



HAL
open science

Effet de la réponse inflammatoire à la phase aigüe du sepsis sur l'induction de la réponse SOS bactérienne

Ana Catalina Hernandez Padilla

► **To cite this version:**

Ana Catalina Hernandez Padilla. Effet de la réponse inflammatoire à la phase aigüe du sepsis sur l'induction de la réponse SOS bactérienne. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2022. Français. NNT : 2022LIMO0095 . tel-04082459

HAL Id: tel-04082459

<https://theses.hal.science/tel-04082459>

Submitted on 26 Apr 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 - Biologie, Chimie, Santé (BCS)

Inserm UMR 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
Ana Catalina Hernández Padilla

Le 6 décembre 2022

Effet de la réponse inflammatoire à la phase aiguë du sepsis sur l'induction de la réponse SOS bactérienne

Thèse dirigée par la Professeure Marie-Cécile PLOY et le Docteur Robin JEANNET

JURY :

Président du jury

M. Antoine GUILLON, MD, PhD, Service de Réanimation, CHU-Tours - Inserm 1100 CEPR, Université de Tours

Rapporteurs

Mme. Zeynep BAHAROGLU, PhD, CR, Unité Plasticité du Génome Bactérien, Institut Pasteur, Paris

M. Thomas GUILLARD, PR, Inserm UMR 1250 P3Cell, Université de Reims - Champagne - Ardenne

Examineurs

M. Antoine GUILLON, MD, PhD, Service de Réanimation, CHU-Tours - Inserm 1100 CEPR, Université de Tours

M. Ivan MATIC, DR, Inserm U1016 - CNRS UMR 8104, Université Paris Cité

Mme. Marie-Cécile PLOY, PR Inserm UMR 1092 RESINFIT, Université de Limoges

M. Robin JEANNET, PhD, CIC 1435 - Inserm 1262 - UMR CNRS 7276, Université de Limoges

“La vida no es sino una continua sucesión de oportunidades para sobrevivir”

Gabriel García Márquez

Remerciements

Chers tous,

Arrivée à la fin de ce travail, je commence à comprendre l'impact émotionnel de finir une étape de la vie. Je dois avouer avoir commencé cette aventure en pensant que ce serait comme n'importe quel autre projet de recherche, mais cela était loin d'être le cas.

Un travail de thèse est une opportunité pédagogique pour apprendre à faire d'un projet scientifique un projet personnel. L'ignorance, la curiosité et les ambitions au départ donnent la motivation suffisante pour survivre à la première année. Les résultats positifs, significativement inférieurs en nombre que les échecs, s'ils sont bien répartis dans le temps, peuvent aider à tenir jusqu'au troisième. Enfin, le travail d'écrire le manuscrit renouvelle la sensation d'ignorance et de curiosité du départ, en ajoutant une bonne partie d'humilité de réaliser que ce que nous avons accompli n'est qu'une fraction infime dans la compréhension d'un phénomène biologique.

Ce qui fait avancer la production de résultats de qualité, sont les discussions avec les collègues, l'aide de ceux qui ont plus d'expérience, les critiques des superviseurs.

Cette première section est dédiée à ceux qui ont rendu possible l'avancement de cette étude grâce à leur contribution scientifique et technique sur le projet, mais également à leur contribution sur ma croissance personnelle.

Je voudrai d'abord remercier la Professeure **Marie-Cécile Ploy**. Grace à des scientifiques comme vous, aujourd'hui en Europe, tout individu peut rêver de devenir scientifique, indépendamment de son sexe ou de son origine. Votre capacité à « prendre de la hauteur » a permis au projet d'avancer quand nous nous perdions dans les détails. Merci de m'avoir donné l'opportunité de travailler avec vous, d'avoir eu la patience d'écouter mes idées infaisables, de m'avoir recadré quand le nombre de responsabilités dans lesquelles je m'investissais était plus élevé que le nombre d'heures dans la journée.

Robin (In English), Thanks to you I set foot again in a lab, made mistakes pipetting, cutting tape, speaking in French. I know the passage from colleague to thesis director was not smooth, but your kindness and father-like attitude made things easier when times were hard. I hope we get to be good colleagues again, now that I can be part of the team of "scientifics", and not the all-time-hated, clinicians in research.

Stecy, I know we always spoke in French, but English remains our written language. I have no words to thank you. You have a magical spark that lights up the room in a matter of seconds. I fully agree with Robin and Marie-Cécile's insistence in our complementarity. Your organization, rigorousness, attachment to the facts, artistic touch, taught me all I know now to write a protocol and do my figures. My French level grew exponentially with you and the karaoke nights in front of the cytometer. I'm sure your English will grow even better during your postdoc, as well as your experience and publications. You have all what's needed in a great scientist and big things await you!

Je tiens à M. le Professeur **Antoine GUILLON** d'avoir accepté de présider ce jury.

Je remercie Mme la Docteure **Zeynep BAHAROGLU** et M le Professeur **Thomas GUILLARD** d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse et ce manuscrit en tant que rapporteurs. J'aimerais remercier M. le Docteur **Ivan MATIC** d'avoir accepté de juger mon travail de thèse en tant qu'examineur.

Merci à tous les membres du jury, pour le temps que vous allez consacrer à ce travail de thèse, en vous souhaitant une bonne lecture.

Thomas, merci pour ton aide avec les intégrons. J'admire ta passion pour les EGM, auxquelles tu es capable de dédier des journées entières. Merci pour ton soutien, pour ta compagnie et pour la bonne musique les week-ends et les soirées de longues manips.

Sandra, merci pour le suivi que tu as fait au projet dès son début, pour tes commentaires enrichissants sur mes différents manuscrits, merci de m'avoir appris l'importance des contrôles, même si j'ai sûrement dû en oublier quelques-uns au passage.

Les résultats de ce travail doivent leur existence aux granulocytes des patients et des donneurs sains. Merci à tous nos collègues du labo et du CIC qui n'ont pas peur des aiguilles pour avoir donné de leur sang et temps au projet. Vous pouvez être fiers des capacités phagocytaires et de production de ROS de vos neutrophiles (voir section Résultats). Je dois remercier également l'équipe de recrutement des donneurs sains du CIC 1435 : les Docteurs **Christine VALLEJO**, **Rachel FROGET**, et **Fabienne MARIAUD**, ainsi que **Clémentine MICHALSKI**, **Cécile THUILLIER**, **Coralie CHALOT** et **Isabelle HERAFA**. Merci pour votre travail, votre temps, votre réactivité, et accueil aux donneurs. L'inclusion des patients septiques a été réalisé grâce au Docteur **Thomas DAIX**. Thomas, merci pour toute l'aide pendant la thèse : au-delà de l'identification de patients avec des critères si restreints, pour ta vision critique et clinique, et pour tes réponses toujours très rapides et pratiques à mes questions fréquemment de dernière minute. Je suis contente de pouvoir continuer à travailler avec toi sur les projets en cours et à venir en réa.

Je dois remercier les équipes des différentes plateformes qui ont permis le recueil des échantillons des donneurs de cellules souches hématopoïétiques, à **Cathy** de la plateforme de cytométrie pour la formation sur les différents cytomètres, pour le dépannage, et pour les bonnes conversations à côté du ronronnement des machines pendant des heures de tri ou de passage des tubes. Je remercie également **Claire**, de la plateforme de microscopie, pour la formation (très « claire ») sur l'utilisation du microscope confocal. Enfin, je remercie **Émilie** et **Jessie**, de la plateforme de séquençage, pour leurs avis sur le traitement des échantillons de bactéries phagocytées parmi les débris embêtants des cellules eucaryotes.

Merci à tous les collègues de bureau du troisième et du premier étage. A ceux qui ne sont plus là (**Camille**, **Wadad**, **Lilian**, **Ana**, **Caro**). A ceux qui ont partagé l'angoisse des manips qui ne fonctionnent pas et les jours de longues manips avec des centaines de tubes. A ceux qui m'ont permis d'avoir des discussions sur les résultats bizarres (**Lucie**, **Linda**, **Jessie**, **Emma**, **Stecy**, **Audrey**, **Sylvain**, **Léa**, **Jennifer**, **Israah**). Enfin, une petite pensée aux nouveaux thésards en « différents stades de maturation » : **Aurélien**, **Audrey**, bon courage pour la fin, et **Mélanie**, **Morgane**, **Anne-Laure** et **Claire**, gardez la motivation pour les moments difficiles. Une thèse est surtout une épreuve de résistance.

Linda, s'il y a une personne à qui je dois mon amour pour ce projet, c'est bien toi. C'est grâce à toi que j'ai appris les noms des éléments du laboratoire et des détails de la réponse SOS en français avant toute autre langue. Tu es une enseignante dans tous les sens du terme : tu as la patience pour enseigner et évaluer, mais surtout la passion pour transmettre ton amour et ta capacité à t'émerveiller avec les mystères de la microbiologie. Merci, pour tout l'apprentissage technique, pour tout le soutien, pour les soirées de discussion d'articles, des résultats, de la vie.

Lucie, grâce à toi j'ai appris qu'une vraie amitié est plus grande que les différences entre les individus. Je crois qu'à part notre intérêt pour le cinéma, et la 'bonne bouffe', tu me permets d'avoir une vision différente sur pleins d'autres sujets, et c'est ce que j'adore partager avec toi ! Ta sensibilité aux autres, ta façon de trouver le bon mot pour les moments difficiles, ta disposition pour être toujours là pour les autres, ton soutien inconditionnel, ton attention aux détails, sont des qualités que j'admire et que j'espère cultiver.

Yohann, I think we always had a language identity issue. English feels more natural tho. Thank you for all the help with my integron issues. While writing I realize we share more than what catches the eye: our thesis director, the cytometer, our 'in between' status in large projects where the scientific competences adapt to social ones. I'm happy to know that at least in the middle term we may continue crossing each-other. Your talent is way bigger than what you like to show, and I'm sure it is already bringing you far.

Margaux, Merci pour tes cours de pipetage et 'retro-pipetage'. Grâce à ta précision ce projet a eu sa « cerise sur le gâteau », et probablement quelques points de plus sur l'impact factor. J'espère revenir au labo à midi, pour partager la table et écouter tes discussions sur la politique et l'environnement, ou les histoires d'Achille. Les histoires que j'aimerais continuer à écouter sont sûrement celles de **Mélissa** tant improbables que drôles, racontées à une vitesse supérieure que celle de **Nicolas** à l'attaque des gâteaux offerts à la salle de pause. Nico, merci pour les bonnes recommandations en science-fiction, que ce soient des livres, films, séries, jeux vidéo ou sur la meilleure adaptation entre les quatre.

Quand on est loin de chez soi, les amis et collègues peuvent devenir rapidement une grande famille, qui comme la culture colombienne est riche en façons de voir le monde, en habitudes et en origines. Merci à l'équipe du CIC : **Elodie, Julie, Sarah, Tifenn, Olivier, Dr. François**, pour la confiance que vous avez sur ce que je suis capable de faire et de devenir, j'espère ne pas vous décevoir. Merci à **Rachel** et **Seb**, pour nos soirées Karaoké et Just Dance, qui m'ont permis de développer ma diction en français, et ont élargie mes connaissances sur les plus hauts représentants de l'élégante culture française.

Merci à mes voisins chez « Chichi » : **Julie, Lucie, Andrew, Diane** and **Simon**, for the most interesting conversations on your research, experiences and background. Thank you for the nice apéros, birthday parties, where we would always end up talking about frustration in science and thanks to which I learnt to relativize our little role in the great plan of building knowledge. Can't wait to have more free time to discuss films, books, and podcasts with you, listen to you play or invite you for some Colombian food and parties.

Merci aux amis de Sylvain, qui m'ont rapidement accepté comme le +1 qui ne manque pas un événement. Merci à **Yohan** et **Adé, Max, Marine, Marie-Fleur, Sarah, Marie** et **Emilie**, pour les fêtes surprises, les anniversaires, les courses, les barbecues, l'escalade, les burgers, les

déménagements (entre autres). Vous êtes une des raisons pour que je reste la +1 de Sylvain (haha).

Gracias a mi comunidad hispanoparlante, que ha hecho que la distancia se sienta menos fría, que me han permitido guardar mi identidad. Gracias a **Yuli, Jaime, Lina, Ana, Caro, Dayana, Dimitri, Liz, Oscar, David, Tati, Gloria, Daniel, Mate, Yolanda y Dani**. Espero volver pronto a la vida de festejo, abrazos, buena comida, baile y sobre todo sin quejas, que solo nosotros sabemos tener.

Gracias a mis amigos meranistas **Lizceth, Juan, Sara y Javier**, que han seguido allí a pesar de la distancia, sus recorridos variados, son tan enriquecedores e interesantes que espero con emoción seguir compartiendo sus experiencias. Gracias a mis amigos clínicos: **Jaime, Juank, Checho, Clau, Rafa, Caro, Maria, Sandrita**, que me recuerdan que mi lado clínico alguna vez existió, y no es solo un sueño lejano y vago de una vida pasada. Gracias a los profes de la unidad de Infectología del San Ignacio (**Valderrama, Tamara, Lowenstein, Quiroga, Garzón, Álvarez, Gualtero**) que me permitieron construirme en la investigación clínica, y me enseñaron su utilidad al servicio de los pacientes.

Finalmente, debo agradecer a mi familia. A la familia que me ha acompañado, apoyado, motivado e impulsado desde hace 30 años y gracias a la que me encuentro donde estoy el día de hoy. Gracias **Ma**, por enseñarme que ser mujer requiere valor, por mostrarme con tu experiencia el liderazgo, la justicia, la capacidad de comunicación y de comprensión de la gente, lo importante de no aceptar un “no” por respuesta, de ser creativa, de arriesgarse, de buscar oportunidades, de querer que el mundo sea mejor. Gracias **Patolo**, por inculcarme el amor por la ciencia y lo improbable, por enseñarme la disciplina y el compromiso, el trabajo duro e incansable, la resistencia, y la importancia de que las oportunidades no deben solo buscarse, deben no dejarse ir. Muchas gracias a los dos por estar siempre tan presentes, por hacerme sentir que no están lejos, por escuchar mis angustias más pequeñas, y darles la importancia que necesito, enseñarme a procesarlas y resolverlas, darme consejos a diario, animarme cuando los llamo a las 2am con pesadillas. Lamento que el destino que he elegido esté tan lejos de casa, pero quiero pensar que esto solo hace nuestro hogar más grande.

Juanse, mi nene. Esta aventura ha sido una montaña rusa, para los dos. Gracias por venir a verme desde el principio, por ser mi orgullo y motivación. Tu capacidad de luchar por lo que amas y por la dignidad de lo que haces es lo que me dice cada día “vale la pena intentarlo”. Estoy muy orgullosa de ver cómo te construyes cada día, de ver la belleza y complejidad del arte que creas.

Je dois remercier également la famille Meyer qui m'a adopté il y a déjà trois ans. Merci à **Francine, Philippe et Pierre** pour votre accueil et bienveillance. Vous m'avez très rapidement donné l'impression de faire partie de la famille. Merci beaucoup pour votre écoute, pour m'avoir donné la confiance nécessaire pour m'exprimer et pour valoriser mes opinions. Merci pour votre empathie et pour avoir appris l'espagnol. Merci beaucoup de partager avec moi la magie de la vie des animaux et des plantes, et la logique des jeux de société. Merci pour les étés au parfum de miel et les hivers au goût de Bredle. En vous connaissant, j'ai compris d'où vient la douceur de Sylvain, sa transparence, sa responsabilité envers les autres et l'environnement. Merci **Ben**, pour ta bienveillance, ta créativité, ton extravagance, et pour partager avec moi les difficultés de vivre avec un Meyer.

Enfin, je te remercie, **Sylvain**. Cette thèse n'aurait probablement jamais vu le jour sans toi. Un projet de thèse devient facilement une idée fixe. Nos sujets de conversation sont souvent liés au travail, et cette dernière année, j'ai en plus pas arrêté avec mon questionnement sur les bactéries fluorescentes et le sepsis. Merci de m'écouter, merci pour tes retours scientifiques et personnels. Merci de célébrer les bons résultats avec moi, de m'offrir une épaule pour pleurer quand j'en ai eu besoin, de prendre en charge les petites choses de la vie quotidienne quand mon esprit était occupé par un travail abstrait. Merci de faire de chaque détail de la vie, un détail magique. Amor de mis amores, es un privilegio construir este nuevo mundo a tu lado.

A propos de l'auteur

Je suis née en 1991 à Bogota, Colombie, au sein d'une famille qui m'a permis de cultiver ma passion pour les sciences de la vie. Médecin généraliste de l'Université Nationale de Colombie grâce à la bourse « *Mejores bachilleres del pais* » (les meilleurs bacheliers du pays). J'ai trouvé mon intérêt pour la recherche fondamentale lors d'un stage dans le *Pulmonary and Critical Care Basic Science lab* (Laboratoire de physiologie pulmonaire et réanimation) de l'Université de Weill Cornell, New York City, lors d'un travail sur la quantification de l'ADN mitochondrial libre dans le plasma comme biomarqueur de l'inflammation. De retour en Colombie, j'ai travaillé pendant 2 ans comme médecin dans le service de maladies infectieuses de l'Hôpital Universitaire San Ignacio à Bogota, avec une expérience de recherche clinique.

Suite à une rencontre fortuite lors d'un congrès international en 2017, j'ai pu bénéficier d'un stage au sein du CIC 1435 de Limoges, où j'ai continué des activités de recherche clinique et translationnelle dans le domaine de la PAVM (pneumopathie acquise sous ventilation mécanique). Un an après, mon niveau de français était suffisant pour continuer mes études dans le M2 Agents infectieux – Interaction avec leurs hôtes et l'environnement, à l'Université Paris – Saclay.

La thématique du stage de M2, réalisé au sein du laboratoire Inserm UMR 1092, dirigé par la Professeure Marie-Cécile Ploy a captivé mon intérêt et a renouvelé ma curiosité sur la recherche fondamentale. Ce travail de thèse est la continuité du sujet, centré sur l'étude de l'effet de la réponse immune innée sur l'activation des réseaux génétiques de réponse bactériens.

Je tiens à remercier les lecteurs et lectrices de ce manuscrit pour leur lecture critique. Toute discussion scientifique à la recherche de nouvelles idées pour aider à poursuivre ce travail est bienvenue. Je tiens également à m'excuser pour toutes les fautes de grammaire qui auraient pu échapper aux yeux judicieux de mes superviseurs et collègues. J'espère sincèrement que ma façon d'écrire vous « amène le soleil », comme disent ceux qui entendent mon accent.

Droits 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	3
A propos de l'auteur	3
Droits d'auteurs	9
Table des matières	10
Liste des Abréviations	12
Table des tableaux	15
Préambule	19
Chapitre I. Les granulocytes immatures dans le sepsis	21
<i>I.1. Le sepsis, définition et impact sur la santé publique</i>	21
<i>I.2. Prise en charge et traitement du sepsis</i>	24
I.2.1. Le sepsis bundle et la sélection des résistances aux antibiotiques	26
<i>I.3. La dérégulation immune innée dans le sepsis</i>	26
I.3.1. L'état pro-inflammatoire	27
I.3.2. L'état immunosuppresseur	28
<i>I.4. Les neutrophiles dans la réponse inflammatoire normale</i>	30
I.4.1. Phagocytose	32
I.4.2. Formation des pièges extracellulaires (NETose)	37
<i>I.5. Neutrophiles, Granulocytes Immatures et sévérité clinique chez les patients septiques</i>	38
I.5.1. Activité immunosuppressive des granulocytes matures dans le sepsis	38
I.5.2. Granulopoïèse d'urgence	39
I.5.3. Caractérisation et différenciation des neutrophiles et granulocytes immatures	40
Chapitre II. Mécanismes bactériens d'adaptation au stress : La première étape pour survivre 44	
<i>II.1. Agents du stress bactérien dans le sepsis</i>	44
II.1.1. Le stress oxydant	47
<i>II.2. Réponse bactérienne au stress oxydant</i>	53
II.2.1. Régulation de la réponse au stress oxydant	53
II.2.2. Enzymes antioxydantes, tampons redox et modifications du métabolisme	56
II.2.3. Réparation des dommages aux protéines	59
<i>II.3. La réponse SOS</i>	61
II.3.1. Inducteurs de la réponse SOS	63
II.3.2. Induction de la réponse SOS	64
Chapitre III. Réponse SOS et résistance aux antibiotiques chez <i>E. coli</i>	71
<i>I.1. Réponse SOS et résistance aux antibiotiques</i>	72
I.1.1. Résistance par mutations chromosomiques et réponse SOS	72
I.1.2. Expression et dissémination de gènes de résistance par des éléments génétiques mobiles, sous régulation SOS	74

Objectifs	82
Matériels et Méthodes	83
<i>I.1. Développement d'un modèle pour suivre l'induction de la réponse SOS après interaction Granulocyte-Bactérie in vitro et ex vivo</i>	83
I.1.1. Sources des granulocytes matures et immatures	83
I.1.2. Souches et plasmides	89
I.1.3. Modèle pour suivre l'induction de la réponse SOS chez <i>E. coli</i> par les GI et les neutrophiles	91
<i>I.2. Modèles pour mesurer l'impact biologique de la réponse SOS intra-phagosomale par l'expression des résistances aux antibiotiques</i>	94
I.2.1. Quantification de l'activité d'excision de l'intégrase de l'intégron.....	94
I.2.2. Suivi de l'activité d'excision de l'intégrase de l'intégron chez <i>E. coli</i> après interaction avec les GI ou neutrophiles	98
I.2.3. Récupération des bactéries phagocytées après incubation avec des GI ou neutrophiles..	99
I.2.4. Suivi de l'expression du gène <i>qnrB2</i> après induction par l'interaction des bactéries avec les granulocytes immatures et les neutrophiles.....	99
Résultats	102
<i>I.1. Phagocytose et production des ROS par les GI et les neutrophiles</i>	102
<i>I.2. Induction de la réponse SOS par les Granulocytes Immatures et les neutrophiles</i>	109
<i>I.3. Impact biologique de la réponse SOS intra-phagosomale : expression des résistances aux antibiotiques</i>	121
I.3.1. Induction de la résistance à la ciprofloxacine par l'expression du gène <i>qnrB2</i>	121
I.3.2. Optimisation d'un modèle pour quantifier l'activité d'excision de l'intégrase de l'intégron	123
Valorisation scientifique	132
Discussion	157
<i>I.1. Phagocytose et production de ROS par les Granulocytes Immatures et les Neutrophiles</i>	157
<i>I.2. Induction de la réponse SOS bactérienne</i>	159
<i>I.3. Impact biologique de la réponse SOS intra-phagosomale</i>	163
I.3.1. Expression de <i>qnrB2</i> et résistance aux fluoroquinolones	163
I.3.2. Optimisation d'un modèle pour quantifier l'activité d'excision de l'intégrase de l'intégron	164
I.3.3. Virulence	166
Perspectives	167
Conclusion	169
Références bibliographiques	170

Liste des Abréviations

A				F	
ADN	Acide Désoxyribonucléique				Flavin Adenine Dinucleotide
ADNdb	Acide Désoxyribonucléique Double Brin	FAD		FAD Réduit	
ADNsb	Acide Désoxyribonucléique Simple Brin	FADH		Fraction Inspiré D'oxygène	
AMPK	AMP-Activated Protein Kinase	FiO2		Ligand De Type FMS Tyrosine Kinase	
ARN	Acide Ribonucléique	FLT3		Forward Scatter, Détecteur De Taille	
ARNm	Acide Ribonucléique Méssager	FSC			
ARNt	Acide Ribonucléique De Transfert				G
ATP	Adénosine Triphosphate	G-CSF		Facteur Stimulant De Colonies	
	C	GCS		Granulocytaires	
C3a	Facteur 3 Du Complément Activé	GFP		Glasgow Coma Score	
C5a	Facteur 5 Du Complément Activé			Green Fluorescent Protein, Protéine Verte Fluorescente	
CFU	Colony-Forming Unit, Unités Formant Des Colonies	GI		Granulocytes Immatures	
CGD	Chronic Granulomatous Disease, Granulomatose Chronique Familiale	GI-HL60		Granulocytes Immatures Provenant De La Lignée Cellulaire HL-60	
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice	GI-Sepsis		Granulocyte Simatures Provenant Des Patients Septiques	
	D	GM-CSF		Facteur Stimulant De Colonies Granulocytaires- Macrophages	
DAMP	Damage Associated Molecular Patterns, Molécules Associées Aux Dommages				H
DAPI	4',6-Diamidino-2- Phenylindole	H-NS		Histone Like Protein, Protéine De Type Histone	
EGM	Element Génétique Mobile	HL-60		Human Leukemia Cell Line. Lignée Cellulaire De Leucemie Humaine	
	E			Human Leukocyte Antigen – Dr Isotype, Isotype Dr De L'antigène Des Leucocytes Humains	
		HLA-DR			

	I		O
IFN	Interferon		Odds Ratio, Rapport De Cotes
IL	Interleukine	OR	
	Inductible Nitric Oxyde Synthase, Synthèse D'oxyde Nitrique Inductible		P
iNOS			Pression Artérielle Moyenne
IQR	Intervalle Interquartile	PAM	
	L		Pathogen Associated Molecular Patterns, Molécules Associées Aux Pathogènes
LB	Luria-Bertani, Milieu De Culture Bactérien	PAMP	
LPS	Lipopolysaccharide	PaO2	Pression Partiel D'oxygène
	M		Pression Artérielle Systolique
	Myeloid-Derived Suppressor Cells, Cellules Myéloïdes Suppresives	PAS	
MDSC		PBS	Phosphate-Buffered Saline
MPO	Myelopéroxydase		Programmed Cell Death Protein 1, Protéine De Mort Cellulaire Programmé
	Mechanistic Target Of Rapamycin, Cible De La Rapamycine Chez Les Mammifères	PD1	
MTOR		PDL1	Programmed Death Ligand 1, Ligand De Mort Programmé
	N		Phosphoinositide 3-Kinase
NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide		Pattern Recognition Receptors, Récepteurs De Reconnaissance Des Motifs Associées Aux Pathogènes Ou Aux Dommags
NADH	Forme Réduite De NAD		
	Réparation Par Excision Nucléotidique, Nucleotide Excision Repair	PRR	
NER			Q
	Neutrophil Extracellular Traps, Pièges Extracellulaires		Quick Sequential Organ Failure Assessment
NETs		qSOFA	
Neut	Neutrophiles		R
	Neutrophiles Provenat D'un Patient CGD		Reactive Nitrogen Species, Espèces Réactifs Du Nitrogène
Neut-CGD	Neutrophiles Provenant De La Lignée Cellulaire HL-60	RNS	Reactive Oxygen Species, Espèces Réactives De L'oxygène
Neut-HL60			
NFKB	Nuclear Factor-Kappa B	ROS	
NO	Nitric Oxide, Oxyde Nitrique		

RTqPCR	Reverse Transcription Quantitative Real-Time PCR, PCR Quantitative De Transcription Reverse En Temps Réel	SSC	Side Scatter, Détecteur De Structure
			T
SOD	S Superoxyde Dismutase	TF	Facteur Tissulaire Toll-Like Receptor, Recepteur De Type Toll
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment	TLR	
		TNF	Facteur De Nécrose Tumorale
SRIS	Syndrome De Réponse Inflammatoire Systémique		U
		UV	Ultraviolet
SSB	Single Strand DNA- Binding Protein, Protéines D'attachement À L'adn De Simple Brin		

Table de Figures

Figure 1. Hypothèse et structure du document	20
Figure 2. Définition opérationnelle des patients avec un sepsis et un état de choc septique	24
Figure 3. Résumé iconographique du sepsis <i>bundle</i>	25
Figure 4. Initiation du traitement antibiotique efficace et survie	25
Figure 5. Liens entre l'état pro-inflammatoire et la défaillance organique dans le sepsis	27
Figure 6. Altérations de la réponse immune innée	30
Figure 7. Le système hématopoïétique	31
Figure 8. Étapes de la phagocytose	32
Figure 9. Maturation du phagosome	34
Figure 10. Assemblage du complexe NADPH-oxydase actif	35
Figure 11. Cascade de production des ROS dans le phagosome	36
Figure 12. Mécanismes d'induction de la granulopoïèse d'urgence	39
Figure 13. Caractéristiques morphologiques des granulocytes immatures et neutrophiles	40
Figure 14. Types de stress subis par les bactéries au contact avec l'hôte humain	45
Figure 15. Chaîne des réactions d'oxydation sur un résidu cystéine	48
Figure 16. Chaîne des réactions d'oxydation sur un résidu méthionine	48
Figure 17. Activité catalytique d'une enzyme Fe-S déshydratase	49
Figure 18. Chaîne des réactions d'oxydation du cluster Fe-S	49
Figure 19. Réaction de Fenton	50
Figure 20. Types de dommages oxydatifs les plus fréquents sur l'ADN	51
Figure 21. Résumé des ROS produits par les phagosomes et le stress oxydant dans une bactérie	52
Figure 22. Mécanisme d'activation d'OxyR	54
Figure 23. Mécanisme d'activation de SoxR	55
Figure 24. Résumé des réponses au stress oxydant	56
Figure 25. Réactions antioxydantes	57
Figure 26. Voies métaboliques productrices de ROS, des métabolites antioxydants et ses alternatives	58
Figure 27. Réactions de Fenton	59
Figure 28. Mécanisme de réparation par les thiorédoxines	59
Figure 29. Mécanisme de réparation protéique par les glutarédoxines	60
Figure 30. Mécanisme de réparation protéique par les méthionine-sulfoxide réductases.	61
Figure 31. Distribution du gène <i>lexA</i> dans le domaine bactérien	62
Figure 32. Résumé des inducteurs de la réponse SOS	63
Figure 33. Représentation du répresseur LexA, dimérisation et interaction avec l'ADN	64
Figure 34. Gènes régulés par la réponse SOS	65
Figure 35. Structure de la protéine RecA. Adaptée de ^{119,120} . RecA est une protéine multifonctionnelle oligomérique de 38kDa composée de trois domaines : un domaine central avec des sites d'attachement à l'ADNsb, où a lieu l'activité ADNsb-ADNdb recombinase (1, orange), proche du site d'attachement à l'ATP portant l'activité hydrolytique (2, bleu) ; un domaine N-terminal qui lui permet d'interagir avec d'autres monomères ; et un domaine C-terminal qui permet l'entrée de l'ADNdb dans d'autres régions du chromosome bactérien (3, 4, 5, rouge, jaune, bleu clair).	66
Figure 36. Nucléofilament de RecA-ADNsb	67
Figure 37. Régulation SOS par LexA et RecA	68
Figure 38. Formation du filament postsynaptique à l'aide de RecA	70
Figure 39. Résumé des cibles des antibiotiques et des mécanismes de résistance	71
Figure 40. Résumé des études sur la relation entre l'induction SOS et l'augmentation de la résistance aux antibiotiques par mutation de la cible	73
Figure 41. Transfert d'ADN entre bactéries	75

Figure 42. Alignement de la région promotrice de <i>qnrB2</i> et des allèles de <i>qnrB</i>	76
Figure 43. Distribution des cassettes des gènes par rapport à leur fonction	78
Figure 44. Structure d'un intégron mobile	79
Figure 45. Activités de recombinaison de l'intégrase de l'intégron	80
Figure 46. HL-60 au cours de la différenciation	84
Figure 47. Représentation en Dot-plots des HL-60 après 10 jours de différenciation avant et après tri cellulaire	85
Figure 48. Vérification de la pureté des granulocytes après tri magnétique négatif par cytométrie en flux	88
Figure 49. Schéma des souches et plasmides utilisés dans ce modèle	89
Figure 50. Stratégie de <i>gating</i> pour l'analyse de granulocytes (GI ou neutrophiles) et des bactéries phagocytées, production de ROS et réponse SOS	93
Figure 51. Stratégie de « <i>gating</i> » pour l'analyse des bactéries non phagocytées	94
Figure 52. Schéma de l'estimation de l'activité d'excision de l'intégrase d'intégron de classe 1	97
Figure 53. Schéma de l'estimation de l'activité d'excision de l'intégrase d'intégron de classe 1 après induction SOS	98
Figure 54. Calcul du taux d'augmentation de l'expression de <i>qnrB2</i>	101
Figure 55. Stratégie de « <i>gating</i> » pour la quantification de la phagocytose et la production de ROS par les granulocytes	103
Figure 56. Activité phagocytaire des granulocytes immatures (GI-HL60) et neutrophiles (Neut-HL60) obtenus de la différenciation de la lignée cellulaire HL-60	104
Figure 57. Activité phagocytaire des granulocytes humaines	105
Figure 58. Production des ROS par les granulocytes immatures (GI-HL60) et neutrophiles (Neut-HL60) obtenus de la différenciation de la lignée cellulaire HL-60	107
Figure 59. Production des ROS par les granulocytes humains	108
Figure 60. Stratégie de « <i>gating</i> » pour l'identification de granulocytes portant des bactéries GFP+	110
Figure 61. Induction de la réponse SOS par les GI et Neutrophiles différenciés à partir de la lignée cellulaire HL-60	111
Figure 62. Induction de la réponse SOS par les granulocytes humains	112
Figure 63. Moyenne d'intensité de fluorescence pour GFP parmi les bactéries incubées sans induction SOS et les dérivés HL60 incubés sans bactéries	113
Figure 64. Phagocytose et induction SOS chez <i>E. coli</i> MG1656 <i>mCherry/pPsfIA::gfp</i> phagocyté par les granulocytes du modèle <i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i> , en absence du CellRox Deep Red.	115
Figure 65. Stratégie de « <i>gating</i> » des événements extracellulaires	115
Figure 66. Expression de la réponse SOS par les bactéries non phagocytées	116
Figure 67. GI ou Neutrophiles provenant de la différenciation des HL-60 incubés avec <i>E. coli</i> MG1656- <i>mCherry/pPsfIA::gfp</i> et visualisés par microscopie confocale	117
Figure 68. Granulocytes du modèle <i>ex vivo</i> incubés avec <i>E. coli</i> MG1656- <i>mCherry/pPsfIA::gfp</i> et visualisés par microscopie confocale	118
Figure 69. Phagocytose, production de ROS et induction SOS par les neutrophiles et GI des donneurs sains, après stimulation avec du plasma du patient septique	120
Figure 70. Taux d'augmentation en l'expression de <i>qnrB2</i>	123
Figure 71. Quantification de la phagocytose, production de ROS et pourcentage de cellules marquées GFP après induction de la réponse SOS par les HL-60 différenciés en GI ou Neutrophiles	125
Figure 72. Fréquence d'excision parmi les bactéries non phagocytées	126
Figure 73. Comparaison de l'estimation de la fréquence d'excision entre la cytométrie (A) et le comptage sur boîte (B)	127
Figure 74. Comparaison de l'activité d'excision <i>E. coli</i> MG1656/ <i>pZE1-IntI1wlexAmut2</i>	128
Figure 75. Proposition de protocole pour mesurer la fréquence d'excision des bactéries phagocytées	131

Figure 76. Proportion de bactéries GFP+ (ligne bleue) parmi le total de bactéries (ligne rouge), en fonction de la concentration de H₂O₂	159
Figure 77. Résumé d'évènements qui peuvent causer un changement de niveau de fluorescence mCherry et GFP dans le phagosome	161
Figure 78. Résumé des résultats obtenus dans ce travail	164
Figure 79. Possibles impacts de l'induction de la Réponse SOS dans le phagosome granulocytaire	169

Table des tableaux

Tableau 1. Score de SOFA	23
Tableau 2. Score de qSOFA	23
Tableau 3. Résumé des altérations fonctionnelles des GI dans le sepsis.....	42
Tableau 4. Opérons régulés par OxyR	54
Tableau 5. Caractéristiques cliniques des patients septiques inclus.	86
Tableau 6. Souches et plasmides utilisés dans le modèle SOS	90
Tableau 7. Amorces utilisées pour confirmer l'insertion de la séquence <i>mcherry</i> au site λ att	90
Tableau 8. Amorces utilisées pour déléter la séquence PsfIA* du plasmide pPsfIA*:: <i>gfp</i> et la séquencer	91
Tableau 9. Plasmides d'induction	95
Tableau 10. Plasmides rapporteurs	96
Tableau 11. Amorces utilisées pour construire pExCatGFP.....	96
Tableau 12. Sondes utilisées pour la RTqPCR.....	100
Tableau 13. CMI de la ciprofloxacine	122
Tableau 14. Nombre final et fréquence d'excision des bactéries phagocytées par des granulocytes issues de la maturation de la lignée HL-60	129
Tableau 15. Quantité finale et fréquence d'excision de <i>E. coli</i> MG1656/ pZE1- <i>Int11w</i> /p6851 après 36 heures d'incubation avec des Neut-HL60 ou GI-HL60	129

Préambule

Le sepsis, syndrome de dysfonction d'organe secondaire au déséquilibre dans la réponse immune aux infections, est une entité clinique ayant un impact de santé publique important dû à sa morbi-mortalité. D'autre part, le développement et la sélection des résistances aux antibiotiques chez les bactéries responsables de ces infections peuvent impacter le pronostic chez les patients septiques.

Des centaines d'études sont publiées chaque année sur les deux sujets séparément, soutenus par l'intérêt global de lutter contre l'antibiorésistance et ses conséquences sur la santé humaine et l'environnement.

Ce travail a pour objectif principal de mieux comprendre l'interaction hôte-pathogène au cours du sepsis ; à savoir celle entre les granulocytes humains et la bactérie modèle *Escherichia coli*, dans un modèle *ex vivo*, après sa mise au point *in vitro*. Dans cette interaction, nous avons évalué l'activité de contrôle des pathogènes chez les granulocytes immatures et neutrophiles, ainsi que leur capacité à induire la réponse SOS bactérienne, et les conséquences de cette induction sur l'expression des gènes de résistance aux antibiotiques.

Le présent travail de recherche a été, dès sa naissance, une idée translationnelle :

Dans sa conception, suite à l'interprétation des données immunologiques par un cerveau bactériologique.

Dans sa mise en œuvre, par la codirection entre un immunologiste et une microbiologiste.

Dans son exécution, par le travail synergique d'une doctorante scientifique et d'une doctorante clinicienne.

Dans son écriture, puisque mon parcours est aussi varié que ma curiosité.

Et enfin transdisciplinaire *dans la composition du jury examinateur*.

C'est dû à ce caractère translationnel, que les sujets abordés peuvent paraître éloignés lorsque l'hypothèse motivant ce travail n'est pas gardée à l'esprit. Pourtant, la structure de ce document suit celle de l'hypothèse, que nous avons choisie de séparer en trois grandes parties (**Figure 1**).

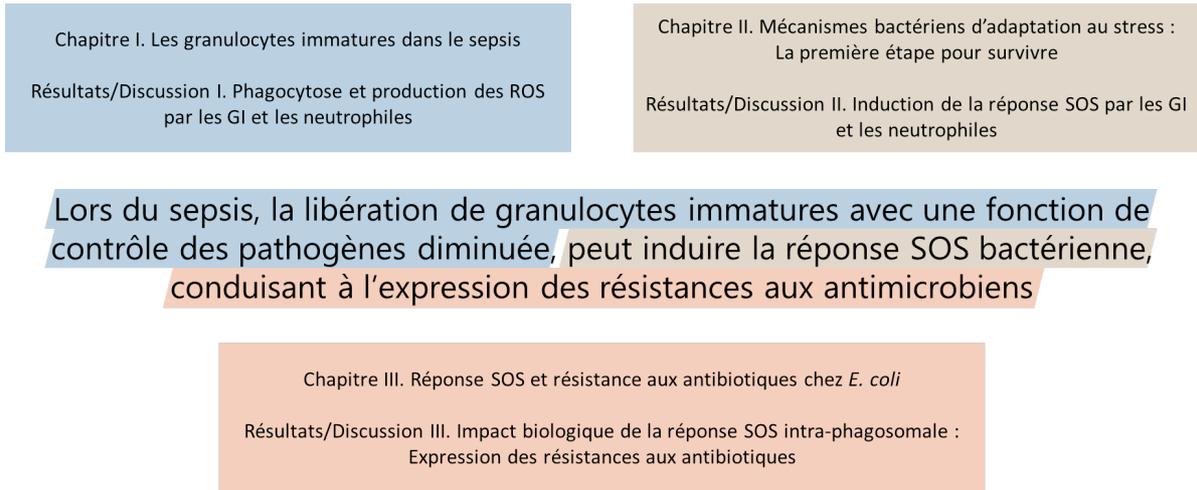


Figure 1. Hypothèse et structure du document

Chapitre I. Les granulocytes immatures dans le sepsis

Malgré la découverte et l'usage généralisé des antibiotiques pour le traitement des maladies infectieuses, les infections bactériennes sont encore la cause de millions de décès dans le monde. À l'heure actuelle, la diminution de la mortalité due au sepsis repose principalement sur le diagnostic rapide, la stabilisation de l'état de choc septique et l'initiation précoce du traitement antibiotique efficace. Les efforts déployés dans la recherche ces dernières années tant sur le plan clinique que sur le plan fondamental, ont eu pour objectifs d'augmenter la vitesse et la précision du diagnostic microbiologique ; d'identifier les facteurs de risque de sévérité et mortalité ; et d'évaluer l'efficacité des traitements complémentaires pour améliorer la survie des patients.

L'identification de la dérégulation immunitaire et sa meilleure compréhension ont permis l'évolution du concept de « sepsis ». Parmi les facteurs d'aggravation - mesurée par la nécessité de suivi dans un service de réanimation, du développement des infections secondaires, et de mortalité à court et moyen terme – l'augmentation des granulocytes immatures dans le sang périphérique a un rôle primordial. Cependant, les détails fonctionnels de cette association ne sont pas complètement connus.

Ce premier chapitre vous présente un résumé de la définition du sepsis et son épidémiologie (page 21), les aspects généraux de son traitement (page 24), la dérégulation immunitaire liée au sepsis (page 26) et plus précisément les altérations connues chez les neutrophiles et les granulocytes immatures (page 38), avec une courte description de leur fonction normale (page 30).

I.1. Le sepsis, définition et impact sur la santé publique

Le sepsis est un syndrome de dysfonction d'organe secondaire à la réponse dérégulée de l'hôte à une infection. Cette entité clinique est responsable d'un risque accru de mortalité, d'environ 10 à 17 %¹⁻³.

Selon la plus récente estimation de l'impact global du sepsis, 48,9 millions de nouveaux cas ont été diagnostiqués en 2017 dans le monde, avec 11 millions de décès associés⁴. L'incidence et la mortalité du sepsis sont plus importantes dans les régions ayant un index sociodémographique plus faible, ainsi que dans certaines populations plus fragiles : population pédiatrique (< 5 ans) et adultes âgés (> 65 ans)^{4,5}.

D'un point de vue physiopathologique, le sepsis est l'état intermédiaire entre l'infection, et le choc septique. Une première étape d'invasion comprend l'entrée, l'établissement et la croissance d'un micro-organisme pathogène, souvent bactérien, dans un tissu. **L'infection** fait référence à l'ensemble des étapes d'invasion tissulaire, de la réponse inflammatoire de l'hôte, et des dommages locaux secondaires^{6,7}.

Bien que la résolution soit souvent contenue grâce au système immunitaire, l'infection se complique dans 39 % des cas par une réponse immunitaire dérégulée, avec des stades d'immunosuppression et d'hyperinflammation^{8,9}. Cette étape est connue actuellement comme le **Sepsis**^{3,10}. Dans le monde, les infections pulmonaires, abdominales, urinaires et les bactériémies représentent 80 % des causes de sepsis^{11,12}. En France, les points d'appel infectieux les plus fréquemment responsables d'un sepsis sont les voies urinaires (29 %), respiratoires (28 %), et digestives (17 %) ⁸.

Un état septique soutenu peut induire une vasodilatation et des perturbations microcirculatoires, appelé **choc septique**. Un âge supérieur à 50 ans, le sexe masculin, les antécédents de cancer, d'immunodéficience et de défaillance chronique d'organe sont des facteurs de risque de développer un choc septique ^{2,11,12}. Enfin, un choc septique non résolu peut, par un mécanisme pas encore totalement élucidé, entraîner des lésions cellulaires et une défaillance multiorganes, conduisant au décès ^{10,13}. La défaillance d'organes secondaire au sepsis concerne les fonctions rénales (51 %), hépatiques (30 %), hématologiques (20 %), neurologiques (24 %), et cardiovasculaires (20 %) ^{8,11}.

Le diagnostic du sepsis a substantiellement évolué lors des trente dernières années. Précédemment le sepsis était défini comme un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS) à l'infection ¹⁴. Dans ce cadre, l'apparition d'une dysfonction d'organe changeait la classification en « sepsis sévère ». En 2016, l'actualisation de la définition a été accompagnée par l'inclusion du score SOFA (de l'anglais *Sequential Organ Failure Assessment* ou évaluation séquentielle de la défaillance d'organes) (**Tableau 1**), et sa version simplifiée « *quick SOFA* » (qSOFA) (**Tableau 2**) (**Figure 2**). Cette nouvelle définition est le résultat d'une meilleure compréhension des altérations immunitaires et non immunitaires qui impactent le pronostic vital des patients septiques. L'objectif principal de cette actualisation est de faciliter l'identification précoce des patients les plus à risque pour initier des interventions spécifiques plus rapidement ³.

Tableau 1. Score de SOFAAdapté de ³.

Système	Score				
	0	1	2	3	4
Respiratoire	Besoin d'assistance respiratoire				
PaO ₂ /FiO ₂	>400	<400	<300	<200	<100
Coagulation					
Plaquettes (x10 ³ /µL)	>150	<150	<100	<50	<20
Hépatique					
Bilirubine (mg/dL)	<1.2	1.2 - 1.9	2.0 - 5.9	6.0 - 11.9	>12.0
µmol/L)	<20	20 - 32	33 - 101	102 - 204	>204
Cardiovasculaire	Besoin de support vasoactif (µg/kg/min, pendant >1 heure)				
	PAM >70 mmHg	PAM <70mmHg	Dopamine <5 dobutamine (toute dose)	Dopamine 5.1 - 15 épinephrine <0.1 norépinephrine <0.1	Dopamine >15 épinephrine >0.1 norépinephrine >0.1
Neurologique					
GCS	15	13 - 14	10 - 12	6 - 9	<6
Rénale					
Créatinine (mg/dL)	<1.2	1.2 - 1.9	2.0 - 3.4	3.5 - 4.9	>5.0
µmol/L)	<110	110 - 170	171 - 299	300 - 440	>440
Diurèse (mL/jour)				<500	<200

PaO₂ : Pression partielle d'oxygène, FiO₂ : Fraction inspirée d'oxygène, PAM : Pression artérielle moyenne, GCS : (*Glasgow coma score*, échelle de Glasgow)

Tableau 2. Score de qSOFAAdapté de ³.

Critère	Score
Fréquence respiratoire >22 respirations/min	1
Altération de la conscience (GCS <14)	1
Hypotension artérielle (PAS <100 mmHg)	1

GCS : (*Glasgow coma score*, échelle de Glasgow), PAS : Pression artérielle systolique.

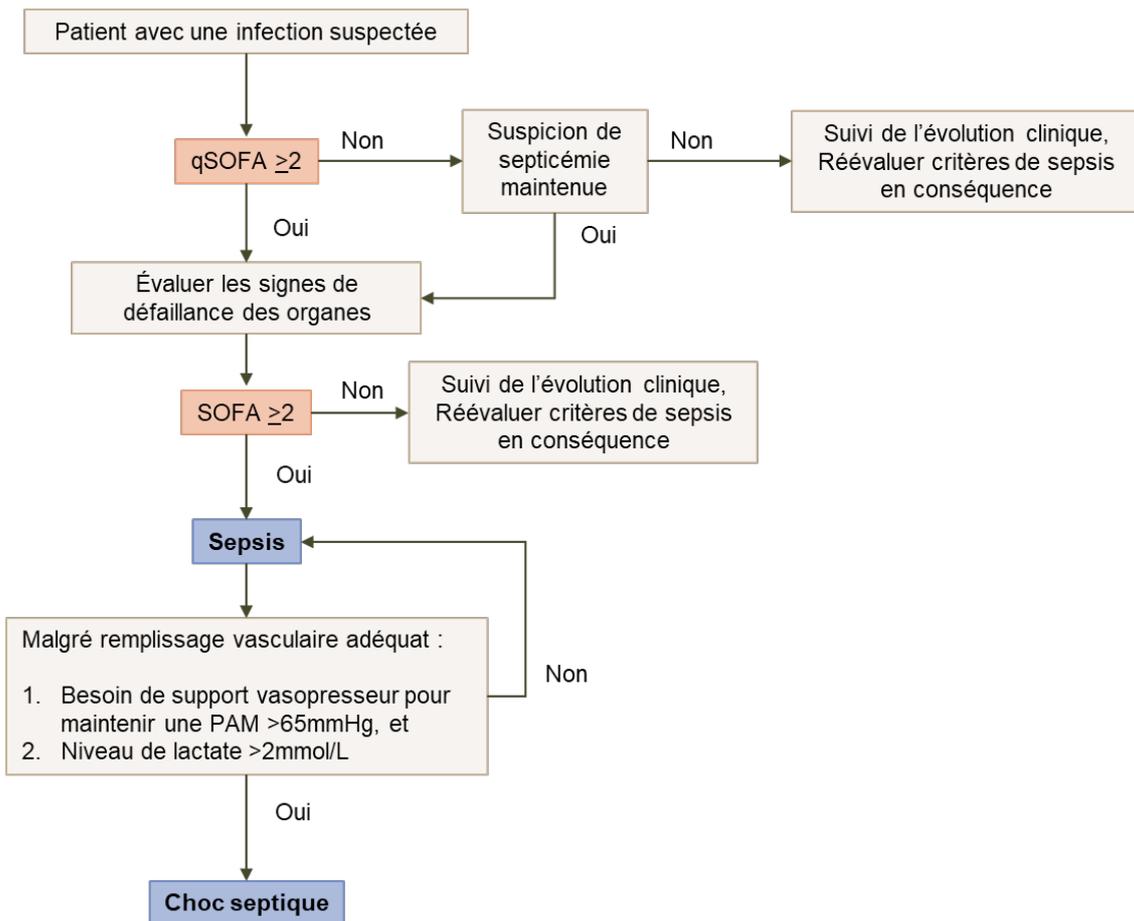


Figure 2. Définition opérationnelle des patients avec un sepsis et un état de choc septique
Adapté de ³.

