P., Hallett, M.B., Findlay, G.P., Morris, M.R., 2008. IMMATURE CIRCULATING NEUTROPHILS IN SEPSIS HAVE IMPAIRED PHAGOCYTOSIS AND CALCIUM SIGNALING. *Shock* 30, 618–622. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e318173ef9c>
- Tasseff, R., Jensen, H.A., Congleton, J., Dai, D., Rogers, K.V., Sagar, A., Bunaciu, R.P., Yen, A., Varner, J.D., 2017. An Effective Model of the Retinoic Acid Induced HL-60 Differentiation Program. *Sci. Rep.* 7, 14327. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14523-5>
- Tcyganov, E., Mastio, J., Chen, E., Gabrilovich, D.I., 2018. Plasticity of myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Curr. Opin. Immunol.* 51, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.03.009>
- Tecchio, C., Micheletti, A., Cassatella, M.A., 2014. Neutrophil-Derived Cytokines: Facts Beyond Expression. *Front. Immunol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00508>
- Tigner, A., Ibrahim, S.A., Murray, I., 2022. Histology, White Blood Cell, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Turvey, S.E., Broide, D.H., 2010. Innate immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S24–S32. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.016>
- Uhel, F., Azzaoui, I., Grégoire, M., Pangault, C., Dulong, J., Tadié, J.-M., Gacouin, A., Camus, C., Cynober, L., Fest, T., Le Tulzo, Y., Roussel, M., Tarte, K., 2017. Early Expansion of Circulating Granulocytic Myeloid-derived Suppressor Cells Predicts Development of Nosocomial Infections in Patients with Sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 196, 315–327. <https://doi.org/10.1164/rccm.201606-1143OC>
- Uhm, T.G., Kim, B.S., Chung, I.Y., 2012. Eosinophil Development, Regulation of Eosinophil-Specific Genes, and Role of Eosinophils in the Pathogenesis of Asthma. *Allergy Asthma Immunol. Res.* 4, 68. <https://doi.org/10.4168/aair.2012.4.2.68>

- Van Acker, H., Coenye, T., 2017. The Role of Reactive Oxygen Species in Antibiotic-Mediated Killing of Bacteria. *Trends Microbiol.* 25, 456–466. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.008>
- van Kessel, K.P.M., Bestebroer, J., van Strijp, J.A.G., 2014. Neutrophil-Mediated Phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *Front. Immunol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00467>
- Venet, F., Demaret, J., Gossez, M., Monneret, G., 2021. Myeloid cells in sepsis-acquired immunodeficiency. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1499, 3–17. <https://doi.org/10.1111/nyas.14333>
- Venet, F., Monneret, G., 2018. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nat. Rev. Nephrol.* 14, 121–137. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.165>
- Vincent, J.-L., Jones, G., David, S., Olariu, E., Cadwell, K.K., 2019. Frequency and mortality of septic shock in Europe and North America: a systematic review and meta-analysis. *Crit. Care* 23, 196. <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2478-6>
- Vogt, K.L., Summers, C., Chilvers, E.R., Condliffe, A.M., 2018. Priming and de-priming of neutrophil responses in vitro and in vivo. *Eur. J. Clin. Invest.* 48, e12967. <https://doi.org/10.1111/eci.12967>
- Völkel, P., Dupret, B., Le Bourhis, X., Angrand, P.-O., 2018. Le modèle poisson zèbre dans la lutte contre le cancer. *médecine/sciences* 34, 345–353. <https://doi.org/10.1051/medsci/20183404016>
- Walker, F., Zhang, H.-H., Matthews, V., Weinstock, J., Nice, E.C., Ernst, M., Rose-John, S., Burgess, A.W., 2008. IL6/sIL6R complex contributes to emergency granulopoietic responses in G-CSF- and GM-CSF-deficient mice. *Blood* 111, 3978–3985. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-10-119636>
- Wang, D., Sennari, Y., Shen, M., Morita, K., Kanazawa, T., Yoshida, Y., 2020. ERK is involved in the differentiation and function of dimethyl sulfoxide-induced HL-60 neutrophil-like cells, which mimic inflammatory neutrophils. *Int. Immunopharmacol.* 84, 106510. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106510>
- Wang, X., Yousefi, S., Simon, H.-U., 2018. Necroptosis and neutrophil-associated disorders. *Cell Death Dis.* 9, 111. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0058-8>
- Wang, Y., Jönsson, F., 2019. Expression, Role, and Regulation of Neutrophil Fcγ Receptors. *Front. Immunol.* 10, 1958. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01958>
- Wang, Y., Robertson, J.D., Walcheck, B., 2011. Different Signaling Pathways Stimulate a Disintegrin and Metalloprotease-17 (ADAM17) in Neutrophils during Apoptosis and Activation. *J. Biol. Chem.* 286, 38980–38988. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.277087>
- Wang, Y., Wu, J., Newton, R., Bahaie, N.S., Long, C., Walcheck, B., 2013. ADAM17 cleaves CD16b (FcγRIIIb) in human neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1833, 680–685. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.11.027>
- Warnatsch, A., Tsourouktoglou, T.-D., Branzk, N., Wang, Q., Reincke, S., Herbst, S., Gutierrez, M., Papayannopoulos, V., 2017. Reactive Oxygen Species Localization Programs Inflammation to Clear Microbes of Different Size. *Immunity* 46, 421–432. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.013>
- Wenisch, C., Fladerer, P., Patruta, S., Krause, R., Hörl, W., 2001. Assessment of Neutrophil Function in Patients with Septic Shock: Comparison of Methods. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8, 178–180. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.1.178-180.2001>
- Winterbourn, C.C., Kettle, A.J., Hampton, M.B., 2016. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annu. Rev. Biochem.* 85, 765–792. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014442>
- Witter, A.R., Okunnu, B.M., Berg, R.E., 2016. The Essential Role of Neutrophils during Infection with the Intracellular Bacterial Pathogen *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* 197, 1557–1565. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600599>
- Wright, H.L., Thomas, H.B., Moots, R.J., Edwards, S.W., 2013. RNA-Seq Reveals Activation of Both Common and Cytokine-Specific Pathways following Neutrophil Priming. *PLoS ONE* 8, e58598. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058598>