I.2. Prise en charge et traitement du sepsis

Le sepsis est une urgence médicale. Une prise en charge précoce est déterminante pour limiter la défaillance d'organes et diminuer le risque de mortalité ¹⁵.

La prise en charge efficace commence par l'identification précoce de l'état septique en suivant les critères de diagnostic décrits dans l'algorithme de la **Figure 2**. L'application du score de SOFA sert dans ces cas non seulement à calculer le risque de mortalité du patient, mais aussi à constater la présence d'une défaillance organique et la prendre en charge immédiatement.

L'identification précoce d'un état de choc et une prise en charge optimale par le remplissage vasculaire avec un support vasopresseur si nécessaire, permettent d'assurer la perfusion et diminuer la lésion tissulaire¹⁶. Enfin, le point clé pour contrôler l'infection en cause est l'instauration d'un traitement antibiotique efficace.

Toutes ces interventions ont été résumées dans le « Sepsis *Bundle* », un ensemble d'interventions cliniques à des fins diagnostiques et thérapeutiques qui visent à diminuer la mortalité chez les patients septiques (**Figure 3**). Le *Sepsis bundle* fait partie des recommandations internationales développées à partir de 2002 dans une campagne appelée « *Surviving sepsis* », poursuivant un consensus sur la définition du sepsis et des directives pour son diagnostic et traitement ¹⁷.

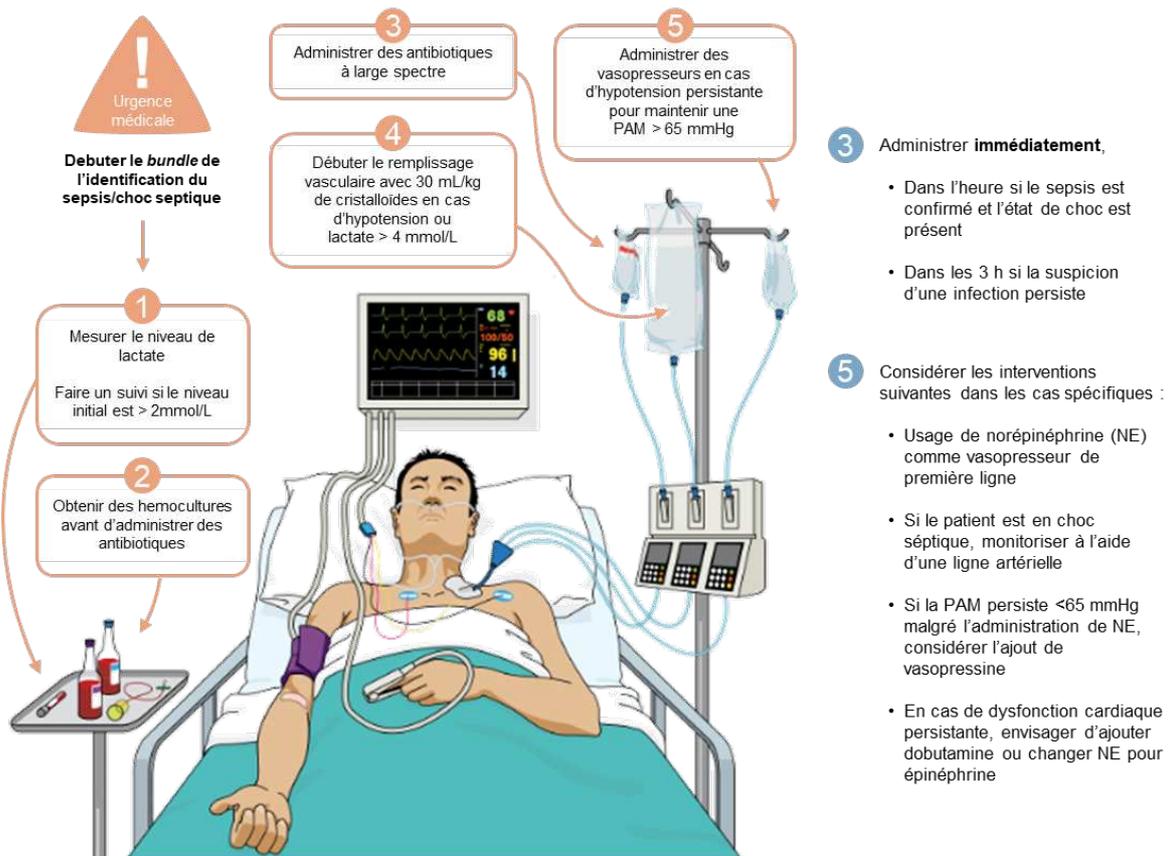


Figure 3. Résumé iconographique du sepsis *bundle*

Adapté de SurvivingSepsis.org et ¹⁸

Selon les dernières actualisations, les interventions du sepsis *bundle* doivent être effectuées dans la première heure après le diagnostic du sepsis ^{18,19}. La décision sur ce délai est basée sur des études démontrant que le délai d'initiation des antibiotiques est inversement proportionnel à la survie chez les patients septiques. Cette association a été magnifiquement illustrée dans l'étude de Kumar et al (**Figure 4**), qui a démontré qu'à partir de six heures après l'initiation du choc septique, chaque heure de retard dans l'instauration d'un traitement antibiotique efficace, était associée à une diminution moyenne de la survie de 7,6 % ²⁰.

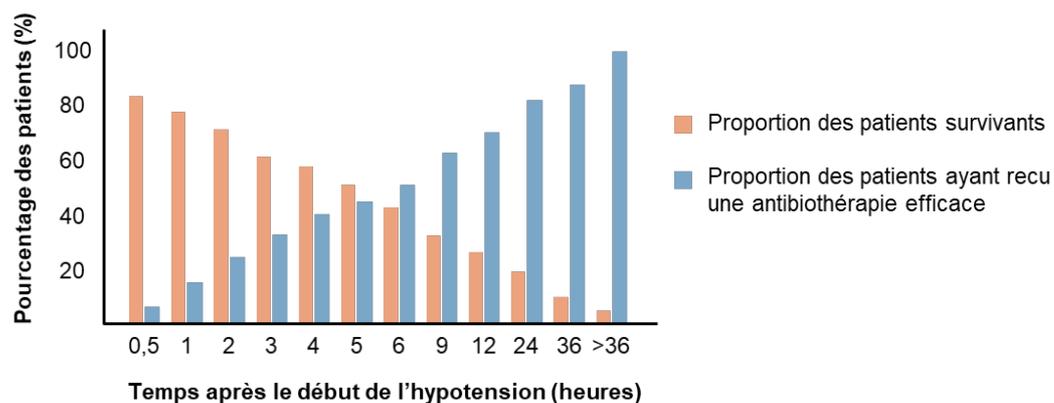


Figure 4. Initiation du traitement antibiotique efficace et survie

Adapté de ²⁰.

I.2.1. Le sepsis bundle et la sélection des résistances aux antibiotiques

Même si le *Sepsis bundle* réunit des recommandations pertinentes, la limitation de la fenêtre d'intervention à 1 heure a été fortement critiquée^{21,22}. En effet, cette remise en question a été premièrement justifiée en raison de résultats non concluants de l'impact de l'initiation précoce du traitement antibiotique sur le risque de mortalité²³.

Deuxièmement, un diagnostic plus rapide n'est pas forcément plus précis. En tant que recommandation internationale, le sepsis *bundle* a été imposé comme une norme dans les services d'urgence. Les critères diagnostiques proposés par le consensus international pour la définition de sepsis et choc septique « Sepsis-3 »³, sont moins performants pour l'identification du sepsis que ceux utilisés précédemment²⁴. Néanmoins, ces derniers avaient une faible spécificité : 43 % des patients traités pour une suspicion de sepsis n'avaient pas d'infection²⁵. La charge de travail croissante dans les services d'urgence s'ajoute à la tendance vers le surdiagnostic et à la pression d'initiation d'un traitement antibiotique à large spectre en moins d'une heure. L'application du sepsis *bundle* dans la réalité facilite un usage non approprié des antibiotiques, un facteur déterminant dans la sélection de bactéries résistantes.

La résistance aux antibiotiques est un problème de santé publique à cause du risque d'échec thérapeutique, conduisant à une augmentation de la mortalité (OR 1,19 ; 95 % CI, 1,03-1,37, $p=0.02$)²⁶. En 2019, 4,95 millions des décès dans le monde ont été associés à l'antibiorésistance, parmi lesquels 1,27 million ont été attribués directement à cette cause. Les organismes les plus fréquemment responsables des décès associés ou attribués à l'antibiorésistance incluent en ordre décroissant : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa*²⁷.

Le risque accru de mortalité justifie, dans la prise en charge précoce du sepsis, l'utilisation empirique d'antibiotiques à large spectre ciblant les espèces bactériennes les plus fréquemment résistantes aux antibiotiques. Toutefois, le ciblage des bactéries résistantes (dans 67 % des cas) est plus fréquent que la prévalence d'infections par ces organismes (26 %)²⁶. Le choix de l'antibiothérapie est complexe : la mortalité est augmentée par un traitement tardif, mais aussi par un traitement précoce non adapté.

C'est précisément la complexité de ce choix, et la persistance d'une mortalité importante en dépit des campagnes extensives d'éducation sur la prise en charge du patient septique, qui motive la recherche continue d'autres facteurs — tels que la réponse immune — et qui influencent l'évolution clinique de ces patients.

I.3. La dérégulation immune innée dans le sepsis

L'idée de dysfonction immune pendant le sepsis et les travaux pour améliorer la connaissance de cette dysfonction ont évolué depuis les années 1980 grâce aux études qui évaluent différentes techniques d'immunothérapie pour améliorer la survie⁹.

La dérégulation immune pendant le sepsis comporte à la fois des phénomènes de réponse inflammatoire exagérée et d'immunosuppression. Deux paradigmes sont proposés pour comprendre la coexistence de ces états :

- La survenue séquentielle d'une phase pro-inflammatoire initiale, suivie par une étape anti-inflammatoire compensatoire qui peut devenir immunosuppressive^{9,28} ;
- L'émergence en parallèle d'états pro-inflammatoires et immunosuppresseurs. La prédominance d'un phénotype clinique pro-inflammatoire ou immunosuppresseur dépend des facteurs de l'hôte (génétique, âge, environnement et facteurs de risque, comorbidités) et de l'agent pathogène (type de pathogène, virulence, charge bactérienne)¹⁰.

Bien que cette dérégulation affecte l'immunité innée et adaptative, nous nous focaliserons uniquement, dans la suite du manuscrit, sur les caractéristiques de la dérégulation immunitaire innée et plus spécifiquement les altérations subies par les granulocytes.

I.3.1. L'état pro-inflammatoire

L'état pro-inflammatoire est essentiel pour lutter contre l'infection, mais peut devenir critique s'il n'est pas régulé. La réponse immune exagérée de l'hôte participe à la lésion tissulaire qui contribue au choc septique et à la dysfonction d'organes (**Figure 5**).

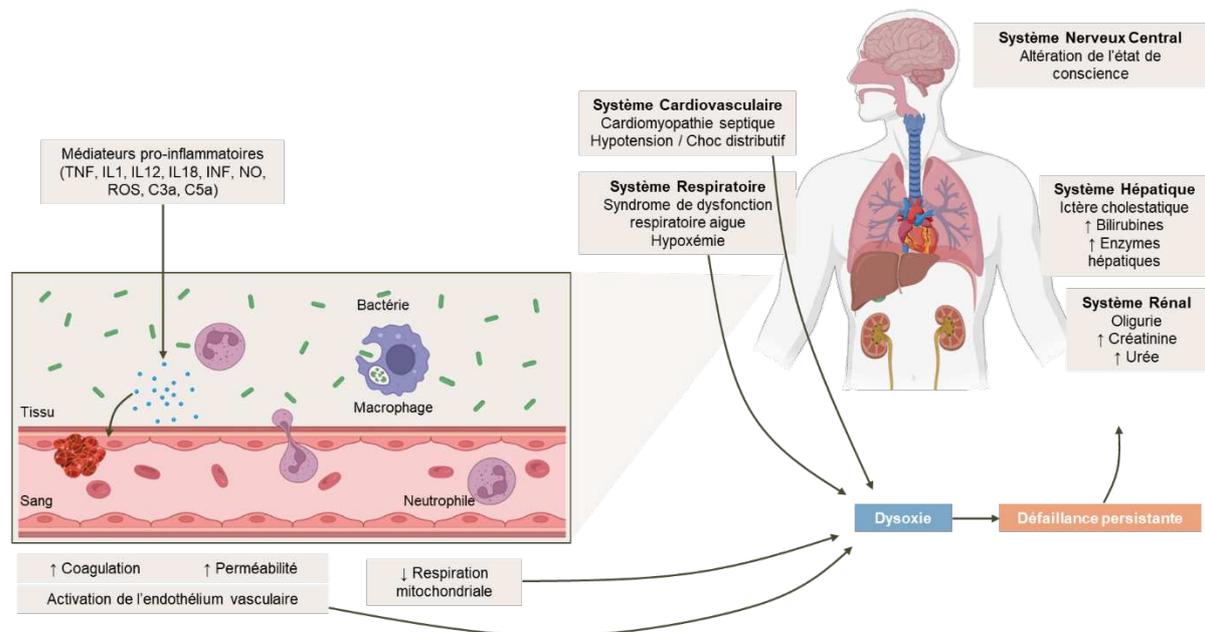


Figure 5. Liens entre l'état pro-inflammatoire et la défaillance organique dans le sepsis
Adapté de^{16,29}

Les médiateurs pro-inflammatoires (cytokines) destinés à attirer les leucocytes (macrophages, monocytes et neutrophiles) vers le tissu infectéⁱ, ont des récepteursⁱⁱ au-delà des cellules immunitaires. L'augmentation de ces cytokines a pourtant des effets sur le métabolisme cellulaire à un niveau systémique entraînant l'inhibition de la respiration mitochondriale. L'activation de l'endothélium, initialement pour faciliter l'extravasation des

ⁱ TNF α , IL1 α , IL1 β , Facteur tissulaire (TF), INF γ , NO et les ROS

ⁱⁱ Phosphoinositide 3-kinase (PI3K), mechanistic target of rapamycin (mTOR), et AMP-activated protein kinase (AMPK)

cellules immunitaires vers le site d'infection, dérive en un état pro-coagulantⁱⁱⁱ et de perte de la fonction de barrière^{iv} 28.

De plus, la libération des protéines lytiques, de NO, TNF α , INF γ , entre autres par les leucocytes activés, cause une perte de l'intégrité des endothéliums. Cette perte de la barrière tissulaire facilite la migration bactérienne systémique et la congestion tissulaire locale.

La perte d'intégralité et l'activation des endothéliums altèrent la perfusion tissulaire 28, tandis que l'effet inhibiteur sur la respiration mitochondriale augmente les demandes d'oxygène tissulaire 30,31. Ces deux événements conjoints participent au déséquilibre entre les besoins métaboliques et les apports du tissu, ce qui conduit à une défaillance organique, même en absence de lyse cellulaire 28,31. Finalement, la défaillance d'organes maintient et augmente l'état de choc, incrémentant le risque de mortalité chez ces patients 9,12.

I.3.2. L'état immunosuppresseur

L'immunosuppression liée au sepsis est un processus complexe secondaire à de multiples facteurs tel que l'apoptose, la régulation cellulaire épigénétique ou transcriptionnelle et la reprogrammation métabolique des cellules de l'immunité innée et adaptative, et la régulation négative du système neurovégétatif. Tous ces facteurs entraînent une diminution des fonctions immunitaires, associées à une augmentation du risque des infections secondaires et de mortalité 9,12. Les mécanismes conduisant à l'immunosuppression dans le sepsis sont multiples et peuvent se regrouper en :

- *Apoptose* : Augmentée dans les lymphocytes T et B et les cellules dendritiques, par une voie intrinsèque (déclenchée par la mitochondrie), et extrinsèque (par l'activation des récepteurs « de mort cellulaire »^v). Des résultats de modèles animaux du sepsis montrent une diminution de l'autophagie comme mécanisme de mort cellulaire, favorisant l'apoptose. Les cellules apoptotiques ont, à leur tour, une activité immunosuppressive 32.
- *Tolérance aux endotoxines* : L'exposition répétée des cellules myéloïdes au LPS (lipopolysaccharide) bactérien entraîne un état de tolérance par un mécanisme de reprogrammation de la réponse immunitaire^{vi}, où la stimulation des récepteurs de reconnaissance des motifs associés aux pathogènes ou aux dommages (*Pattern Recognition Receptors*, PRR), induit une production réduite des cytokines. Le

ⁱⁱⁱ Par la génération de thrombine médié par le TF et la diminution des fonctions anticoagulants (production diminuée d'antithrombine, de la voie inhibitrice du TF et de la protéine C active)

^{iv} La fixation de la thrombine sur les récepteurs PAR1 endothéliaux contribue à l'altération du cytosquelette et la contraction cellulaire, la déstabilisation des contacts entre cellules et l'augmentation de la perméabilité vasculaire. La libération de NO par l'activation de la synthèse d'oxyde nitrique inductible (iNOS) chez les neutrophiles et monocytes contribue également à l'augmentation de la perméabilité vasculaire par un phénomène de vasodilatation.

^v Par la voie PDL1-PD1 qui affecte principalement les lymphocytes, mais aussi par le Fas ligand, le TNF et les glucocorticoïdes)

^{vi} Caractérisée par la diminution de l'expression des gènes codants pour des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires comme le TNF et IL-12, ou pour des seconds messagers intracellulaires telles que des protéines de phosphorylation et des facteurs de transcription comme le NF κ B

développement d'un phénotype « tolérant » peut être expliqué par un mécanisme de régulation épigénétique (par la modification des histones)³³⁻³⁶.

- *Expression des cytokines anti-inflammatoires* : Une augmentation de l'expression des cytokines anti-inflammatoires telles que les cytokines IL10, facteur de croissance transformant B (ou TGF β), IFN α , IL4, IL6 et IL13³⁷.
- *Reprogrammation métabolique* : La prolifération rapide des lymphocytes et monocytes est associée à une reprogrammation métabolique de l'utilisation de glucose vers des voies de glycolyse cytosoliques, plus accessibles mais moins performantes que la phosphorylation oxydative pour la production d'ATP, même en conditions de normoxie. Ces altérations ont été associées à une activité dysfonctionnelle de mTOR qui conduit à une diminution de l'expression des cytokines³⁸⁻⁴⁰
- *Régulation du système nerveux central* : le système nerveux central a un effet régulateur négatif sur la réponse immune par innervation adrénergique ou cholinergique directement sur les organes lymphoïdes, ou par voie systémique à travers de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, par la sécrétion des glucocorticoïdes^{41,42}.

De multiples études ont montré une association clinique entre l'immunosuppression — mesurée par des indicateurs comme la diminution de l'expression du récepteur HLA-DR par les monocytes, l'augmentation de l'expression de PDL1 par des sous-populations granulocytaires et l'apparition des sous-types cellulaires avec des fonctions immunosuppressives (myeloid-derived suppressor cells, MDSC, ou les granulocytes immatures GI), la diminution du nombre de lymphocytes et de cellules dendritiques — et les critères de pronostic aggravé comme l'admission en réanimation, le développement d'une infection nosocomiale secondaire, ou encore le décès^{9,12}.

Parmi les altérations de l'immunité innée (**Figure 6**), pour l'intérêt de ce travail, nous allons détailler les altérations démontrées chez les neutrophiles et ses formes immatures libérées dans le sang périphérique chez les sujets plus à risque d'une infection sévère (page 38). Pour faciliter la compréhension de ces altérations, une courte description des neutrophiles, de leur différenciation et de leurs fonctions de contrôle des pathogènes est développée ci-après.

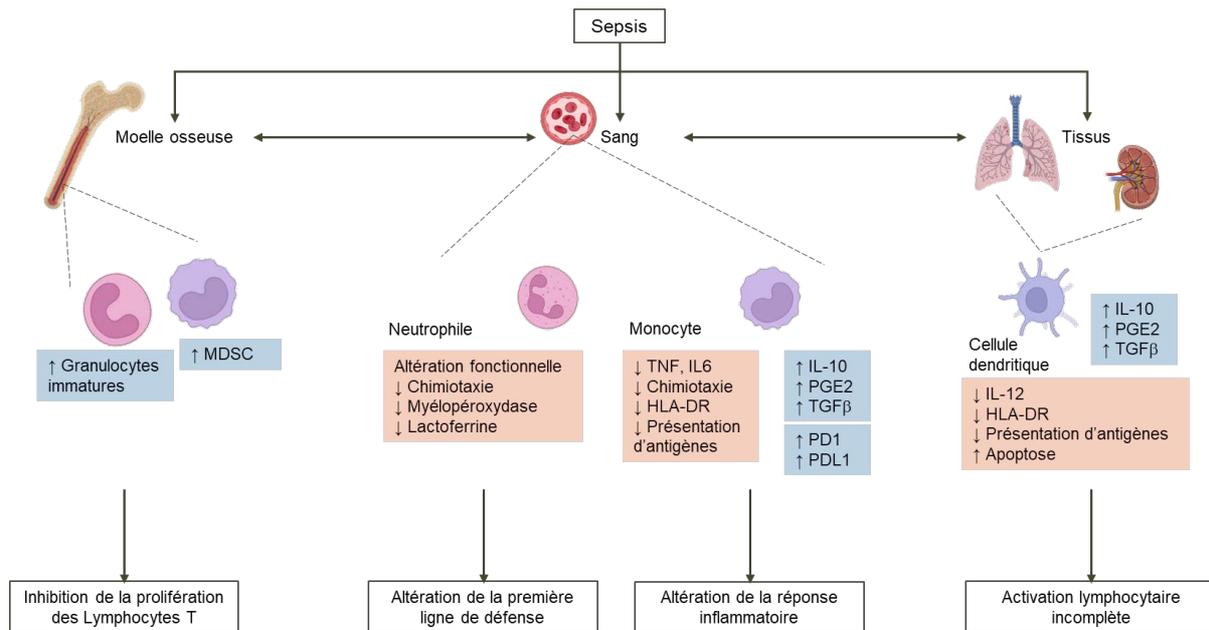


Figure 6. Altérations de la réponse immune innée

Adapté de ⁹

I.4. Les neutrophiles dans la réponse inflammatoire normale

Les neutrophiles sont un type de leucocyte polynucléaire ou granulocyte^{vii}. Ce sont les composants les plus nombreux de la réponse immune innée. Avec les macrophages, les neutrophiles représentent la première ligne de défense contre de multiples micro-organismes. Leur fonction principale est la phagocytose et l'activation des mécanismes bactéricides au site d'infection ^{6,7}.

Compte tenu de leur courte demi-vie (de seulement 24-48 heures) dans la circulation périphérique, leur nombre est maintenu grâce à une production constante à partir de la différenciation des précurseurs myélopoïétiques⁴³. La myélopoïèse (production des monocytes et granulocytes) occupe deux tiers de l'activité de la moëlle osseuse (**Figure 7**). Les granulocytes sont produits en continu à l'état basal chez un adulte sain à un taux de 1 à 2×10^{11} cellules par jour ⁴⁴.

^{vii} Noms descriptifs données par la forme du noyau et la présence des granules dans leur cytoplasme, respectivement. Les autres types de granulocytes sont les éosinophiles et les basophiles.

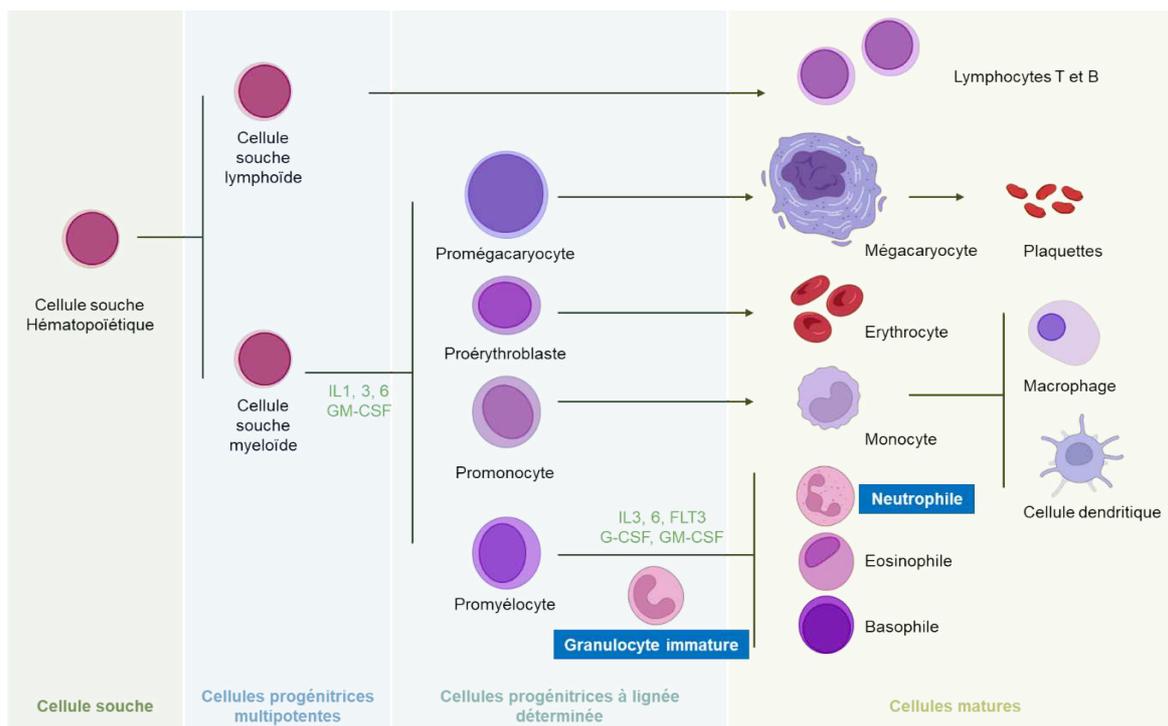


Figure 7. Le système hématopoïétique

Adapté de ^{43,44}. Cellules dérivées de la lignée hématopoïétique. En vert, les cytokines inductrices de la différenciation vers les promyélocytes et neutrophiles. Le terme « Granulocyte Immature » couvre les cellules avec un noyau « en bande » qui peuvent se trouver dans la circulation périphérique et qui ont un niveau intermédiaire de différenciation entre le promyélocyte et les neutrophile/éosinophile/basophile. IL : interleukine, GM-CSF : facteur stimulant de la formation de colonies granulocyte-macrophage (*Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*), G-CSF : facteur stimulant de la formation de colonies granulocytaires (*Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*), FLT3 : Ligand de type FMS tyrosine kinase (*FMS-like tyrosine kinase 3 ligand*).

Le système hématopoïétique est capable d'adapter son taux de division et de différenciation en réponse aux besoins externes et en fonction du type cellulaire requis (hémorragies, infections, etc.)⁴³. La production et la libération des granulocytes à l'état basal et pendant l'infection sont provoquées par le facteur stimulant de la formation de colonies granulocytaires (G-CSF)^{43,44}.

Une fois que les granulocytes immatures atteignent le phénotype mature de neutrophile^{viii}, ils sont libérés dans le sang périphérique où ils circulent à l'état inactif ou dormant^{43,44}. Lors d'une infection, ils sont capables de suivre un gradient de stimuli chimiotactiques (chimiotaxie)⁴⁵, d'interagir et adhérer sur les cellules endothéliales, pour finalement migrer vers le tissu où ils seront activés pour combattre les microorganismes⁴⁴.

^{viii} Au cours de leur maturation, les granulocytes expriment i) des récepteurs de membrane qui facilitent leur sortie de la moëlle osseuse (G-CSFR, CXCR2), ii) des récepteurs qui interviennent dans la reconnaissance des pathogènes (TLR4, CD16), mais aussi diminuent l'expression des récepteurs qui les séquestrent dans la moëlle osseuse (CXCR4). La maturation est également caractérisée par l'apparition séquentielle des différents types des granules cytoplasmiques. Dans l'ordre d'apparition : les granules azurophiles (contenant la plupart des enzymes lytiques et la myelopéroxydase), les granules spécifiques, de gélatinase et de sécrétion.

Les neutrophiles exercent leur fonction bactéricide principalement par la phagocytose, la production des espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*, ROS), et la formation des pièges extracellulaires (*Neutrophil Extracellular Traps*, NETs).

I.4.1. Phagocytose

La phagocytose est le processus cellulaire d'internalisation d'une particule en réponse à l'activation d'un récepteur ⁴⁶. Quand le granulocyte reconnaît une particule pour être ingérée, la restructuration des filaments d'actine du cytosquelette permet l'invagination de la membrane plasmique, l'extension et la fusion des pseudopodes autour d'elle, finissant par la formation d'un phagosome précoce dans le corps cellulaire ^{6,46,47}.

La phagocytose est un évènement très rapide qui peut prendre seulement 45 secondes ⁴⁷. Cependant, elle peut être séparée en sept étapes ⁴⁶ (**Figure 8**) :

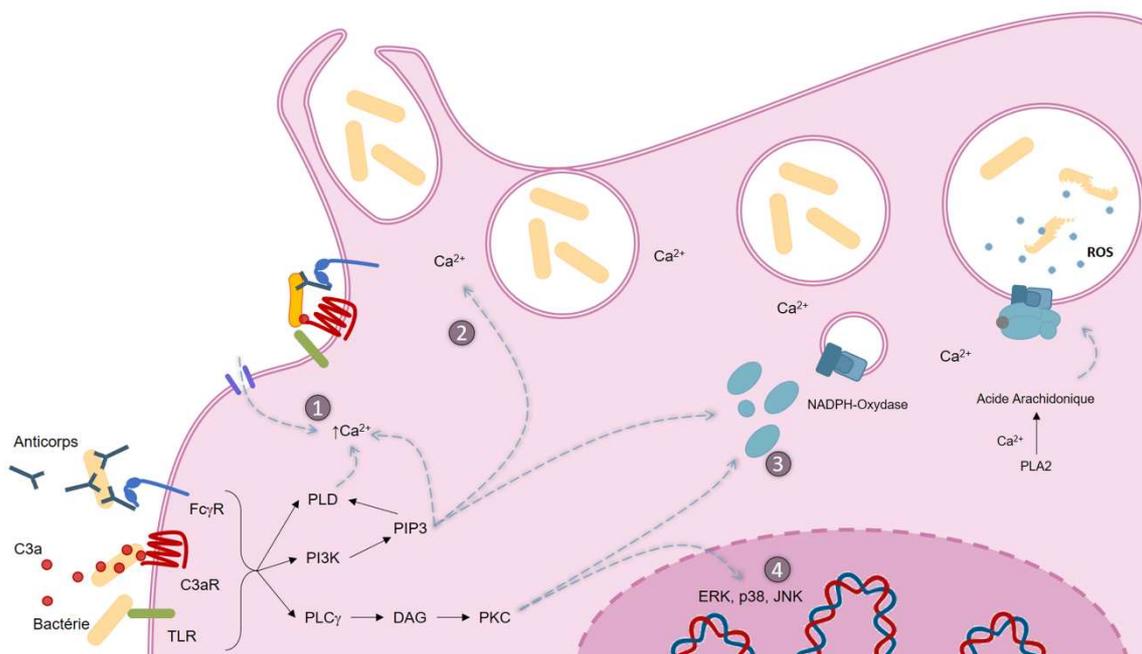


Figure 8. Étapes de la phagocytose

Adapté de ^{6,46-48}. Schéma du processus de phagocytose par un granulocyte. De la gauche vers la droite : les phagocytes identifient les pathogènes par la reconnaissance des ligands de surface ou des molécules de la réponse immunitaire humorale (C3a du complément ou des anticorps). L'attachement au pathogène facilite sa capture et sert également d'évènement déclencheur des voies de signalisation intracellulaires qui agissent à différents niveaux sur l'activation granulocytaire : 1) par l'augmentation du calcium dans le cytoplasme, soit par sa captation du milieu extracellulaire ou sa libération des dépôts intracellulaires. Le calcium est nécessaire pour la correcte activation des voies de signalisation intracellulaires, mais aussi pour aider la dépolarisation de l'actine et l'activation du complexe NADPH-oxydase ; 2) par l'interaction directe avec les filaments d'actine, qui permet la formation des pseudopodes, l'endocytose, la mobilisation et la fusion des vésicules vers le phagosome mature ; 3) par l'induction de l'assemblage du complexe NADPH-oxydase sur la membrane du phagosome et son activation et ; 4) par l'activation des facteurs de transcription qui augmentent l'expression des médiateurs pro-inflammatoires et des lysozymes.

- *Reconnaissance* : Les neutrophiles, comme les macrophages, reconnaissent les pathogènes par leurs récepteurs de surface, capables de distinguer les molécules de surface des pathogènes de celles de l'hôte. Ces récepteurs comprennent ; les récepteurs de reconnaissance des motifs associés aux pathogènes ou aux dommages (*Pattern Recognition Receptors*, PRR)^{ix} ; ou les récepteurs du complément et des immunoglobulines, capables de reconnaître des organismes opsonisés par le C3a ou la portion Fc des anticorps, respectivement.
- *Attachement* : cette étape fait référence à la stabilisation de l'interaction entre les récepteurs de la membrane cellulaire et leurs ligands sur le pathogène. Cette stabilisation permet de tenir fermement la particule à la surface du granulocyte.
- *Signalisation* : les récepteurs cellulaires du granulocyte attachés à la particule infectante activent leurs cascades de signalisation.
- *Formation de la « coupe » de phagocytose* : les premières cascades de signalisation activent la formation d'une coupe de phagocytose autour de la particule pour la capturer. L'interaction d'une surface membranaire plus importante avec le pathogène facilite aussi l'activation de plus de récepteurs granulocytaires, augmentant ainsi l'activation cellulaire.
- *Extension des pseudopodes* : une deuxième vague de signaux intracellulaires stimule le remodelage du cytosquelette d'actine pour former des pseudopodes. Ces pseudopodes permettent d'agrandir la coupe de phagocytose.
- *Fusion des pseudopodes* : les pseudopodes formés entrent en contact à l'opposé de la coupe de phagocytose et fusionnent. La particule contenue est alors attrapée dans le granulocyte.
- *Formation du phagosome* : Après la fusion des pseudopodes, les membranes les plus externes forment la membrane cellulaire, pendant que leurs membranes internes forment la membrane phagocytaire.

I.4.1.1. Maturation du phagosome

Le phagosome en soi est capable de contenir les pathogènes et de prévenir leur prolifération d'une façon indépendante de la production des ROS⁴⁹. Cependant, l'activité bactéricide dépend de la maturation du phagosome, processus qui débute par le changement de la composition lipidique et protéique de la membrane phagocytaire ; l'assemblage des sous-unités du complexe NADPH-oxydase sur la membrane ; et la fusion des granules contenant des enzymes oxydantes et lytiques pour former les phagolysosomes^{46,47,50}. Après la digestion des éléments internalisés, dans certains phagocytes, les composants de la membrane phagolysosomale peuvent être recyclés vers la membrane cellulaire.

Dans le phagolysosome, les phagocytes utilisent de nombreux mécanismes pour détruire les pathogènes : acidification du phagosome, production des ROS, et production des enzymes

^{ix} Parmi les PRR, les plus populaires sont les récepteurs Toll (*Toll Like Receptors*, TLR). Le TLR-4, en association avec le CD14 reconnaît le lipopolysaccharide bactérien (LPS), composant de la paroi des bactéries à Gram négatif, mais est aussi impliqué dans la reconnaissance du virus respiratoire syncytial. Le TLR-2 identifie les protéoglycanes des bactéries à Gram positif.

lytiques^{45,51}. Une augmentation du pH (8.5-9) est initialement nécessaire pour activer les protéases granulaires et est possible grâce à la transformation de l'O₂⁻ produit par la NADPH-oxydase, en H₂O₂ (peroxyde d'hydrogène). La diminution progressive de la production des ROS et la fusion des granules portant des canaux Na⁺/H⁺, permettent l'acidification secondaire du phagolysosome (**Figure 9**)⁴⁵.

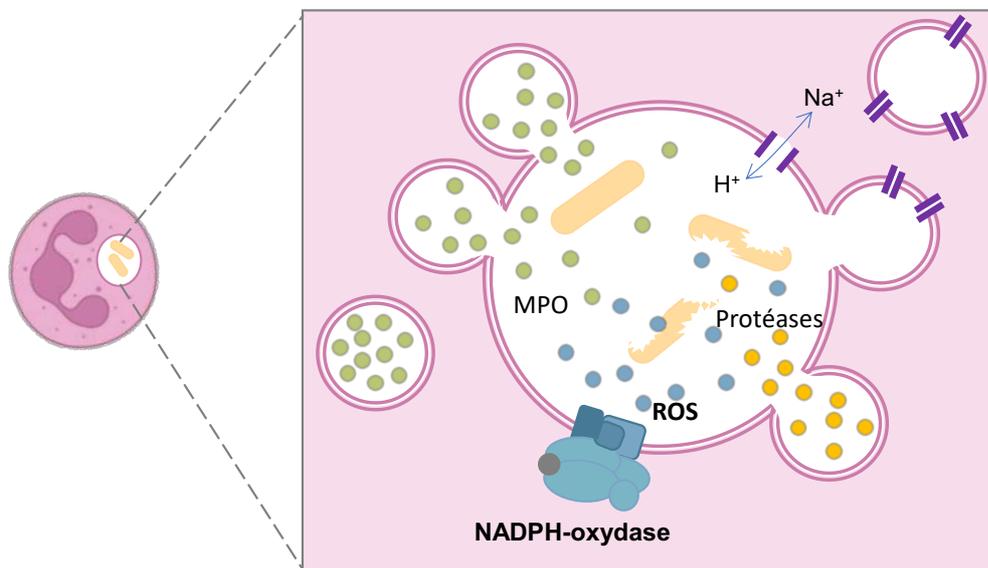


Figure 9. Maturation du phagosome

Adapté de ^{45,51}. Le phagosome contenant les bactéries internalisées avec le complexe NADPH oxydase atteint sa maturation grâce à la fusion des granules azurophiles et spécifiques (en vert, contenant des enzymes lysosomales, myéloperoxydase, élastase et lactoferrine), granules de gélatinase (en jaune, contenant des protéases) et des vésicules de sécrétion (en blanc, portant des protéines de membrane)

L'importance relative de chaque étape (acidification, ROS, enzymes lytiques) varie selon le pathogène et la cellule phagocytaire. À la différence des phagosomes macrophagiques, qui sont beaucoup plus acides, les phagosomes granulocytaires maintiennent un pH alcalin (7.5-8.5) lorsque la NADPH-oxydase est active, et sont hautement spécialisés dans la production des ROS⁵².

I.4.1.1.1. Production des espèces réactives de l'oxygène

Une des particularités des neutrophiles est leur production importante de ROS. En général, les ROS sont des métabolites secondaires des différentes réactions de la chaîne respiratoire des organismes aérobies. Cependant, les cellules phagocytaires expriment un complexe enzymatique, la NADPH-oxydase, qui a pour objectif de produire rapidement une grande quantité de ROS, principalement dans le phagosome. Pour fournir une telle quantité de ROS, les neutrophiles augmentent subitement leur consommation d'oxygène, ce qui cause une activation métabolique cent fois supérieure à leur activité basale, en moins d'une minute. C'est pour cette raison que cette étape est nommée « oxydative burst » (ou « explosion oxydative »)^{51,53}.

I.4.1.1.1.1. La NADPH-oxydase

La NADPH-oxydase est un complexe enzymatique qui utilise une chaîne de transport d'électrons pour réduire l'oxygène moléculaire en anion superoxyde (O_2^-). Ce complexe est composé de sous-unités catalytiques membranaires et régulatrices cytoplasmiques. Deux sous-unités membranaires (gp91^{phox} ou NOX2, et p22^{phox}) forment le cytochrome hétérodimérique de type b, cytb558. Lorsque le neutrophile est activé, les sous-unités cytoplasmiques (p47, p40 et p67^{phox}) sont phosphorylées et se déplacent vers la membrane pour s'associer au cytb558, en compagnie d'une rac GTPase. Ce changement conformationnel active la NADPH-oxydase, capable de capter le NADPH comme donneur d'électrons et de les transporter à travers la membrane vers l'oxygène moléculaire non cytoplasmique dans un événement dépendant de FAD et de l'unité gp91^{phox} (**Figure 10**)^{51,53,54}. Compte tenu de ce flux unidirectionnel d'électrons vers l'espace extracellulaire ou l'intérieur des phagosomes, l'activation des canaux des protons voltage-dépendants est nécessaire pour éviter la dépolarisation de la membrane et le blocage de son activité⁴⁷.

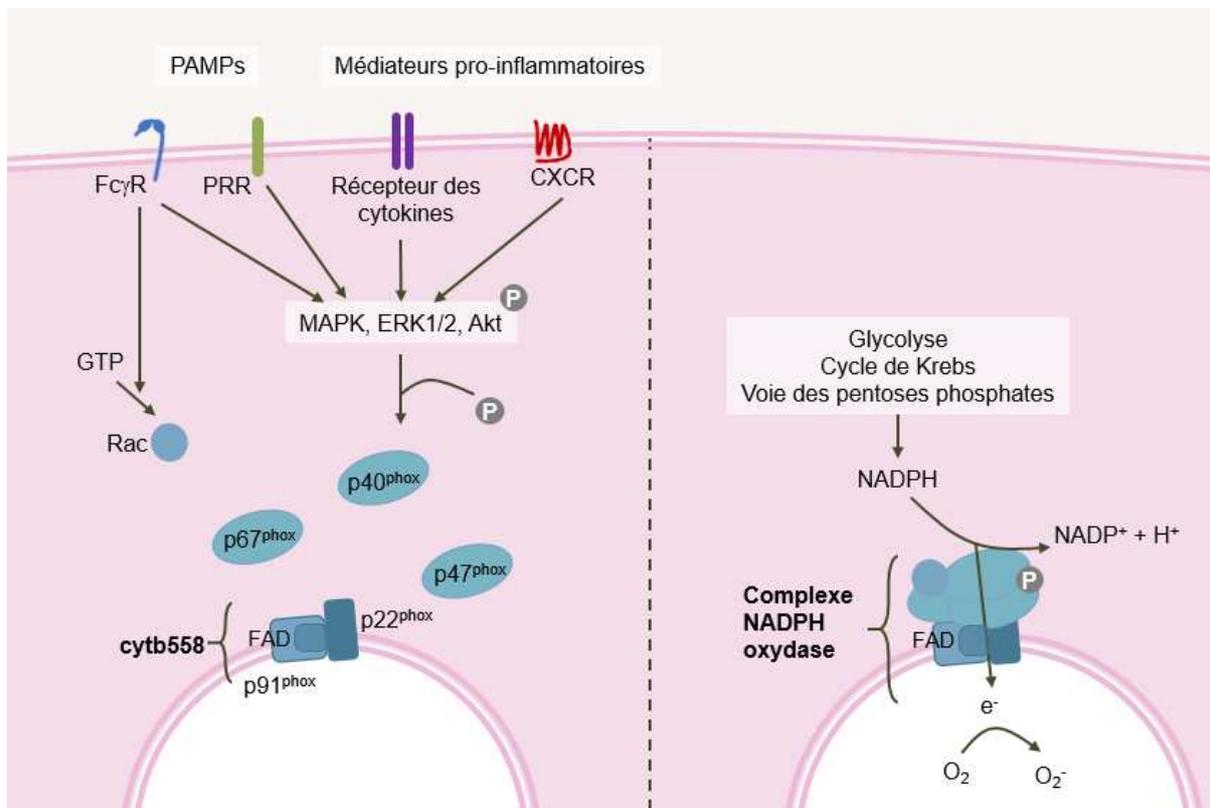


Figure 10. Assemblage du complexe NADPH-oxydase actif

Adapté de^{47,53,55}

I.4.1.1.1.2. Régulation de l'activation du « *burst oxydatif* »

Le burst oxydatif est un événement déclenché, potentialisé et contrôlé en réponse à l'infection. En effet, il est **déclenché** par les voies de signalisation responsables de la polymérisation du complexe NADPH-oxydase, qui sont activées par reconnaissance directe de l'agent pathogène (via les récepteurs TLR) ou des molécules opsonisantes (anticorps ou cascade du complément). Secondairement, cette explosion est **potentialisée** par la réponse inflammatoire puisque l'activité du complexe peut être augmentée par un phénomène de

« priming » ou activation en réponse aux cytokines pro-inflammatoires. Finalement, l'activité de ce complexe enzymatique est **contrôlée**, étant donné que la NADPH-oxydase est inactive à l'état basal grâce à la séparation de ses sous-unités cytoplasmiques et membranaires. L'enzyme est activée par l'assemblage des sous-unités en réponse aux stimuli activant les voies de signalisation décrites précédemment (**Figure 10**). La NADPH-oxydase peut être assemblée sur la membrane phagocytaire pour produire des ROS à l'intérieur du phagosome, ou sur la membrane plasmique, ce qui permet le relargage des ROS vers le milieu extracellulaire^{47,53,55}. L'assemblage différentiel de la NADPH-oxydase sur la membrane phagocytaire ou extracellulaire semble sélectif en fonction de la taille, de la forme et de l'orientation de l'agent pathogène rencontré, de la possibilité des neutrophiles de le phagocyter⁵⁶, et des voies de signalisation activées^{53,57}.

Certes, les ROS ont un rôle antimicrobien direct en tant qu'agents oxydants, mais leur production dans le phagosome précoce fournit également les conditions ioniques et le pH optimal pour activer les sérines protéases responsables de la digestion des pathogènes. Lorsque les ROS sont produits en plus petite quantité, ils agissent comme molécules de signalisation intracellulaire et jouent un rôle dans la formation des NET, et la régulation de l'inflammation^{51,53,58}.

I.4.1.1.1.3. Les espèces réactives de l'oxygène

L' O_2^- est un ROS instable, sa courte demi-vie et son caractère hydrophile le rendent peu efficace comme agent antimicrobien. L'action d'autres enzymes comme la superoxyde dismutase (SOD) ou la myéloperoxydase (MPO), permet leur transformation vers des ROS plus stables et non chargés, avec une activité antimicrobienne plus importante (**Figure 11**)^{47,54}. Bien que l'activation du complexe et la demi-vie des ROS soient relativement rapides, la NADPH-oxydase peut rester active pendant plus de 30 minutes, ce qui assure la disponibilité des ROS pour la dégradation des pathogènes⁵¹.

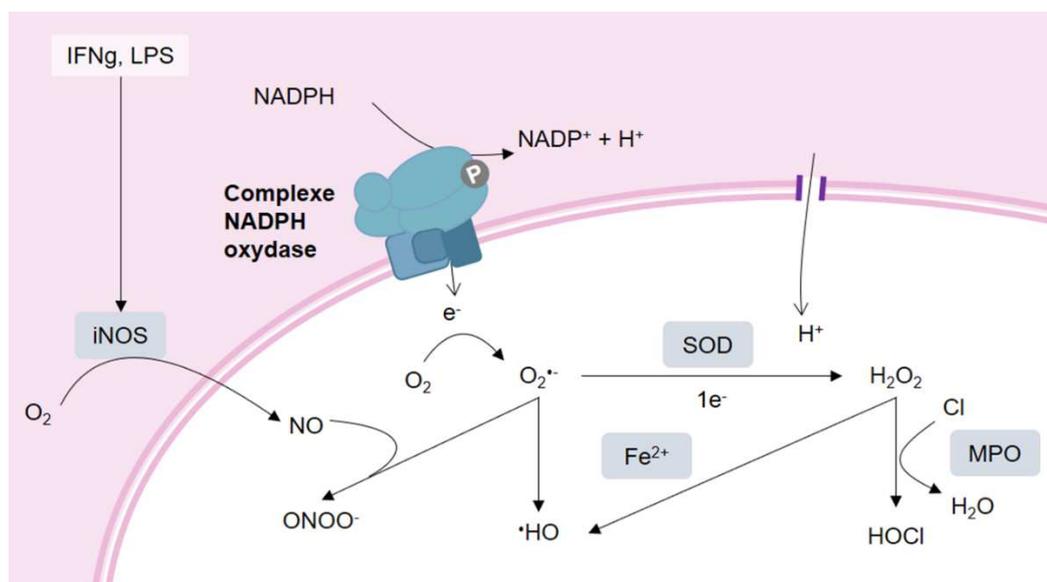


Figure 11. Cascade de production des ROS dans le phagosome

Adapté de ^{47,52,54}. L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) est produit par le complexe NADPH-oxydase à partir de la réduction de l'oxygène moléculaire (O_2) en utilisant un électron donné par le NADPH. Le superoxyde est rapidement transformé en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par les Superoxyde Dismutases (SOD) 1

et 2 ou en radical hydroxyl (*HO) par une réaction de Haber-Weiss catalysé par le fer (Fe²⁺) (Réaction de Fenton). Le pouvoir oxydant du peroxyde d'hydrogène vient aussi de sa transformation en radical hydroxyl (*HO) par une réaction de Fenton. La myéloperoxydase (MPO), enzyme importante des granules azurophiles transforme le peroxyde d'hydrogène en acide hypochlorique. La production d'anion superoxyde peut aussi dériver en la formation des espèces réactives du nitrogène à partir de son interaction avec l'oxyde nitrique, produit par la synthase d'oxyde nitrique inductible (iNOS), activé par la reconnaissance de l'IFN γ ou des molécules associées aux pathogènes (*Pathogen Associated Molecular Patterns*, PAMPs) comme le LPS.

Même si le rôle des ROS comme agents bactéricides isolés des autres fonctions granulocytaires est un sujet de débat⁵⁹⁻⁶¹, il est indéniable que leur production est nécessaire pour parvenir à éliminer les pathogènes, compte tenu du phénotype clinique des patients atteints d'une « Granulomatose Chronique Familiale » (*Chronic granulomatose disease*, CGD).

En effet, cette CGD est une immunodéficiência primaire qui touche un cas sur 250 000 nouveau-nés en Europe et est causée par l'altération fonctionnelle du complexe NADPH-oxydase, secondaire à la mutation d'une des 5 sous-unités du complexe^{x62}. Les granulocytes conservent leur capacité de phagocytose, mais ils ne sont pas en mesure d'éradiquer les microorganismes intracellulaires. L'hôte essaie de lutter contre l'infection en mobilisant davantage de macrophages déficients et de lymphocytes, ce qui entraîne une accumulation de cellules autour des microbes, dénommée granulome⁶. Les patients font fréquemment des infections fongiques invasives ou à bactéries productrices de catalase qui affectent les poumons, la peau, les ganglions lymphatiques et le foie. La prise en charge conventionnelle inclue l'utilisation chronique des antibiotiques et antifongiques en prophylaxie, mais le seul traitement curatif est la transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques⁶².

I.4.2. Formation des pièges extracellulaires (NETose)

Les « pièges extracellulaires des neutrophiles » (*Neutrophil extracellular Traps*, NETs) sont un dernier mécanisme de contrôle des pathogènes. Ils consistent en la libération active d'un mélange de la chromatine cellulaire et des enzymes contenues dans les granules des polynucléaires (élastase, MPO, lactoferrine, gélatinase B)⁴⁵.

Leur fonction principale consiste à piéger et limiter la propagation de l'infection, essentiellement par des liaisons ioniques^{xi}. Cependant leur activité antibactérienne est débattue^{45,55}.

La formation des NETs est provoquée par des médiateurs pro-inflammatoires comme l'IL-8, le TNF α et le LPS. La NADPH-oxydase et la MPO interviennent dans la régulation

^x Deux tiers des cas de CGD sont secondaires à la mutation de *cybb*, gène codant la sous-unité membranaire gp91^{phox}, localisé dans le chromosome X. Dans 20% des cas restants, la mutation est localisée dans le gène *ncf1* (p47^{phox}), et 5% *ncf4* (p40^{phox}), avec une transmission autosomique récessive.

^{xi} Les protéines de surface bactériennes étant chargées positivement et l'ADN relargué étant chargé négativement

intracellulaire, à travers la production de H₂O₂ et de HOCl. D'ailleurs, les patients atteints de CGD ne peuvent pas activer la formation des NETs^{44,45}.

La définition de NETose est associée à une voie de mort cellulaire alternative à l'apoptose et la nécrose⁵⁵. Curieusement, les neutrophiles ayant effectué une NETose peuvent parfois continuer à phagocyter même sous forme de cellule « anucléée »⁴⁵.

I.5. Neutrophiles, Granulocytes Immatures et sévérité clinique chez les patients septiques

La dérégulation immunitaire liée au sepsis s'exprime chez les neutrophiles par une augmentation en nombre avec une activation exagérée pendant la phase pro-inflammatoire, provoquant des lésions tissulaires secondaires. Elle entraîne également une diminution de leur efficacité antimicrobienne et une activité immunosuppressive sur d'autres cellules de l'immunité innée et adaptative.

Parmi les altérations hyperinflammatoires retrouvées chez les neutrophiles, leur accumulation sur les « lits » vasculaires facilite leur activation avant la migration endothéliale. Cela conduit à la libération prématurée des ROS, des enzymes lytiques granulaires et à la NETose^{44,45}. Cette activation délocalisée du site de l'infection entraîne une perte de la barrière endothéliale, contribue à la lésion des organes et à l'augmentation du risque de mortalité dans le sepsis⁴⁵. Ces lésions tissulaires dérivent en un cercle vicieux pro-inflammatoire : la lyse cellulaire libère des molécules associées aux dommages (*Damage associated molecular patterns*, DAMP), qui sont reconnues par les PRR induisant l'activation et la chimiotaxie d'autres dérivés granulocytaires⁴⁵.

I.5.1. Activité immunosuppressive des granulocytes matures dans le sepsis

Les granulocytes ont développé des stratégies de régulation négative pour diminuer l'activation leucocytaire exagérée. Cependant, comme pour les altérations d'autres cellules de la réponse immunitaire, les activités de régulation négative maintenues peuvent avoir des effets immunosuppresseurs.

Chez les neutrophiles, cette autorégulation négative est effectuée par les enzymes lytiques libérées à partir des granules, capables de cliver des récepteurs de membrane :

- La libération des sérines protéases cause le clivage auto- et paracrine des récepteurs granulocytaires importants pour la chimiotaxie comme le CXCR1 (Récepteur de l'IL-8) et le CD35 (Récepteur de CR1); et la phagocytose comme le CD88 (Récepteur de l'opsonine C5a). Les sérines protéases peuvent aussi cliver des récepteurs comme le CD14, corécepteur des LPS, importante pour la reconnaissance par le TLR4.
- L'élastase et la cathepsine G clivent les récepteurs de IL-2 et IL-6 chez les lymphocytes T⁴⁵.
- L'élastase diminue l'expression des molécules co-stimulatrices par les cellules dendritiques, limitant la maturation et l'induction de la réponse Th1 lymphocytaire.

Des sous-types granulocytaires, telles que les MDSC et les granulocytes CD62L^{dim} ont des activités immunosuppressives. Les MDSC ou *Myeloid-Derived Suppressor Cells*, sont des

dérivés myélocytaires (du progéniteur commun des granulocytes et monocytes). Son activité immunosuppressive est médiée par la sécrétion d'arginase 1, une enzyme qui déplete l'arginine de l'environnement, acide amine essentiel pour les lymphocytes T, causant l'arrêt du cycle cellulaire et une lymphopénie secondaire⁴⁵. Les granulocytes CD62L^{dim} sont un sous-type des granulocytes matures capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T dans un mécanisme dépendant de la formation d'une synapse CD11b/CD18 avec le lymphocyte T, et de la libération du peroxyde d'hydrogène⁶³.

I.5.2. Granulopoïèse d'urgence

En réaction aux infections, la production et la libération des granulocytes de la moëlle osseuse augmentent rapidement dans un processus coordonné appelé granulopoïèse d'urgence⁴³. La granulopoïèse d'urgence est déclenchée par des stimuli infectieux, détectés par les cellules souches myélopoïétiques. L'activation de ces dernières peut se faire de façon directe par reconnaissance des molécules associées aux pathogènes (*Pathogen Associated Molecular Patterns*, PAMPs), ou dans la plupart des cas de façon indirecte par le G-CSF et le GM-CSF sécrétés par les monocytes, macrophages tissulaires, cellules épithéliales et cellules stromales mésenchymateuses en réponse à la reconnaissance d'un PAMP comme le LPS^{43,64}.

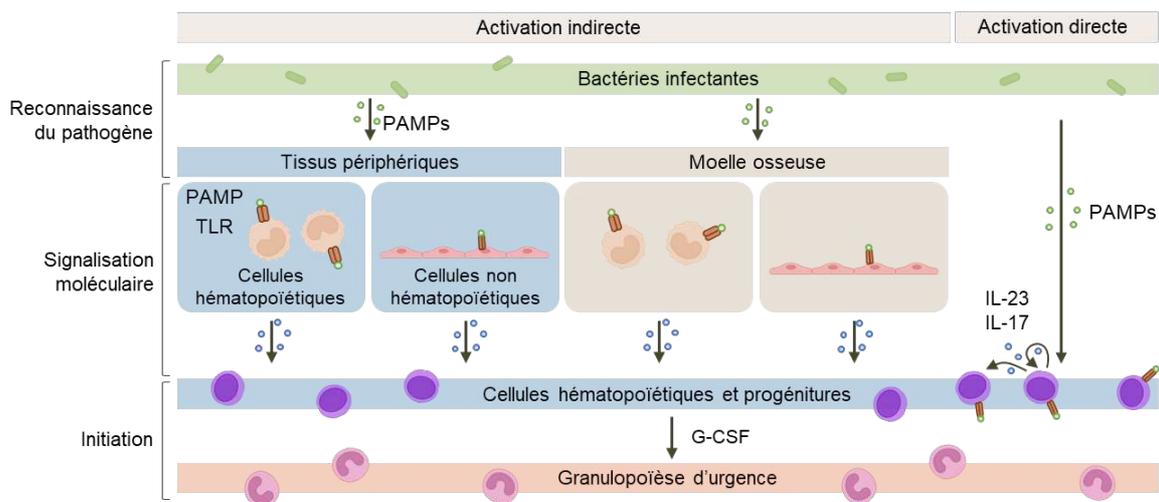


Figure 12. Mécanismes d'induction de la granulopoïèse d'urgence

Adapté de^{43,44}. Le G-CSF est produit en continu à l'état basal pour maintenir le nombre des granulocytes matures. La production d'IL-23 par les macrophages et les cellules dendritiques stimule l'expression de IL17 par les lymphocytes T non conventionnels LT $\gamma\delta$ et de type NK, ce qui à la fois induit l'expression de G-CSF par les cellules endothéliales et les macrophages tissulaires. Dans la moëlle osseuse, la différenciation des cellules souches hématopoïétiques et progénitrices et leur libération sont induites par le G-CSF.

Pendant la réponse à l'infection, les granulocytes migrent vers les tissus périphériques, où ils finissent par atteindre la mort cellulaire comme conséquence de leur activité bactéricide. La régulation de la différenciation et de la libération des granulocytes de la moëlle osseuse en réponse aux besoins systémiques est donc détectée de façon indirecte par leur taux

d'apoptose. Le niveau de G-CSF produit est modulé par l'interaction entre les phagocytes responsables de la dégradation des granulocytes apoptotiques (macrophages et cellules dendritiques), avec les lymphocytes T régulateurs^{43,44}.

Le G-CSF a un rôle central dans la production basale des granulocytes. Même si les stimuli et médiateurs de l'induction de la granulopoïèse d'urgence sont variés et dépendants du pathogène impliqué, le G-CSF reste indispensable. L'IL-6 et le GM-CSF sont aussi requis pour assurer la disponibilité des granulocytes dans le contrôle de l'infection⁴³.

Cette granulopoïèse d'urgence conduit finalement à une augmentation des formes immatures granulocytaires (myélocytes, métamyélocytes et neutrophiles non segmentés) circulantes, normalement présentes uniquement dans la moëlle osseuse, et qui peut monter jusqu'à 30 à 50 % des granulocytes totaux. Cette phase est également connue en clinique sous le terme de « décalage à gauche » (« *left shift* » ou « *band forms* » en anglais)^{43,64-66}. Ce phénomène est caractéristique des processus inflammatoires aigus et fait même partie des critères diagnostiques cliniques d'un syndrome de réponse inflammatoire aiguë^{14,66}.

La granulopoïèse d'urgence est donc un phénomène adaptatif nécessaire pour la survie face aux infections sévères, mais délétère dans le temps et dans l'intensité pour l'hôte⁴³.

I.5.3. Caractérisation et différenciation des neutrophiles et granulocytes immatures

Le développement de techniques d'identification des sous-populations leucocytaires plus sensibles et plus spécifiques a permis une meilleure caractérisation des granulocytes immatures (GI) dans le sepsis. Avant l'expansion de l'utilisation de la cytométrie en flux, les GI étaient discernés des neutrophiles par leurs différences morphologiques :

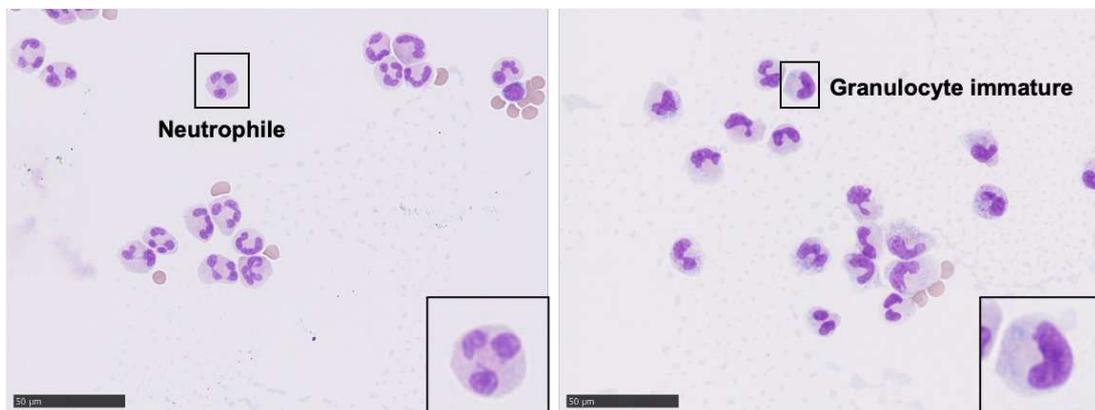


Figure 13. Caractéristiques morphologiques des granulocytes immatures et neutrophiles

Adapté de^{66,67}

- Forme arrondie ou « en bande » (*kidney shaped/band shaped/horseshoe-shaped*) de leur noyau souvent monolobé, en contraste des formes polylobées typiques des neutrophiles ;
- Leur plus grande taille (10-18 µm vs 8-16 µm)
- La présence plus importante de granules précoces chargés de myéloperoxydase^{66,68}.

Aujourd'hui, la quantification des GI et neutrophiles se base sur la présence de marqueurs membranaires, identifiés par cytométrie en flux.

Les granulocytes sont actuellement reconnus par :

- La présence de granules (détecté en cytométrie en flux par leur capacité à disperser la lumière),
- L'expression intermédiaire de CD45 (marqueur commun des cellules hématopoïétiques)
- L'absence d'expression des marqueurs lymphocytaires tels que CD14, CD3 ou CD24.

Les sous-populations granulocytaires sont ensuite identifiées par le niveau d'expression du récepteur CD16 (Fcγ-RIII). Les GI ont une expression diminuée de CD16 (CD16^{dim}) comparativement aux neutrophiles qui possèdent une forte expression membranaire (CD16^{high})^{49,64,65,69,70}.

Cette méthode facilement normalisable⁷¹, a permis de mettre en évidence l'association entre l'augmentation des GI circulants chez des patients septiques récemment diagnostiqués, et l'aggravation clinique^{66,69,72}. En effet, la quantité des GI circulants à l'admission est directement proportionnelle à la sévérité clinique à court terme, définie par l'apparition d'une défaillance d'organe, d'une élévation du risque de mortalité^{66,69}, ou encore du risque d'infection secondaire⁷³.

Par ailleurs, un seuil de 30 % de GI circulants à l'admission peut permettre d'identifier les patients avec un risque accru de mortalité au septième jour (77 % vs 42 % des décès chez les patients avec respectivement plus ou moins de 30 % de GI, p<0.01). L'association de ce marqueur à la présence d'une lymphopénie persistante est reliée également à la mortalité à long terme (57 % vs 20 % de mortalité à J28, p<0.01)⁶⁹.

La raison fonctionnelle derrière cette association n'a pas encore été entièrement élucidée. D'une part, les GI peuvent être libérés de la moëlle osseuse en réponse aux stimuli des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et l'IL-8, fortement augmentées lors d'un sepsis sévère⁷⁴. La hausse des GI circulants peut être interprétée simplement comme un effet secondaire de « l'orage cytokinique » propre au sepsis. Cette immaturité peut, néanmoins, être la cause d'un contrôle limité des pathogènes infectants. Toutefois, les études de la fonction différentielle des neutrophiles et des GI montrent des résultats contradictoires. Le **Tableau 3** résume les différences retrouvées chez les GI par rapport aux neutrophiles dans des modèles de marquage et d'évaluation fonctionnelle *ex vivo*.

Tableau 3. Résumé des altérations fonctionnelles des GI dans le sepsis

Caractéristique	Source des GI	Différence par rapport aux neutrophiles	Référence
Viabilité	Patients septiques	Quantité augmentée par rapport aux neutrophiles de donneurs sains ou de patients septiques. En concordance, le taux d'apoptose est plus important chez les neutrophiles que les GI.	49,65
Marqueurs de membrane			
CD14, MD-2	LPS	Diminués	65
TLR2 et TLR4	Patients septiques	Pas de différence	65
TLR4, CXCR2, CXCR4, C5aR, CD32, CD11b, CD45, CD181, CD182	LPS	Diminués	64
CD16 (Fc γ R)	Patients septiques, SRIS, LPS	Diminué (Fc γ R et Fc γ RIII). Augmente au cours du temps en incubation <i>ex vivo</i> .	64,65
Chimiotaxie	Patients septiques	Réponse diminuée à l'IL8. Le récepteur de l'IL-8 chez les granulocytes est le CXCR2, exprimé sur les neutrophiles, à la fin de la maturation dans la moëlle osseuse ⁴⁴ .	65
	LPS	Pas de différence de la migration en réponse aux pathogènes ou à des molécules « chimio-attractives » (fMLF, C5a ou IL8)	49,70,75
Phagocytose	Patients septiques, SRIS	Diminuée en termes de proportion des cellules qui participent à la phagocytose, autant qu'en nombre des bactéries/particules phagocytées après 20 min, 1 h ou 2 h d'incubation. Probablement en lien avec l'expression diminuée du récepteur Fc γ δ ou à la faible mobilisation du calcium intracellulaire.	64,65,68
	Patients « LPS »,	Pas de différence sur la proportion des cellules faisant de la phagocytose et la quantité des pathogènes phagocytés par cellule sur tous les temps évalués (30-1000 min)	49
Production des ROS	Patients septiques, SRIS	Diminuée	64,65

Activité bactéricide	Patients septiques	Diminuée, probablement en lien avec l'expression diminuée des récepteurs nécessaires pour la phagocytose et la mobilisation du calcium.	49,65
Acidification du phagosome	Patients « LPS »,	Acidification plus importante chez les GI que les neutrophiles en lien à une concentration plus importante de MPO et production de HOCl. L'acidification du phagosome est indépendante de l'activité NADPH-oxydase.	49
Production des cytokines	Patients septiques	Tendance vers un profil pro-inflammatoire, avec une production diminuée d'IL10 et augmentée de TNF α	65
Activation	Patients « LPS », Patients septiques, SRIS	La production de ROS n'atteint pas un même niveau d'augmentation après activation avec du fMLF. Faible réponse à l'opsonisation	64,65,68

SRIS : Patients ayant un syndrome de réponse inflammatoire systémique non infectieux (polytraumatisés, post chirurgical, embolisme pulmonaire, pancréatite aiguë, postpartum) ⁶⁵ ; LPS : Donneurs sains ayant reçu une dose unique des LPS « de référence » de *E. coli* (1 ng/kg des LPS en dose unique, suivie par 1 ng/kg pendant 3 h en continu), dans le cadre d'une étude d'endotoxémie ⁶⁴ ; fMLF (N-formylméthionine-leucyl-phenylalanine) : peptide courant produit par les bactéries en phase de croissance, puissant facteur chimiotactique.

En résumé, les granulocytes immatures sont libérés au cours de la réponse inflammatoire aiguë dans le sepsis par un phénomène de granulopoïèse d'urgence, avec une viabilité augmentée par rapport aux neutrophiles, mais avec une expression diminuée des récepteurs membranaires nécessaires pour la reconnaissance des pathogènes (CD16, CXCR2, CXCR4, C5aR, CD32, CD11b, CD45, CD181, CD182). Les données sur la chimiotaxie et la phagocytose des GI ne sont pas concordantes entre les études, mais leur phagocytose et leur production des ROS en réponse à l'interaction avec des pathogènes ou par stimulation indirecte est comparativement diminuée.

Chapitre II. Mécanismes bactériens d'adaptation au stress : La première étape pour survivre

L'être humain, au centre de la médecine, est souvent considéré comme « la victime » dans l'histoire de la maladie. Néanmoins, dans l'interaction hôte-pathogène lors du sepsis, les bactéries sont aussi des victimes soumises à différents types de stress dans l'environnement de l'hôte.

Des milliers d'années d'évolution ont sélectionné des mécanismes sophistiqués pour faire face aux environnements hostiles. L'exposition à des niveaux de stress non mortels déclenche des réseaux génétiques de réponse aux dommages, chargés de la régulation de l'expression des gènes capables de faciliter l'adaptation bactérienne et la survie en milieu hostile. Parmi ces réseaux, la réponse SOS, responsable du maintien de la réplication, de la réparation de l'ADN, et du contrôle de la division cellulaire, permet d'assurer la survie bactérienne et d'augmenter la probabilité d'adaptation à l'environnement.

Dans ce chapitre seront présentés les différents stress auxquels les bactéries sont soumises dans le corps humain (page 44). Une attention particulière sera accordée au stress oxydant (page 47), subi à l'intérieur des phagosomes granulocytaires et aux mécanismes bactériens de réponse à ce type de stress (page 53). Enfin, la réponse générale au stress « Réponse SOS », sa régulation et ses effecteurs liés aux fonctions de réparation chez *Escherichia coli* seront détaillés (page 61). L'expression des gènes extra-chromosomiques, et les conséquences de mutagenèse, secondaires à l'induction SOS seront traitées dans le Chapitre III (page 71).

II.1. Agents du stress bactérien dans le sepsis

Dans le sepsis, les bactéries peuvent être confrontées à différents types de stress du moment où elles rentrent en contact avec l'environnement humain. Le type (température, pH, exposition aux peptides antimicrobiens sécrétés, hyperosmolarité, stress oxydant, limitation des nutriments) et l'intensité du stress dépendent du microenvironnement (**Figure 14**)⁷⁶.

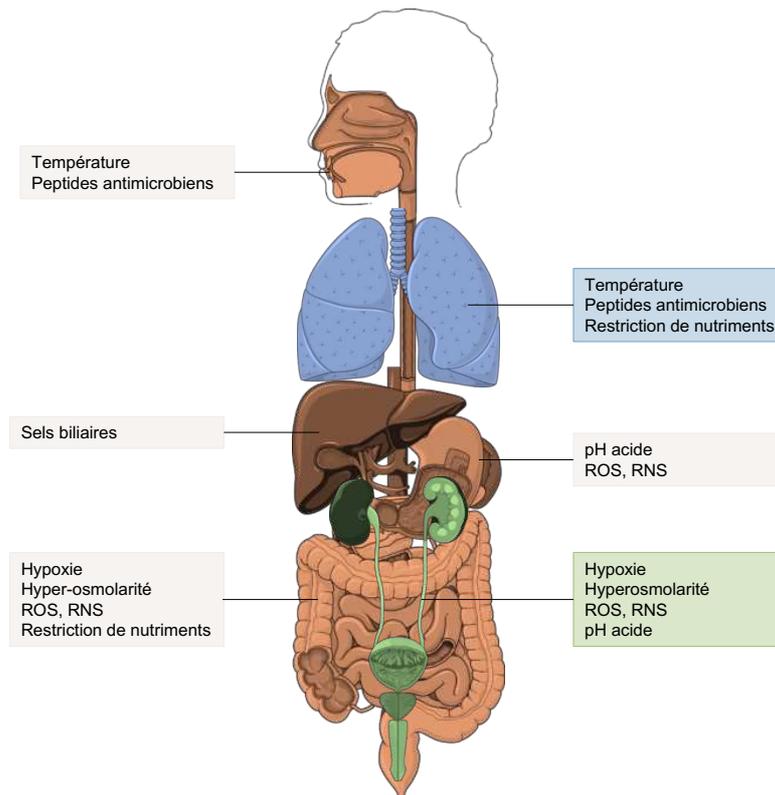


Figure 14. Types de stress subis par les bactéries au contact avec l'hôte humain
Adapté de ⁷⁶.

La **température** relativement plus élevée chez l'hôte en comparaison à l'environnement extérieur est le premier stress subi par les pathogènes. Chez *E. coli*, plus de 120 gènes sont régulés positivement par la température ⁷⁶⁻⁷⁸.

L'induction de l'expression de ces gènes peut être indirecte, par la médiation des protéines de régulation transcriptionnelle telles que la protéine H-NS (*Histone like protein*). À basse température, la protéine H-NS s'attache aux régions promotrices ou séquences codantes des gènes sous son contrôle et quand la température augmente, les régions N terminales des protéines H-NS forment des dimères, libérant ainsi les séquences d'ADN et conduisant à la dérégulation des gènes cibles ^{76,78}.

La régulation positive de l'expression des gènes induits par la température peut être aussi post-transcriptionnelle : à basse température, les extrémités 5' de l'ARNm forment des structures en épingle à cheveux qui rendent difficile l'accès aux ribosomes pour réaliser la traduction. L'augmentation de la température diminue la stabilité de ces structures secondaires et facilite l'expression des gènes ⁷⁶.

Les gènes régulés par le changement de température font partie des groupes de gènes dont l'activation facilite l'adaptation du pathogène à l'environnement de l'hôte : il s'agit de gènes liés à la capture de fer, le transport et le métabolisme des acides aminés, des carbohydrates et des enzymes de la chaîne respiratoire. ^{77,78}

La **limitation des nutriments**, pourrait aussi être considérée comme une stratégie de défense de l'hôte pour limiter la propagation bactérienne. Face à ce stress, les bactéries sont capables de détecter la disponibilité des carbohydrates, métaux essentiels, acides aminés et oxygène

par l'interaction entre les produits intermédiaires du métabolisme de ces nutriments, et des facteurs de transcription des différentes voies métaboliques, pour adapter leur métabolisme en conséquence ^{76,79,80}.

Le système FruR/Cra par exemple est activé lors d'une privation des carbohydrates, et privilégie l'expression des gènes liés aux voies de la glycogénèse sur celles de la glycolyse. La privation de Fer (Fe), Manganèse (Mn) et Zinc (Zn), cofacteurs des enzymes essentielles du métabolisme bactérien est perçue par des facteurs de transcription (comme Fur, MntR et ZincABC) se liant aux métaux, répresseurs des opérons chargés de l'homéostasie des métaux en question. L'hypoxie peut être détectée par des facteurs de transcription sensibles à l'équilibre NADH/NAD⁺ ou FADH/FAD⁺, pour activer alternativement les voies métaboliques aérobies/anaérobies dans les organismes aéro-anaérobies facultatifs ⁷⁶.

Enfin, la réponse stringente perçoit et réagit à la carence en acides aminés. Lorsque les acides aminés sont limités, une forme inhabituelle du nucléotide guanosine, connue comme (p)ppGpp s'accumule comme conséquence de l'augmentation de sa synthèse par la protéine RelA ⁸¹, et la diminution de sa dégradation par la protéine SpoT⁸². Le (p)ppGpp accumulé et le co-facteur DksA interagissent directement avec l'ARN-polymérase et activent la transcription des gènes de réponse aux stress *rpoN*, *rpoS* et *rpoH* qui codent pour les facteurs sigma (σ^{38} , σ^{32} , σ^{70} , σ^{54}), et inhibent l'expression des ARNr et ARNt ^{76,83}.

Les étapes du processus qui va de la détection du stress environnemental à l'expression des gènes des opérons chargés d'y répondre sont semblables pour le stress causé par le **pH acide**, le **stress oxydant** et l'**hypoxie**.

Dans une première étape, les facteurs de transcription portant des motifs sensibles à la modification par le stress spécifique entrent en contact avec les molécules d'intérêt, ce qui provoque un changement conformationnel, à savoir⁷⁶ :

- Les protéines qui détectent le stress causé par le pH acide (Fur, oS, oE, ArsS, CadC, EvgS, PhoQ, PmrB, SsrA) portent des résidus sensibles à l'ionisation : des acides aminés avec des groupes imidazole et carboxyle, comme l'histidine, l'aspartate et le glutamate.
- Les protéines qui détectent le stress oxydant (OxyR, SoxR) et la concentration d'oxygène environnemental (FNR, ArcB/ArcA, Tsr/Aer), portent des acides aminés avec des groupements -thiol ou des groupements permettant la liaison au fer, sensibles à des réactions d'oxydation.

Ensuite, le changement conformationnel cause un changement d'affinité pour l'ADN de ces facteurs de transcription, ce qui induit l'expression des gènes en aval. Les opérons contrôlés par ces facteurs de transcription incluent ⁷⁶ :

- L'expression des décarboxylases, le changement du métabolisme central et du transport et de la composition de la membrane pour s'adapter au pH acide.
- L'expression des enzymes nécessaires au métabolisme anaérobie, et la répression parallèle des gènes du métabolisme aérobie, en réponse à la détection d'un environnement pauvre en oxygène.
- L'expression des récepteurs sensibles à la chimiotaxie par les Nitrites/Nitrates pour utiliser le nitrogène comme accepteur final des électrons dans la chaîne respiratoire à la place de l'oxygène. Ces récepteurs sont induits par le système Tsr/Aer, sensible

aux modifications de FNR mais aussi au niveau de FAD⁻, indicateur du niveau d'oxydation intracellulaire.

II.1.1. Le stress oxydant

Les ROS (espèces réactives de l'oxygène) sont des produits inévitables du métabolisme aérobie, et leur présence à bas niveau dans les cellules procaryotes et eucaryotes est tolérée grâce à l'équilibre entre la concentration des ROS et des agents « antioxydants ». Quand la concentration des ROS augmente, soit par production interne suite à des lésions externes (comme celles produites par des antibiotiques bactéricides^{84,85}, soit par l'augmentation des ROS dans l'environnement (comme dans les phagosomes des granulocytes) ; le déséquilibre entre les ROS et les agents antioxydants est dénommé « stress oxydant »^{59,86}.

II.1.1.1. Mécanismes de dommage moléculaire par les ROS

Les ROS attaquent les liaisons chimiques susceptibles d'être oxydées. En conséquence, les ROS ont un large éventail de cibles moléculaires : ADN et protéines. Chez les bactéries, les protéines qui portent des acide-aminés de type cystéine et méthionine ou des 'clusters' Fe-S sont plus sensibles d'être soumis à des mécanismes d'oxydoréduction. Ces modifications covalentes déstabilisent la structure et inactivent les protéines^{59,76,86,87}. Les ROS peuvent occasionner des dommages à l'ADN directement par interaction avec les bases nitrogénées, ou indirectement par l'interférence avec la fourche de réplication^{76,86}.

Chez les cellules eucaryotes, la peroxydation des lipides est un mécanisme reconnu de lésion cellulaire par le stress oxydant. Cependant, ce phénomène est rarement une cause de lésion chez les bactéries du fait de l'absence de lipides polyinsaturés⁵⁹.

L'activité bactéricide des ROS est donc consécutive aux dommages aux protéines et aux acides nucléiques.

II.1.1.1.1. Dommages aux protéines

La cystéine est un nucléophile^{xii} fort, car elle porte un groupement fonctionnel thiol (-SH). Lorsqu'une protéine est placée dans un milieu à pH physiologique, la déprotonation du SH est favorisée pour former le thiolate (-S⁻). Le thiolate est un nucléophile encore plus fort, susceptible de réagir avec des agents oxydants pour former de l'acide sulfénique (-SOH) ou des radicaux thyl (-RS^{*}). L'acide sulfénique est une espèce très réactive qui peut former des ponts disulfure avec d'autres Cys proximaux ou être oxydée de façon irréversible en acide sulfonique (-SO₂H) ou sulfonique (-SO₃H) (**Figure 15**)^{76,87}.

^{xii} Un nucléophile est une espèce chimique attirée par les charges positives et capable de donner une paire d'électrons.

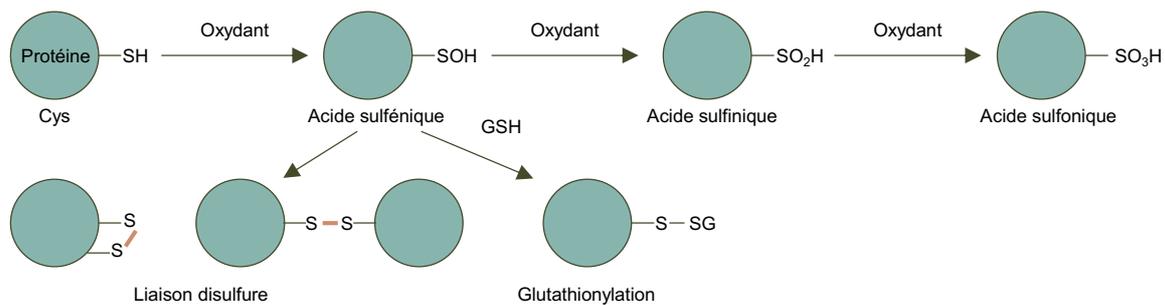


Figure 15. Chaîne des réactions d'oxydation sur un résidu cystéine

Adapté de ⁸⁷.

La méthionine porte aussi du soufre dans un groupe thioéther. Ce thioéther peut être oxydé pour produire du sulfoxyde de méthionine (Met-O), qui en une deuxième étape d'oxydation irréversible forme la méthionine sulfone (Met-O₂). L'endroit d'acquisition de l'oxygène sur le centre sulfure lors de la formation de Met-O fait la différence entre les formes diastéréoisomériques S et R (**Figure 16**) ⁸⁷.

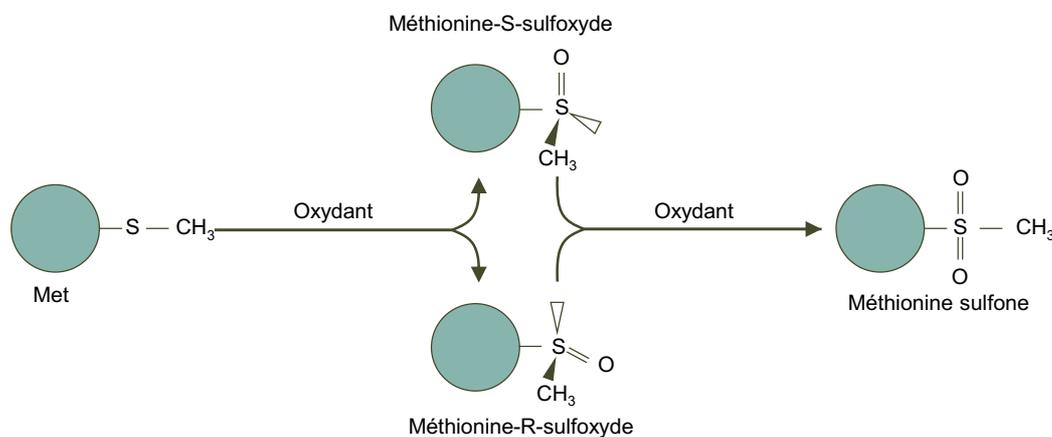


Figure 16. Chaîne des réactions d'oxydation sur un résidu méthionine

Adapté de ⁸⁷.

Le troisième type de résidus sensibles à l'oxydation par les ROS est les clusters Fe-S. Les déshydrogénases dépendantes de Fe-S sont une famille d'enzymes bactériennes normalement chargées des fonctions de déshydratation et incluent des enzymes comme la dihydroxyacide déshydrogénase (DHAD), l'aconitase et la fumarase, importantes dans le cycle d'acide tricarboxylique. Ces enzymes portent un cluster 4Fe-4S dans leur centre catalytique, permettant l'extraction d'un groupe -OH par un des atomes Fe (**Figure 17**) ⁵⁹.

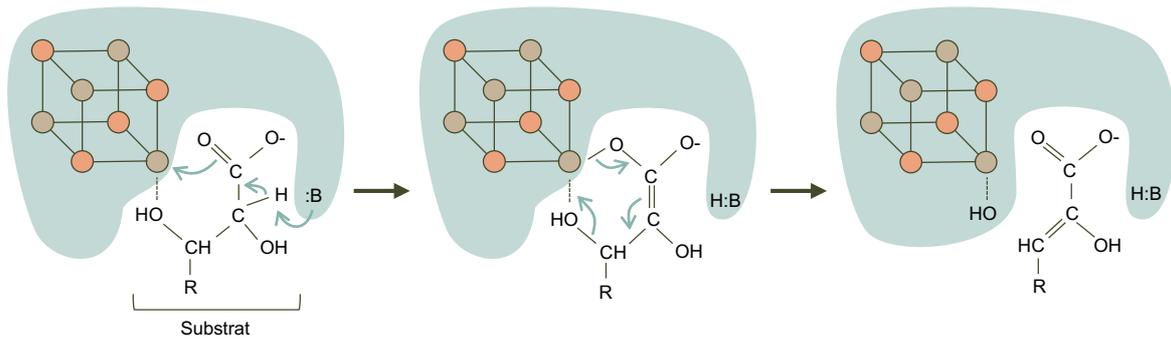


Figure 17. Activité catalytique d'une enzyme Fe-S déshydratase

Adapté de ⁵⁹

Son activité catalytique rend ce cluster Fe-S facilement accessible et susceptible à l'oxydation par le O_2^- et le H_2O_2 . Le cluster oxydé est instable, et l'atome de fer peut s'en dissocier, ce qui finit par inactiver l'enzyme (**Figure 18**). De plus, le Fe^{2+} libéré dans le cytoplasme est capable de transformer les radicaux libres par la réaction de Fenton en ROS plus stables et réactives, augmentant leur toxicité (**Figure 19**) ⁵⁹.

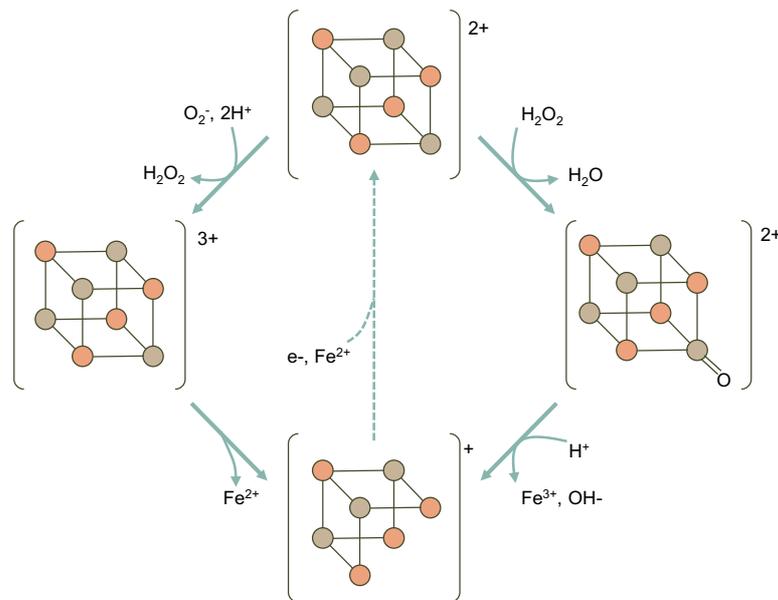


Figure 18. Chaîne des réactions d'oxydation du cluster Fe-S

Adapté de ⁵⁹

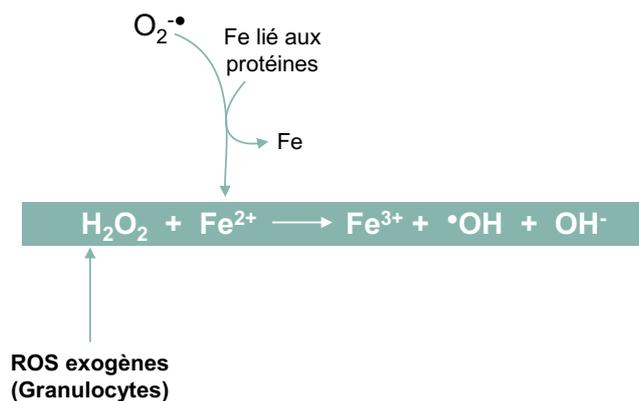


Figure 19. Réaction de Fenton

Adapté de ^{88,89}

Enfin, d'autres enzymes essentielles qui portent un atome de Fer (déshydratases, épimérasés, déshydrogénases, déformylases et désaminases) peuvent être inactivées par l' H_2O_2 à travers une réaction de Fenton, même à de faibles concentrations ($0,5 \mu\text{M}$) ⁵⁹.

II.1.1.1.2. Dommages à l'ADN

Le stress oxydatif peut causer différentes sortes de dommages à l'ADN par des mécanismes directs et indirects.

Indirectement, l'oxydation d'enzymes nécessaires aux étapes de réplication ou de réparation de l'ADN peut entraîner un arrêt de la fourche de réplication, sa déstabilisation, et la formation de cassures de l'ADN double brin (ADNdb) émergent, ou de l'ADN simple brin (ADNsb) sur le « *lagging* » brin ⁹⁰.

Les ROS peuvent aussi endommager l'ADN directement, principalement par l'action de l' $\text{HO}\cdot$. Ce ROS, stable et hautement réactif est produit à partir de l' H_2O_2 qui entre en contact avec le fer cytoplasmique (**Figure 19**). L' $\text{HO}\cdot$ réagit avec les molécules organiques par la formation d'une liaison double, ou par l'extraction d'un atome d'hydrogène du C-H pour former un radical carbone en libérant de l'eau ⁹¹. L' $\text{HO}\cdot$ peut oxyder les bases et les riboses de l'ADN, en provoquant plusieurs types de lésions. La guanine est la base la plus sensible en raison de son plus faible potentiel de réduction^{xiii}. Un produit commun est la 8-hydroxyguanine qui a un potentiel mutagène important, car il peut s'apparier à l'adénine sans être détecté par « la relecture » par les ADN-polymérasés (**Figure 20A**). L'oxydation de la thymine cause des lésions non codantes, ce qui bloque l'avancement de la fourche de réplication et l'apparition des fragments d'ADNsb et d'ADNdb (**Figure 20B**) ⁹⁰.

Finalement, l'oxydation des riboses produit des ruptures de simple brin avec des résidus 3'-glycolate, qui conduisent également à un arrêt de la fourche de réplication (**Figure 20C**) ⁵⁹.

^{xiii} Le potentiel de réduction fait référence à l'affinité d'une molécule pour les électrons (mesurée en volts)

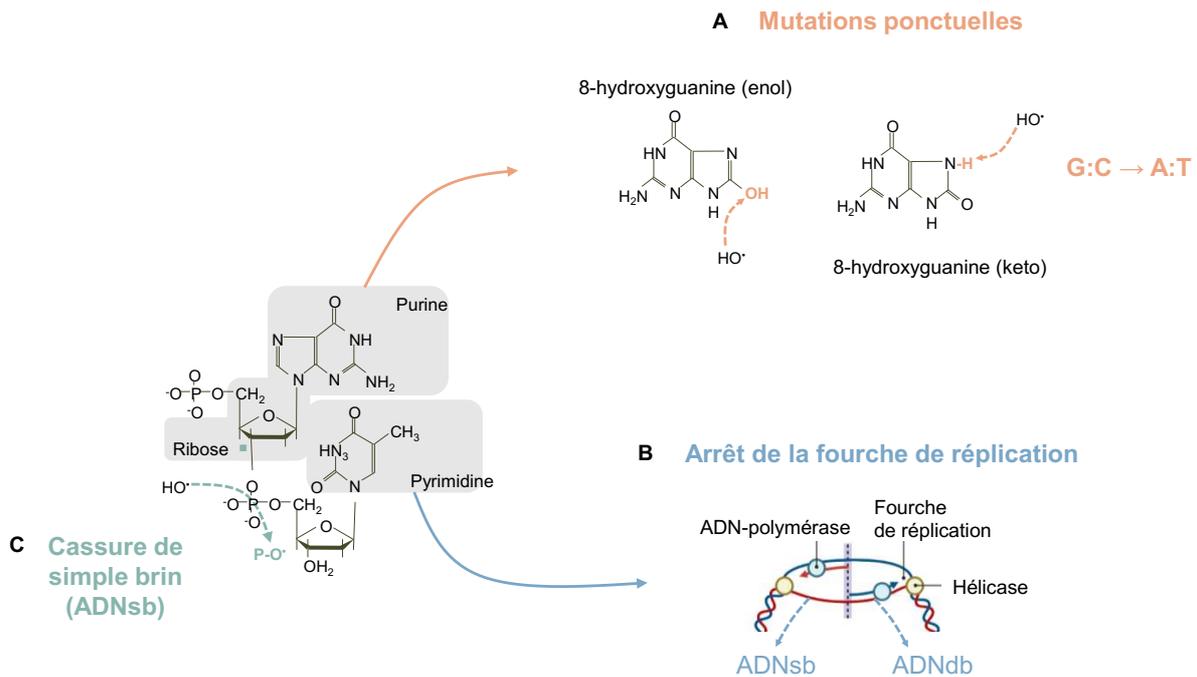


Figure 20. Types de dommages oxydatifs les plus fréquents sur l'ADN

II.1.1.1.3. Le stress oxydant comme mécanisme neutrophilique de contrôle des pathogènes

Il y a très peu d'études sur les détails mécanistiques qui entraînent la lyse bactérienne dans le phagosome des neutrophiles comparé au nombre d'études dédiées au sepsis. La première étude répertoriée sur PubMed pour les termes « *Bacteria + phagosome + ROS + neutrophil* » date de 2001, avec seulement 33 publications jusqu'à présent^{xiv}. L'évidence qui appuie le rôle des ROS dans le processus de contrôle des infections bactériennes repose sur :

- L'apparition des maladies infectieuses récurrentes chez les patients ayant une mutation sur le complexe NADPH-oxydase, et pourtant incapables de produire des ROS dans le phagosome (comme discuté dans la section I.4.1.1.1.3⁶²).
- Le développement de stratégies (facteurs de virulence) dédiées à la limitation du stress oxydatif chez certaines bactéries permettant la survie intracellulaire dans les neutrophiles. *Filifactor alocis* et *Neisseria gonorrhoeae* par exemple peuvent limiter la production de ROS par la NADPH-oxydase^{92,93} ; *Yersinia pestis* peut s'échapper du phagosome porteur de ce complexe⁹⁴ et *Staphylococcus aureus* peut adapter son métabolisme des pyrimidines pour survivre dans un milieu riche en ROS⁹⁵.
- L'augmentation de la production de ROS dans le phagosome s'associe à une activité bactéricide plus importante^{96,97}.

^{xiv} Recherche faite le 7 octobre 2022, et après tri des études ne concernant pas des bactéries comme organisme modèle, ni les neutrophiles.

L'association des informations connues sur la cascade de production des ROS dans le phagosome et sur les mécanismes moléculaires de lésions via le stress oxydatif permet d'imaginer le processus qui aboutit à la mort bactérienne dans le phagosome :

L'anion superoxyde produit par la NADPH-oxydase dans le phagosome est rapidement transformé en peroxyde d'hydrogène par la superoxyde dismutase SOD ; l'acide hypochlorique par la MPO ; le radical hydroxyle par la réaction de Fenton ; et les espèces réactives du nitrogène (*reactive nitrogen species*, RNS) après réaction avec l'oxyde nitrique^{47,52,54}.

Les ROS plus stables et non chargés (l'acide hypochlorique, le radical hydroxyle et les RNS) peuvent diffuser à travers la paroi bactérienne et interagir de façon non sélective avec les protéines et acides nucléiques bactériens. Les protéines portant des résidus acide-aminés avec du soufre, fer ou des clusters Fe-S sont plus sensibles à l'inactivation par oxydation et perte de la structure tertiaire.