- Wu, Z., Sawamura, T., Kurdowska, A.K., Ji, H.-L., Idell, S., Fu, J., 2011. LOX-1 Deletion Improves Neutrophil Responses, Enhances Bacterial Clearance, and Reduces Lung Injury in a Murine Polymicrobial Sepsis Model. *Infect. Immun.* 79, 2865–2870. <https://doi.org/10.1128/IAI.01317-10>
- Xiang, M., Fan, Janet, Fan, Jie, 2010. Association of Toll-Like Receptor Signaling and Reactive Oxygen Species: A Potential Therapeutic Target for Posttrauma Acute Lung Injury. *Mediators Inflamm.* 2010, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2010/916425>
- Yang, D., de la Rosa, G., Tewary, P., Oppenheim, J.J., 2009. Alarmins link neutrophils and dendritic cells. *Trends Immunol.* 30, 531–537. <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.07.004>
- Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X.-F., Wang, H., 2014. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark. Res.* 2, 1. <https://doi.org/10.1186/2050-7771-2-1>
- Yu, H.-H., Yang, Y.-H., Chiang, B.-L., 2021. Chronic Granulomatous Disease: a Comprehensive Review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 61, 101–113. <https://doi.org/10.1007/s12016-020-08800-x>
- Zawrotniak, M., Kozik, A., Rapala-Kozik, M., 2017. Neutrophil Extracellular Traps in Infectious Human Diseases, in: Khajah, M.A. (Ed.), *Role of Neutrophils in Disease Pathogenesis*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68443>

Etude des différences fonctionnelles entre les granulocytes matures et immatures sur l'induction de la réponse SOS bactérienne au cours de la phase aigüe du sepsis

L'hématopoïèse d'urgence observée au cours d'un sepsis est caractérisée par la présence d'un grand nombre de granulocytes immatures (GI). Ces cellules sont supposées avoir une diminution de leur phagocytose et de leur production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) en comparaison avec les neutrophiles. Nous avons émis l'hypothèse que la faible production de ROS des GI ne serait pas suffisante pour induire l'apoptose des bactéries mais conduirait à mettre en place des mécanismes de réparation via la réponse SOS. Lors de cette réponse, la réparation de l'ADN bactérien s'accompagne de mouvement d'éléments génétiques mobiles permettant à la bactérie d'acquérir des mécanismes de résistances aux antibiotiques. Les résultats ont mis en évidence tant *in vitro* qu'*ex vivo* que les GI ont une capacité diminuée à phagocyter *E.coli*, une diminution de production de ROS liée à une diminution du nombre de protéines du complexe NADPH oxydase. Cette diminution de ROS est capable d'induire la réponse SOS bactérienne dans le phagosome des GI. L'activation de ce système peut être associée entre autres à l'acquisition ou l'expression de gène de résistances aux antibiotiques pouvant diminuer l'efficacité du traitement. En parallèle, l'analyse des récepteurs de surface impliqués dans la phagocytose (CD16, CD32, CD64), la migration (CD11b) et la mort cellulaire (Fas-L) ont été analysés dans le temps après incubation avec *E.coli*. Les résultats ont montré une variation dynamique de ces récepteurs corrélée à leurs fonctions antimicrobiennes.

Mots-clés : Neutrophiles, granulocytes immatures, production de ROS, sepsis

Study of the functional differences between mature and immature granulocytes on the induction of the bacterial SOS response during the acute phase of sepsis

The emergency hematopoiesis observed during sepsis is characterized by the presence of large numbers of immature granulocytes (IG). These cells are thought to have decreased phagocytosis and reactive oxygen species (ROS) production in comparison with neutrophils. We hypothesized that the low ROS production of IG would not be sufficient to induce bacterial apoptosis but would lead to the establishment of repair mechanisms via the SOS response. During this response, the repair of the bacterial DNA is accompanied by the movement of mobile genetic elements allowing the bacteria to acquire antibiotic resistance mechanisms. The results showed both *in vitro* and *ex vivo* IG have a decreased capacity to phagocytose *E.coli*, a decrease in ROS production linked to a decrease in the number of proteins of the NADPH oxidase complex. This decrease in ROS is able to induce the bacterial SOS response in the IG phagosome. The activation of this system may be associated with the acquisition or expression of antibiotic resistance genes that may reduce the effectiveness of the treatment. In parallel, the analysis of surface receptors involved in phagocytosis (CD16, CD32, CD64), migration (CD11b) and cell death (Fas-L) were analyzed in time after incubation with *E.coli*. The results showed a dynamic variation of these receptors correlated to their antimicrobial functions.

Keywords: Neutrophils, immature granulocytes, ROS production, sepsis