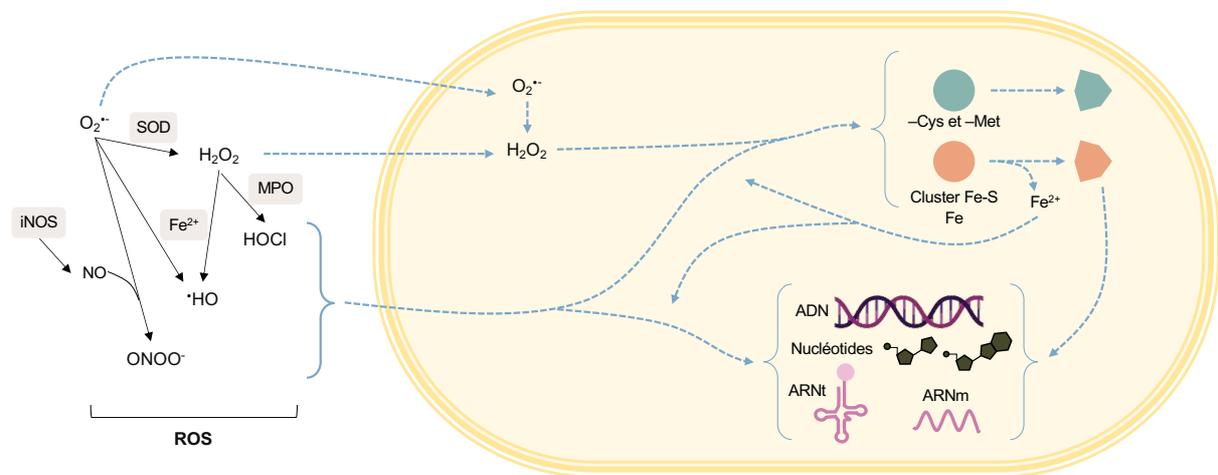


Figure 21. Résumé des ROS produits par les phagosomes et le stress oxydant dans une bactérie

La réplication et la transcription sont également touchées par le stress oxydant⁹⁸ :

- Directement par l'oxydation des nucléotides, qui peut causer des mutations ponctuelles par l'oxydation de la guanine ; l'arrêt de la fourche de réplication par l'oxydation de la thymine, avec l'apparition des ruptures de l'ADNdb (sur le '*leading*' brin) ou ADNsb (sur le '*lagging*' brin par les fragments d'Okasaki ou le '*leading*' brin par *re-priming* post-lésionnel) ; ou l'apparition des fragments d'ADNsb par l'oxydation des riboses.
- Indirectement car la réplication peut être affectée par l'oxydation de la réserve des nucléotides libres, ou des protéines nécessaires dans la fourche de réplication (polymérases, hélicases, gyrases, etc.). Finalement, la transcription peut être aussi affectée par l'oxydation de l'ARNm et de l'ARNt.

Toutes ces altérations conduisent à l'arrêt de la croissance cellulaire et finalement à la mort bactérienne. Pour cette raison, plusieurs stratégies de réponse au stress oxydant ont évolué avec l'adaptation des bactéries à l'environnement aérobie.

II.2. Réponse bactérienne au stress oxydant

Les bactéries possèdent des mécanismes à l'état basal pour limiter le stress oxydant. Ces mécanismes répondent à des bas niveaux de ROS ; par exemple la formation de O_2^- et d' H_2O_2 par les voies métaboliques aérobies est de 5 μM et 10-15 μM par seconde, respectivement⁵⁹. Des mécanismes de réponse supplémentaires sont nécessaires pour défendre les bactéries face à des concentrations plus importantes d'agents oxydants (ROS et RNS)^{76,86}. Grâce à ces mécanismes, la concentration de H_2O_2 est maintenue en dessous de 0.2 μM ⁸⁶.

L'activation des mécanismes supplémentaires d'expression des enzymes antioxydantes, protéines détoxifiantes, et d'enzymes résistantes au stress, ainsi que la réparation des altérations protéiques secondaires à l'oxydation, dépendent de l'induction des régulateurs transcriptionnels OxyR, PerR, OhrR, SoxRS^{76,86,87}.

Ces protéines partagent la particularité de porter des résidus -Cys ou des clusters Fe-S exposés, sensibles à l'oxydation/nitration par les ROS/RNS (H_2O_2 , RSNO, ONOO⁻, O_2 , CO, NO). La modification de ces résidus se traduit par un changement conformationnel qui active ces facteurs transcriptionnels pour déclencher l'expression des réponses adaptatives⁷⁶.

L'activation de chaque voie d'adaptation dépend de la concentration des ROS et inclut l'expression des enzymes « anti-oxydantes » (SOD, catalases et leurs homologues), des tampons redox (Glutathion, NADPH), des enzymes capables de réduire les résidus cystéine et méthionine (thioredoxines, glutathione reductases), et des voies de régulation du fer⁵⁹.

II.2.1. Régulation de la réponse au stress oxydant

Les régulons principaux de réponse au stress oxydant chez *E. coli* sont OxyR et SoxRS^{59,86,99}. L'évolution des micro-organismes dans des environnements aérobies a conduit à la sélection et la conservation de ces régulons et leurs homologues fonctionnels⁸⁶.

OxyR est une protéine de 34kDa, homologue de la famille des régulateurs transcriptionnels LysR. OxyR reconnaît et s'attache à la région promotrice d'environ 40 gènes chargés de la protection contre la toxicité des ROS, mais aussi d'autres sources de stress telles que les hautes températures et les UV. Son activité est donc nécessaire pour la protection contre les dommages cellulaires médiés par la peroxydation des protéines et l'activité antimicrobienne des granulocytes⁸⁶.

La protéine OxyR est normalement à l'état réduit, à des concentrations intracellulaires de H_2O_2 de 50 nM. L'induction transcriptionnelle médiée par OxyR se produit quand les concentrations de H_2O_2 atteignent les 200 nM, et les homotétramères de OxyR sont oxydés sur leurs résidus Cys199, formant un pont disulfure réversible avec le Cys208¹⁰⁰. Le changement conformationnel facilite l'attachement à l'unité α de l'ARN-polymérase pour induire l'expression des gènes sous son contrôle. Une fois que le stress oxydant diminue, des enzymes réductrices (Glutathion réductase et Glutarédoxine), réduisent OxyR vers son état basal répresseur (**Figure 22**)^{59,86,100}. Les opérons faisant partie du régulon OxyR sont résumés dans le **Tableau 4**.

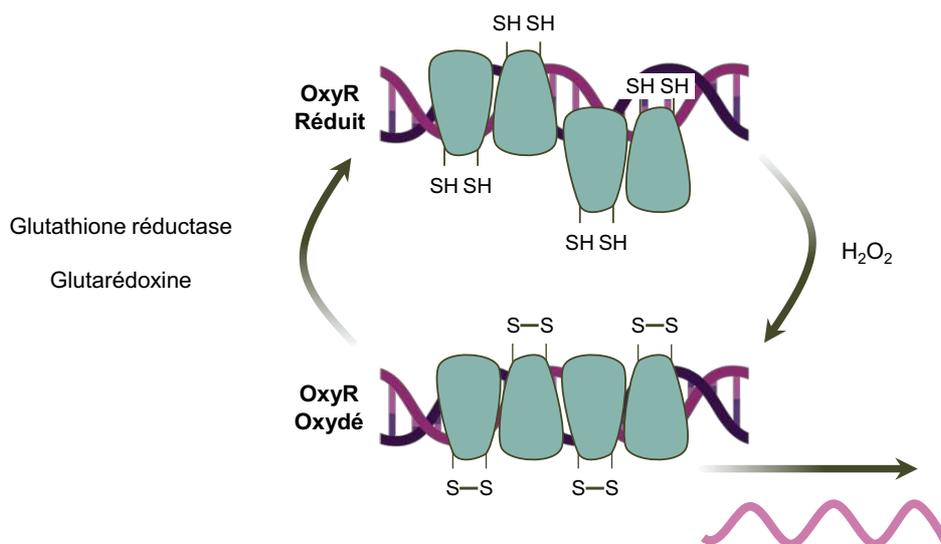


Figure 22. Mécanisme d'activation d'OxyR

Adapté de ^{59,86,101}

Tableau 4. Opérons régulés par OxyR

Adapté de ⁸⁶

Operon	Fonction
<u>Régulés positivement</u>	
<i>ahpCF</i>	Reductase alkyl hydroperoxide
<i>dps</i>	Protéine d'attachement et stockage de fer
<i>dsbG</i>	Disulfure isomérase périplasmique, thiol-disulfide oxidase
<i>f497</i>	Inconnue
<i>fpg</i>	Formamidopyrimidine
<i>fur</i>	Régulateur transcriptionnel d'attachement à l'ADN
<i>gofA</i>	Glutathione oxidoréductase
<i>grxA</i>	Glutarédoxine 1
<i>hcp</i>	Protéine de cluster hybride [4Fe-2S-2O] dans des réductases anaerobiques terminales
<i>hemH</i>	Ferrochelatase
<i>katG</i>	Catalase.hydroperoxydase 1
<i>oxyS</i>	Regulatory sRNA
<i>mntH</i>	Transporteur de manganèse/divalent cation
<i>rscC</i>	Kinase sensitive hybride dans un système de régulation à deux composants avec RcsB et YojN
<i>sufABCD</i>	Protéine d'assemblage des clusters Fe-S cluster; complexe SufBCD; sélénocystéine
<i>SE</i>	lyase; protéine acceptrice de soufre
<i>trxB</i>	Thioredoxin réductase
<i>trxC</i>	Thioredoxin 2
<i>yaaA</i>	Protéine conservée
<i>yaiA</i>	Protéine de fonction inconnue

<i>ybjM</i>	Protéine de membrane interne
<i>yhjA</i>	Predicted cytochrome C peroxidase
<i>yljA</i>	Protéine régulatrice de la spécificité du substrat de la ClpA

Régulés négativement

<i>agn43</i>	Antigène 43 (Ag43). Auto-transporteur de phase variable de la membrane externe
<i>fhuF</i>	Réductase de fer impliquée dans le transport de l'hydroximate ferrique
<i>oxyR</i>	Régulateur transcriptionnel d'attachement à l'ADN
<i>mom</i>	
(<i>oMu</i>)	Modification de l'ADN
<i>stiA</i>	Sous-unité fimbriale
<i>yaeH</i>	Protéine conservée
<i>ydcH</i>	Protéine de fonction inconnue
<i>ydeN</i>	Protéine conservée
<i>ytfK</i>	Protéine conservée
<i>uxuA</i>	Mannonate hydrolase
Autres	
<i>gtrABC</i>	Bactoprenol-linked glucose translocase; bactoprenol glucosyl transferase;
(<i>oP22</i>)	glucosyltransferase
<i>ydf</i>	Protéine de membrane interne

SoxR est une protéine de 17kDa qui forme des homodimères. Elle est inactive à l'état réduit, mais lors de l'oxydation univalente de ces clusters 2Fe-2S par l' O_2^- , le NO ou des niveaux élevés d' H_2O_2 , SoxR subit un changement conformationnel qui lui permet de restructurer l'espaceur du promoteur du gène *soxS* pour induire sa transcription par l'ARN-polymérase (**Figure 23**)¹⁰². A son tour, la protéine de 13kDa SoxS, fonctionne comme un facteur de transcription secondaire et régule positivement l'expression de 119 gènes chez *E. coli*^{59,86,103}.

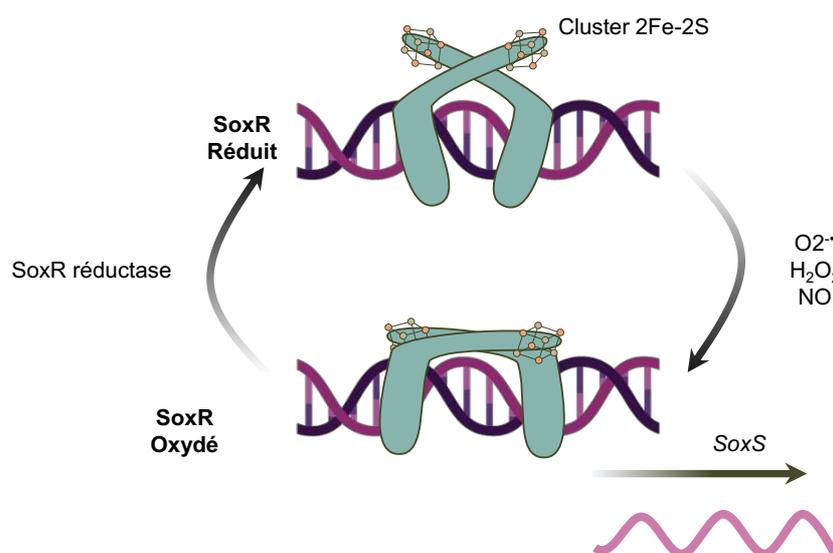


Figure 23. Mécanisme d'activation de SoxR

Adapté de ^{59,86,102}

Au total, les effecteurs de ces régulateurs font face au stress oxydant par la diminution de la concentration intracellulaire de ROS : en produisant des enzymes antioxydantes, des tampons redox et en adaptant leur métabolisme. De plus, elles produisent des enzymes d'oxydoréductases pour réparer les protéines oxydées, et expriment des enzymes résistantes à l' $O_2^{\bullet-}$ (Figure 24).

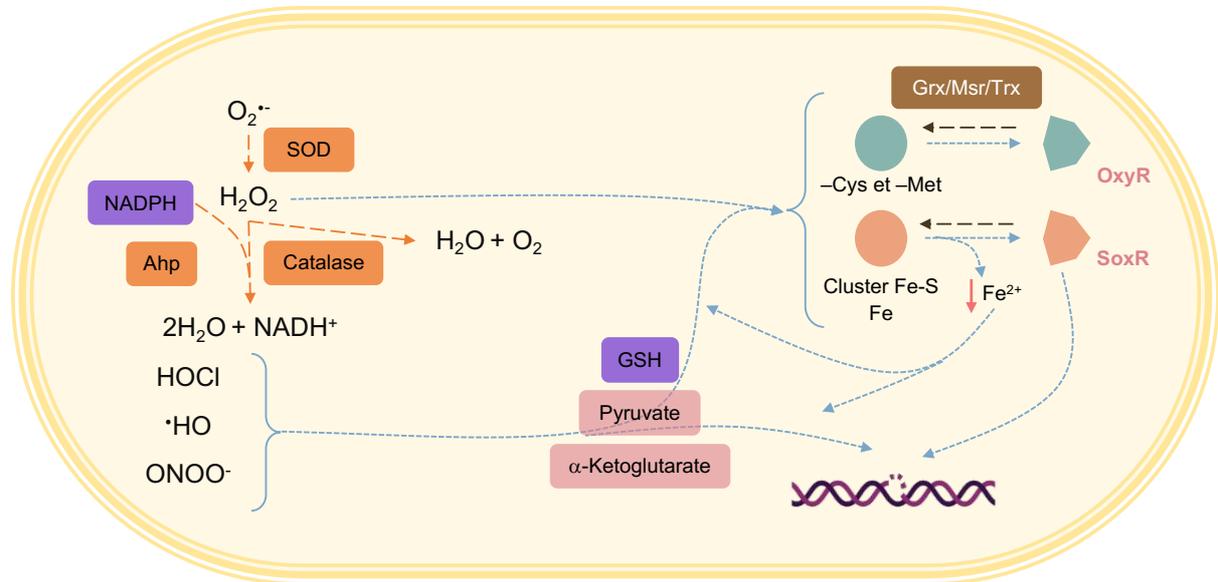


Figure 24. Résumé des réponses au stress oxydant

En orange sont représentées les enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase SOD, la catalase et l'alkyl hydroperoxyde réductase Ahp). En violet, les tampons redox (le NADPH et le glutathion). En rose, les voies métaboliques qui produisent du pyruvate et α -ketoglutarate et diminuent la captation de fer. En brun, les enzymes oxydoréductases (thiorédoxines et glutarédoxines).

II.2.2. Enzymes antioxydantes, tampons redox et modifications du métabolisme

Un premier mécanisme pour diminuer la concentration des ROS intracellulaires consiste en l'expression d'enzymes capables de les transformer en molécules non réactives^{86,99}. *E. coli* possède trois superoxyde dismutases (SOD) : MnSOD (*sodA*), FeSOD (*sodB*) – cytoplasmiques –, et CuZnSOD (*sodC*) – périplasmique –, qui transforment l' $O_2^{\bullet-}$ en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le H_2O_2 est ensuite dégradé pour produire H_2O et O_2 par les catalases (dénommés alkyl hydroperoxyde réductase (Ahp), Hydroperoxydase I (KatG) et hydroperoxydase II (KatE) chez *E. coli*) (Figure 25)^{59,86}.

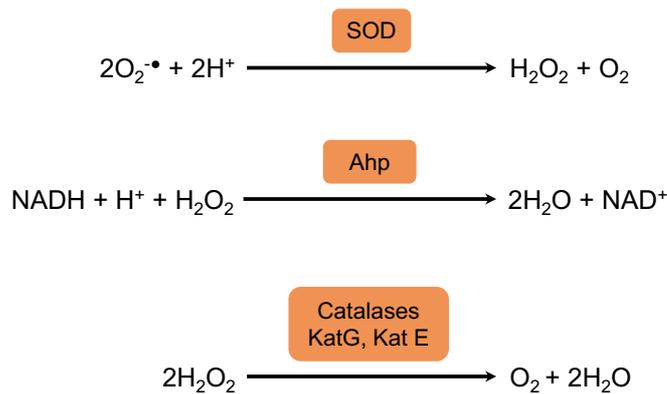


Figure 25. Réactions antioxydantes

Adapté de ⁵⁹.

L'hydroperoxyde réductase (Ahp) a besoin de NADH comme réducteur stœchiométrique, et pourtant son fonctionnement est limité par la concentration de NADH produit par le métabolisme bactérien. L'Ahp est donc saturée à des concentrations d'H₂O₂ supérieures à 20µM, seuil à partir duquel les autres catalases sont induites⁵⁹.

Les bactéries parviennent aussi à dégrader les ROS ayant réussi à rentrer dans la cellule en produisant des tampons cytoplasmiques et périplasmiques comme le glutathion^{xv}. En plus de son activité de tampon, le glutathion empêche l'oxydation irréversible du Cys (formation de l'acide sulfonique) à travers la formation des liaisons glutathion-acide sulfonique sur les protéines oxydées ⁸⁷.

Finalement, l'activation des réponses OxyR et SoxR/S cause une modification de l'activité métabolique basale de la bactérie, pour privilégier des voies qui produisent le NADPH (voie des pentoses phosphate¹⁰⁴), cofacteur pour les systèmes antioxydants (Ahp, glutathion réductase) ; ou des métabolites susceptibles d'être décarboxylés pour former des produits non réactifs (pyruvate, 'α-Ketoglutarate)(**Figure 25**)⁹⁹.

^{xv} Glutathion réduit les liens disulfure en agissant comme un donneur d'électrons. Une fois oxydé, le glutathion est réduit par la glutathion réductase, qui utilise la NADPH comme donneur d'électrons.

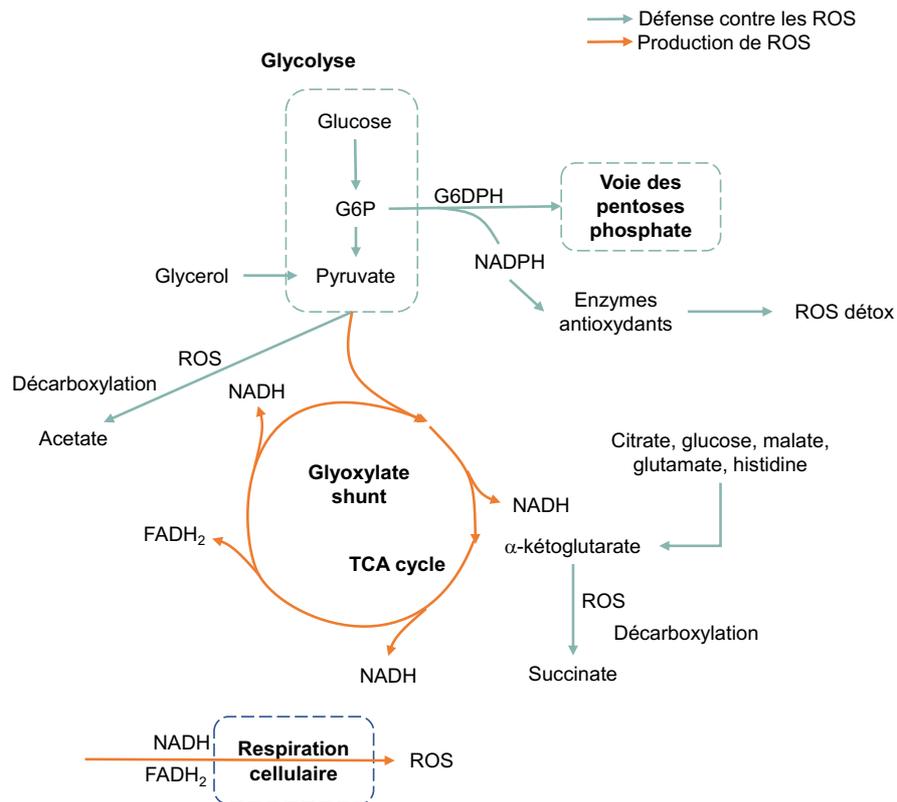


Figure 26. Voies métaboliques productrices de ROS, des métabolites antioxydants et ses alternatives

Adapté de ⁹⁹

L'adaptation métabolique cherche aussi à diminuer la production intracellulaire des ROS, par le métabolisme aérobie bactérien (**Figure 26**), ou par la transformation des ROS externes vers des espèces plus stables et réactives par la voie de la réaction de Fenton (**Figure 27**). La bactérie oriente donc son métabolisme vers des voies qui produisent moins de ROS (Glyoxylate shunt pour éviter la formation de $FADH_2$), et augmente l'expression de Fur, principal répresseur des gènes chargés de l'acquisition et de l'homéostasie du fer ^{52,86,99}.

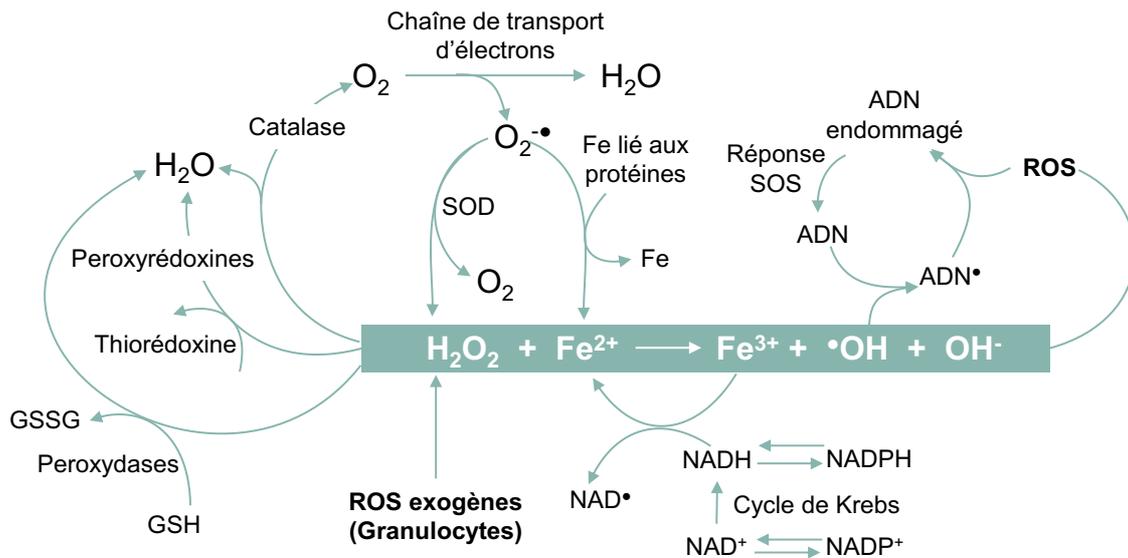


Figure 27. Réactions de Fenton

Adapté de ^{88,89}

II.2.3. Réparation des dommages aux protéines

Ces réseaux de gènes pour faire face au stress oxydant peuvent exprimer des oxydoréductases ; enzymes capables de réduire le radical oxydé pour revenir à la forme -thiol (thiorédoxines et glutarédoxines) originale ⁸⁷.

Les thiorédoxines (Trx) ont un motif catalytique CXXC. Le motif amino-terminal est une Cys présente sous forme de thiolate à l'état physiologique. La formation d'un pont disulfure intermédiaire avec le substrat est la première étape pour le réduire. Cette interaction cause la déprotonation du deuxième résidu Cys, stabilisé par la formation des liaisons hydrogène avec d'autres acides aminés adjacents. Le Cys déprotoné brise le lien disulfure intermédiaire par une attaque neutrophilique, libérant ainsi le substrat réduit. La régénération du motif CXXC réduit est réalisée par la Trx réductase, une flavoenzyme dépendante du NADPH (Figure 28). *E. coli* exprime Trx1 en conditions de stress oxydant, et Trx2 pour aider la maintenance de l'activité catalytique des enzymes avec des activités redox en conditions physiologiques et de stress ⁸⁷.

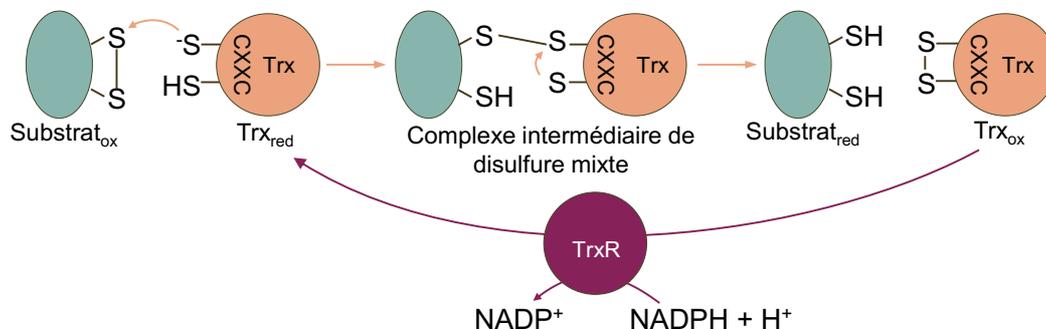


Figure 28. Mécanisme de réparation par les thiorédoxines

D'après ⁸⁷

La plupart des glutarédoxines (Grx) partagent la structure CXXC des Trx, ou portent un site catalytique CXXS. *E. coli* exprime Grx1, 2, 3 (CXXC), capables de réduire les Cys oxydées, et Grx4 (CXXS), qui aident à la formation des *clusters* Fe-S. Les Grx fonctionnent de façon similaire aux Trx et sont alors réduites par le glutathion, qui à son tour est réduit par la glutathion réductase (**Figure 29**)⁸⁷.

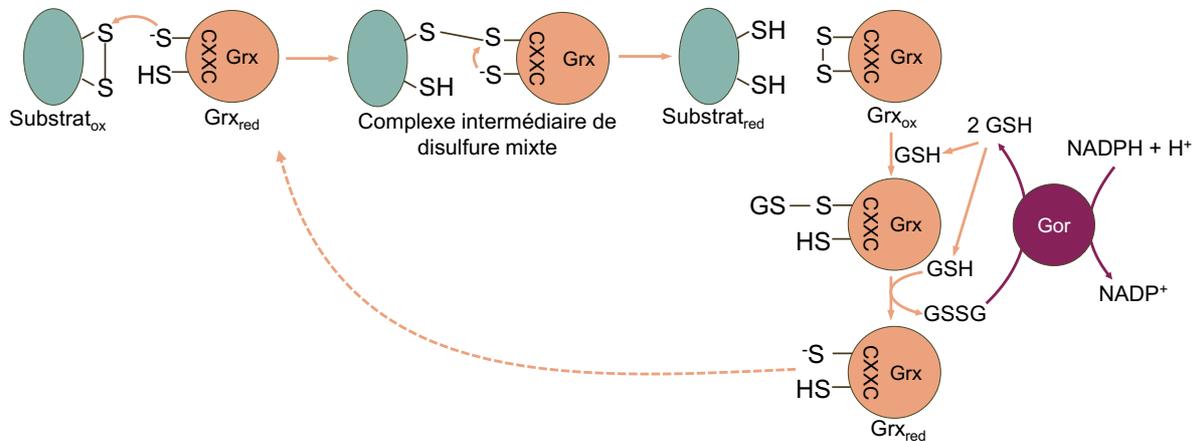


Figure 29. Mécanisme de réparation protéique par les glutarédoxines
D'après⁸⁷.

La réparation des résidus Méthionine est accomplie par les méthionine-sulfoxyde réductases (Msr), des oxydoréductases hautement conservées. *E. coli* exprime les MsrA, B, C et la biotin sulfoxyde réductase (BisC). MsrA et B sont des enzymes stéréospécifiques^{xvi}, capables de réduire le Met-O libre ou dans les protéines. Le mécanisme catalytique consiste en l'utilisation d'un résidu Cys nucléophile pour attaquer le substrat et libérer une Met réduite en oxydant le thiol vers l'acide sulfoxyde. Dans un deuxième temps, un autre résidu Cys de Msr fait une attaque nucléophile sur le résidu oxydé précédemment pour former un pont disulfure intermédiaire, en libérant une molécule d'eau. La Msr oxydée est ensuite réduite par une Trx pour la rendre active à nouveau (**Figure 30**)⁸⁷.

^{xvi} MsrA et MsrB ont la même structure tridimensionnelle disposée en miroir ; MsrA réduit Met-S-O et MsrB réduit Met-R-O.⁸⁷

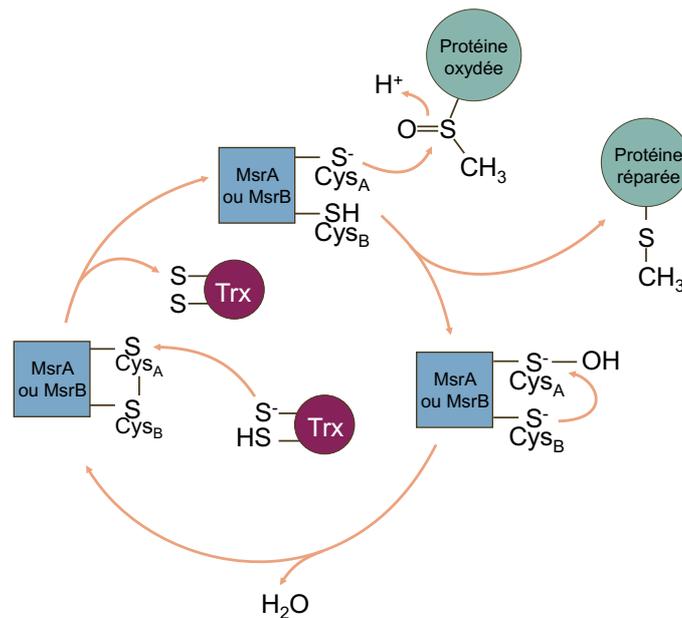


Figure 30. Mécanisme de réparation protéique par les méthionine-sulfoxide réductases.
D'après⁸⁷.

Le taux de dommage des protéines portant des cluster Fe-S est tellement élevé ($5 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$), que même à des concentrations minimales de O_2^- (10^{-10}M), le temps moyen pour endommager une enzyme de façon irréversible est de 20 minutes. Les cellules restent toutefois viables grâce à la réparation constante des clusters endommagés par des réactions de réduction et re-métalisation. Les protéines YggX et YtfE, membres du régulon SoxR/S sont chargées de ces activités. L'activation du régulon SoxR/S peut aussi induire l'expression des déshydratases résistantes à l' O_2^- (comme l'aconitase A pour remplacer l'aconitase B sensible à l' O_2^-) ou des enzymes déshydratases indépendantes du Fe-S comme la Fumarase C⁵⁹.

Enfin, les dommages produits à des enzymes portant un Fe unique sont généralement reversés par l'addition d'un Fe^{2+} , ou par le remplacement de l'atome du fer par du manganèse ; un cofacteur résistant à l' H_2O_2 , qui permet de garder une activité catalytique similaire à celle du fer⁵⁹.

Puisque les mécanismes qui permettent la survie des bactéries aux dommages de l'ADN doivent être mis en place indépendamment du type de lésion, la régulation de cette réponse est faite par des systèmes globaux de réponse aux stress : la réponse SOS et RpoS.

Le régulon RpoS, facteur sigma de la phase stationnaire, est induit par différents types de stress pendant la phase de croissance exponentielle de *E. coli*. Ce régulon contrôle la transcription par exemple des gènes pour l'expression des catalases (KatE et KatG) et des chélateurs de fer, mais aussi de l'ADN-polymérase IV (gène *dinB*), pour protéger et réparer l'ADN face au stress oxydant, de façon complémentaire à l'activité de OxyR et SOS⁹⁰.

II.3. La réponse SOS

Les dommages à l'ADN qui conduisent à l'arrêt de la fourche de réplication ont pour conséquence le réarrangement génomique, la mutagenèse ou notamment, la mort cellulaire.

Pour faire face à ces dommages, les bactéries ont sélectionné un système inductible de réparation qui facilite également leur adaptation à des environnements hostiles : la réponse SOS¹⁰⁵.

Le régulon SOS est hautement conservé, avec des homologues de son répresseur universel LexA présents dans la majorité des génomes bactériens séquencés (sauf chez *Streptococcus*, les groupes *Bacteroidetes*-Green sulfur et *Epsilonproteobacteria*). L'étude de la présence du gène *recA* et des unités transcriptionnelles réprimées par LexA a mis en évidence la grande variabilité des réseaux des gènes SOS-régulés chez les bactéries (**Figure 31**). Ces réseaux varient en termes de nombre et de fonctions des gènes qu'ils contiennent. Toutefois, un groupe de gènes paraît conservé dans différents phyla bactériens, surtout les plus proches de *E. coli* : *lexA*, *recA*, *ssb*, *urvA* et *ruvAB*, impliqués dans la régulation SOS, la stabilisation de l'ADN simple brin, et sa réparation¹⁰⁶.

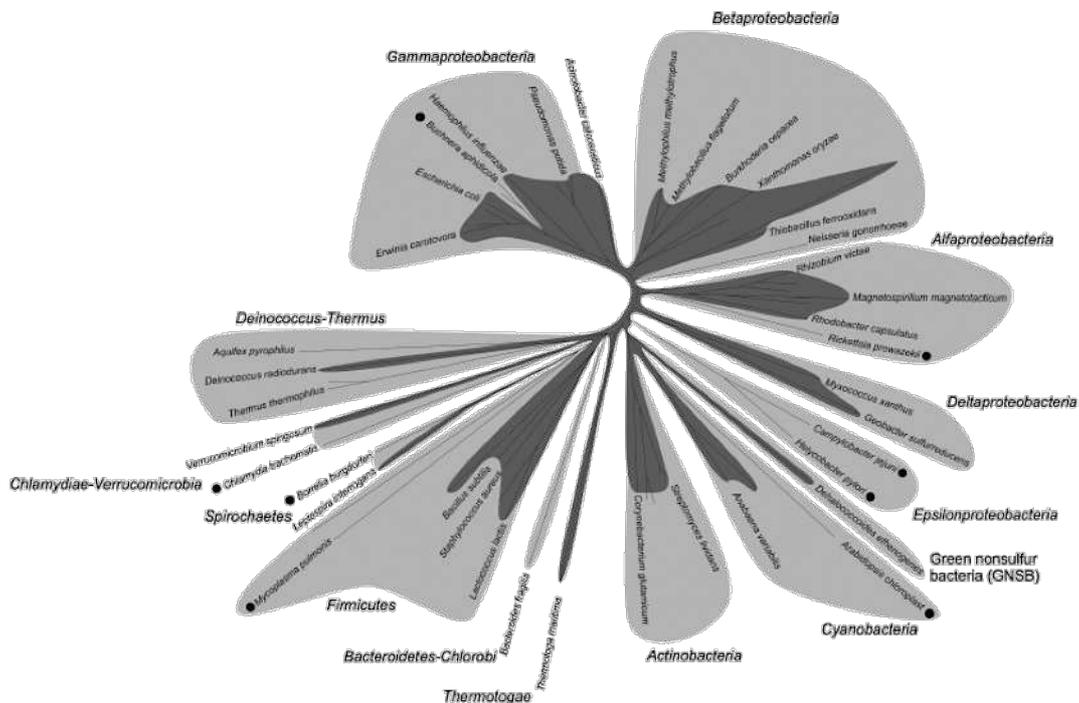


Figure 31. Distribution du gène *lexA* dans le domaine bactérien

Basée sur la distribution phylogénétique dérivée des séquences *recA*. En gris clair, les groupes phylogénétiques, et en gris foncé, les aires où le gène *lexA* est présent. Les cercles marquent les espèces avec des gènes SOS-régulés moins nombreux. D'après ¹⁰⁶.

L'expression de gènes du régulon SOS assure la survie bactérienne par l'activation coordonnée d'enzymes responsables du maintien de l'intégrité de la fourche de réplication, de la réparation de l'ADN, de la prévention de la division cellulaire prématurée, et de l'activation des voies tolérantes aux dommages pour assurer la continuité de la réplication lorsque les dommages ne peuvent pas être réparés ^{88,90,107-109}.

La protéine LexA ne régule pas uniquement des gènes chargés de maintenir l'intégrité du génome. Dans certaines espèces, les gènes régulés par la réponse SOS sont impliqués dans le fitness bactérien, avec des variations en fonction des types de stress que chaque espèce rencontre dans sa niche environnementale ^{106,110}. Il peut aussi s'agir de gènes portés par les éléments génétiques mobiles transmis par transfert horizontal (plasmides, phages, éléments

conjugatifs intégratifs (ICE), intégrons), habituellement avec des fonctions de virulence, d'adaptation ou de résistance aux antibiotiques ¹¹⁰.

Chez *E. coli*, le régulon est composé de plus de 50 gènes avec des fonctions liées à la réparation de l'ADN par recombinaison homologe, la synthèse translésionnelle, l'arrêt du cycle cellulaire, et l'induction de facteurs de virulence ^{90,106,108,109,111}.

II.3.1. Inducteurs de la réponse SOS

Indépendamment de son origine, les dommages à l'ADN sont perçus par les bactéries principalement *via* la formation d'ADNsb ^{112,113}.

Ils existent plusieurs situations dans la vie d'une bactérie qui impliquent l'apparition de fragments d'ADNsb : le stress oxydant détaillé précédemment, à travers les ROS mais aussi des chromates ou des espèces réactifs du nitrogène (RNS) ; la radiation UV ; les ultrasons ; et finalement les molécules qui interfèrent avec la réplication de l'ADN, à la fois d'origine externe (comme certains antibiotiques) ou interne, via des seconds messagers (Mrr induit par l'augmentation de la pression, ou DpiBA par les bêta-lactamines). Toutefois, les dommages à l'ADN ne sont pas la seule source d'ADNsb ; l'ADN acquis par transfert horizontal (conjugaison, transduction et transformation) arrive aussi sous la forme d'ADNsb et peut activer la réponse SOS ^{106,114}.

Enfin, la réponse SOS peut être activée en l'absence de fragments d'ADNsb, par des signaux de stress environnementaux comme la privation de nutriments (par les niveaux de cAMP) ou le pH basique (par induction directe de l'autoprotéolyse du répresseur LexA) (**Figure 32**) ¹⁰⁶.

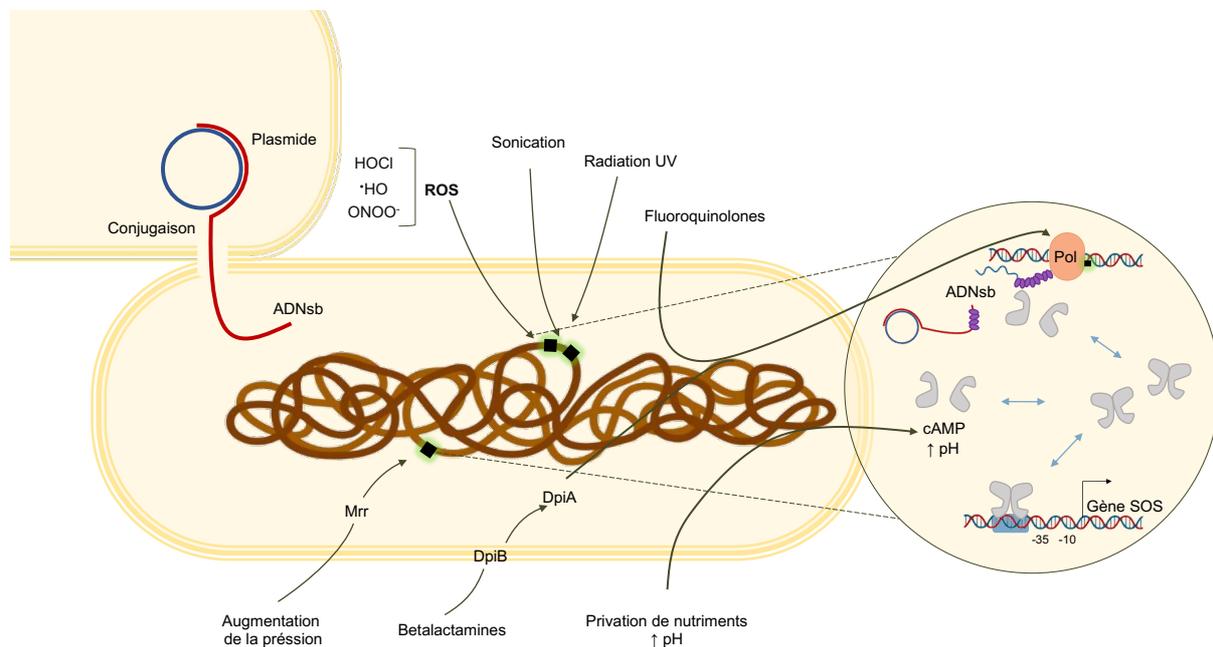


Figure 32. Résumé des inducteurs de la réponse SOS

Adapté de ¹⁰⁶

II.3.2. Induction de la réponse SOS

À l'état basal le régulon SOS est réprimé par l'attachement de la protéine LexA sur des séquences spécifiques appelées « boîtes LexA » qui sont localisées sur les régions opératrices des gènes du régulon¹¹⁵. Pendant la phase de croissance normale, *E. coli* contient 1300 molécules de LexA¹¹³. LexA forme des homodimères liés par le domaine C-terminal, qui peuvent être libres dans le cytoplasme (20 %) ou attachés aux boîtes LexA (80 %) (Figure 33).

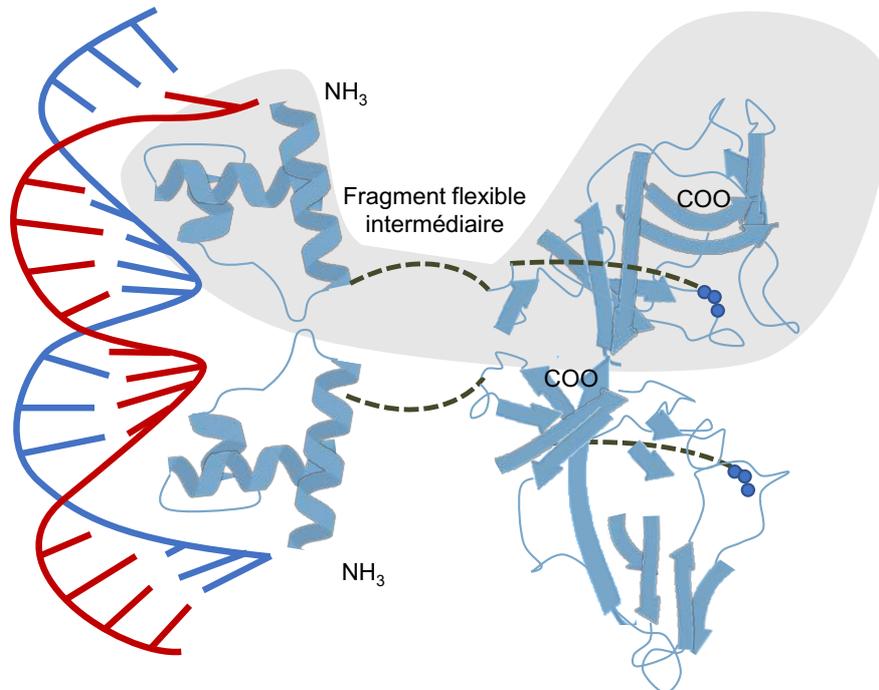


Figure 33. Représentation du répresseur LexA, dimérisation et interaction avec l'ADN

Adapté de ^{116,117}. La protéine LexA (bleu clair), principal répresseur du régulon SOS, est composée de deux domaines : un domaine N-terminal d'attachement à l'ADN ; et un domaine C-terminal qui permet la dimérisation et porte une activité protéase latente. Les deux domaines sont reliés par un court fragment intermédiaire flexible. Adapté de ¹¹⁶.

La protéine LexA a une forte affinité pour la séquence « 5'-CTG(TN)₈ACAG-3' » ; les séquences qui ressemblent le plus à cette séquence consensus sont plus fortement réprimées par LexA. Le niveau d'affinité et donc de répression est inversement proportionnel au niveau de déviation ou « hétérogénéité » de la séquence LexA par rapport à cette séquence consensus ^{115,118}.

Une caractéristique clé de la réponse SOS est l'induction coordonnée de gènes individuels du régulon (**Figure 34**) : l'ordre d'induction et la force d'expression de chaque gène du régulon dépendent du niveau d'hétérogénéité de la séquence LexA, et du nombre de boîtes LexA présentes dans la séquence promotrice ^{111,115}

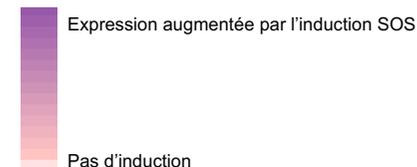
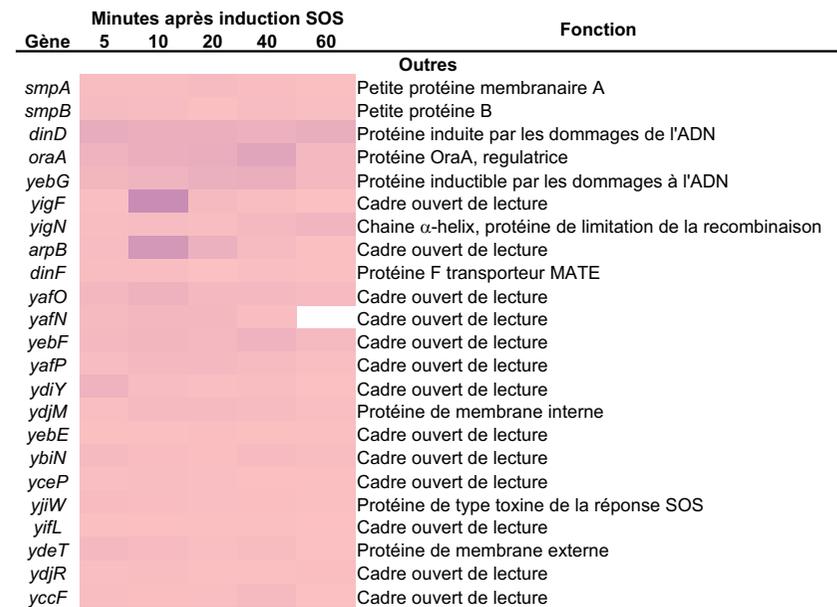
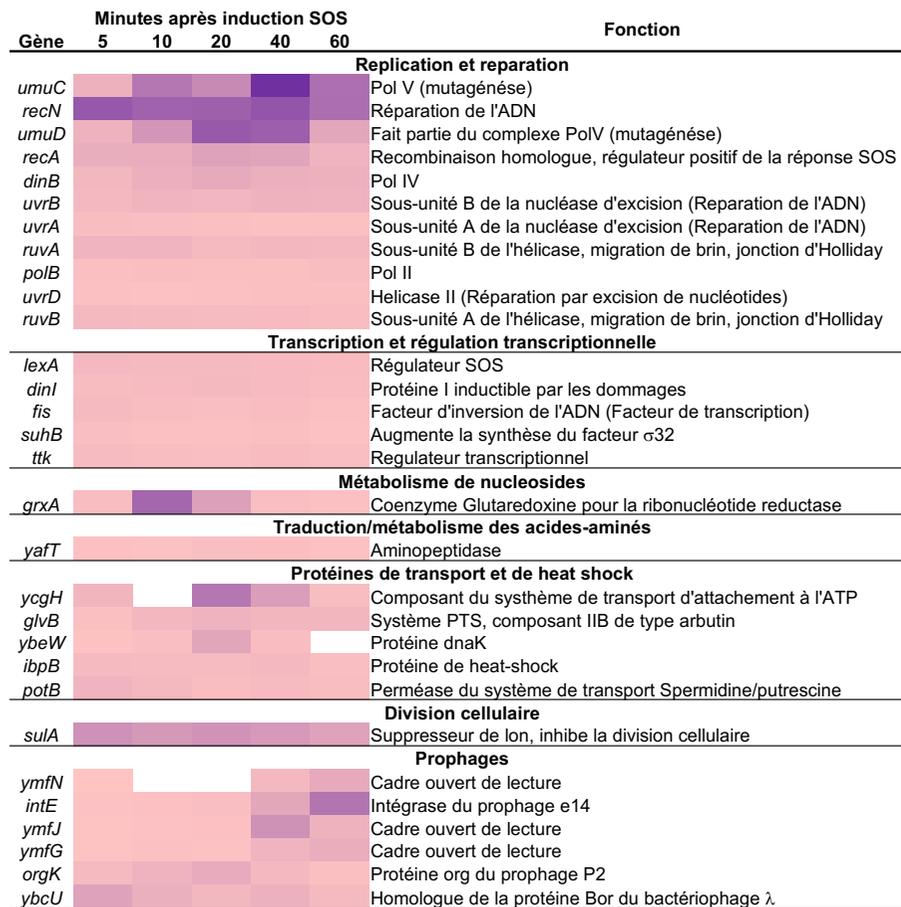


Figure 34. Gènes régulés par la réponse SOS

Adapté de ¹¹¹.

L'activation de la réponse SOS est contrôlée par la protéine RecA. La famille des recombinases de type RecA est présente dans tous les organismes. Ces protéines jouent un rôle central dans la recombinaison homologue, nécessaire pour la réparation des dommages de l'ADN dans les organismes procaryotes ou la méiose dans les organismes eucaryotes ¹¹⁹.

À l'état basal, *E. coli* contient 7000 molécules de RecA (**Figure 35**) ¹¹⁹.

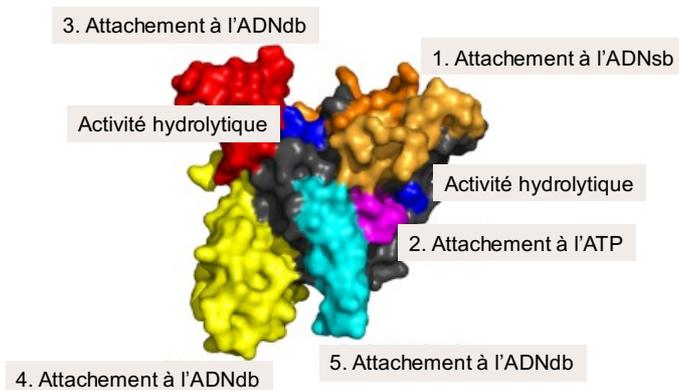


Figure 35. Structure de la protéine RecA. Adaptée de ^{119,120}. RecA est une protéine multifonctionnelle oligomérique de 38kDa composée de trois domaines : un domaine central avec des sites d'attachement à l'ADNsb, où a lieu l'activité ADNsb-ADNdb recombinase (1, orange), proche du site d'attachement à l'ATP portant l'activité hydrolytique (2, bleu) ; un domaine N-terminal qui lui permet d'interagir avec d'autres monomères ; et un domaine C-terminal qui permet l'entrée de l'ADNdb dans d'autres régions du chromosome bactérien (3, 4, 5, rouge, jaune, bleu clair).

La protéine RecA a plusieurs activités : une activité **co-protéase** qui lui permet de réguler la synthèse et l'activité des protéines de réparation de l'ADN par l'induction de la réponse SOS ; une activité **recombinase**, importante pour l'association à l'ADNsb et sa réparation par recombinaison homologue ^{119,121} ; et une activité **ATPase**, nécessaire pour maintenir sa forme active, pour l'échange correct des brins pendant la recombinaison homologue, et pour faciliter la régression de la fourche de réplication ¹²².

La protéine RecA reconnaît et s'attache à des fragments d'ADNsb formant un nucléofilament. Ce nucléofilament existe en deux états : comprimé inactif en absence d'ATP, et étendu actif en présence d'ATP (**Figure 36**) ¹²³.

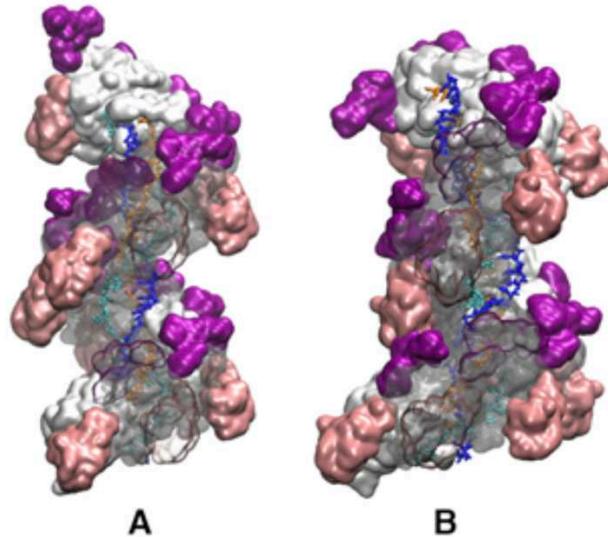


Figure 36. Nucléofilament de RecA-ADNsb

D'après ^{120,123}. Deux tours d'ADNsb couverts du filament de RecA polymérisé. Chaque sous-unité de RecA se fixe à 3 bases sur l'ADNsb, et chaque tour d'ADNsb lie 6 monomères de RecA. Sur l'image A le nucléofilament est attaché à l'ATP. L'image B montre le changement de la géométrie du nucléofilament par l'attachement à l'ADP au lieu de l'ATP.

II.3.2.1. Activité co-protéase de RecA

Le nucléofilament actif (étendu) de RecA-ADNsb, même en l'absence d'hydrolyse d'ATP ¹²⁴, interagit avec les homodimères de LexA libres ¹¹⁸. Le nucléofilament actif induit l'activité protéase du domaine C-terminal de LexA et cause son autoclivage ¹²⁵. L'autoprotéolyse et la séparation des dimères de LexA rendent accessible un marqueur de dégradation localisé dans les domaines de liaison à l'ADN ¹¹⁷ pour la dégradation par les protéases ClpXP et Lon ^{126,127}. Cette lyse résulte en la diminution de la concentration intracellulaire de LexA de 2 à 0,2µM, et provoque la dissociation des homodimères de LexA attachés aux gènes du régulon, permettant ainsi leur expression (**Figure 37**) ^{76,90,128}.

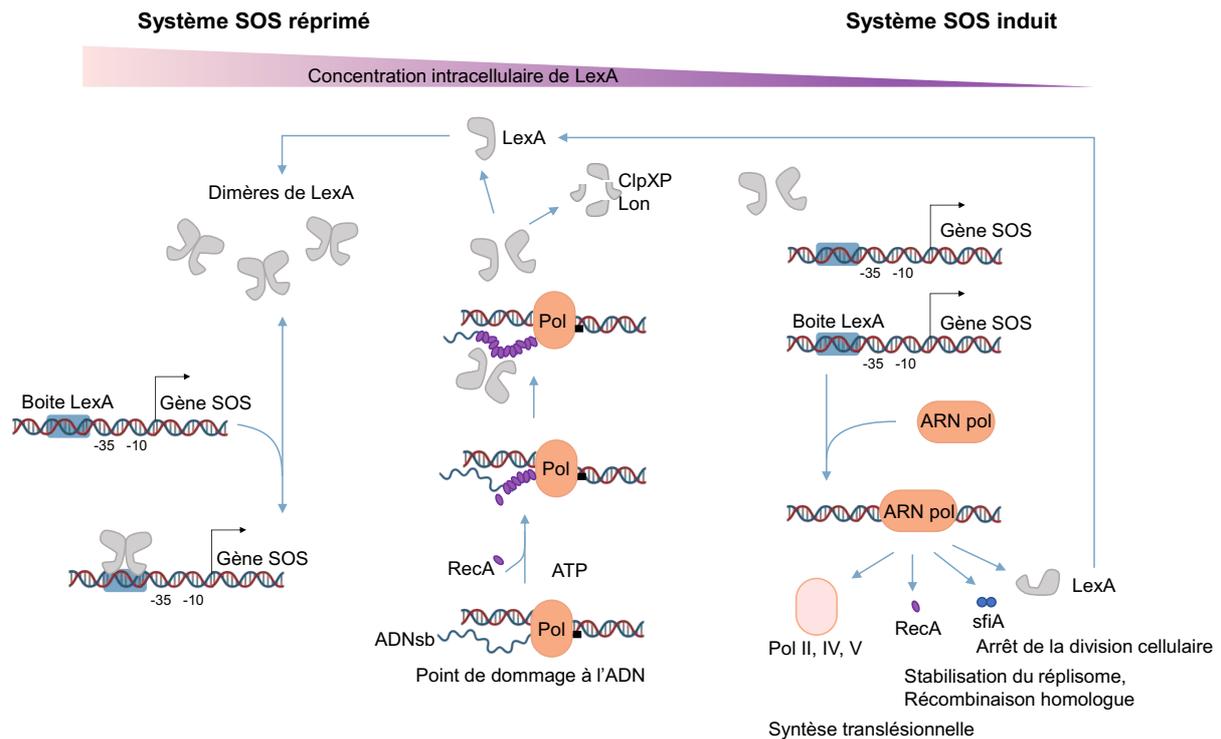


Figure 37. Régulation SOS par LexA et RecA

Adapté de ¹²⁸

Cette réponse graduelle est adaptée dans le temps par rapport au niveau de dommage subi : un bas niveau de dommage produit moins de nucléofilaments et active uniquement les gènes avec des faibles affinités pour LexA ; les gènes induits par des niveaux plus importants de dommage ont une affinité plus forte pour LexA. Ainsi, les gènes activés en premier sont chargés de la protection et de la maintenance structurelle du réplisome en tolérant les dommages à l'ADN, ainsi que la diminution de la vitesse de déplacement de la fourche de réplication pour permettre la réparation par excision des nucléotides (*Nucleotide excision repair*, NER) (**Error! Reference source not found.**^{108,111,129}).

L'activation de la réponse SOS induit l'expression de *sfiA* (*sulA*), un « *checkpoint inhibiteur* » du cycle cellulaire bactérien, qui agit par l'inhibition de la polymérisation de FtsZ, un élément structural du cytosquelette nécessaire pour la division cellulaire. Cet arrêt du cycle cellulaire donne à la bactérie le temps de se réparer^{105,109,130}.

La protéine LexA a une fonction de répression non seulement à l'état basal, mais aussi de régulation négative après l'induction de la réponse SOS. Le gène *lexA* fait partie des gènes du régulon SOS et pourtant sa production constante sous l'induction du régulon permet de l'accumuler : quand le signal toxique disparaît, LexA n'est plus clivée, ce qui permet à la bactérie de retourner vers son état basal (**Figure 37**).

II.3.2.2. Activité recombinase de RecA et réparation SOS dépendante de l'ADN

La protéine RecA est activement impliquée dans différentes voies de réparation de l'ADN par induction de la réponse SOS comme décrit précédemment, par initiation de la recombinaison

homologue et l'activation de Pol V, par stabilisation de la fourche de réplication, et par priorisation des polymérase de synthèse translésionnelle en réponse aux dommages¹⁰⁷.

Face aux dommages aigus, les bactéries peuvent activer des réponses cellulaires pour récupérer la structure normale de la séquence d'ADN. Les réponses plus conservatives permettent le retour vers la structure originale sans mutations, par excision des éléments endommagés (excision des bases, excision des nucléotides ou des « *mismatch* »)⁸⁸. Dans la réparation par excision nucléotidique (*nucleotide excision repair*, NER) le complexe UvrAB reconnaît le segment endommagé, UvrC coupe ce segment pour que l'hélicase UvrD l'enlève. Le fragment est ensuite remplacé par l'ADN-polymérase I à haute-fidélité, et attaché au brin réparé par la ligase⁹⁰. UvrA, B, C et D font partie du régulon SOS, et sont induites tôt et par de faibles niveaux de dommages¹¹¹.

Si le niveau de dommage augmente ou persiste, des mécanismes pour atténuer les conséquences létales de l'arrêt de la réplication de l'ADN sont mis en place. Ce deuxième groupe de stratégies est dénommé « mécanismes de tolérance aux dommages » et inclut des mécanismes « libres d'erreurs » (*error free*) comme la recombinaison homologue et la recombinaison par régression de la fourche de réplication ; mais aussi des mécanismes sujets aux erreurs (*error prone*) comme la synthèse translésionnelle⁹⁰.

Ces trois mécanismes partent d'un événement commun : le blocage de la fourche de réplication par la rencontre d'une erreur. Dans le cas du stress oxydant, l'arrêt du réplisome peut être secondaire à l'oxydation de la thymine ou des riboses⁵⁹. Le réplisome peut se déplacer en aval de la lésion et créer de nouvelles amorces (*primers*) pour réinitier la réplication en contournant le fragment endommagé. Ce fragment intermédiaire est donc un segment d'ADNsb, protégé transitoirement par des SSB (protéines d'attachement à l'ADNsb ; *Single Strand DNA-Binding protein*)¹⁰⁹.

RecFor et RecBCD (régulés par la réponse SOS) recrutent RecA vers l'ADNsb, pour remplacer SSB. L'attachement de RecA et la formation du nucléofilament actif permettent l'induction de la réponse SOS, mais activent aussi son activité recombinase, nécessaire pour initier la recombinaison homologue^{88,90,107}.

II.3.2.2.1. Recombinaison homologue

Le nucléofilament actif RecA-ADNsb, dans ce contexte connu comme « filament présynaptique », s'attache à l'ADNdb et forme un « filament synaptique » qui se déplace à la recherche des régions d'homologie pour les utiliser comme base pour la réparation. Quand une région d'homologie est découverte, l'échange des brins forme le filament postsynaptique (**Figure 38**)^{119,123}. Le filament synaptique interroge les sites d'homologie sur le chromosome bactérien, mais aussi sur le brin jumeau (*sister strand*), produit de la réplication incomplète par un mécanisme de régression de la fourche de réplication, également médié par RecA¹²².

La réparation se finit par un événement de réplication médié par RuvABC (aussi régulé par la réponse SOS). Ce type de recombinaison généralement ne produit pas de mutations, mais augmente la probabilité de réarranger le chromosome par la recombinaison entre séquences similaires^{108,111,114}.

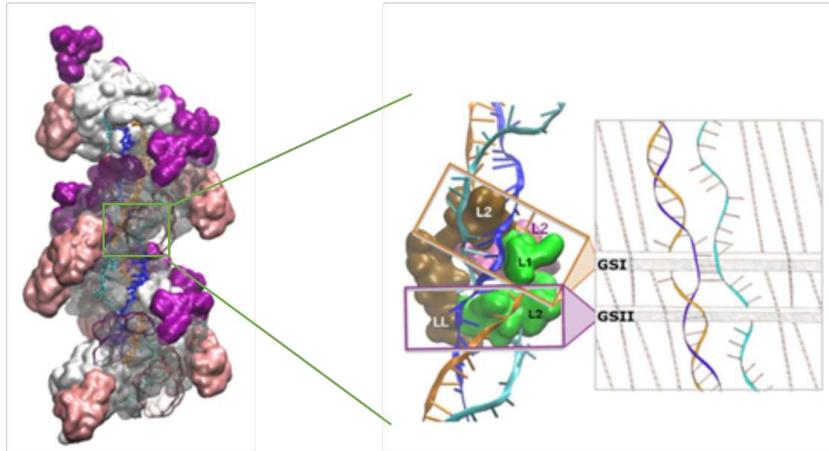


Figure 38. Formation du filament postsynaptique à l'aide de RecA

Adapté de ¹²⁰

II.3.2.2.2. Synthèse translésionnelle :

Si le niveau de lésion est trop important pour être complètement réparé, la synthèse translésionnelle est la dernière alternative pour permettre la réplication et la survie bactérienne.

L'association de RecA avec les fragments d'ADNsb cause un clivage protéolytique sur UmuD en l'activant. UmuD' activée forme un complexe avec UmuC : l'ADN-polymérase V (UmuD'₂C), capable de continuer la réplication de l'ADN indépendamment des changements de bases dans le site de lésion grâce à l'amplitude de son site catalytique. L'activité endonucléase sans relecture des polymérases du système de synthèse translésionnelle (Pol V [*umuCD*], Pol II [*polB*] et Pol IV [*dinB*]) entraîne une probabilité élevée de mutagenèse^{88,90,109}.

Finalement, RecA joue un rôle régulateur sur la transcription et la réplication, aidant la priorisation des voies de réparation utilisées par la bactérie. RecA stimule l'activité de la topoisomérase I, responsable du contrôle de la typologie de l'ADN, modulant l'activité transcriptionnelle en réponse aux dommages¹³¹. Sur la fourche de réplication, RecA inhibe la progression des réplisomes de Pol III (actives pendant l'activité de réplication basale de la bactérie), stimule la réplication par Pol II, Pol IV et Pol V (des réplisomes de réparation translésionnelle)¹¹², et initie la recombinaison homologue qui, par un mécanisme de compétition pour le substrat, limite la synthèse translésionnelle¹⁰⁷.

Chapitre III. Réponse SOS et résistance aux antibiotiques chez *E. coli*

L'induction de la réponse SOS a un impact sur l'apparition des résistances aux antibiotiques. En plus de la réparation de l'ADN, l'activation SOS augmente la plasticité du génome et l'apparition de mutations chromosomiques, et facilite le transfert horizontal de gènes. De plus, le répresseur universel du régulon SOS : LexA, régule aussi l'expression de gènes portés par des éléments génétiques mobiles ayant des fonctions de virulence ou de résistance aux antimicrobiens^{90,108}.

La plupart des antibiotiques utilisés actuellement sont des molécules produites ou dérivées de composés d'origine naturelle. Pourtant, la sélection des mécanismes pour surmonter leur action est le résultat de plusieurs siècles d'évolution, plus ancien que la découverte et l'utilisation des antibiotiques pour le traitement des infections humaines¹³².

D'un point de vue populationnel, la sélection des résistances apparaît quand une partie de la population originalement sensible développe une mutation ou acquiert des gènes de résistance par transfert horizontal, qui affectent l'action de l'antibiotique, préservant la survie en présence de la molécule. L'antibiotique élimine donc la population encore sensible, permettant la prédominance de la sous-population résistante.

Les stratégies de résistance sont classées en différentes catégories selon le mécanisme moléculaire utilisé : la mutation de la cible (qui provoque une diminution de l'affinité de l'antibiotique pour son site de fixation) ; la diminution de la concentration intra-cellulaire de l'antibiotique (par imperméabilité ou bien par l'activation des pompes d'efflux) ; l'inactivation enzymatique de l'antibiotique ou finalement, le changement des voies métaboliques.

Tous ces mécanismes peuvent être exprimés de façon naturelle (intrinsèque ou induite), ou acquise (par la mutation de gènes, ou par transfert horizontal des gènes de résistance) (**Figure 39**)¹³³.

Cibles des antibiotiques

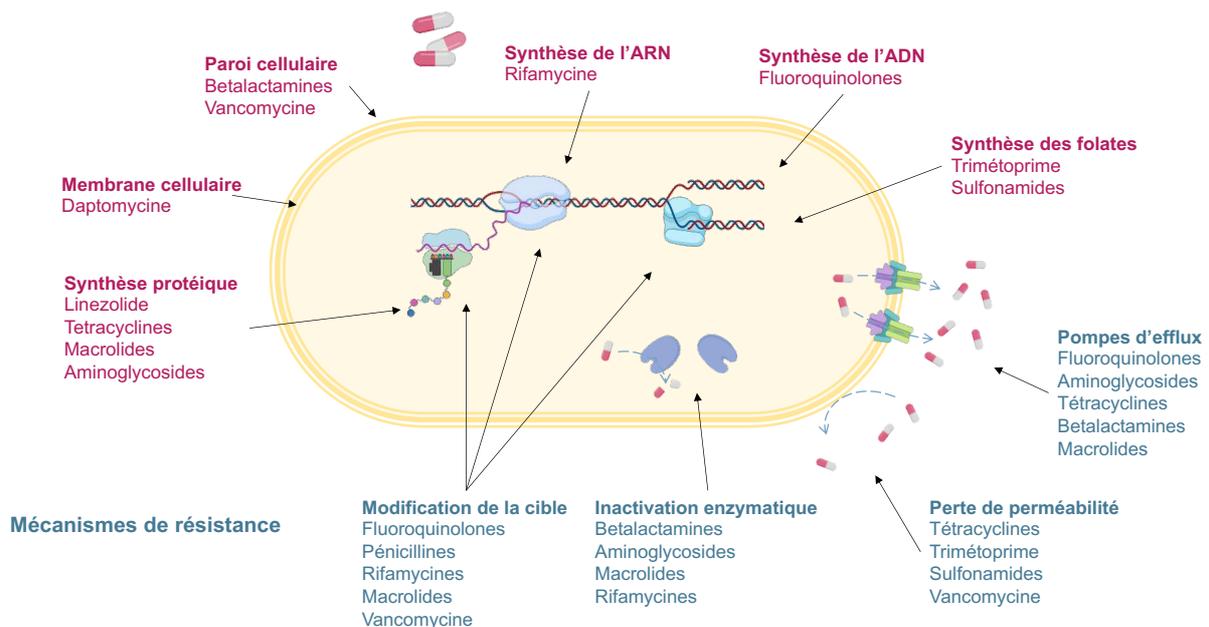


Figure 39. Résumé des cibles des antibiotiques et des mécanismes de résistance

Adapté de¹³³

I.1. Réponse SOS et résistance aux antibiotiques

Plusieurs mécanismes de résistance mentionnés dans la **Figure 39** passent par l'activation de la réponse SOS pour être acquis (mutations ponctuelles, réarrangement des cassettes de résistance dans un intégron de classe 1), disséminés (transfert de l'élément intégratif conjugatif SXT) ou exprimés (résistance plasmidique à la ciprofloxacine par l'expression du gène *qnrB2*).

I.1.1. Résistance par mutations chromosomiques et réponse SOS

Bien que des mutations ponctuelles puissent apparaître indépendamment de la réponse SOS, l'activation de cette dernière contribue à la conservation des mutations par les mécanismes de réparation expliqués dans la section II.3.2.2.2. L'association entre l'induction de la réponse SOS et l'augmentation de l'apparition de mutations chromosomiques a été démontrée à différents niveaux (**Figure 40**) :

- L'incubation de *E. coli* avec H₂O₂ 1 mM est associée à une augmentation des mutations par un mécanisme de substitution de base (9,3-fois), de décalage du cadre de lecture (66-fois) ou de recombinaison allélique principalement (22-fois)¹³⁴.
- La déficience d'enzymes antioxydantes chez *E. coli* (mutant *sodAsodB*) est associée à une augmentation du taux de mutations « spontanées » de 4 fois. Ce phénotype disparaît en croissance dans un milieu anaérobie ou par la complémentation du milieu avec un antioxydant (mimétique de la superoxyde dismutase, SOD)¹³⁵.
- L'inactivation de *recA* et *umuC* chez *E. coli* (mutants *recA56* et *umuC122*, respectivement) diminue la fréquence de mutations par substitution de base en croissance dans un milieu aérobie. La croissance de *E. coli* non muté en anaérobiose diminue la fréquence des mutations « spontanées », alors que cela n'a pas d'effet sur le niveau de mutations « spontanées » dans les mutants *recA* et *umuC*¹³⁶.
- L'activation constitutive de la réponse SOS (souche *E. coli recA730*) est associée à une augmentation du niveau des mutations spontanées. Pol IV (*dinB*) est responsable d'une augmentation de 3 fois, tandis que Pol V (*umuDC*) est associée à une augmentation de 10 fois de la fréquence de mutations¹³⁷.
- L'exposition de *E. coli* à la radiation UV induit une augmentation de la concentration de la protéine UmuD' sous-unité de l'ADN-polymérase V, d'une façon directement proportionnelle à la fréquence de mutations exprimée par la résistance à la rifampicine¹³⁸.
- L'exposition de *E. coli* à des agents cancérigènes (*N*-2-acétylamino-fluorène ou benzo(*a*)pyrène), induit l'apparition de mutations par décalage du cadre de lecture, d'une façon SOS dépendante¹³⁹.
- Le blocage de l'induction SOS par un mutant exprimant un LexA non clivable (*E. coli-lexAS119A*), inhibe l'évolution des souches résistantes à la ciprofloxacine (par mutation ponctuelle du gène *gyrA*) et à la rifampicine (par mutation du gène *rpoB*) *in vivo* et *in vitro*, après traitement avec la ciprofloxacine comme inducteur SOS¹⁴⁰.
- L'exposition de *Mycobacterium tuberculosis* aux dommages à l'ADN (par radiation UV, mitomycine ou H₂O₂) cause une augmentation de 20-50 fois de la fréquence de

mutants résistants à la rifampicine. Ces phénotypes n'ont pas été induits dans une souche mutante *recA*. L'ADN-polymérase DnaE2 a été prouvée responsable de l'augmentation de la fréquence de mutations après induction SOS, en causant des lésions de type substitution des bases, phénotype attendu pour une polymérase translésionnelle. Finalement, la délétion de *dnaE2* a été associée à une diminution de la charge bactérienne à long terme, diminution de la virulence (mesurée par le pourcentage de survie), et l'apparition de mutants résistants à la rifampicine dans un modèle murin d'infection¹⁴¹.

- L'induction des mutations par radiation UV chez *Caulobacter crescentus* induit la réponse SOS et l'expression des polymérases inducibles (*dnaE2*, *imuA* et *imuB*), avec une augmentation conséquente de la fréquence des mutants résistants à la rifampicine, par un mécanisme de mutation ponctuelle (transversions G :C – CG)¹⁴².
- L'exposition de *E. coli* entéropathogène (E22) à la ciprofloxacine ou à la zidovudine, inducteurs de la réponse SOS dans un modèle animal d'infection intestinale, résulte en l'émergence de résistance à la rifampicine (3 fois plus fréquente que dans les infections non traitées), minocycline et fosfomycine¹⁴³.
- L'exposition de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae* et *S. aureus* à différentes molécules anticancéreuses (dont le mécanisme d'action est basé sur l'interaction avec l'ADN), cause à la fois l'induction de la réponse SOS, et l'augmentation de la fréquence de mutants de *E. coli* résistants à la rifampicine, ainsi que de mutants de *P. aeruginosa* résistants à l'imipénème, de mutants de *S. aureus* résistants à la ciprofloxacine et de mutants de *E. cloacae* résistants au cefotaxime¹⁴⁴.

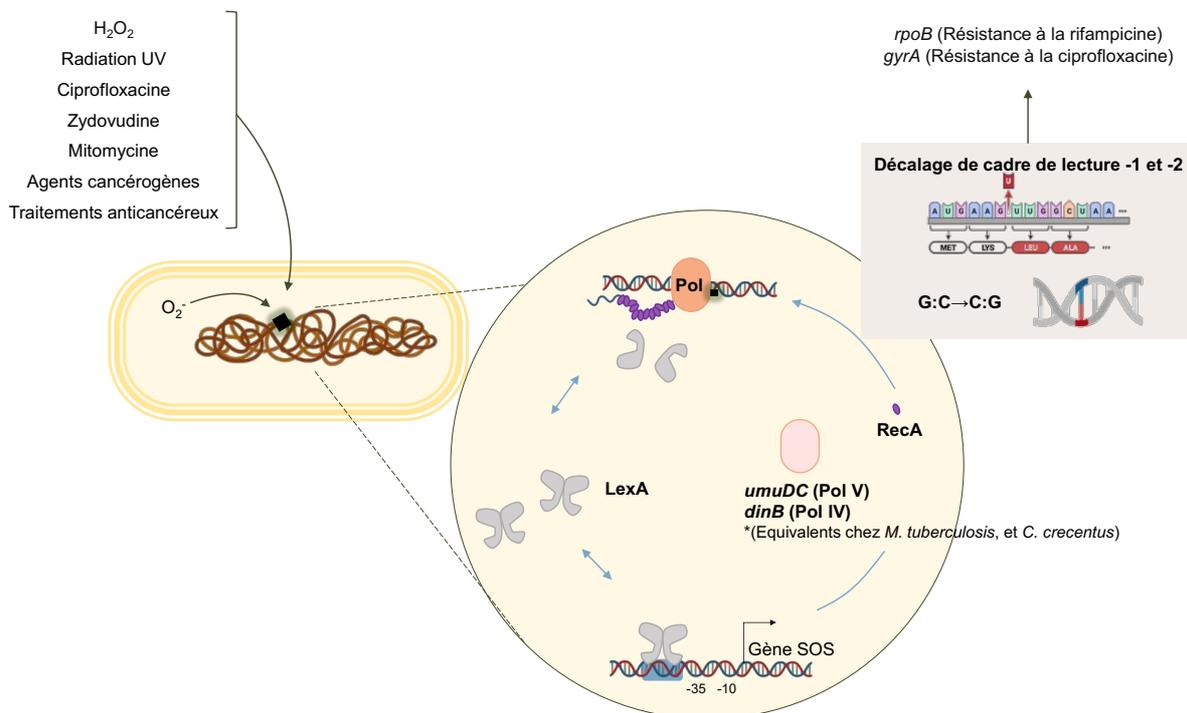


Figure 40. Résumé des études sur la relation entre l'induction SOS et l'augmentation de la résistance aux antibiotiques par mutation de la cible

I.1.2. Expression et dissémination de gènes de résistance par des éléments génétiques mobiles, sous régulation SOS

L'activité de LexA n'est pas limitée au régulon SOS et s'étend à divers éléments génétiques mobiles (EGM). Le contrôle de l'expression des gènes portés par les EGMs par ce type de réponse assure la limitation de leur expression pendant la phase de croissance normale de la bactérie. Ce type de contrôle permet de diminuer le coût biologique (*fitness cost*)¹⁴⁵ ou la lyse cellulaire¹¹⁰ associés à l'expression de ces gènes. Dans l'autre sens, l'induction de leur expression d'une façon coordonnée à la réponse aux stress environnementaux, permet à la bactérie d'exploiter les gènes portés par l'EGM qui peuvent donner un avantage adaptatif.

I.1.2.1. Généralités des éléments génétiques mobiles

Les EGM sont des segments d'ADN qui codent pour des enzymes et protéines responsables du mouvement de l'ADN entre réplicons ou entre bactéries. Le mouvement de l'ADN entre procaryotes ou « transfert horizontal de gènes » peut se faire par transformation, conjugaison ou transduction¹⁴⁶.

La transformation dénomme l'acquisition d'ADN libre dans l'environnement. Ce type de mouvement d'ADN peut être exécuté uniquement par des bactéries en état de compétence¹⁴⁷.

La transduction est une forme de transfert véhiculé par un virus bactérien nommé phage, qui peut porter des gènes bactériens de façon accidentelle lors de son emballage (**Figure 41, 1**).

La conjugaison nécessite des éléments répliatifs indépendant du chromosome, nommés plasmides ou « éléments intégratifs et conjugatifs » (*integrated conjugative elements*, ICE), parmi lesquels les transposons conjugatifs. Ce type d'élément génétique code pour des protéines qui facilitent leur transfert de la bactérie donneuse à la bactérie receveuse (**Figure 41, 2**).

Les transposons non conjugatifs sont des fragments d'ADN capables de « sauter » d'un réplicon à un autre dans une même bactérie. L'insertion des transposons dans le génome bactérien est médiée par une transposase, codée par le transposon. En revanche, ces transposons ne portent pas de gènes codant leur mobilité entre bactéries ; leur insertion dans un plasmide ou un phage peut entraîner leur transfert vers une autre bactérie (**Figure 41, 3**).

Les intégrons ne codent pas non plus ni pour leur réplication ni pour leur transfert mais expriment une intégrase SOS-réglée qui peut entraîner des réarrangements de cassettes de gènes par recombinaison site-spécifique (**Figure 41, 4**)¹⁴⁶.

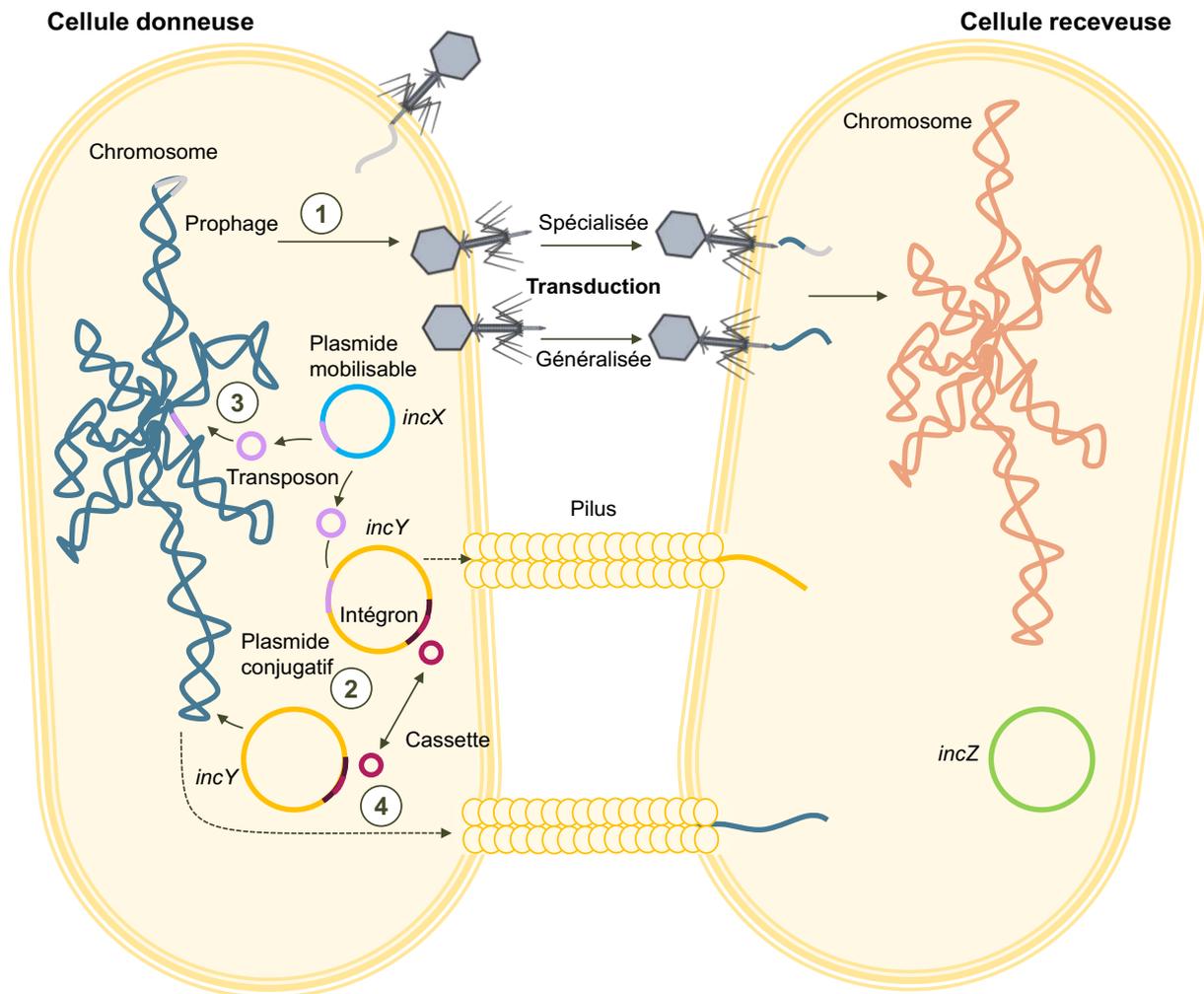


Figure 41. Transfert d'ADN entre bactéries
Adapté de ¹⁴⁶

I.1.2.2. Bactériophages sous le contrôle SOS

Un premier avantage de la régulation des EGM par la réponse SOS est la limitation de l'effet délétère de leur expression constitutive. C'est le cas du contrôle du cycle de vie des bactériophages tempérés. Généralement ces phages intègrent leur génome dans le chromosome bactérien où il est répliqué en tant que prophage, en une étape nommée cycle lysogénique ou quiescent (**Figure 41**, 1). Lors d'un stress conduisant au dommage de l'ADN, ces phages activent leur phase lytique avec une réplication importante qui conduit à la lyse de la bactérie hôte ^{146,148}.

La répression dans ces cas est faite soit directement par LexA, en reconnaissant des séquences type boîte LexA dans les régions promotrices des gènes du phage, ou de façon indirecte par l'expression d'un anti-répresseur régulé par LexA, qui à son tour neutralise l'action du répresseur du phage ^{148,149}.

Le transfert horizontal peut également faciliter la dissémination par transduction des gènes de résistance aux antibiotiques. Par exemple, l'exposition d'une souche de *Salmonella* aux fluoroquinolones, a induit, via la réponse SOS, l'excision d'un prophage de la bactérie,

favorisant ainsi le transfert d'un plasmide portant des gènes de résistance aux antibiotiques par transduction¹⁵⁰.

I.1.2.3. Dissémination et expression de gènes de résistance aux antibiotiques plasmidiques par induction SOS

Le système SOS induit également l'échange et l'expression de gènes de résistance aux antibiotiques portés par des plasmides.

Parmi les cibles extra-chromosomiques de la régulation SOS, il a été démontré que le gène plasmidique de résistance aux quinolones *qnrB2*¹⁵¹, ainsi que d'autres allèles de *qnrB*¹⁵² sont réprimés par LexA (**Figure 42**).

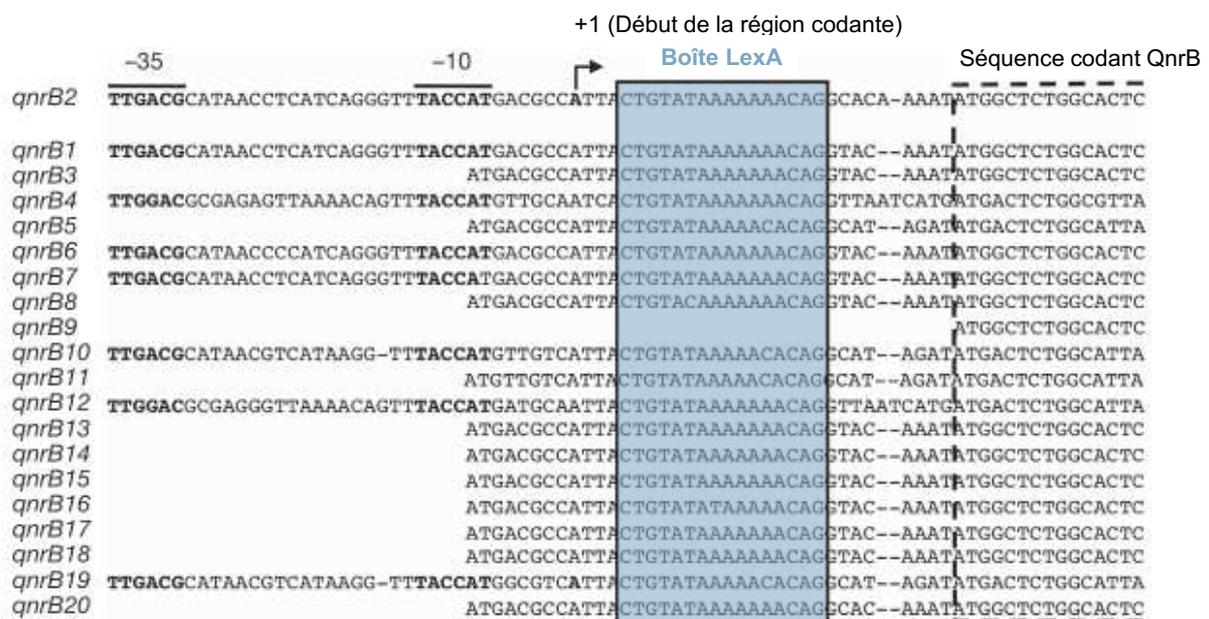


Figure 42. Aligment de la région promotrice de *qnrB2* et des allèles de *qnrB*

Adapté de¹⁵¹

Les variants du gène *qnr* sont groupés en familles (*A*, *B*, *C*, *D*, *S* et *VC*), chacune avec un nombre variable d'allèles, dont 71 connus pour *qnrB*. Qnr fait partie de la famille des pentapeptides répétés, impliqués dans l'interaction entre protéines. Il fonctionne en s'attachant à l'ADN gyrase et à la topoisomérase IV pour ainsi protéger la bactérie de l'activité inhibitrice des quinolones¹⁵³.

Les gènes *qnr* et ses homologues ont été découverts dans le chromosome de différents types de bactéries (*g-Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinomycetales*), essentiellement aquatiques (*Aeromonas*, *Photobacterium*, *Shewanella*, *Vibrio*), et *qnrB* particulièrement, dans le complexe *Citrobacter freundii*, bien avant la découverte et l'utilisation des quinolones¹⁵⁴. Leur dissémination vers d'autres hôtes bactériens (*K. pneumoniae*, *S. enterica*, *E. cloacae*, *K. oxytoca*, *E. coli*, pour *qnrB*) suit leur incorporation dans une grande variété d'éléments transposables (IS26, ISCR1, ISEcp1)¹⁵³.

D'une façon similaire, le plasmide pDIJ09-518a hébergeant le gène *qnrD* est capable d'induire son expression via la réponse SOS, par un mécanisme d'accumulation des espèces réactives du nitrogène (RNS) en réponse à des concentrations sub-inhibitrices d'aminoglycosides¹⁵⁵.

L'expression des gènes de transposases, résolvases et éléments d'insertion est aussi augmentée chez *M. tuberculosis* suite aux dommages à l'ADN par un mécanisme SOS-dépendant¹⁴¹.

La dissémination de certains EGM est également régulée par la réponse SOS. Un premier exemple est celui de l'élément intégratif et conjugatif SXT, chez *Vibrio cholerae* contenant des gènes conférant la résistance au chloramphénicol, sulfaméthoxazole, triméthoprim et streptomycine. Cet élément conjugatif régule son propre transfert par l'expression d'un répresseur SetR qui, comme LexA, est clivé par RecA lors de dommages à l'ADN¹⁵⁶. L'intégrase des intégrons de classe 1, portés par des EGM (**Figure 41, 4**), est aussi régulée par la réponse SOS permettant le réarrangement de cassettes de résistance et donc leur expression ou acquisition.

I.1.2.3.1. Les intégrons

Initialement décrit en 1980 comme un élément génétique capable d'acquérir ou de perdre des gènes de résistance¹⁵⁷, un intégron est actuellement défini comme une plateforme génétique composée d'un système de recombinaison site-spécifique capable d'intégrer, exprimer et réarranger des éléments d'ADN spécifiques dénommés « cassettes »¹⁵⁸⁻¹⁶¹.

La présence généralisée de ces éléments chez différentes espèces bactériennes, essentiellement à Gram négatif suggère une dissémination horizontale. Cependant, les intégrons ne possèdent pas d'activité mobile par eux-mêmes et sont portés par des EGM comme les plasmides conjugatifs et les transposons^{162,163}.

De part leur large variété et distribution, les intégrons sont classifiés de différentes façons. Une première classification correspond à leur contexte génétique, qui les sépare en intégrons chromosomiques et intégrons mobiles.

Les intégrons chromosomiques sont présents dans 17% des espèces bactériennes avec un génome connu. Bien qu'il y ait des différences phylogénétiques, suggérant des événements de transfert horizontal rares, les intégrons chromosomiques sont des structures sédentaires dans le génome de l'hôte, capables de collecter de vastes réseaux de cassettes¹⁵⁹, ayant des fonctions de résistance, virulence, d'activité métabolique, de formation de biofilm¹⁵⁸ ou de modules toxine-anti-toxine¹⁶⁴, bien que pour la plupart (80%) la fonction ne soit pas connue¹⁵⁸.

En revanche, les intégrons mobiles, portés par des plasmides ou transposons, contiennent un nombre limité de cassettes (généralement pas plus d'une dizaine). Les cassettes sont diverses en taille, fonction et en leur séquence « *attC* » ; site reconnu par l'intégrase de l'intégron pour effectuer l'activité de recombinaison. Les cassettes identifiées à ce jour confèrent une résistance à la plupart des classes d'antibiotiques^{xvii 163,165}.

Les cassettes sont généralement des cadres ouverts de lecture (*open reading frames*, ORF) individuels de 500 à 1000 paires de bases, dépourvus de promoteur, couplés à un site de recombinaison *attC*. Les cassettes, circulaires sous forme libre, sont intégrées dans la région

^{xvii} La haute prévalence des cassettes de résistance est conséquence de la sélection : de la pression de sélection faite par l'utilisation des antibiotiques ; et du biais de sélection, puisque ce type de cassette est plus activement recherché pour son intérêt en clinique.

variable de l'intégron par un événement de recombinaison spécifique entre les site *attI* et *attC*, catalysé par l'intégrase de l'intégron¹⁶⁶.

Le site *attC* est localisé à l'extrémité 3' du cassette et est composé par quatre sites d'attachement à l'intégrase : R'', L'', L' et R'. Les sites R' (5'-GTTRRRY) et R'' (5'-RYYAAC) sont des séquences palindromes séparées par une séquence intermédiaire de taille variable. La présence des séquences palindromiques permet la formation d'une structure secondaire cruciforme en appariant R'' et R', et L'' et L', importante pour la reconnaissance par l'intégrase^{159,167}.

La structure secondaire du site *attC* est plus importante pour son activité que la séquence en soi, ce qui permet une certaine flexibilité sur la reconnaissance des différents sites *attC* par IntI. IntI s'attache à la structure en épingle à cheveux formée par la structure secondaire de l'ADN ; le nucléotide qui dépasse de la formation sur le site L'' détermine le brin qui sera recombiné, brin du bas, assurant la correcte orientation de la cassette dans l'intégron¹⁶⁸⁻¹⁷¹.

Actuellement plus de 500 cassettes ont été décrites avec des fonctions variables (**Figure 43**)¹⁶⁵.

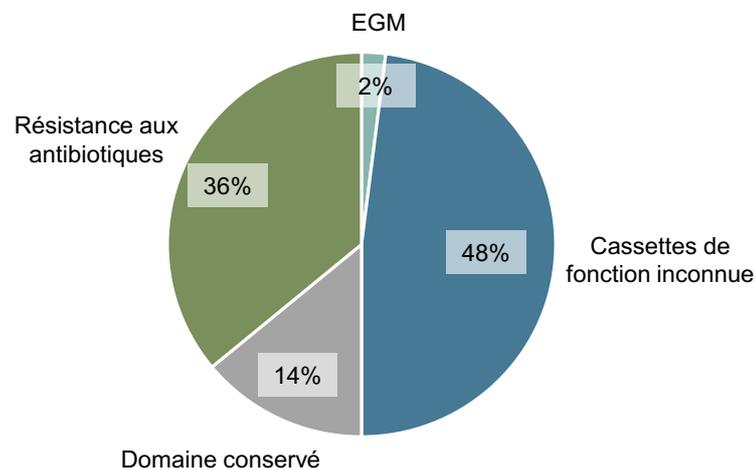


Figure 43. Distribution des cassettes des gènes par rapport à leur fonction
D'après¹⁶⁵.

La région conservée 5' des intégrons mobiles contient trois éléments (**Figure 44**):

- Un gène *intl*, codant l'intégrase de l'intégron, responsable d'une recombinaison site-spécifique¹⁵⁸. La séquence du gène *intl* de l'intégrase permet la classification des intégrons en différentes classes.
- Une séquence *attI* adjacente à *intl*, *attI*, qui est un site de recombinaison reconnu par l'intégrase pour l'insertion des cassettes.
- Un promoteur Pc localisé soit dans la séquence *intl* ou entre le gène *intl* et le site *attI*, nécessaire pour l'expression des cassettes. Treize différents Pc ont été identifiés dans les intégrons de classe 1, possédant différents niveaux d'activité. Chez les intégrons de classe 1, la variété des séquences de Pc, localisé dans le gène de l'intégrase *intl1*, est associée à des variants de IntI1 dont l'activité de recombinaison varie¹⁷². La localisation des cassettes à l'intérieur de l'intégron est importante puisque l'expression de ces cadres ouverts de lecture dépend du promoteur commun Pc, localisé dans la

région 5' conservée. La force d'expression de chaque cassette est donc directement proportionnelle à sa proximité du Pc.

Parmi les intégrons mobiles, les intégrons de classe 1 sont les plus répandus en clinique^{173,174}

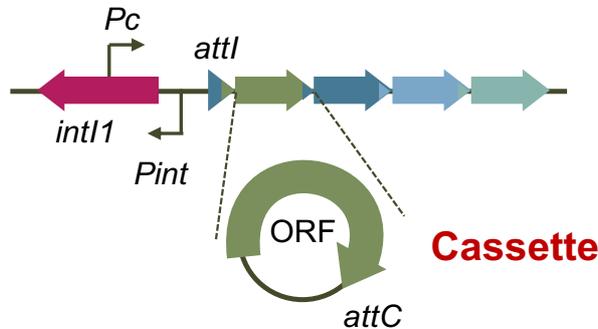


Figure 44. Structure d'un intégron mobile

Les intégrons de classe 1 ont été isolés dans 22 à 59% des infections cliniques par des bactéries à Gram négatif¹⁷⁵ et leur présence est fortement associée à l'expression clinique de résistance. En effet, la présence des intégrons de classe 1 ou 2 dans un isolat clinique d'infection urinaire ou abdominale par une bactérie à Gram négatif est associée à l'expression de résistance à au moins une famille d'antibiotiques^{xviii}. Inversement, l'absence d'intégrons a été montré comme un marqueur d'absence de résistance d'intérêt clinique, avec une valeur prédictive négative de 92,8%¹⁷⁶.

L'intégrase d'intégron peut catalyser plusieurs types d'évènements de recombinaison : i) une recombinaison entre un site *attC* et le site *attI*, permettant l'**insertion** d'une cassette dans la structure de l'intégron en première position par rapport aux autres cassettes, ii) une recombinaison entre deux sites *attC* entraînant une **excision** de cassette(s) et le potentiel rapprochement d'une cassette distale plus proche du Pc facilitant ainsi son expression (**Figure 45**)¹⁶⁷.

^{xviii} Les betalactamines, aminoglycosides, fluoroquinolones et co-trimoxazole ont été testés.

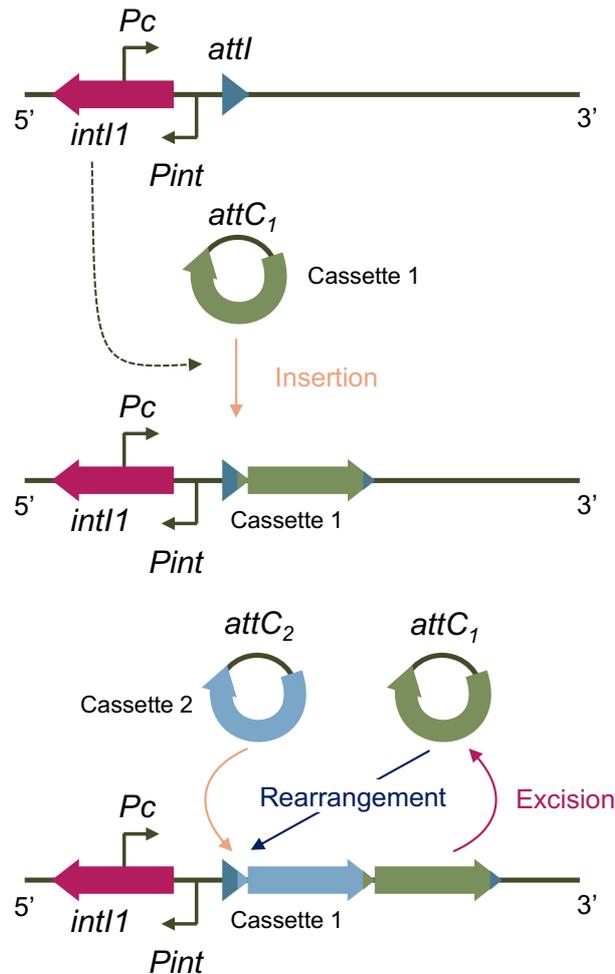


Figure 45. Activités de recombinaison de l'intégrase de l'intégron

Adapté de ¹⁷⁵

L'intégrase de classe 1 a un coût bactérien (*fitness cost*) faible ¹⁴⁵. Ceci explique l'avantage de la régulation de son expression par la réponse SOS ¹⁷⁷ et la concordance entre le niveau de fonctionnalité des intégrases, et leur pourcentage de régulation par LexA ¹⁷⁸. En effet, la régulation de l'expression de l'intégrase est apparue tôt dans l'histoire évolutive des intégrons chromosomiques, et les motifs d'attachement de LexA ont été perdus dans les souches n'ayant pas ce type de régulation ¹⁷⁸. De manière concordante, les souches où l'intégrase n'est pas régulée par la réponse SOS, portent une intégrase tronquée ¹⁷⁹.

L'induction de la réponse SOS déclenche l'expression de IntI1 et augmente la fréquence de recombinaison des cassettes. Comme mentionné précédemment, la réponse SOS peut s'activer dans des contextes de stress où par exemple, le réarrangement des cassettes peut augmenter l'expression de certaines cassettes par leur rapprochement au Pc, générant des nouveaux phénotypes qui facilitent l'adaptation et la survie bactériennes. Sa capacité de recombinaison des cassettes a été démontrée dans un cas clinique qui met en évidence la beauté de la recherche translationnelle. Une souche de *P. aeruginosa* résistante à la ceftazidime a été identifiée chez un patient. L'analyse de cette souche a permis d'identifier la cassette *bla_{OXA-28}* comme responsable de cette résistance, en 2^{ème} position dans un intégron. De façon intéressante, le premier isolat chez le premier patient de cette épidémie était sensible

à la ceftazidime, car le gène *bla_{OXA-28}*, était alors en 3ème position dans l'intégron et n'était pas exprimé. Le changement de phénotype de cette souche a été consécutif à l'administration de métronidazole chez ce patient. Or le métronidazole a la capacité d'induire la réponse SOS, ce qui a entraîné un réarrangement des cassettes par excision d'une des cassettes résultant au rapprochement de la cassette *bla_{OXA-28}* plus près du Pc et l'expression de résistance à la ceftazidime ¹⁸⁰.

Objectifs

Le sepsis est une urgence médicale qui constitue un problème de santé publique mondial⁴. Les recherches actuelles dans ce domaine visent à mieux comprendre les facteurs de ce syndrome pour limiter l'évolution vers la défaillance d'organes et le décès. La mortalité attribuée au sepsis est influencée à la fois par des facteurs de l'hôte et du pathogène, dont le niveau des granulocytes immatures (GI) circulants⁶⁹ et l'adaptation du pathogène²⁶, respectivement, sont déterminants.

Les fonctions de défense face aux pathogènes telles que la phagocytose et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont diminuées chez les GI par rapport aux neutrophiles^{49,64,65,68}. La réponse SOS bactérienne est un mécanisme de défense d'adaptation de la bactérie vis-à-vis de différents stress, qui peut être induite par les ROS.

Ce travail part donc de l'hypothèse que la faible production de ROS produits par les GI pourrait déclencher la réponse SOS bactérienne qui elle-même serait responsable de l'acquisition ou de l'expression de résistances aux antibiotiques.

En concordance, notre **objectif principal** a été d'évaluer la capacité des GI et des neutrophiles d'induire la réponse SOS bactérienne, en fonction de leur activité phagocytaire et de leur production de ROS, et d'étudier l'impact de cette induction sur l'expression SOS-dépendante de résistances aux antibiotiques.

Pour ce faire, dans une **première étape** nous avons développé un modèle d'incubation de *E. coli* avec des GI ou neutrophiles, qui permet l'évaluation simultanée de la phagocytose, la production de ROS et l'induction de la réponse SOS *in vitro* et *ex vivo*.

Compte tenu de l'association entre l'induction SOS et l'expression des résistances aux antibiotiques, dans une **deuxième étape**, nous avons voulu évaluer la capacité des GI et des neutrophiles d'induire l'expression de résistances aux antibiotiques par deux mécanismes représentatifs de résistance SOS-dépendante : l'expression d'un gène de résistance porté par un plasmide¹⁵¹ et l'expression de l'intégrase de l'intégron, dont l'activité d'excision peut entraîner un réarrangement des cassettes de gènes et ainsi un changement du phénotype de résistance^{177,178}.

Matériels et Méthodes

I.1. Développement d'un modèle pour suivre l'induction de la réponse SOS après interaction Granulocyte-Bactérie *in vitro* et *ex vivo*

Dans le cadre de ce travail, nous avons mis au point un modèle facilement adaptable *in vitro* et *ex vivo* pour suivre dans le temps des variables immunologiques (la phagocytose et la production des ROS) et bactériennes (induction de la réponse SOS). Ce modèle basé sur la fluorescence est quantifiable par cytométrie en flux et visible par microscopie confocale.

I.1.1. Sources des granulocytes matures et immatures

Le modèle d'incubation de *E. coli* avec des cellules eucaryotes a été travaillé *in vitro*, en utilisant des granulocytes immatures et des neutrophiles différenciés à partir de la lignée cellulaire HL-60. Une fois structuré, ce modèle a été utilisé pour les analyses *ex vivo*, avec des granulocytes immatures et neutrophiles humains de donneurs sains ou de patients.

I.1.1.1. Différenciation des HL-60 en granulocytes matures et immatures

La lignée cellulaire HL-60 est dérivée des cellules de leucémie myéloblastique humaine, équivalentes des cellules promyélocytaires. La différenciation de ces cellules vers des monocytes peut être induite par le $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D₃, ou bien vers des neutrophiles avec l'acide rétinoïque^{181,182}.

I.1.1.1.1. Modèle de différenciation des HL-60

Le protocole de différenciation des HL-60 a été développé en collaboration avec une autre doctorante, Stecy Chollet⁶⁷. Il permet d'obtenir des neutrophiles au bout de 10 jours après induction avec $1\mu\text{M}$ d'acide rétinoïque dans du milieu RPMI 1640 (Eurobio) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal inactivé à 56°C (Deutscher) et 1% d'acides aminés (Gibco), de glutamine (Gibco), de pyruvate (Gibco), et de vitamines (Gibco). Les cellules ont été incubées en suspension à 37°C et 5% de CO₂. Le volume de milieu de culture a été ajusté tous les 2 jours pour maintenir une concentration de $5 \cdot 10^6$ cellules par mL.

Le niveau de maturation a été suivi par la caractérisation des changements histologiques et d'expression des marqueurs de surface (**Figure 46**).

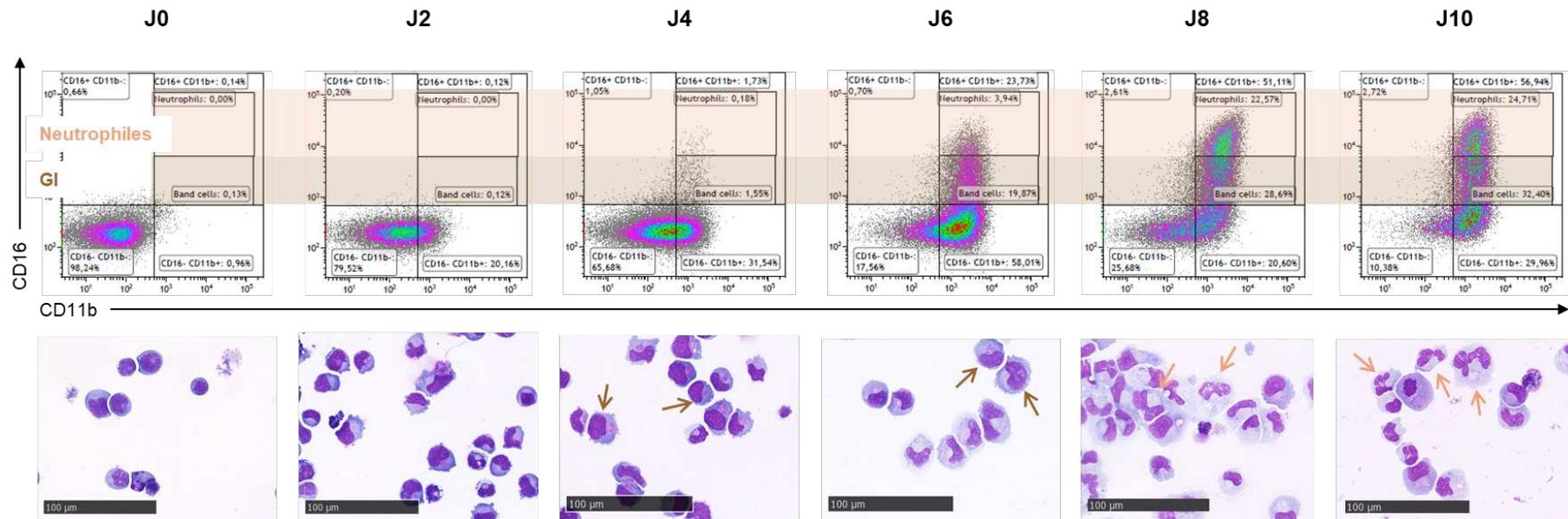


Figure 46. HL-60 au cours de la différenciation

En haut, suivi par l'expression de CD16 et CD11b par cytométrie en flux. En bas, des images de microscopie après coloration de May-Grünwald-Giemsa. Les neutrophiles (flèches orange clair) sont définies par leur expression augmentée de CD16 (CD16^{hi}), expression de CD11b (CD11b⁺), et la forme polylobée du noyau. Les granulocytes immatures (flèches en brun) sont caractérisés par l'expression diminuée de CD16 (CD16^{low}), l'expression de CD11b⁺ et la forme en bande du noyau. D'après ⁶⁷.

I.1.1.1.2. Tri des granulocytes matures et immatures

Les cellules ont été récupérées après 10 jours de différenciation, quantifiées sur lame de Malassez, et marquées avec des anticorps anti-CD11b-FITC et anti-CD16-Vioblue (Miltenyi, 0,5µL pour 10^6 cellules) pour permettre la séparation des granulocytes immatures des neutrophiles sur le trieur cellulaire BD FACSAria III.

Les anticorps REALease de chez Miltenyi ont été choisis pour leur capacité à être lysés après tri, ce qui libère les récepteurs membranaires et enlève les fluorophores pour éviter les interactions avec les expériences ultérieures.

Le tri cellulaire, à un débit moyen de 5000 cellules/seconde et une efficacité >80%, a permis de récupérer 1.10^7 granulocytes immatures (GI) et 7.10^6 neutrophiles en 5 heures. Les cellules ont été récupérées dans du milieu RPMI 1640 supplémenté et maintenues à 4°C pendant le tri.

Une acquisition de 5000 événements des cellules triées a confirmé la pureté de l'échantillon (>90%) (**Figure 47**).

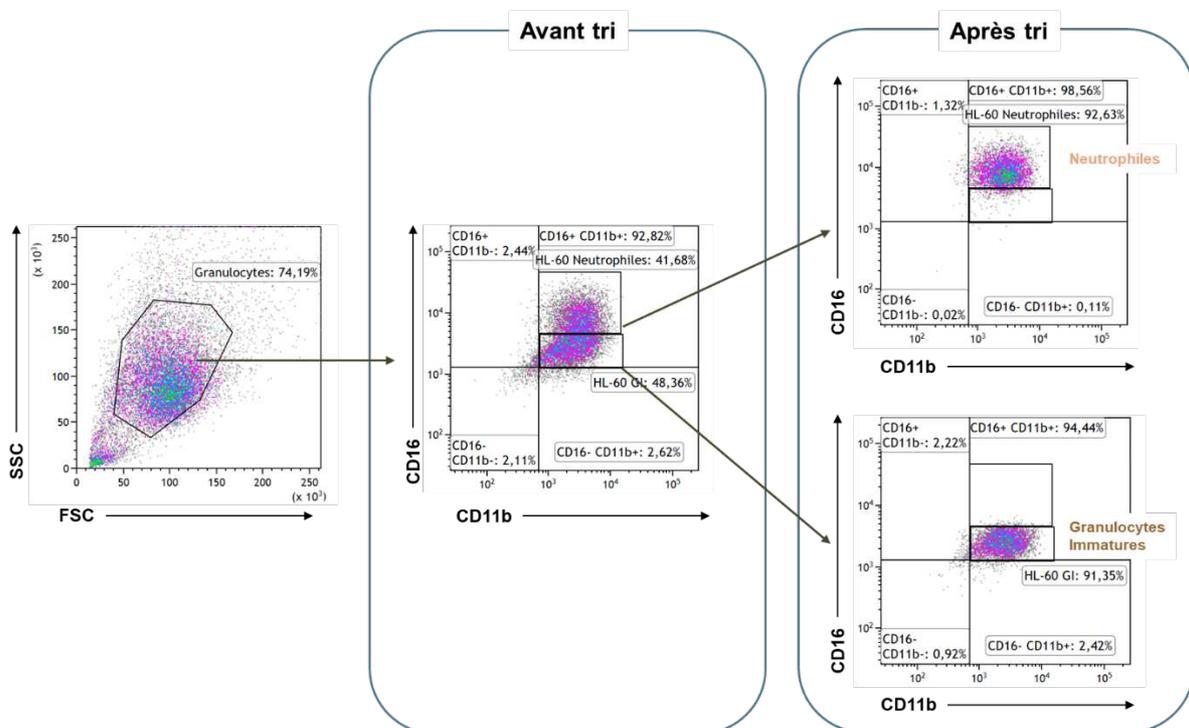


Figure 47. Représentation en Dot-plots des HL-60 après 10 jours de différenciation avant et après tri cellulaire

Les granulocytes ont été séparés du débris par une première fenêtre SSC/FSC, qui classe les événements acquis par structure (*Side scatered channel* SSC) et taille (*Forward Scattered channel* FSC). Le marquage des récepteurs de membrane CD16 et CD11b a été utilisé pour identifier les Neutrophiles ($CD16^{high}/CD11b^{+}$), et les Granulocytes immatures ($CD16^{low}/CD11b^{+}$). Après tri, les neutrophiles et les granulocytes immatures récupérés dans des tubes différents ont atteint une pureté de 92.6% et 91.4%, respectivement.

La quantité finale des GI-HL60 et Neut-HL60 a été suspendue dans du RPMI 1640 supplémenté à une concentration finale de 5.10^6 cellules/mL.

I.1.1.2. Granulocytes immatures et neutrophiles humains

Pour l'étude de la fonctionnalité des granulocytes immatures et des neutrophiles d'origine humaine, nous avons utilisé quatre types de cellules récupérées des échantillons de sang périphérique :

- Des granulocytes immatures provenant de patients septiques (GI-sepsis). Les échantillons de sang des patients septiques ont été collectés uniquement si le patient remplissait les critères suivants : avoir un diagnostic de sepsis de moins de 24 heures, être admis dans le service de réanimation et avoir >80% de GI dans le sang périphérique d'après la quantification par cytométrie en flux. Les patients inclus n'avaient pas des antécédents médicaux. Les fonds de tube des échantillons de sang contenant des GI sont enregistrés et conservés au sein du centre de Ressources Biologiques du CHU de Limoges. Les caractéristiques des patients sont résumées dans le **Tableau 5**
- Des granulocytes immatures de donneurs sains (GI G-CSF). Les GI sont normalement absents du sang périphérique chez les sujets sains. Cependant, les donneurs de cellules souches hématopoïétiques reçoivent du facteur stimulant des colonies de granulocytes (G-CSF) pour induire la libération des cellules souches hématopoïétiques (CD34+) de la moëlle osseuse et permettre leur étude à partir d'un échantillon de sang périphérique. Les fonds de tube des échantillons de sang contenant des GI sont enregistrés et conservés au sein du centre de Ressources Biologiques du CHU de Limoges. La viabilité des granulocytes a été évaluée par l'ajout du marqueur de viabilité cellulaire « DAPI », et la proportion des cellules viables a été calculée par cytométrie en flux.
- Des neutrophiles de donneurs sains (Neutrophiles). Les neutrophiles utilisés provenaient de sujets sains après signature d'un consentement éclairé et évaluation médicale, par le Centre d'Investigation Clinique du CHU de Limoges (CIC-1435).
- Des neutrophiles d'un patient atteint d'une granulomateuse chronique familiale (Neut-CGD). Pendant le déroulement de cette étude, nous avons eu l'opportunité de recueillir un échantillon de sang d'un patient ayant une déficience de la sous-unité gp91^{phox} de la NADPH-oxydase, dans le cadre de son suivi clinique de routine.

Tableau 5. Caractéristiques cliniques des patients septiques inclus.

	Date d'inclusion	Age	Sexe	Site d'Infection	Pathogène
Patient 1	14/06/2022	36	F	Urinaire	<i>Proteus mirabilis</i>
Patient 2	11/06/2022	28	F	Bactériémie	<i>Serratia marcescens</i>
Patient 3	14/05/2022	60	F	Bactériémie	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Patient 4	10/04/2022	58	F	Urinaire	<i>Escherichia coli</i>
Patient 5	17/03/2022	23	M	Intra-abdominale	<i>Escherichia coli</i> et <i>Streptococcus constellatus</i>

Les échantillons de sang périphérique de tous les patients et donneurs sains ont été prélevés au Centre Hospitalier Universitaire de Limoges (CHU de Limoges) en France, conformément

aux principes éthiques de la Déclaration d'Helsinki et avec l'approbation du comité d'éthique local (numéro CPP : 18.11.30.42116 ; Clinicaltrial.gov : NCT03846596).

I.1.1.2.1. Tri des granulocytes matures et immatures humains

Les GI et les neutrophiles contenus dans les échantillons de sang ont été triés parmi les autres cellules du sang grâce au tri magnétique négatif en utilisant le kit « *EasySep Direct Human Neutrophil Isolation* » (STEMCELL). 5 mL de sang périphérique ont été incubés avec le cocktail d'anticorps à une concentration de 50µL/mL selon les instructions du fabricant. Ce cocktail contient des anticorps dirigés contre des marqueurs présents sur les cellules hématopoïétiques autres que les neutrophiles, et absents chez ces derniers. L'échantillon est incubé avec le cocktail puis des particules magnétiques « RapidSpheres » capables de s'attacher aux anticorps sont ajoutés. L'ensemble est placé dans un aimant et les cellules enrobées par les anticorps magnétisés se fixent sur les parois du tube, ce qui permet la récupération des granulocytes en suspension. Le processus a été répété deux fois pour augmenter la pureté de la population granulocytaire. La quantité finale de granulocytes a été déterminée à l'aide du compteur cellulaire automatisé Countess 3FL (Invitrogen) et la pureté (>90%) a été vérifiée par cytométrie en flux après marquage avec les anticorps suivants : CD45-AmCyan, CD15-BV650, Lin-FITC^{xix}, CD11b-APCCy7, CD16-PECy7, et le marqueur de viabilité « Flixable Viability Dye-Viakrome 808 » (**Figure 48**).

^{xix} « Lin » fait référence au cocktail d'anticorps ciblant des marqueurs des cellules lymphocytaires : CD3, CD19, CD20, CD56, CD123.

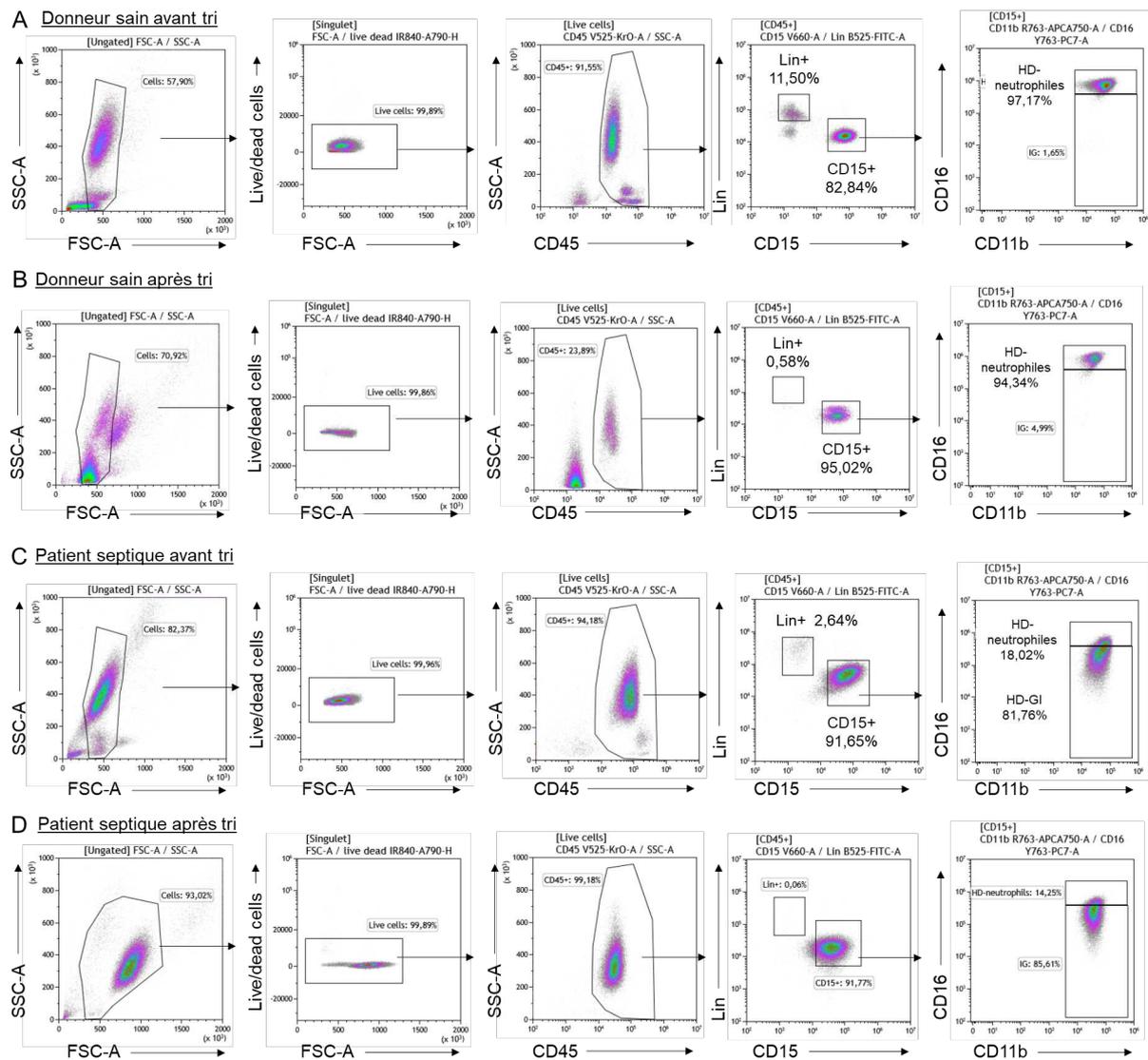


Figure 48. Vérification de la pureté des granulocytes après tri magnétique négatif par cytométrie en flux

Un échantillon de sang total (A et C) et un du produit de tri (B et D) ont été marqués par les anticorps CD45-AmCyan, CD15-BV650, Lin-FITC, CD11b-APCCy7, CD16-PECy7, et le marqueur de viabilité « Flixable Viability Dye-Viakrome 808 ». La stratégie de *gating* pour l'identification des granulocytes immatures et neutrophiles est présentée sur ces *dot-plots*. La première fenêtre à gauche permet l'identification des cellules par leur taille structure (SSC/FSC), puis, des cellules viables par le marquage de viabilité (Live/dead cells/FSC-A). Parmi les cellules viables, les dérivés myéloïdes sont identifiés par leur expression de CD45. Les granulocytes sont des cellules CD15+/Lin-. L'identification des granulocytes immatures (C et D) des neutrophiles (A et B) est faite par le niveau d'expression du marqueur CD16. Les cellules différentes des granulocytes (CD45+/Lin-/CD15-), présentes dans le sang total (A et C), ont été éliminées avec succès après le tri magnétique négatif (B et D), atteignant une pureté de 94,3% pour les neutrophiles (B), et de 85,6% pour les granulocytes immatures dans cet exemple. D'après ⁶⁷.

Les granulocytes immatures ou neutrophiles ont été suspendus dans du RPMI 1640 supplémenté à une concentration finale de $5 \cdot 10^6$ cellules/mL.

I.1.2. Souches et plasmides

Les souches de *E. coli* utilisées dans ce modèle expriment la protéine mCherry de façon constitutive pour permettre leur identification par cytométrie en flux et microscopie confocale (bactéries rouges, mCherry+). Le choix de cette fluorescence a pour objectif de i) différencier les bactéries des débris ; ii) d'identifier les granulocytes ayant fait la phagocytose, par l'augmentation d'intensité de fluorescence rouge au cytomètre ; iii) de visualiser les bactéries rouges dans les granulocytes par microscopie confocale.

La visualisation de l'induction de la réponse SOS par un modèle de fluorescence a été réalisée à l'aide du plasmide pPsfIA::gfp portant une fusion transcriptionnelle entre le promoteur de *sfIA* « PsfIA », qui possède une boîte LexA, et le gène *gfp* (**Figure 49**). Ce promoteur a été choisi car son expression est induite rapidement (dès 5 minutes) après induction de la réponse SOS (**Figure 34**)¹¹¹. Les souches et plasmides utilisés dans ce modèle sont résumés dans le **Tableau 6**.

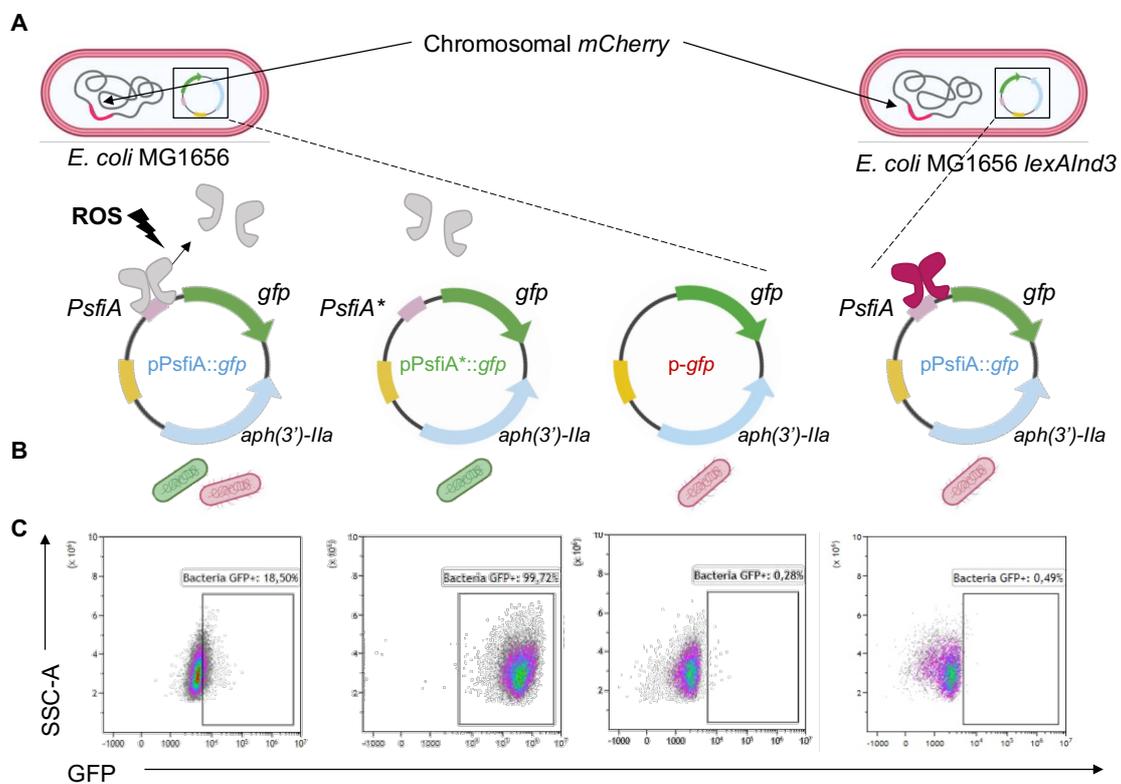


Figure 49. Schéma des souches et plasmides utilisés dans ce modèle

Les souches *E. coli* MG1656-mCherry et son dérivé *E. coli* MG1656-*lexAInd3*-mCherry, portant un gène *mcherry* chromosomique d'expression constitutive ont été transformées avec les plasmides rapporteurs pPsfIA::gfp, pPsfIA*::gfp ou p-gfp (**A**). Les phénotypes attendus pour chaque souche sont représentés par des bactéries rouges ou rouges-vertes (**B**). Des dot-plots d'une acquisition des cultures de chaque souche mettent en évidence ce phénotype par cytométrie en flux. L'axe des abscisses correspond au niveau de fluorescence émis par la GFP. Le rectangle noir définit les bactéries exprimant la GFP (**C**).

Tableau 6. Souches et plasmides utilisés dans le modèle SOS

Souches de <i>E. coli</i>		
Nom	Description	Référence
<i>E. coli</i> MG1656-mCherry	MG1656 portant le gène <i>mcherry</i> au site λatt , avec une expression constitutive de mCherry.	183
<i>E. coli</i> MG1656- <i>lexAInd3</i> -mCherry	MG1656- <i>lexAInd3</i> portant le gène <i>mcherry</i> au site λatt , avec une expression constitutive de mCherry. Gène <i>lexA</i> muté empêchant l'autoprotéolyse de LexA	Cette étude
Plasmides		
pPsfIA:: <i>gfp</i>	Plasmide pSU38 Δ tot <i>lacZ</i> portant une fusion transcriptionnelle de la région promotrice de <i>sfIA</i> « PsfIA » et du gène <i>gfp</i> ; et hébergeant le gène <i>aph(3')-Iia</i> (confère la résistance à la kanamycine, expression constitutive).	Collection du laboratoire
pPsfIA*:: <i>gfp</i>	pPsfIA:: <i>gfp</i> dans lequel la boîte LexA de PsfIA est mutée (empêche la fixation de LexA à sa boîte)	Collection du laboratoire
p- <i>gfp</i>	Plasmide pSU38 Δ tot <i>lacZ</i> portant le gène <i>gfp</i> sans promoteur, et le gène <i>aph(3')-Iia</i> (confère la résistance à la kanamycine, expression constitutive).	Cette étude

I.1.2.1.1. Construction de la souche mCherry-*lexAInd3*

La souche mCherry-*lexAInd3*, exprimant de façon constitutive la protéine mCherry a été construite par transduction de la cassette *km-frt-mcherry*¹⁸³ à partir d'un lysat P1 au site λatt d'une souche réceptrice *E. coli* MG1656-*lexAInd3*, pour donner la souche MG1656-*lexAInd3*-*km-frt-mcherry*.

La résistance à la kanamycine a été supprimée dans une deuxième étape en utilisant une recombinase FLP, comme décrit précédemment¹⁸⁴. Les colonies produites, MG1656-*lexAInd3*-*mcherry* ont été criblées par séquençage Sanger pour la présence du gène *mcherry* au site λatt et la perte du gène de la kanamycine à l'aide des amorces décrites dans le (Tableau 7) et par cytométrie en flux pour l'émission de fluorescence à 610 nm.

Tableau 7. Amorces utilisées pour confirmer l'insertion de la séquence *mcherry* au site λatt

Nom de l'amorce	Séquence (5' → 3')	Référence
λATT -ext5	GGCGATAAATTGCCGCATCG	183
λATT -ext3	TGCCACCATCAAGGGAAAGCCC	

I.1.2.1.2. Construction du plasmide p-*gfp*

Le plasmide p-*gfp* a été construit à partir du plasmide pPsfIA*::*gfp* par la délétion de la séquence PsfIA*, en utilisant les amorces DelPsfIARev et DelPsfIAFwd (Tableau 8), et le kit de clonage In-Fusion HD (Clontech). La délétion a été confirmée par séquençage Sanger en utilisant les amorces Km-verif-3 et MRVD-2 (Tableau 8), et par la perte de fluorescence GFP quantifiée par cytométrie en flux.

Tableau 8. Amorces utilisées pour déléter la séquence PsfiA* du plasmide pPsifA*::gfp et la séquencer

Nom de l'amorce	Séquence (5'→ 3')	Référence
DelPsfiARev	GATCCATTATTTTCGTAGTTAAGAATTCGAT	Cette étude
DelPsfiAFwd	CGAAAATAATGGATCCTAAAGGAGAAGAAGAACT	
Km-verif-3	GGATTCATCGACTGTGGCCG	Collection du laboratoire
MRVD-2	TTCTGCTGACGCACCGGTG	

I.1.3. Modèle pour suivre l'induction de la réponse SOS chez *E. coli* par les GI et les neutrophiles

Les différentes bactéries du modèle (**Tableau 6**), ont été cultivées sur la nuit à 37°C sous agitation à 300 rpm dans du milieu Luria-Bertani (LB) avec de la kanamycine (25 µg/mL). Une dilution au 1/100^{ème} de cette culture dans le même milieu a été incubée pendant 2 h dans les mêmes conditions jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ de 0,6 – 0,8.

La culture a été centrifugée à 5000 rpm pendant 5 min à 4°C et le culot de bactéries suspendu dans du RPMI 1640 supplémenté pour arriver à une concentration de 10.10⁸ bactéries par mL.

Les GI ou neutrophiles, indépendamment de leur source, ont été incubés en parallèle avec les *E. coli* du modèle (**Tableau 6**) à un ratio de 200 bactéries par cellule, en suspension dans du milieu RPMI 1640 supplémenté, et dans un bain marie à 37°C pendant 10, 30, et 60 minutes.

Au bout de ces temps, la sonde CellROX Deep Red (Thermofisher) a été rajoutée pour visualiser la présence des ROS. Cette sonde n'est pas fluorescente à l'état réduit, et elle émet de la fluorescence à 665 nm après oxydation par le superoxyde (O₂⁻) ou le radical hydroxyle (*HO). Les échantillons doivent être incubés pendant 30 minutes additionnelles avec la sonde dans les mêmes conditions, pour un temps total de 40, 60 et 90 minutes d'incubation.

Pour visualiser la phagocytose et l'induction de la réponse SOS à des temps d'incubation inférieurs (10 et 30 minutes), des conditions ont été ajoutées en présence de la sonde CellROX pendant les mêmes temps dans un bain marie à 37°C. Une condition avec le mélange de granulocytes et bactéries en présence de la sonde sans incubation a été fixée comme condition de temps 0.

Des conditions de bactéries seules et granulocytes seuls ont été effectuées en parallèle dans les mêmes temps, comme contrôles de « non-induction ». Un aliquot supplémentaire de bactéries a été incubé dans du milieu contenant de la ciprofloxacine (25 ng/mL, MIC of the *E.coli* MG1656), inducteur de la réponse SOS, pour confirmer la capacité du modèle à induire la réponse SOS.

Pour vérifier que l'induction de la réponse SOS quantifiée parmi les bactéries phagocytées n'était pas été liée à l'ajout de la sonde CellROX, cette expérience a été répétée pour les conditions contenant la souche *E. coli*-MG1656-mCherry/pPsfiA*::gfp en incubation avec les granulocytes, en remplaçant la sonde par du milieu de culture (RPMI 1640 supplémenté), à un volume identique.

I.1.3.1. Pré-stimulation des granulocytes des donneurs sains

A différence des granulocytes des donneurs sains, les GI provenant des patients septiques ont été pré-stimulés (« *primed* ») par contact avec des molécules pro-inflammatoires liées à l'infection (DAMPs, PAMPs, cytokines, etc).

Afin d'évaluer l'effet de la pré-stimulation des granulocytes de donneurs sains (GI des donneurs de cellules souches hématopoïétiques, et Neutrophiles) sur la phagocytose, la production de ROS et l'induction de la réponse SOS, nous avons incubé les granulocytes de donneurs sains avec du plasma d'un patient septique. Après tri (section I.1.1.2.1 de M&M, page 87), les granulocytes ont été incubés avec 100µL de plasma provenant d'un patient septique, pendant 10 min à 37°C dans le bain marie. Après incubation, les granulocytes ont été lavés avec du PBS, centrifugés à 300 G pendant 5 minutes, et les cellules ont été suspendues dans du milieu RPMI 1640 supplémenté à une concentration de $5 \cdot 10^6$ cellules/mL.

I.1.3.2. Quantification de la phagocytose, et de la production de ROS par cytométrie en flux

Après incubation aux temps indiqués précédemment, le marqueur de viabilité DAPI^{xx} a été ajouté et incubé pendant 5 min à l'abri de la lumière, puis les échantillons ont été fixés avec du formaldéhyde 4%, et acquis sur le cytomètre en flux Cytotflex LX, Beckman coulter.

Prenant en compte la différence de taille entre les bactéries et les granulocytes, et pour augmenter la sensibilité, chaque échantillon fixé a été acquis en deux temps :

- Une première acquisition était réglée pour l'identification des cellules **Figure 50**. Cette acquisition permettait d'identifier les granulocytes viables par l'absence de marquage DAPI. Parmi ces cellules, la **phagocytose** était mesurée grâce à l'expression de fluorescence rouge par les bactéries. Les granulocytes ayant phagocyté des bactéries auront une fluorescence augmentée sur le canal d'acquisition de mCherry+. Parmi les granulocytes phagocytaires, l'intensité de fluorescence émise par la sonde CellROX est un indicateur indirect de la quantité des **ROS produits** par le granulocyte. Finalement, parmi les cellules phagocytaires, celles contenant des bactéries avec une **réponse SOS** induite ont été identifiées par l'expression de la fluorescence verte, bactéries GFP+.

Les valeurs acquises par cytométrie en flux permettent la quantification de deux types de variables : la proportion des cellules contenant des bactéries rouges mCherry+ ou rouges et vertes mCherry+/GFP+, et l'intensité de fluorescence émise par ces cellules. La moyenne d'intensité de fluorescence (*Mean Fluorescence Intensity* ; MFI) pour la mCherry reflète donc la quantité de bactéries contenues par cellule phagocytaire, tandis que la MFI pour GFP représente à la fois la quantité de bactéries mCherry+/GFP+ et la quantité de GFP exprimée par bactérie.

^{xx} DAPI ou 4',6-diamidino-2-phenylindole est un fluorochrome avec une forte affinité pour les séquences riches en AT de l'ADN. Comme sa pénétration à travers des membranes intactes est moins efficace, ce marqueur est utilisé pour identifier les cellules non viables ¹⁸⁵

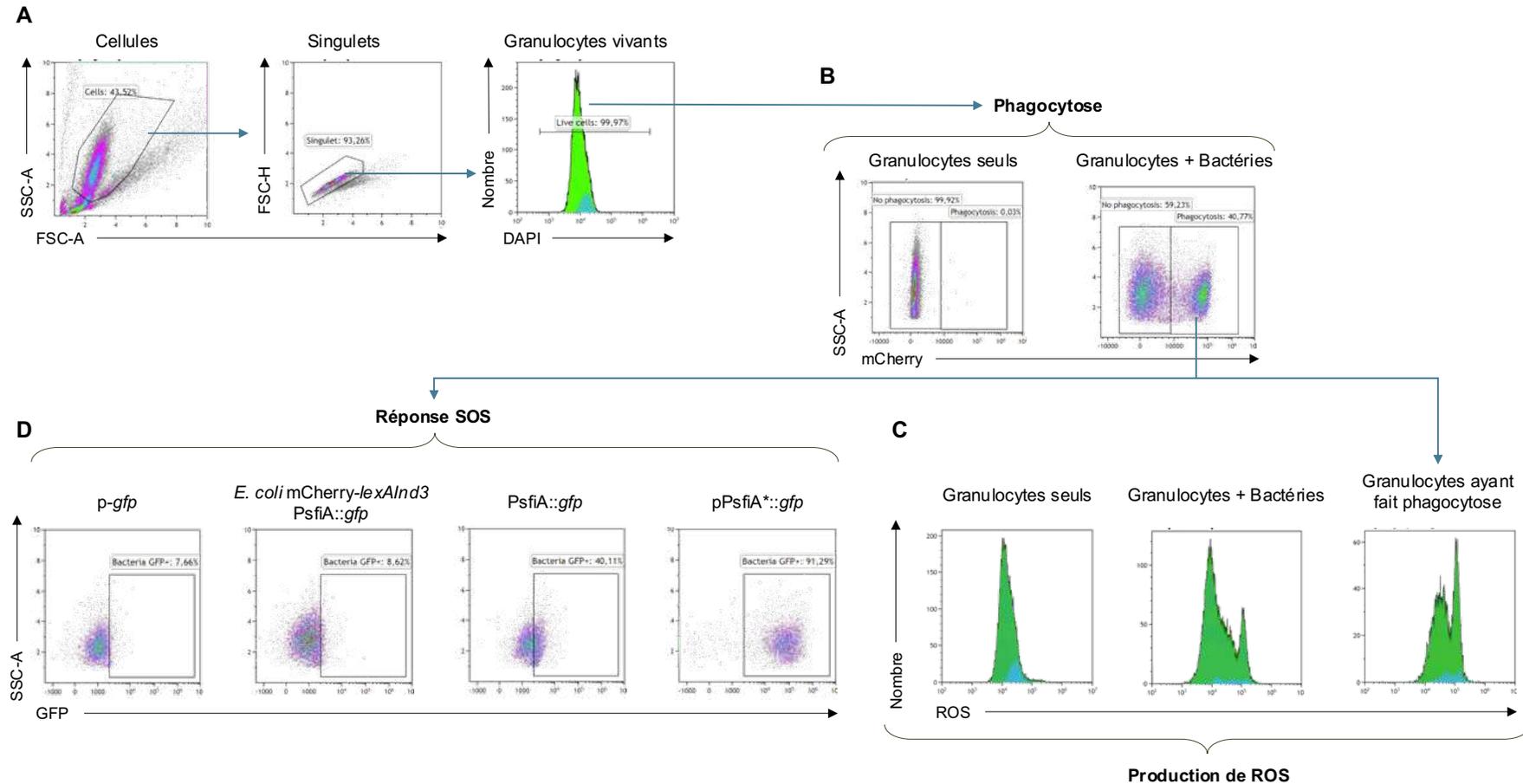


Figure 50. Stratégie de *gating* pour l'analyse de granulocytes (GI ou neutrophiles) et des bactéries phagocytées, production de ROS et réponse SOS
 Les granulocytes ont été identifiés par leurs caractéristiques de taille/structure. Les granulocytes singlets ont été sélectionnés et parmi eux, les cellules vivantes (A). Dans la fenêtre des granulocytes vivants, les événements de phagocytose ont été identifiés par l'augmentation en intensité de fluorescence correspondant à mCherry (rouge). L'acquisition des granulocytes incubés seuls a été utilisée pour placer la fenêtre correspondant à la phagocytose (B). La moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) des ROS a été utilisée comme rapporteur de la quantité de ROS produits par les cellules, avec intérêt particulier pour les granulocytes phagocytaires (C). L'induction de la réponse SOS a été quantifiée dans la fenêtre des granulocytes ayant phagocyté des bactéries mCherry, par le suivi de l'augmentation de la MFI de la GFP. L'acquisition des bactéries « p-gfp » a aidé à positionner la fenêtre des événements GFP+ (D).

- Une deuxième acquisition a été réglée pour les bactéries non phagocytées (**Figure 51**) et a permis d'estimer le niveau d'expression de la GFP sous contrôle de PsfIA chez ces bactéries.

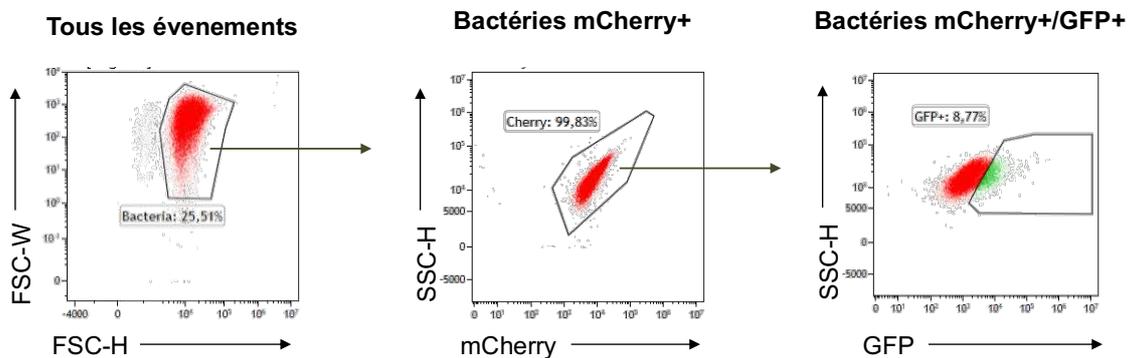


Figure 51. Stratégie de « gating » pour l'analyse des bactéries non phagocytées

Les bactéries non phagocytées ont été différenciées des débris par fenêtrage FSC-W/FSC-H ¹⁸⁶. Un deuxième histogramme permet d'identifier mCherry+. Sur ces bactéries, l'émission de fluorescence à 509 nm de la GFP a permis l'identification des bactéries ayant induit la réponse SOS.

I.1.3.3. Visualisation de la phagocytose, production de ROS et de la réponse SOS par microscopie confocale

Après incubation et perméabilisation des granulocytes avec du formaldéhyde 4%, les échantillons ont été traités par le CytoPainter Phalloïdin-iFluor 405 Reagent (Abcam) et incubés 30 min à 4°C protégés de la lumière pour marquer les filaments d'actine. L'excès de Phalloïdine a été enlevé par lavage avec du PBS, et le culot a été suspendu dans 25 µL de PBS et déposé sur une lame de microscopie (SUPERFROST® PLUS, ThermoFisher). Les images ont été acquises sur le microscope LSM880 Zeiss, et analysées à l'aide du programme IMARIS 9.6 software (Bitplane).

I.2. Modèles pour mesurer l'impact biologique de la réponse SOS intra-phagosomale par l'expression des résistances aux antibiotiques

L'expression des résistances aux antibiotiques via l'activation de la réponse SOS parmi les bactéries phagocytées a été mesurée à travers deux approches : la quantification de l'activité d'excision de l'intégrase de l'intégron, et l'expression du gène *qnrB2*, responsable de la résistance aux quinolones.

I.2.1. Quantification de l'activité d'excision de l'intégrase de l'intégron

La quantification de l'activité d'excision de l'intégrase de l'intégron a été basée sur un modèle décrit préalablement ^{177,187}. Brièvement, le modèle mesure la capacité de l'intégrase de l'intégron à catalyser la recombinaison entre deux sites *attC*, causant l'excision de la cassette localisée entre ces deux sites. L'évènement d'excision est donc mesuré grâce à l'expression d'un gène localisé en aval de la cassette. Quand la cassette est présente, elle est exprimée et le gène en aval est silencieux car trop loin du promoteur. Quand la cassette est excisée, le gène en aval rapproché du promoteur est alors exprimé.

Ce modèle utilise un système à deux plasmides : un plasmide dit « d'induction » contenant le gène *intI1*, et un deuxième plasmide dit « rapporteur », contenant la construction avec la

cassette et le gène en aval. Nous avons utilisé la séquence du gène *int11* codant pour l'intégrase avec la plus grande efficacité de recombinaison (appelé dans cette étude *int11w*)

I.2.1.1. Les plasmides d'induction

Deux types de plasmides d'induction ont été utilisés dans ce travail :

- Pour évaluer la sensibilité de la cytométrie en flux pour quantifier l'activité d'excision de l'intégrase, le plasmide p734 (**Tableau 9**) résultat du clonage du gène *int11* sous le contrôle du promoteur PBAD dans le plasmide pBAD18 a été utilisé¹⁸⁷. L'expression de l'intégrase dans cette construction est donc inductible par l'incubation des bactéries dans un milieu contenant de l'arabinose¹⁸⁸.

Un plasmide pBAD18 sans le gène *int11* a été transformé dans une souche portant le plasmide rapporteur, comme contrôle de l'absence d'excision en absence d'intégrase¹⁸⁹.

- Pour évaluer la capacité d'excision de l'intégrase, après induction SOS, un plasmide d'induction pZE1-Int11w avec le gène de l'intégrase *int11* sous le contrôle de son propre promoteur a été utilisé¹⁷⁷.

Le plasmide pZE1-mcs1 sans le gène *int11* a été transformé dans une souche portant le plasmide rapporteur, comme contrôle de l'absence d'excision en absence d'intégrase.

Le plasmide pZE1-Int1wlexAmut2 a été utilisé comme témoin positif de l'activité d'excision de l'intégrase sous son propre promoteur à l'état déréprimée, par mutation de la boîte LexA localisée dans le promoteur de *int11*¹⁷⁷ (**Tableau 9**).

Tableau 9. Plasmides d'induction

Plasmides		
pBAD18	ori _{ColE1} AmpR	189
p734	<i>int11w</i> cloné dans le plasmide pBAD18	187
pZE1-mcs1	Plasmide pZE12-mcs1 sans promoteur	177
pZE1-Int11w	<i>int11w</i> cloné dans le plasmide pZE1-mcs1	
pZE1-Int1wlexAmut2	pZE1-Int11w portant les substitutions TAA-N10-CAG et CTG-N10-ACT dans la boîte lexA pour empêcher l'attachement de LexA.	

I.2.1.2. Les plasmides rapporteurs

Les plasmides rapporteurs utilisés avaient un promoteur commun (Plac), suivi par un gène de résistance au chloramphénicol flanqué de deux sites *attC* (*attC_{aadA7-Cat(T4)}-attC_{VCR2}*), et un gène rapporteur *aac6'-lb** (p6851) ou *gfp* (pExCatGFP)(**Tableau 10**).

Tableau 10. Plasmides rapporteurs

Plasmides		
p6851	pSU38::attCaadA7-catT4-attCVCR2::aac6'-lb*	177
pExCatGFP	pSU38::Plac::attC _{aadA7} -Cat(T4)-attC _{VCR2} ::gfp	Cette étude

I.2.1.2.1. Construction du plasmide rapporteur pExCatGFP

Le plasmide pExCatGFP a été construit à partir du plasmide p6851 (pSU38::attC_{aadA7}-cat(T4)-attC_{VCR2}::aac6'-lb*¹⁷⁷) où le gène *aac6'-lb* a été remplacé par celui codant la *gfp*. Le plasmide p6851 a été digéré avec les enzymes HindIII et SphI pour déléter le gène *aac6'-lb*, et le fragment a été purifié sur gel d'agarose. Le gène *gfp* a été amplifié en utilisant les amorces infusionGFP-ex-5 et infusionGFP-ex-3 (**Tableau 11**) à partir du plasmide pZE1RGFP¹⁹⁰. Les deux fragments ont été clonés avec le kit de clonage In-Fusion HD (Clontech). L'insertion du fragment GFP a été confirmé par séquençage Sanger en utilisant les amorces MRVD-2 (**Tableau 8**) et pSU38-verif-sq (**Tableau 11**)

Tableau 11. Amorces utilisées pour construire pExCatGFP

Nom de l'amorce	Séquence (5' → 3')	Référence
infusionGFP-ex-5	GGCGTTAGGTATTTGCATGCGAAAGGAGAAGAAGAACTTTTCA C	Cette étude
infusionGFP-ex-3	CACCGCCGGACAAGCTTATTTGTATAGTTCATCC	
pSU38-verif-sq	GCCCACCCCTGTCCCTC	Collection du laboratoire

I.2.1.3. Modèle de suivi de l'activité d'excision de l'intégrase d'intégron chez *E. coli*

Dans notre modèle, le plasmide rapporteur pExCatGFP porte une « cassette synthétique » contenant le gène constitutivement exprimé *cat(T4)* flanqué par les sites *attC_{aadA7}* et *attC_{VCR}*; un promoteur Plac précède le site *attC_{aadA7}*, le site *attC_{VCR}* étant suivi du gène *gfp* (**Tableau 10, Figure 52**). Du fait de la distance entre le promoteur Plac et le gène *gfp*, ce dernier n'est pas exprimé.

Il était donc attendu que l'induction de l'expression de *int1* porté par le plasmide p734, cause l'excision de la cassette synthétique par recombinaison des sites *attC*, le rapprochement du gène *gfp* au Plac, et l'expression de fluorescence GFP (**Figure 52**).

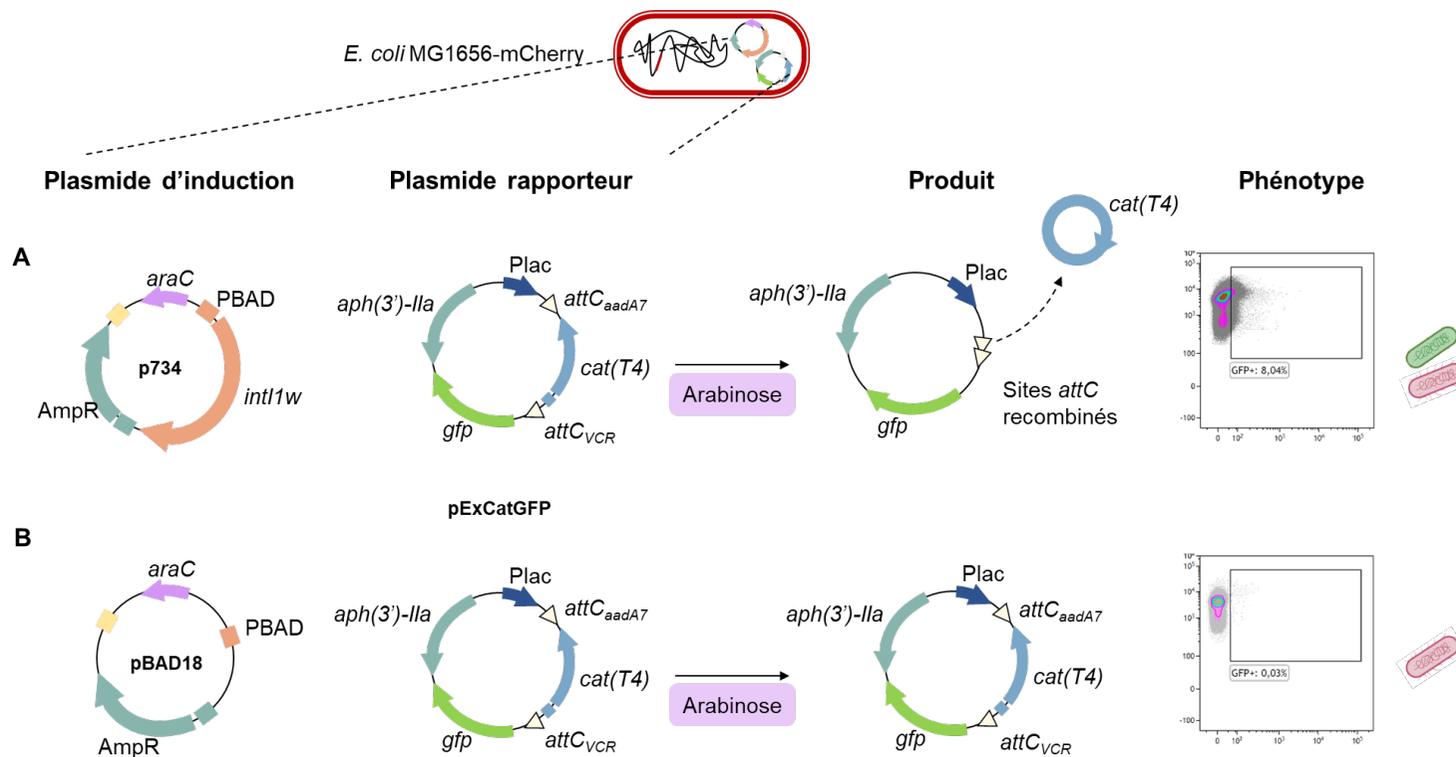


Figure 52. Schéma de l'estimation de l'activité d'excision de l'intégrase d'intégron de classe 1

Le plasmide d'induction p734 (A) ou le plasmide pBAD18 (B) et le plasmide rapporteur pExCatGFP ont été transformés dans la souche *E. coli* MG1656-mCherry. Les souches ont été incubées à 37°C sous agitation à 300 rpm, pendant la nuit dans un milieu LB supplémenté avec Glucose 1%, kanamycine 25 µg/mL et ampicilline 100 µg/mL pour inhiber l'activité du promoteur pBAD et donc l'expression de l'intégrase. Puis, les cultures ont été diluées au 1/100^{ème} et incubées dans un bouillon LB complémenté par des antibiotiques et soit du Glucose 1% soit de l'Arabinose 0,2%^{xxi} pour une deuxième incubation sur la nuit. L'induction de l'expression de l'intégrase se traduit par l'expression de la GFP qui peut être quantifiée par cytométrie en flux (A, graphe de droite, mélange de bactéries mCherry+ et, mCherry+/GFP+). Sans induction (B) les bactéries mCherry+ n'expriment pas la GFP.

^{xxi} L'incubation dans un milieu complémenté par Arabinose 0,2% induit l'expression du gène en aval du promoteur PBAD, tandis que la glucose inhibe leur expression dans un mécanisme dépendant du gène *araC*¹⁸⁸.

La fréquence d'excision a été calculée comme le ratio des bactéries (mCherry+/GFP+), sur le total des bactéries mCherry+, d'après les résultats de l'acquisition par cytométrie en flux, suivant les paramètres de *gating* décrits dans la **Figure 51**.

I.2.2. Suivi de l'activité d'excision de l'intégrase de l'intégron chez *E. coli* après interaction avec les GI ou neutrophiles

Pour estimer l'activité d'excision de l'intégrase de l'intégron après interaction avec les granulocytes, le plasmide inducteur pZE1-Int1w a été transformé dans une souche *E. coli* MG1656-mCherry/pExCatGFP ou *E. coli* MG1656-mCherry/p6851 (**Tableau 10**). La fréquence d'excision a été calculée grâce à l'expression de la GFP (**Figure 53 A**), ou bien de la résistance à la tobramycine (**Figure 53 B**).

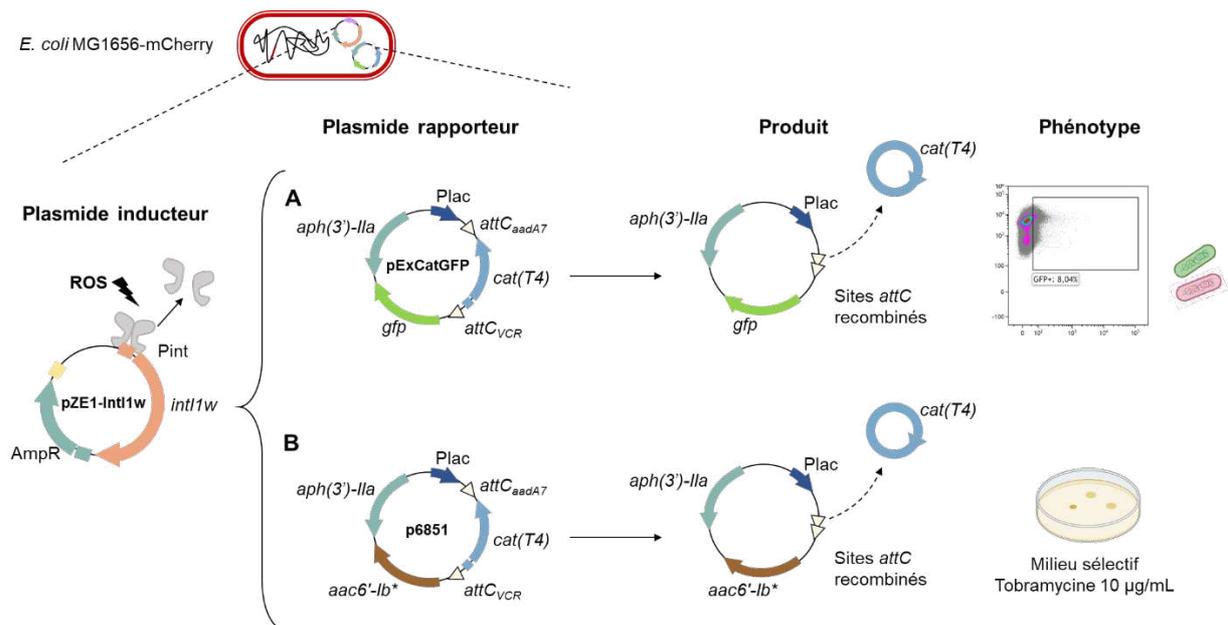


Figure 53. Schéma de l'estimation de l'activité d'excision de l'intégrase d'intégron de classe 1 après induction SOS

La souche *E. coli* MG1656-mCherry a été transformée avec un plasmide inducteur (dans ce cas, le pZE1-Int1w portant le gène *int1w* sous son propre promoteur), et un des deux plasmides rapporteurs, pExCatGFP ou p6851. Lors de l'interaction de la bactérie avec des ROS produits dans le phagosome des granulocytes, l'activation de la réponse SOS induit le clivage de LexA et la libération des promoteurs du régulon. L'intégrase exprimée peut catalyser l'excision du fragment *attC_{aadA7}-cat(T4)-attC_{VCR}* et le gène rapporteur est alors exprimé. L'excision est quantifiée par l'expression de la fluorescence verte (mCherry+/GFP+), ou par la résistance à la tobramycine.

Les souches *E. coli* MG1656-mCherry/pExCatGFP et *E. coli* MG1656-mCherry/p6851 ont été transformées en parallèle avec les plasmides pZE1-mcs1 ou pZE1-Int1wlexAmut2 comme témoin négatif et positif de l'expression de l'intégrase, respectivement (**Tableau 9**).

I.2.2.1. Quantification de l'activité d'excision de l'intégrase induite par les granulocytes, par cytométrie en flux

Les souches *E. coli* MG1656-mCherry portant le plasmide rapporteur pExCatGFP (**Tableau 10**) et l'un des plasmides d'induction pZE1-mcs1, pZE1-Int1w ou pZE1-LexAmut2¹⁷⁷ (**Tableau**

9) ont été incubées avec des granulocytes comme décrit dans la section I.1.3 des Matériels et méthodes

L'acquisition par cytométrie en flux des échantillons fixés a été faite en deux étapes, d'abord avec un focus sur les événements de grande taille pour les granulocytes (**Figure 50**), puis sur les événements de petite taille pour les bactéries non phagocytées (**Figure 51**).

I.2.2.2. Quantification de l'activité d'excision de l'intégrase induite par les granulocytes, par sélection de résistance aux antibiotiques

Les GI ou neutrophiles issus de la différenciation des HL-60 ont été incubés avec des *E. coli* MG1656 portant le plasmide rapporteur p6851¹⁷⁷, et l'un des plasmides inducteurs pZE1-mcs1, pZE1-Int1w ou pZE1-LexAmut2 (**Tableau 9**), à un ratio de 200 bactéries par cellule.

Les suspensions des bactéries/cellules ont été incubées à 37°C dans un bain marie pendant 90 minutes ou sur la nuit. Les bactéries phagocytées ont été récupérées en suivant le protocole décrit dans la section I.2.3 des Matériels et méthodes.

Un aliquot des ces bactéries a été dilué à 10⁻⁵-10⁻⁶ et mis sur boîtes non sélectives (LB + Kanamycine 25 µg/mL ; Ampiciline 100 µg/mL) pour quantifier le nombre total des bactéries, et le volume restant a été mis sur des boîtes LB + Kanamycine 25 µg/mL ; Ampiciline 100 µg/mL contenant en plus de la Tobramycine à 10 µg/mL pour sélectionner les bactéries dans lesquelles la cassette synthétique *attC_{aadA7-cat(T4)}-attC_{VCR}* aurait été excisée. La fréquence d'excision a été calculée comme le ratio des bactéries résistantes à la tobramycine sur le total des bactéries phagocytées (CFU/ml).

I.2.3. Récupération des bactéries phagocytées après incubation avec des GI ou neutrophiles

Les bactéries non phagocytées ont été éliminées par une méthode de centrifugation par gradient de densité, dans une solution de saccharose¹⁹¹. Après incubation, les suspensions de bactéries/cellules ont été diluées dans un volume de PBS froid, placées délicatement sur une colonne de 3 mL de saccharose 50% à 4°C, et centrifugées à 250 G pendant 8 min à 4°C. La phase superficielle contenant les bactéries extracellulaires a été éliminée, et les cellules suspendues dans la phase de saccharose ont été lavées au PBS et récupérées.

Les cellules ont été lysées par un mécanisme de choc osmotique à l'aide d'eau distillé stérile pour libérer les bactéries intracellulaires.

I.2.4. Suivi de l'expression du gène *qnrB2* après induction par l'interaction des bactéries avec les granulocytes immatures et les neutrophiles

I.2.4.1. Incubation bactéries et granulocytes

Les granulocytes (GI ou neutrophiles) ont été incubés avec *E. coli* MG1656 ou *E. coli* MG1656-*lexAInd3*, portant le plasmide pPqnrB2-*qnrB2* (expression de *qnrB2* sous le contrôle de son propre promoteur, PqnrB2, régulé par LexA)¹⁵¹ pendant 90 min à 37°C dans un bain marie, et respectant le ratio de 200 bactéries par cellule. Les bactéries phagocytées ont été récupérées comme décrit dans la section I.2.3 pour évaluer l'induction de l'expression de *qnrB2* par RT-qPCR, et l'expression de résistance à la ciprofloxacine dans cette population.

Du fait de la disponibilité variable des échantillons des patients dans le temps, l'analyse de l'induction d'expression du gène *qnrB2* après interaction avec des GI a été faite à partir de deux types d'échantillons différents : pour la quantification des transcrits du gène *qnrB2*, nous avons analysé des bactéries, seules, et après incubation avec des neutrophiles des donneurs sains, et avec des GI de patients septiques. Pour la détermination de la sensibilité à la ciprofloxacine, nous avons comparé des bactéries en incubation seules, et après incubation avec des neutrophiles des donneurs sains, et des GI des donneurs de cellules hématopoïétiques.

I.2.4.2. Quantification des transcrits du gène *qnrB2*

Le culot de bactéries phagocytées a été incubé pendant 15 minutes avec 20µg/mL de RNase A (Macherey-Nagel) à température ambiante pour éliminer l'ARN eucaryote contaminant. La RNase A a été éliminée par centrifugation (>12000 x g pendant 10 min, RT), et le culot a été lavé dans du PBS filtré, puis a été immédiatement traité avec le RNeasy Mini Kit (Qiagen), en suivant les instructions du fabricant pour récupérer l'ARN bactérien purifié.

L'ADN contaminant a été éliminé à l'aide du kit Turbo-DNAfree (ThermoFisher Scientific) selon les instructions du fabricant et l'ARN isolé a été dosé à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop ND1000 (Thermo Fisher Scientific) puis conservé à -80°C.

La rétro-transcription a été réalisée suivant les indications du kit PrimeScript RT (Perfect Real Time, Takara), dans un volume final de 60 µL. Les concentrations d'ARN ont été ajustées à une quantité finale équivalente à celle de l'échantillon le moins concentré (32ng). Un témoin négatif de chaque échantillon sans le mélange enzymatique RT a été ajouté.

Les ADNc obtenus ont été quantifiés avec le kit Perfecta fastmix II (QuantaBio), selon les instructions du fabricant avec des amorces (10µM) et sondes FAM (10µM) spécifiques des gènes ciblés (**Tableau 12**). Les échantillons ont été traités en triplicats techniques. Une gamme étalon a été réalisée en utilisant un plasmide de concentration connue de 10⁸ à 10² copies contenant les gènes ciblés. Chaque gène (*rpoB* chromosomique ; *qnrB2* et *aph(3')-IIa* plasmidiques) a été estimé séparément. Le gène chromosomique *rpoB* a été utilisé comme gène de référence pour la normalisation des résultats. Pour tenir compte des multiples copies de plasmide par bactérie, le gène plasmidique conférant une expression constitutive de résistance à la kanamycine (*aph(3')-IIa*) a aussi été utilisé pour normaliser l'expression de *qnrB2*.

Tableau 12. Sondes utilisées pour la RTqPCR

Sonde	Séquence (5'→ 3')	Reference
rpoB-R1	GTTTGGTACGCGCAGAGAAG	183
rpoB-L2	CCGGTATCGTTTACATTGGTG	
kana R1	GTAGCCGGATCAAGCGTATG	
kana L1	GAAGGGACTGGCTGCTATTG	
qnrB2 LC1	CGGCGAGTTTTCGACTTT	151
qnrB2 LC2	ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	
rpoB-probe	[6FAM]CTGGTTGGTAAGGTAACGCCGAAAGGT [TAM]	183
kana-probe	[6FAM]TCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGC[BHQ1]	
qnrB2-probe	[6FAM]TGGGTGACTTAGATATTCGGCGCGTT(Tamra)	151

Le nombre de copies du gène ADNc *qnrB2* a été calculé comme expliqué dans la **Figure 54**

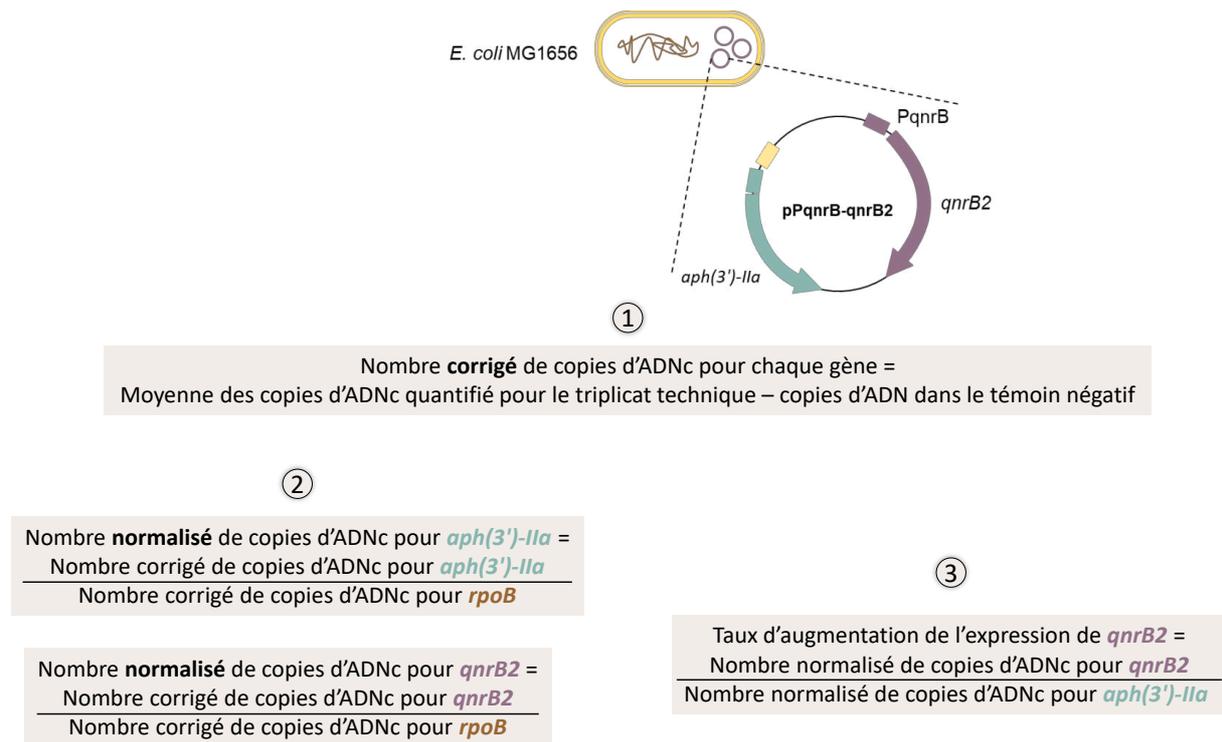


Figure 54. Calcul du taux d'augmentation de l'expression de *qnrB2*

I.2.4.3. Détermination de la sensibilité à la ciprofloxacine par E-test®

Pour mesurer un possible changement du niveau de sensibilité à la ciprofloxacine secondaire à l'expression du gène *qnrB2*, nous avons réalisé une incubation de *E. coli* MG1656/pPqnrB-*qnrB2* ou *E. coli* MG1656-*lexAInd3*/pPqnrB-*qnrB2* avec des granulocytes comme décrit dans la section I.2.4.1.

Les bactéries phagocytées ont été récupérées en suivant le protocole de la section I.2.3, et mises en suspension dans de la solution saline pour atteindre une concentration de 0,5 McFarland. Cette suspension a été étalée sur une boîte MH non sélective et la CMI pour la ciprofloxacine a été mesurée à l'aide d'une bandelette E-test® (bioMérieux) de ciprofloxacine. L'ellipse d'inhibition de croissance a été lue après incubation pendant 18h à 37°C.

La CMI des souches de *E. coli* MG1656/pPqnrB-*qnrB2*, *E. coli* MG1656-*lexAInd3*/pPqnrB-*qnrB2* et *E. coli* MG1656/pSU38- Δ tot incubés sans cellules a été également mesurée pour comparaison.

Résultats

Les patients ayant un risque augmenté de mauvaise pronostic (admission en réanimation, développement des infections secondaires, et mortalité) ont une augmentation en la proportion de granulocytes immatures (GI)^{66,69,73} libérés de la moëlle osseuse^{43,64}. Ces derniers ont des fonctions de phagocytose et de production de ROS diminuées par rapport aux neutrophiles^{64,65,68}.

L'hypothèse évaluée dans ce travail propose que lors du sepsis, la libération de granulocytes immatures peut induire la réponse SOS bactérienne, conduisant à l'expression entre autres de résistances aux antimicrobiens (**Figure 1**). Pour vérifier cette hypothèse, nous avons développé un modèle d'incubation *in vivo* et *ex vivo* de *E. coli* avec différents sous-types de granulocytes. A l'aide de ce modèle, l'activité phagocytaire et de production de ROS par les GI et les neutrophiles a été comparée (section I.1 de résultats, page 102), ainsi que leur capacité à induire la réponse SOS bactérienne (section I.2 de résultats, page 109).

L'impact biologique de cette induction a été évalué par l'expression de résistance aux antibiotiques liée à la réponse SOS : i) par l'induction de l'expression du gène *qnrB2* (section I.3.1, page 121), conférant la résistance aux quinolones, et ii) par l'induction de l'expression de l'intégrase de l'intégron de classe 1, importante pour l'acquisition, la dissémination et le rangement des cassettes de gènes de résistance au sein de l'intégron (section I.3.2, page 123).

L'ensemble des résultats obtenus dans ce travail de thèse sont décrits dans cette section. Une grande partie de ces résultats ont fait l'objet d'un article (en cours de soumission) que vous trouverez à la fin de la section Résultats.

I.1. Phagocytose et production des ROS par les GI et les neutrophiles

Nous avons dans un premier temps évalué la capacité de phagocytose et de production de ROS des différents granulocytes. Les GI et les neutrophiles ont été incubés avec la souche *E. coli* MG1656-mCherry pour suivre leur activité phagocytaire. La sonde CellROX qui émet de la fluorescence lorsqu'elle est clivée par une réaction d'oxydation a été ajoutée pour quantifier la production de ROS. Le tout a été incubé pendant 10, 30, 40, 60 et 90 minutes, à 37°C. Les échantillons ont ensuite été fixés et acquis par cytométrie en flux. Un échantillon de cellules en présence de *E. coli* MG1656-mCherry et la sonde CellROX fixé sans incubation a été acquis comme temps 0 (le protocole détaillé est décrit page 92 du Matériels et méthodes).

Des conditions de cellules incubées avec la sonde CellROX mais sans bactéries ont été également acquises pour mesurer la production de ROS par les granulocytes en absence de stimulation.

Grâce à l'expression constitutive de mCherry par *E. coli* MG1656-mCherry, les cellules ayant phagocyté des bactéries peuvent être identifiées par cytométrie en flux par leur fluorescence rouge. L'incubation des granulocytes seuls a été utilisée pour déterminer le seuil d'auto-fluorescence rouge des cellules. Le nombre d'événements au-dessus de ce seuil parmi le total des cellules viables définit la proportion de cellules ayant phagocyté des bactéries (% de phagocytose), tandis que la moyenne d'intensité de fluorescence (*Mean Fluorescence Intensity*, MFI) est un indicateur du nombre de bactéries phagocytées par cellule (MFI mCherry).

La fluorescence émise par l'oxydation de la sonde CellRox Deep Red, mesurée parmi les cellules ayant phagocyté des bactéries, est un indicateur de la production de ROS. La MFI pour cette fluorescence est proportionnelle à la quantité de ROS produits (**Figure 55**).

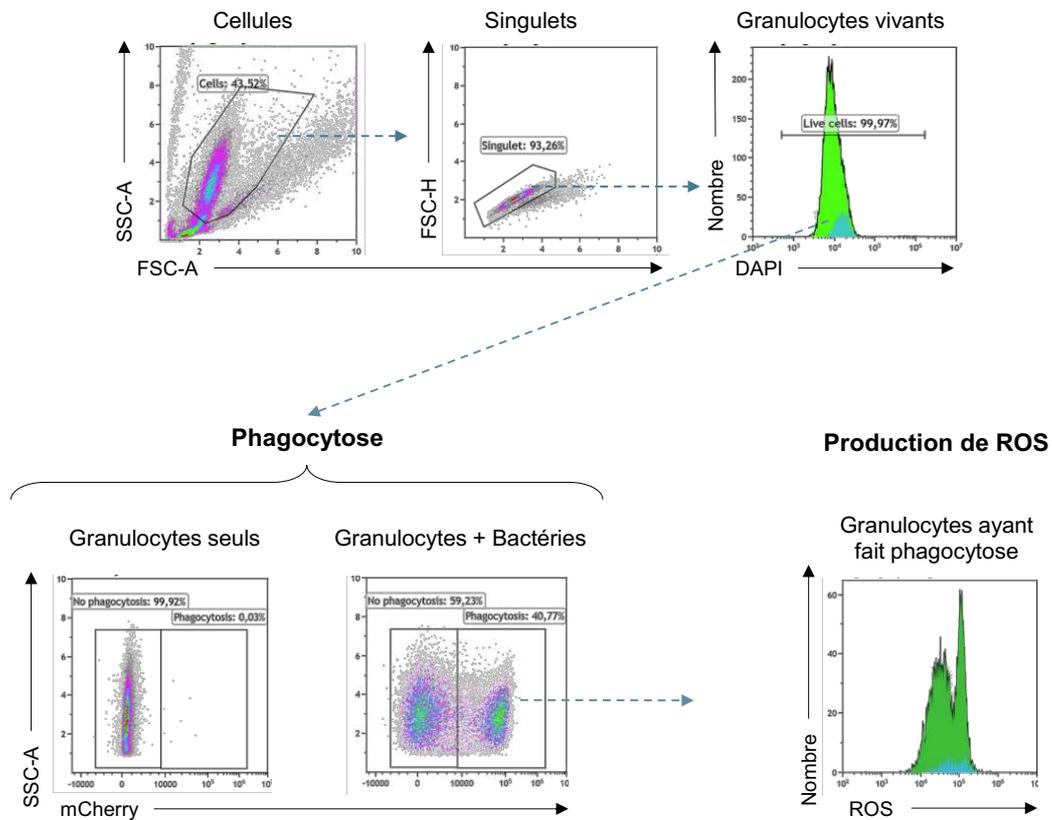


Figure 55. Stratégie de « gating » pour la quantification de la phagocytose et la production de ROS par les granulocytes

Les granulocytes ont été identifiés par leur caractéristiques de taille/structure (SSC-A/FSC-A). Les granulocytes acquis en 'singlets' ont été sélectionnés parmi les débris cellulaires et les doublets (FSC-H/FSC-A). Les granulocytes singlets viables ont été identifiés par leur absence de fluorescence DAPI (Nombre/DAPI). Les granulocytes ayant phagocyté des bactéries ont été identifiés grâce à leur fluorescence mCherry (SSC-A/mCherry). Parmi les granulocytes phagocytaires, la quantité de ROS produite a été estimée en fonction de la moyenne d'intensité de fluorescence pour CellROX (Nombre/ROS).

Ces variables ont été mesurées initialement *in vitro* pour les GI et les neutrophiles issus de la différenciation de la lignée HL-60 (**Figure 56** et **Figure 58**) ; et puis *ex vivo*, pour des GI provenant de donneurs de cellules souches hématopoïétiques ayant reçu du G-CSF ; des GI provenant de patients septiques ; et des neutrophiles de donneurs sains (**Figure 57** et **Figure 59**). Nous avons réalisé ces tests avec les 4 souches dérivées de *E. coli* MG1656-mCherry contenant les plasmides rapporteurs de la réponse SOS, pour vérifier que la phagocytose et la production de ROS n'étaient pas différentes selon la souche utilisée.

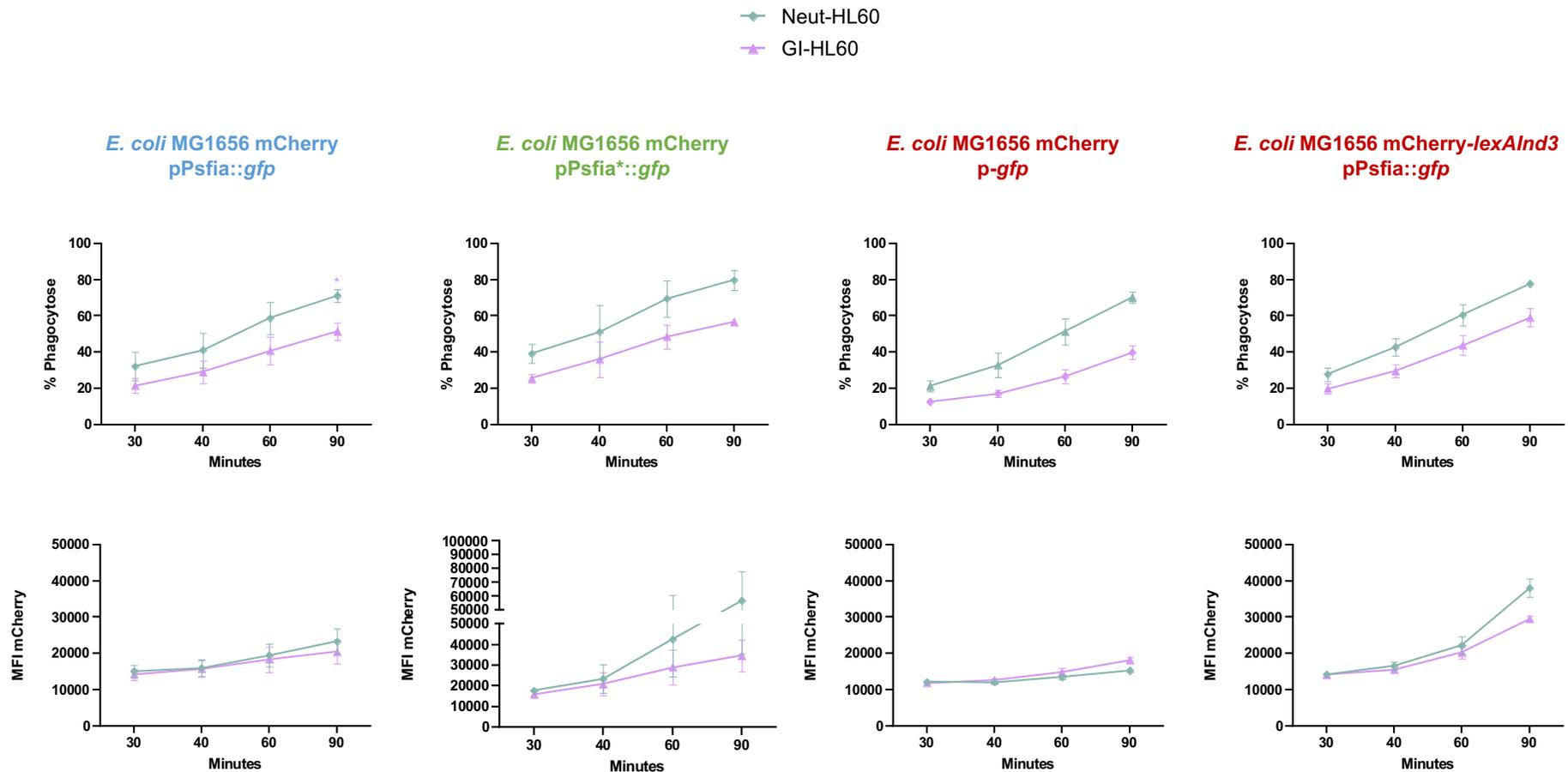


Figure 56. Activité phagocytaire des granulocytes immatures (GI-HL60) et neutrophiles (Neut-HL60) obtenus de la différenciation de la lignée cellulaire HL-60

L'activité de phagocytose a été mesurée par l'incubation en parallèle avec les 4 *E. coli* du modèle pour suivre l'induction de la réponse SOS (de la gauche vers la droite : *E. coli* MG1656 mCherry/pPsfiA::gfp ; pPsfiA*::gfp ; p-gfp ; et *E. coli* MG1656 mCherry-lexAInd3/pPsfiA::gfp). En haut, le pourcentage des cellules ayant fait de la phagocytose, en bas, la moyenne des bactéries phagocytées par cellule d'après l'intensité de fluorescence pour mCherry (MFI mCherry). GI-HL60 n=5, Neut-HL60 n=5 Test d'ANOVA, *p<0,05.

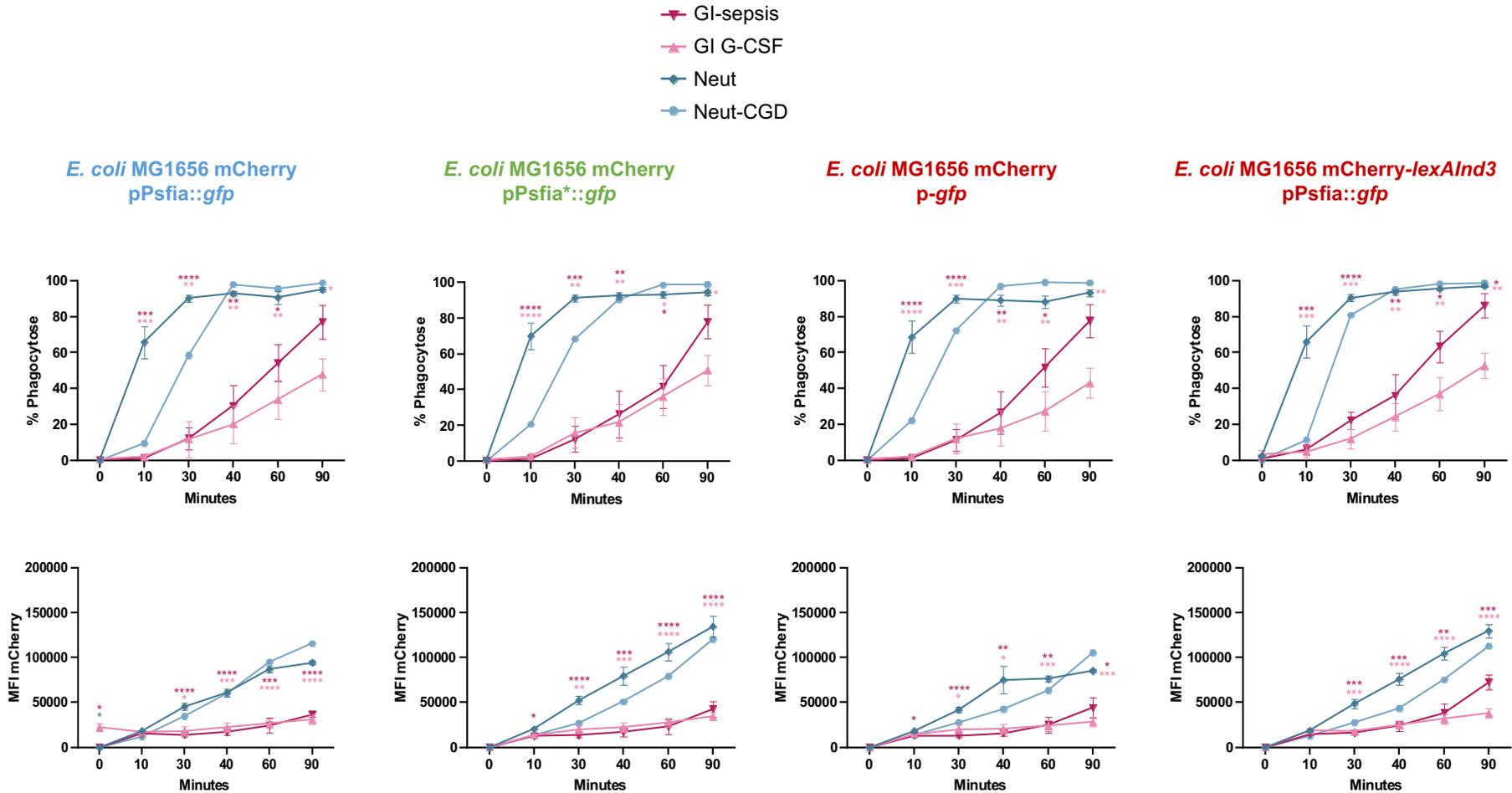


Figure 57. Activité phagocytaire des granulocytes humains

GI des patients septiques (GI-sepsis, rouge cerise) ; GI des donneurs de cellules hématopoïétiques (GI G-CSF, rose pâle) ; neutrophiles des donneurs sains (Neut, bleu foncé), et neutrophiles d'un patient atteint d'une granulomatose chronique familiale (« *chronic granulomatose disease* », CGD) (Neut-CGD, bleu clair). L'activité de phagocytose a été mesurée par l'incubation en parallèle avec les 4 *E. coli* du modèle pour suivre l'induction de la réponse SOS. En haut, le pourcentage des cellules ayant fait de la phagocytose, en bas, la moyenne des bactéries phagocytées par cellule d'après l'intensité de fluorescence pour mCherry. GI-sepsis n= 5, GI G-CSF n= 5, Neut=10, Neut-CGD n= 1. Test d'ANOVA, *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 ; ****p<0,0001.

Les modèles *in vitro* et *ex vivo*, ont montré de façon concordante une meilleure capacité des neutrophiles à phagocyter en comparaison des granulocytes immatures. Le pourcentage de cellules phagocytaires est plus important parmi les neutrophiles que ce soit à partir de cellules HL-60 différenciées ou *ex vivo* mais leur cinétique n'est pas similaire.

Les neutrophiles différenciés de la lignée cellulaire HL-60 (Neut-HL60) ont une augmentation graduelle de l'activité de phagocytose qui atteint un maximum de 80% à 90 minutes. Bien que cette proportion soit supérieure à celle des granulocytes immatures de la même lignée (GI-HL60) avec un maximum inférieur à 60%, la différence n'est pas significative et les courbes évoluent selon le même mode. Les Neut-HL60 et GI-HL60 semblent de plus phagocyter en moyenne le même nombre de bactéries (**Figure 56**).

En contraste, les granulocytes immatures issus des prélèvements humains ont une activité phagocytaire significativement diminuée par rapport à celle des neutrophiles, à la fois en termes de proportion de cellules phagocytaires, et de moyenne de bactéries phagocytées par cellule (**Figure 57**).

Les neutrophiles des donneurs sains (Neut) sont rapidement actifs : après 10 minutes d'incubation, 66% des neutrophiles ont phagocyté des bactéries. Pour ce projet nous avons eu l'opportunité d'utiliser un échantillon de sang périphérique d'un patient atteint d'une granulomatose chronique familiale (*Chronic Granulomatose Disease*, CGD). Cette maladie, est secondaire à la mutation d'une sous-unité du complexe NADPH-oxydase (dans ce cas, la gp91^{phox}) ce qui bloque l'assemblage du complexe et le *burst* oxydatif⁶². Néanmoins, l'activité phagocytaire de ces neutrophiles (Neut-CGD) reste intacte, comme le démontrent nos résultats (**Figure 57**). Les Neut-CGD semblent en revanche nécessiter plus de temps pour arriver au même niveau de phagocytose que les neutrophiles des donneurs sains, mais cette différence n'est pas significative, et à 40 minutes d'incubation en présence des bactéries, 93% des cellules des deux sous-types ont phagocyté les bactéries.

Les granulocytes immatures des donneurs de cellules hématopoïétiques (GI G-CSF) ont une cinétique plus proche de celle des dérivés de la lignée cellulaire : une augmentation graduelle et limitée avec un maximum de 48% des cellules engageant la phagocytose à 90 minutes. Les granulocytes immatures de patients septiques (GI-sepsis) gardent cette cinétique, mais atteignent un maximum de phagocytose plus proche de celle des neutrophiles (77% à 90 minutes).

Les activités de phagocytose sont similaires quelle que soit la souche utilisée.

Nous avons ensuite analysé les résultats de la production de ROS par les GI et neutrophiles issues de la différenciation des HL-60 (**Figure 58**) et les GI et neutrophiles humains (**Figure 59**).

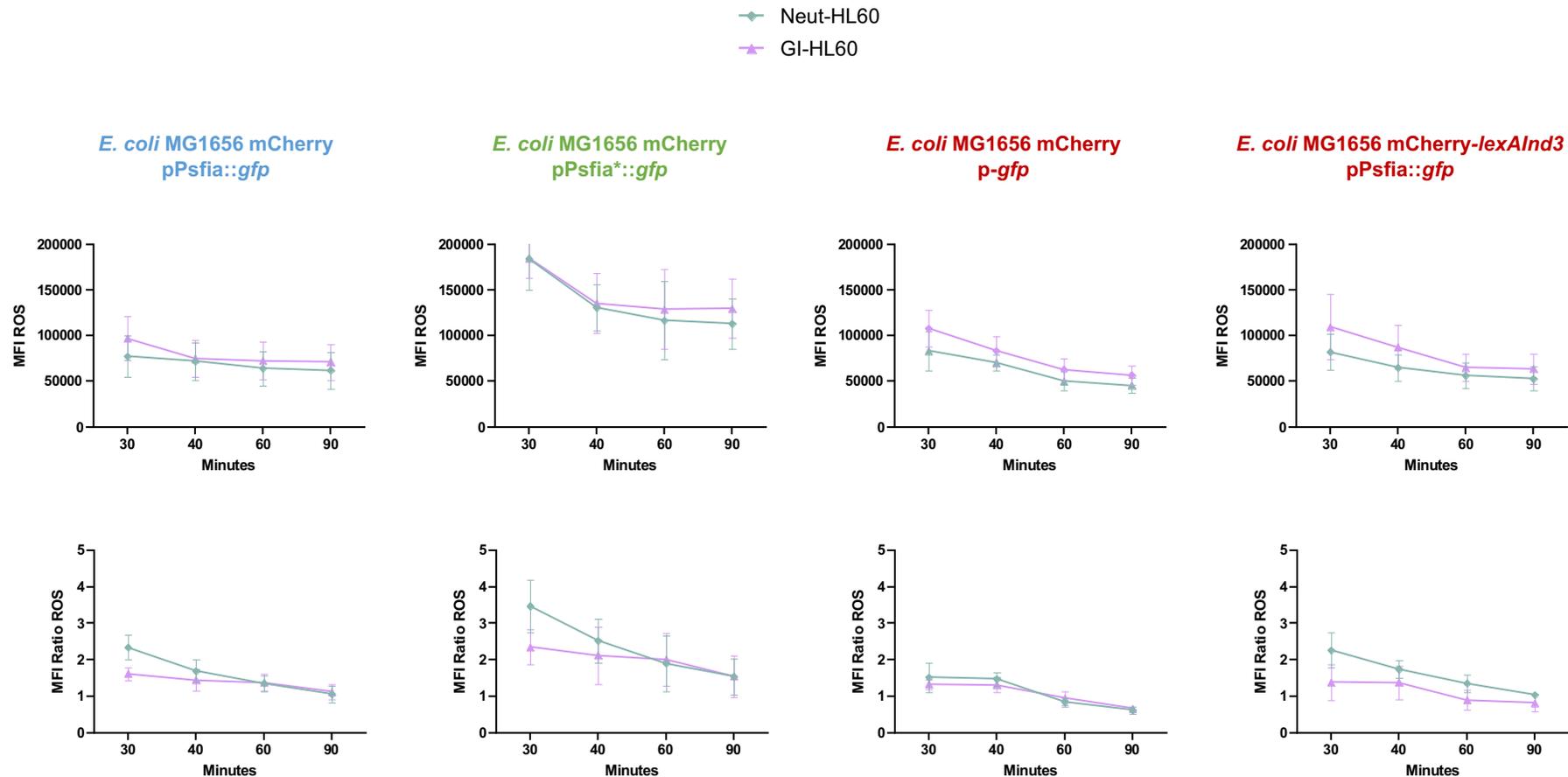


Figure 58. Production des ROS par les granulocytes immatures (GI-HL60) et neutrophiles (Neut-HL60) obtenus de la différenciation de la lignée cellulaire HL-60

La production des ROS a été mesurée en parallèle après incubation avec les 4 *E. coli* du modèle pour suivre l'induction de la réponse SOS. En haut, la valeur de la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) mesurée (fluorescence émise par la sonde CellRox). En bas, le ratio de la MFI calculé en rapportant la MFI mesurée en conditions d'incubation des granulocytes avec les bactéries sur la MFI mesurée en conditions d'incubation des granulocytes seuls aux mêmes temps d'incubation. GI-HL60 n=5, Neut-HL60 n=5.

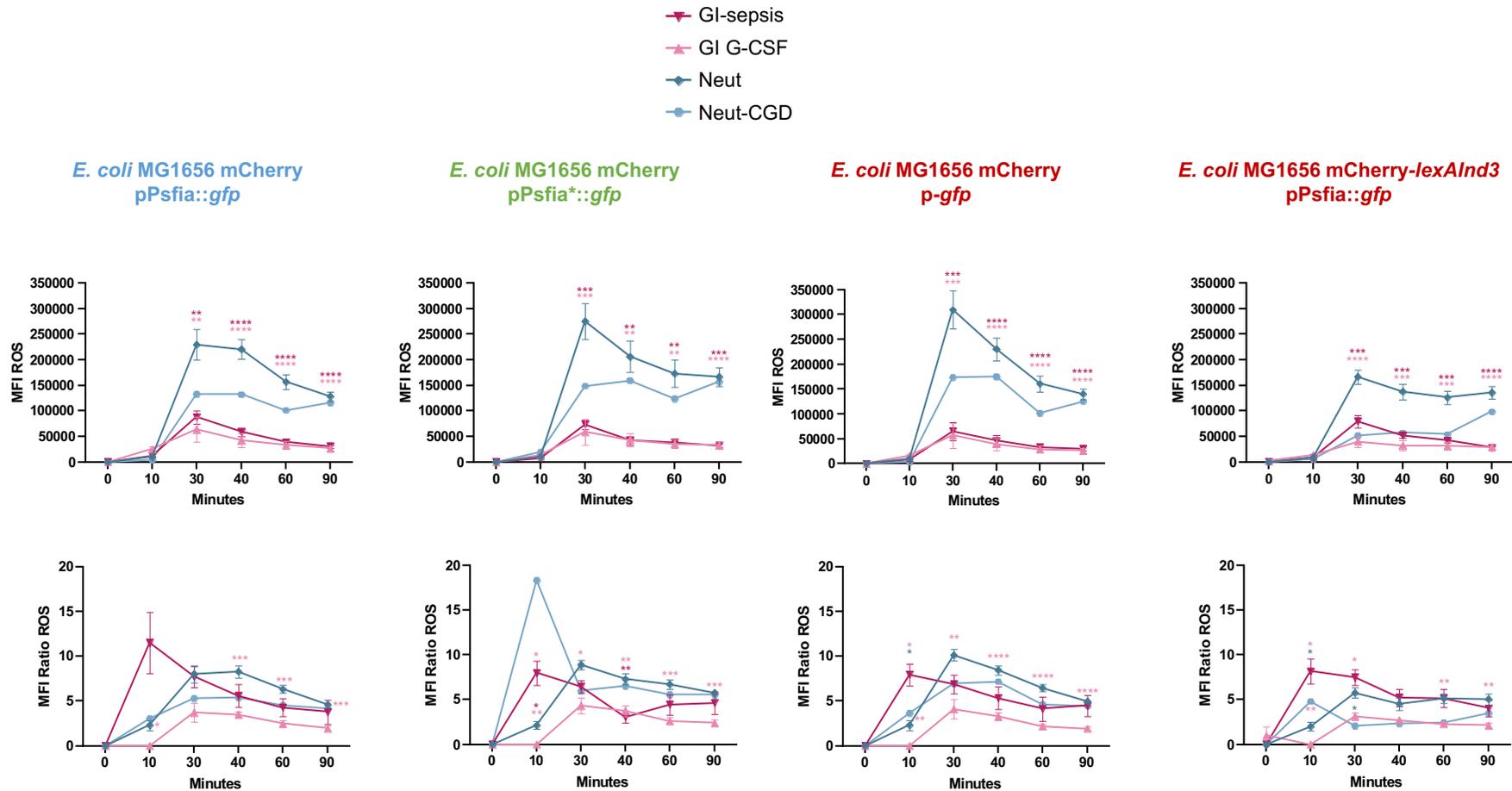


Figure 59. Production des ROS par les granulocytes humains

Les GI des patients septiques (GI-sepsis, rouge cerise) ; GI des donneurs de cellules hématopoïétiques (GI G-CSF, rose pâle) ; neutrophiles des donneurs sains (Neut, bleu foncé), et neutrophiles d'un patient atteint d'une granulomatose chronique familiale (« *chronic granulomatose disease* », CGD) (Neut-CGD, bleu clair). En haut, la valeur de la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) correspondant à la fluorescence émise par la sonde CellRox. En bas, le ratio de la MFI calculé en rapportant la MFI mesurée en conditions d'incubation des granulocytes avec les bactéries sur la MFI mesurée en conditions d'incubation des granulocytes seuls aux mêmes temps d'incubation. GI-sepsis n= 5, GI G-CSF n= 5, Neut=10, Neut-CGD n= 1. Test d'ANOVA, *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 ; ****p<0,0001.

La sonde de détection des radicaux $O_2^{\bullet-}$ et $\bullet HO$ n'est pas spécifique des ROS produits par le complexe NADPH-oxydase et peut donc réagir avec les ROS dérivés du métabolisme cellulaire. Pour quantifier le bruit de fond produit par ces dérivés, une condition avec les cellules seules (sans stimulation) incubées avec la sonde a été ajoutée. Le calcul du ratio entre la fluorescence produite par les cellules phagocytaires et les cellules non stimulées est proposé pour évaluer le taux d'augmentation des ROS. Les résultats de la production de ROS sont donc présentés de deux façons : par la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI), et par ce ratio.

Les granulocytes différenciés à partir des HL-60 n'ont pas montré de différence de production de ROS, en fonction de leur niveau de maturation (**Figure 58**). A 30 minutes d'incubation avec les GI-HL60 et Neut-HL60, on observe une légère augmentation de la production de ROS par rapport à leur production sans stimulation (**Figure 58**, Ratio MFI). A 90 minutes, la production de ROS par les cellules incubées avec les bactéries était revenue à l'état basal de production sans induction, correspondant à l'activité de ROS lié au métabolisme cellulaire (**Figure 58**, Ratio MFI).

Dans le modèle *ex vivo*, les GI (GI-sepsis et GI G-CSF) ont montré une production de ROS significativement inférieure à celle des neutrophiles des donneurs sains (Neut) à partir de 30 minutes d'incubation (**Figure 59**, MFI ROS). Les résultats du patient CGD (Neut-CGD), ayant une mutation documentée de la sous-unité gp91^{phox} du complexe NADPH-oxydase qui la rendre non-fonctionnelle, montrent une production de ROS inférieure à celle des Neutrophiles et non significativement supérieure à celle des GI. Comme ce patient n'est pas capable de produire des ROS par la voie NADPH-oxydase, nous supposons que les ROS observés sont dus à l'activité métabolique de la cellule, principalement des ROS mitochondriaux.

Lorsque l'on analyse les données en ratio de MFI, on observe que à partir de 30 minutes, toutes les cellules incubées avec des bactéries ont une augmentation de leur production de ROS (ratio MFI, Figure 58). La production de ROS des GI-sepsis augmente en moyenne d'un facteur $5,2 \pm 2,6$ par rapport à leur production basale. Cette augmentation est d'un facteur 6.7 ± 2.4 pour les Neut. Toutefois, l'augmentation de production de ROS chez les GI-sepsis ne se traduit pas par une production en quantitativement plus importante comme par rapport aux neutrophiles (**Figure 59**, MFI ROS).

Toutes ces constatations sont vraies indépendamment de la bactérie avec laquelle les cellules étaient incubées.

I.2. Induction de la réponse SOS par les Granulocytes Immatures et les neutrophiles

Dans le but de mettre en évidence une induction SOS par cytométrie en flux et microscopie, la souche *E. coli* MG1656-*mCherry* a été transformée alternativement avec les plasmides rapporteurs pPsfIA::*gfp*, pPsfIA*::*gfp* et p-*gfp* ; et la souche *E. coli* MG1656-*mCherry-lexAInd3*, avec le plasmide pPsfIA::*gfp* (**Figure 49** page 89, **Tableau 6** page 90). Brièvement, le plasmide pPsfIA::*gfp* porte une fusion transcriptionnelle entre le promoteur de *sfiA* « PsfiA », ayant une boîte LexA – et le gène *gfp*. L'activation de la réponse SOS par l'induction du clivage de LexA, permet l'expression de la protéine fluorescente GFP. Le plasmide pPsfIA*::*gfp*, où la boîte LexA a été mutée pour empêcher l'attachement de LexA est utilisée comme témoin positif de l'expression constitutive de GFP. Enfin, le plasmide portant le gène *gfp* sans promoteur (p-*gfp*) et la souche *E. coli* MG1656-*mCherry-lexAInd3* ont été utilisés comme témoins négatifs de l'expression de *gfp*, et de l'induction de la réponse SOS, respectivement. La fluorescence

émise par la GFP et son niveau d'intensité ont été quantifiés au sein des cellules contenant des bactéries (**Figure 60**), ainsi que parmi les bactéries non phagocytées (**Figure 65**).

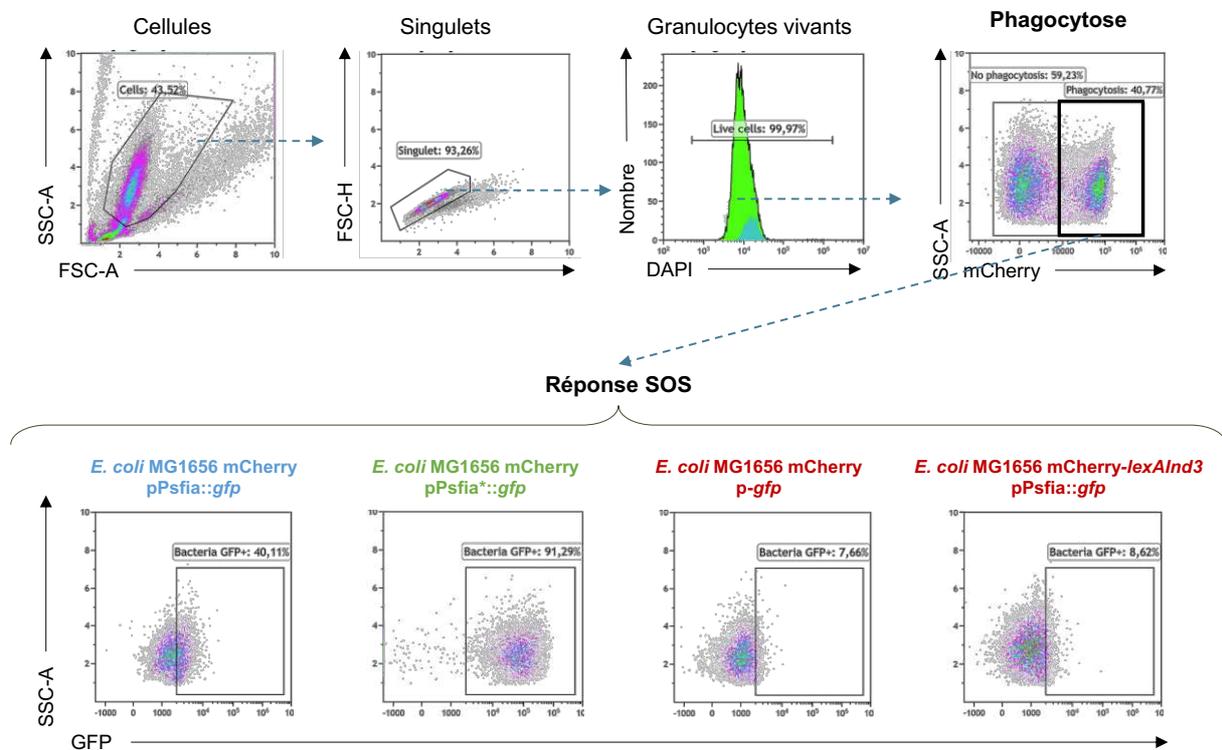


Figure 60. Stratégie de « gating » pour l'identification de granulocytes portant des bactéries GFP+

Les granulocytes contenant des bactéries GFP+ ont été identifiés dans la fenêtre des granulocytes contenant des bactéries (SSC-A/mCherry), d'après leur augmentation d'intensité de fluorescence pour mCherry. A leur tour, les granulocytes phagocytaires ont été identifiés parmi les granulocytes vivants (Nombre/DAPI) passés individuellement (FSC-H/FSC-A) devant le laser d'acquisition du cytomètre.

D'une manière similaire aux résultats d'analyse de phagocytose, le niveau d'induction SOS par les bactéries phagocytées a été quantifié par le pourcentage de cellules contenant des bactéries mCherry+/GFP+ (% GFP+). La moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) pour la GFP renseigne sur la moyenne de bactéries mCherry+/GFP+ contenues dans chaque cellule (MFI GFP+). Ces deux variables ont été mesurées *in vitro* (**Figure 61**) et *ex vivo* (**Figure 62**).

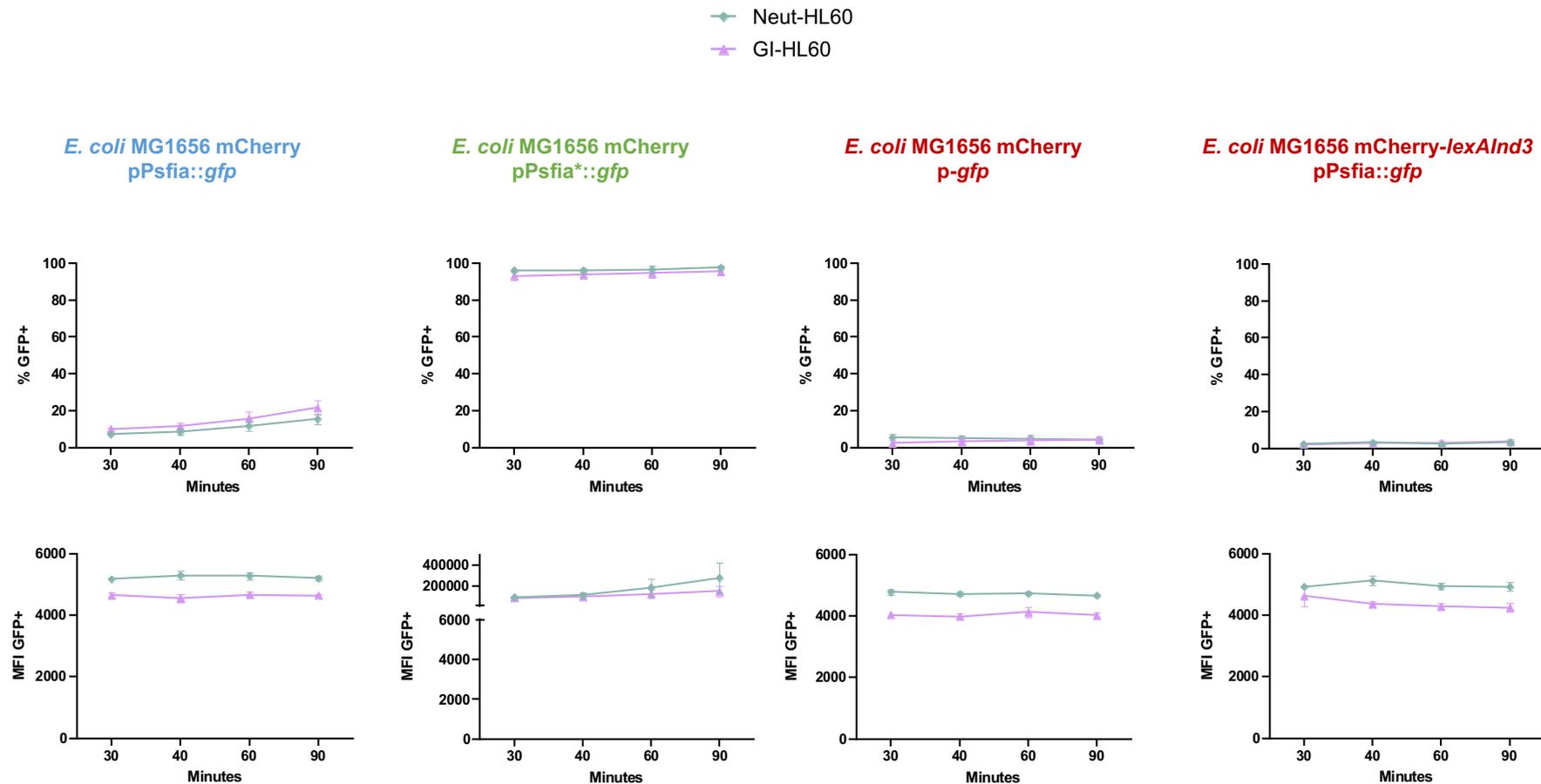


Figure 61. Induction de la réponse SOS par les GI et Neutrophiles différenciés à partir de la lignée cellulaire HL-60

L'induction de la réponse SOS a été suivie par l'incubation des bactéries *E. coli* MG1656 mCherry/pPsiA:gfp avec les neutrophiles et les GI différenciés de la lignée cellulaire HL-60. Les conditions avec la souche *E. coli* MG1656 mCherry/pPsiA*::gfp correspondent au contrôle positif pour l'expression de la GFP et les souches *E. coli* MG1656 mCherry/p-gfp et *E. coli* MG1656 mCherry-lexAInd3/pPsiA::gfp comme contrôles négatifs de l'expression de GFP et de la réponse SOS, respectivement. GI-HL60 n=5, Neut-HL60 n=5

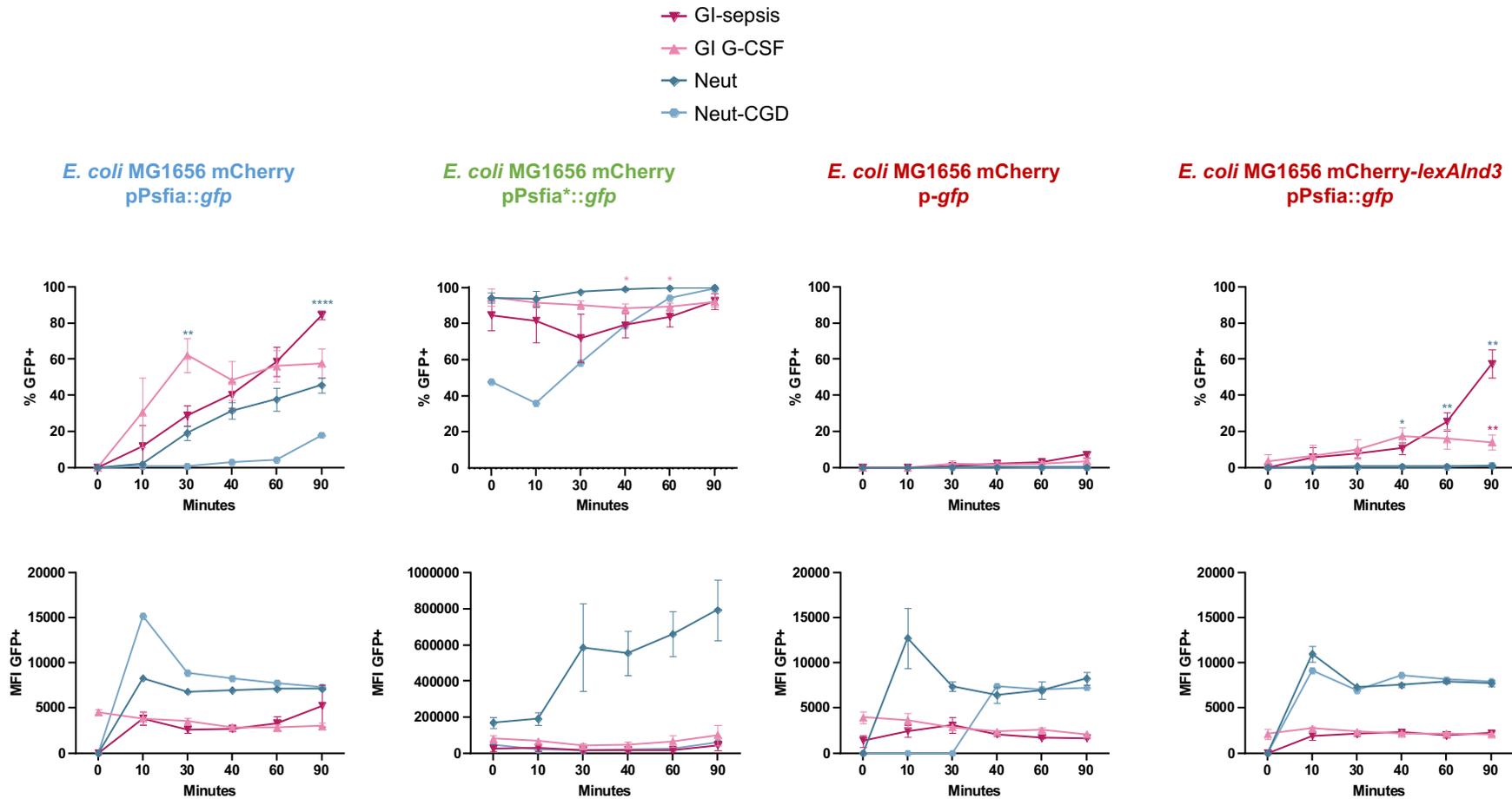


Figure 62. Induction de la réponse SOS par les granulocytes humains

L'induction de la réponse SOS a été suivie par l'incubation des bactéries *E. coli* MG1656 mCherry/pPsfia::gfp avec des neutrophiles des donneurs sains (Neut) et du patient atteint d'une granulomateuse chronique familiale (Neut-CGD), ainsi que des granulocytes immatures provenant des patients septiques (GI-sepsis), ou des donneurs de cellules hématopoïétiques (GI G-CSF).

Les conditions avec la souche *E. coli* MG1656 mCherry/pPsfia*::gfp correspondent au contrôle positif pour l'expression de la GFP et les souches *E. coli* MG1656 mCherry/p-gfp et *E. coli* MG1656 mCherry -lexAInd3/pPsfia::gfp comme contrôles négatifs de l'expression de GFP et de la réponse SOS, respectivement. GI-sepsis n= 5, GI G-CSF n= 5, Neut=10, Neut-CGD n= 1. Test d'ANOVA, *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 ; ****p<0,0001.

L'incubation de *E. coli* MG1656 mCherry/pPsfIA::gfp avec les granulocytes différenciés à partir de la lignée cellulaire HL-60 a montré un bas niveau d'induction SOS indépendamment du niveau de maturation avec un maximum de cellules contenant des bactéries GFP+ de 22% à 90 minutes. Néanmoins, 100% des cellules contiennent des bactéries qui expriment la GFP dans le contrôle positif, comme attendu. En revanche, il y a une quasi disparition du signal GFP avec les souches *E. coli* MG1656-mCherry/p-gfp (4.1 ± 2.9 %) et *E. coli* MG1656-mCherry-lexAInd3 (2.8 ± 1.6 %) montrant que la GFP observée avec *E. coli* MG1656 mCherry/pPsfIA::gfp (qui atteint 21.7 ± 8.9 % à 90 minutes d'incubation avec les GI-HL60) est liée à la réponse SOS (**Figure 61**). Les valeurs observées en MFI pour ces deux contrôles sont donc dues à l'autofluorescence des cellules comme le montre la **Figure 63**.

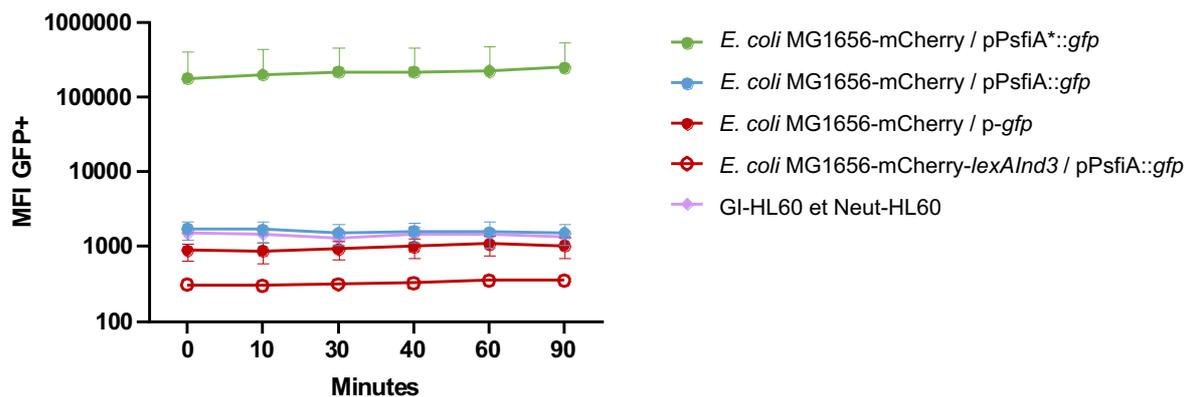


Figure 63. Moyenne d'intensité de fluorescence pour GFP parmi les bactéries incubées sans induction SOS et les dérivés HL60 incubés sans bactéries

Les valeurs représentées sont la moyenne et l'écart-type de 11 expériences indépendantes.

Les résultats sont plus intéressants pour le modèle *ex vivo*, où la proportion des granulocytes phagocytaires qui contiennent des bactéries GFP+ est plus importante chez les GI, avec une augmentation rapide pour les GI G-CSF, qui atteint un plateau de 58% des cellules qui sont GFP+ à 30 minutes d'incubation avec *E. coli* MG1656 mCherry/pPsfIA::gfp. Les GI-sepsis ont une augmentation plus graduelle mais continue, et à 90 minutes d'incubation, 85% des GI-sepsis contiennent des bactéries dans lesquelles la réponse SOS a été activée. Ce niveau d'induction est significativement plus élevé pour les GI-sepsis que pour les neutrophiles des donneurs sains (85% vs. 46%, $p < 0.0001$ à 90 minutes) (**Figure 62**).

Avec la souche *E. coli* MG1656 mCherry-lexAInd3/pPsfIA::gfp, on observe une fluorescence augmentée à partir de 40 minutes d'incubation. Ce résultat est surprenant, car la mutation LexAInd3 entraîne une forme de LexA non clivable¹⁹². Cependant, en plus de sa production de ROS, le phagosome granulocytaire est caractérisé par son et de pH élevé (7.5 - 8.5). Il a été montré que la réaction d'autoclivage de LexA peut survenir spontanément à des pH entre 7.15 et 10 d'une façon dépendante du pH et du temps, et indépendamment de RecA¹⁹³. L'expression de *gfp* dans cette souche pourrait donc être expliquée par une diminution de sa forme dimérisée répressive après un temps d'incubation prolongé (au moins 40 à 60 minutes) en présence de GI-sepsis¹⁹². Toutefois, l'induction de la réponse SOS dans la souche *E. coli* MG1656 mCherry/pPsfIA::gfp est associée à la réponse SOS, car l'augmentation de l'expression de GFP pour cette souche est plus rapide (visible à partir de 10 minutes

d'incubation), et à 90 minutes la proportion de GI-sepsis contenant des mCherry-*lexAInd3/pPsfIA::gfp* GFP+ reste significativement inférieur que celles *E. coli* MG1656 mCherry/pPsfIA::*gfp* GFP+ (57.8 ± 19.3 vs. 84.5 ± 5.5 %, $p=0.039$). Quand on analyse les résultats en MFI GFP+, la cinétique d'intensité de fluorescence observée est identique avec les deux contrôles négatifs, *i.e.* avec la souche *E. coli* MG1656 mCherry/p-*gfp* *E. coli* MG1656 mCherry-*lexAInd3/pPsfIA::gfp*, ce qui montre que l'activité GFP observée à 90 minutes (en % de GFP) n'est pas liée à l'activation de la réponse SOS bactérienne. (**Figure 57**). Avec les neutrophiles, on observe une MFI GFP+ supérieure à celle des GI (**Figure 62**), probablement expliquée par leur capacité à phagocyter plus de bactéries (comme démontré par le résultat de MFI mCherry, **Figure 57**). La MFI GFP+ des neutrophiles (donneurs sains ou GCD) est identique que ce soit avec la souche *E. coli* MG1656 mCherry/p-*gfp* ou avec *E. coli* MG1656 mCherry-*lexAInd3/pPsfIA::gfp*, montrant là aussi que cette fluorescence observée détecte une fluorescence indépendante de l'expression de *gfp* puisque on a une valeur identique pour la souche qui ne peut pas exprimer la *gfp*, *E. coli* MG1656 mCherry/p-*gfp*.

De façon intéressante, les neutrophiles provenant du patient CGD, incapables de produire des ROS par le complexe NADPH-oxydase, n'ont pas induit la réponse SOS chez les bactéries.

Nous pouvons conclure donc, que la réponse SOS est induite dans les bactéries phagocytées par les GI et les neutrophiles humains ; que la proportion des granulocytes contenant des bactéries avec une réponse SOS active est plus importante chez les GI. De plus, malgré la capacité des neutrophiles à phagocyter significativement plus de bactéries, l'intensité d'induction de la réponse SOS parmi les bactéries phagocytées par les GI est si importante qu'il n'y a pas de différences en termes de MFI GFP+ entre les sous-types cellulaires (**Figure 62** avec *E. coli* MG1656 mCherry/pPsfIA::*gfp*).

Pour exclure un possible effet de la sonde CellRox sur l'induction de la réponse SOS chez les bactéries phagocytées, nous avons répété cette expérience en remplaçant ce réactif par du milieu de culture RPMI 1640 supplémenté. Le pourcentage de phagocytose et d'induction SOS a été mesuré après incubation des granulocytes immatures et neutrophiles du modèle *in vitro* et *ex vivo* en incubation avec *E. coli* MG1656 mCherry/pPsfIA::*gfp* (**Figure 64**).

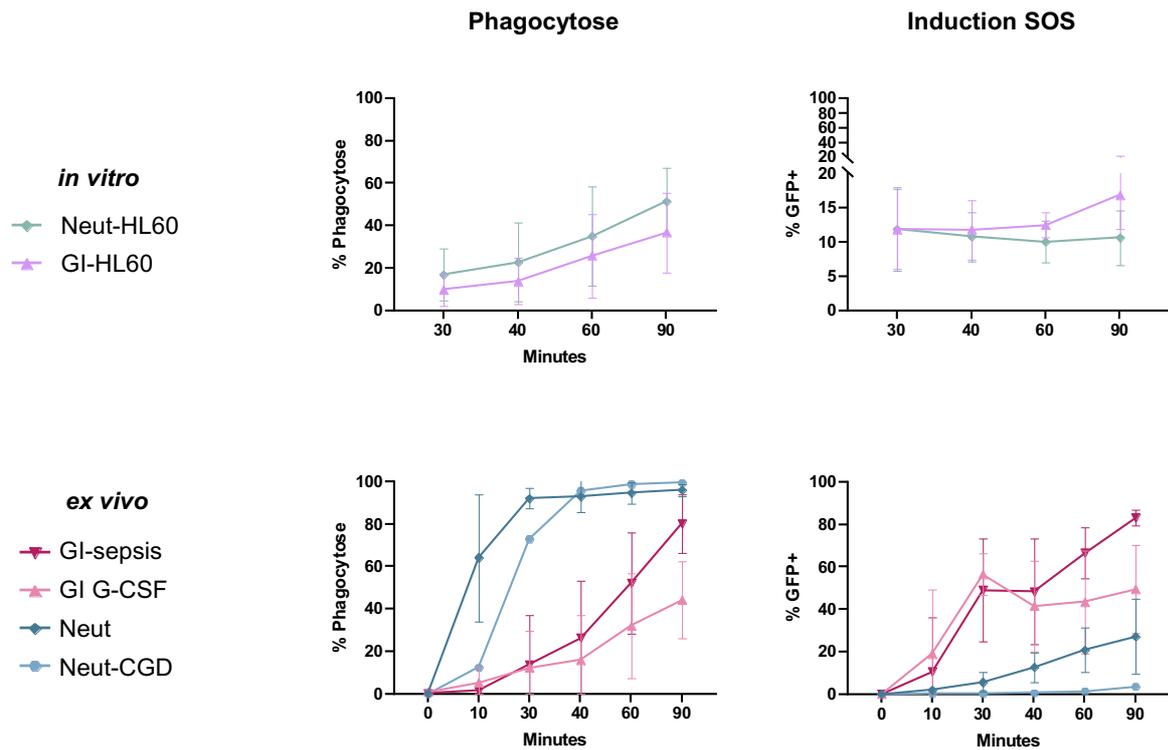


Figure 64. Phagocytose et induction SOS chez *E. coli* MG1656 mCherry/pPsfIA::gfp phagocyté par les granulocytes du modèle *in vitro* et *ex vivo*, en absence du CellRox Deep Red. GI-HL60 n=5, Neut-HL60 n=5

La cinétique des courbes dans les deux modèles, identique à celles décrites précédemment, a confirmé l'effet anodin de la sonde utilisée pour détecter les ROS sur la phagocytose et l'induction SOS.

Les granulocytes peuvent produire des ROS dans le phagosome et vers l'espace extracellulaire. C'est pourquoi nous avons mesuré l'induction de la réponse SOS parmi les bactéries non phagocytées (**Figure 66**). La quantification du nombre des bactéries GFP+ était basée sur la stratégie de *gating* représentée dans la **Figure 65**.

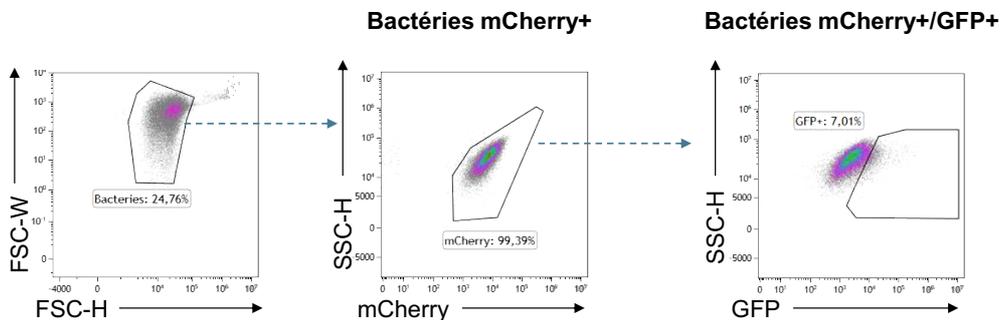


Figure 65. Stratégie de « gating » des évènements extracellulaires

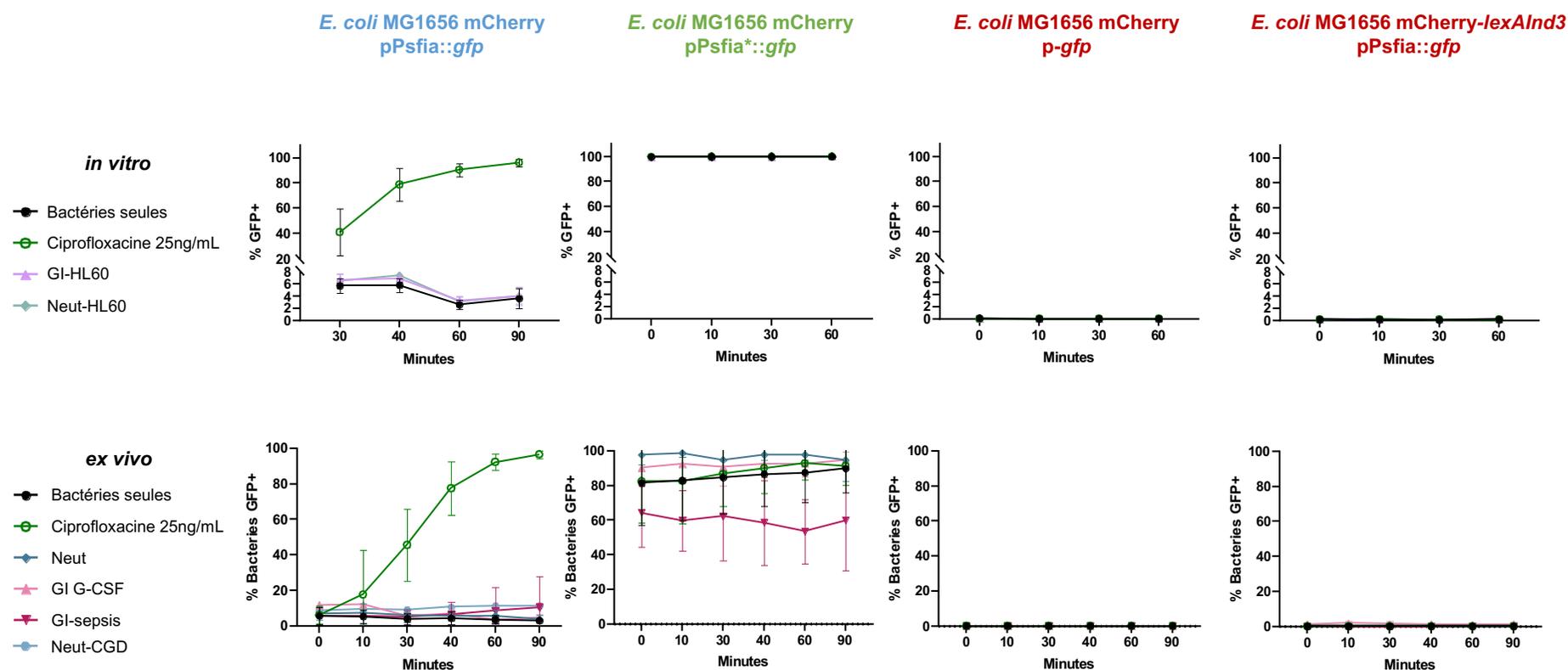


Figure 66. Expression de la réponse SOS par les bactéries non phagocytées

Le pourcentage des bactéries exprimant de la GFP a été quantifié après incubation de *E. coli* MG1656 mCherry/pPsfia::gfp, *E. coli* MG1656 mCherry/pPsfia*::gfp, *E. coli* MG1656 mCherry/p-gfp et *E. coli* MG1656 mCherry-lexAInd3/pPsfia::gfp avec les neutrophiles et GI issus de la différenciation d'une lignée cellulaire (HL-60) en haut, ou des neutrophiles et granulocytes immatures humains en bas. Pour confirmer la capacité du modèle à mettre en évidence l'induction de la réponse SOS par l'expression de la GFP, des bactéries incubées avec un inducteur connu de la réponse SOS (Ciprofloxacine 25ng/mL, cercle vert), a été ajoutée comme contrôle. Les bactéries incubées seules (non stimulées) ont été ajoutées également pour quantifier le niveau basal d'expression SOS (Bactéries seules, cercle noir). GI-HL60 n=5, Neut-HL60 n=5, GI-sepsis n= 5, GI G-CSF n= 5, Neut=10, Neut-CGD n= 1.

La proportion des bactéries *E. coli* MG1656 mCherry/pPsfIA::gfp GFP+ était non significativement différente quelles que soient les conditions évaluées, ce qui suggère une absence d'induction SOS par les bactéries non phagocytées. Pour confirmer que cette absence de signal n'est pas dû à un échec du modèle de mettre en évidence l'induction SOS par l'expression de GFP, une condition de bactéries incubées avec de la ciprofloxacine (25ng/mL) a été ajoutée. Sous ciprofloxacine, 100% des bactéries ont activé la réponse SOS au bout de 90 minutes (**Figure 66**), confirmant que la réponse SOS est activable en extracellulaire, mais que dans les conditions d'incubation avec les différents sous-types cellulaires, elles n'est pas activée.

Pour prouver la concordance des évènements de phagocytose, de production de ROS et d'induction SOS, quantifiés précédemment par cytométrie en flux, des aliquots d'incubation de *E. coli* MG1656-mCherry/pPsfIA::gfp avec les différents sous-types granulocytaires du modèle *in vitro* (**Figure 67**) et *ex vivo* (**Figure 68**) ont été analysés en microscopie confocale (section I.1.3.3 de Matériels et méthodes, page 94).

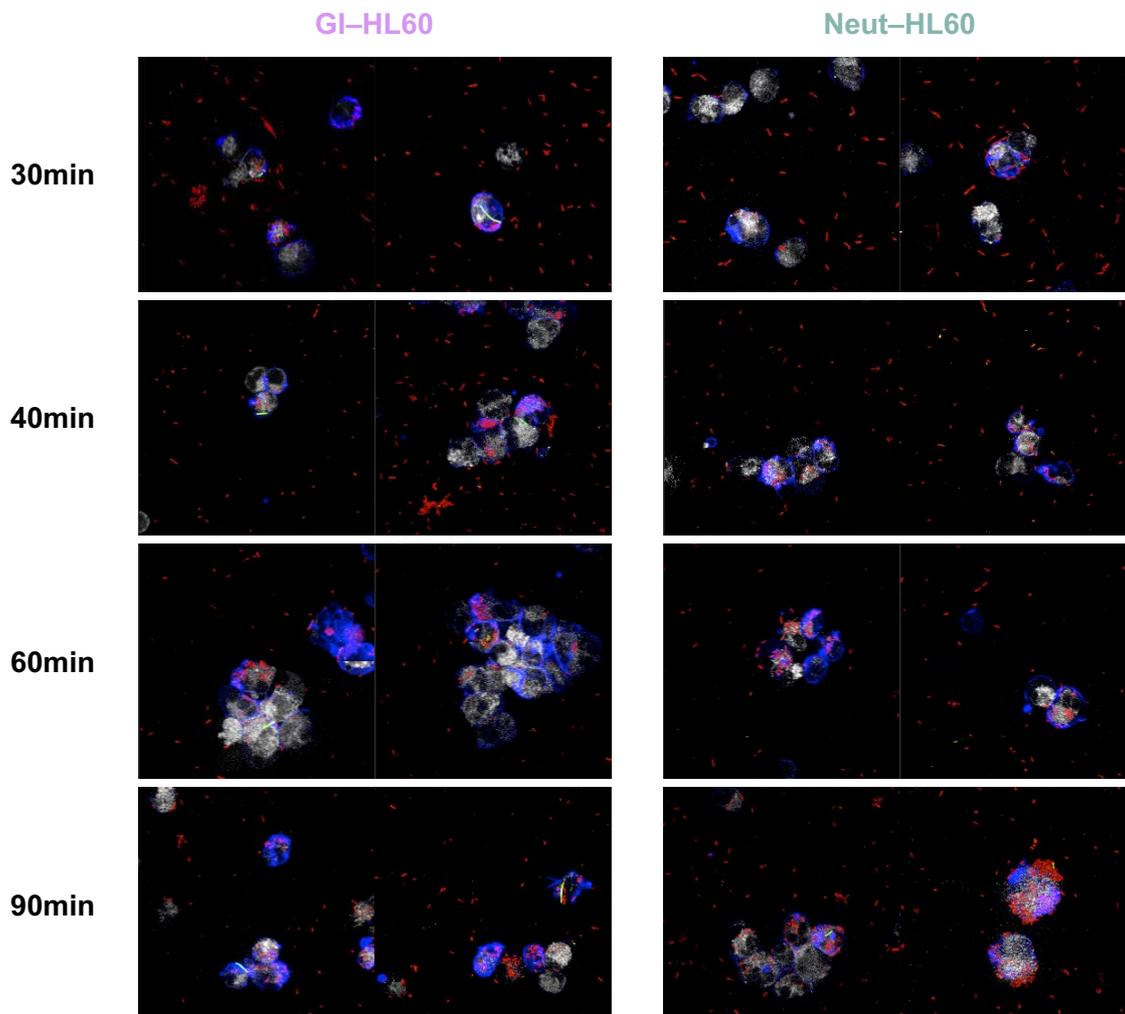


Figure 67. GI ou Neutrophiles provenant de la différenciation des HL-60 incubés avec *E. coli* MG1656-mCherry/pPsfIA::gfp et visualisés par microscopie confocale

Après incubation des bactéries mCherry+ (rouge), pendant 30, 40, 60 et 90 minutes, les filaments d'actine ont été colorés en bleu par l'ajout de phalloïdine. Les ROS produits par les cellules sont visibles grâce à la sonde CellRox Deep Red (blanc), ajoutée 30 minutes avant la fin du temps d'incubation établi.

Les bactéries mCherry+ ayant induit la réponse SOS expriment en plus le gène *gfp* (vert). GI-HL60 n=5, Neut-HL60 n=5

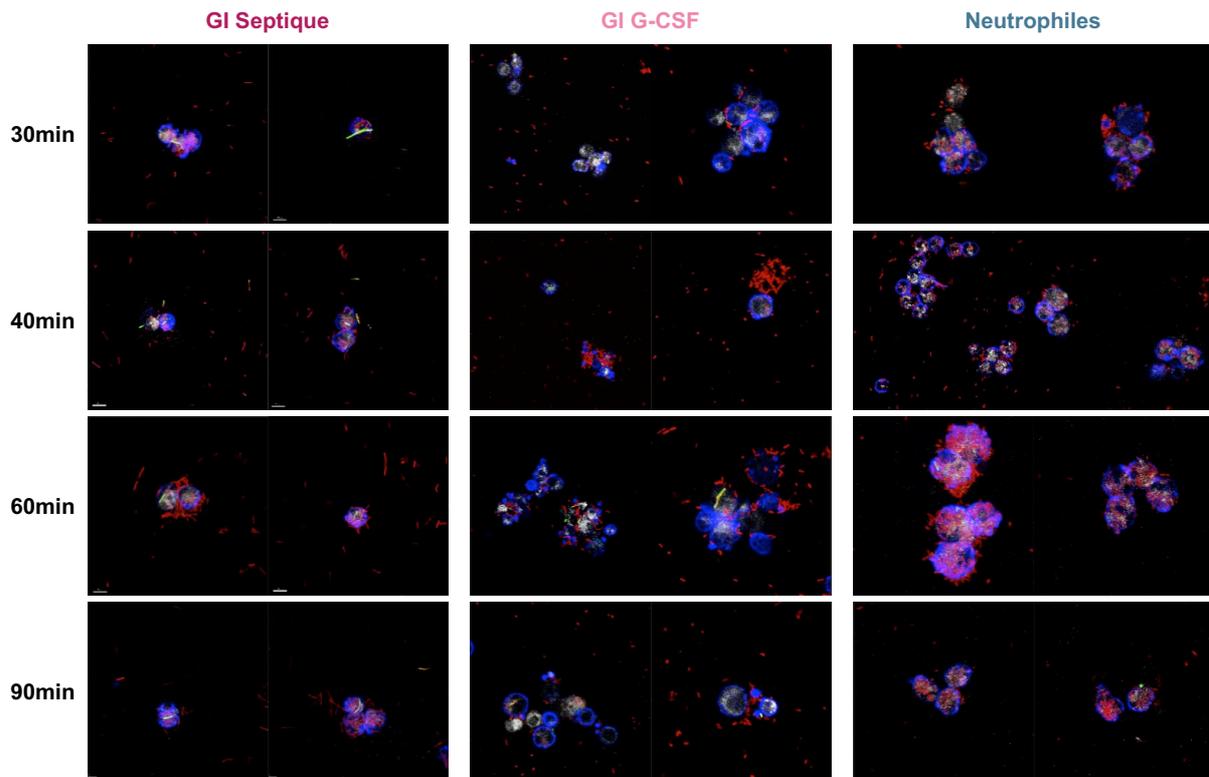


Figure 68. Granulocytes du modèle *ex vivo* incubés avec *E. coli* MG1656-mCherry/pPsfIA::gfp et visualisés par microscopie confocale

E. coli MG1656-mCherry/pPsfIA::gfp a été incubé avec des GI provenant d'un patient septique (GI septis, gauche) ; des GI provenant des donneurs de cellules hématopoïétiques (GI G-CSF), et des neutrophiles des donneurs sains. Après incubation des bactéries mCherry+ (rouge), pendant 30, 40, 60 et 90 minutes, les filaments d'actine ont été colorés en bleu par l'ajout de phalloïdine. Les ROS produits par les cellules sont visibles grâce à la sonde CellRox Deep Red (blanc), ajoutée 30 minutes avant la fin du temps d'incubation établi. Les bactéries mCherry+ ayant induit la réponse SOS expriment en plus le gène *gfp* (vert).

Les images montrent la co-localisation de la fluorescence correspondant aux ROS, à l'intérieur des granulocytes, où se trouvent les bactéries phagocytées, parmi lesquelles sont visibles les bactéries qui expriment la GFP. La différence du nombre de bactéries phagocytées entre les neutrophiles et les GI est bien visible, particulièrement dans l'exemple du modèle *in vivo* à 90 minutes d'incubation (**Figure 67**) et dans le modèle *ex vivo* à 60 minutes d'incubation (**Figure 68**). En accord avec les résultats de cytométrie, les bactéries GFP+ se trouvent préférentiellement à l'intérieur des granulocytes. Elles sont visibles dans les GI-sepsis, GI G-CSF et GI-HL60, comme dans les neutrophiles, mais elles apparaissent plus tardivement dans ces derniers (après 90 minutes d'incubation). Il est aussi intéressant de noter le phénotype filamentaire des bactéries GFP+, qui suggère un défaut de septation des bactéries. Ce phénomène pourrait être dû à l'activation du gène chromosomique *sfiA*, responsable de l'arrêt de la division cellulaire.

Finalement, nous nous sommes intéressés à la différence du niveau d'induction de la réponse SOS par les GI-sepsis et les GI G-CSF. La différence plus importante entre ces deux sous-

types cellulaires réside dans leur état d'activation par la réponse à l'infection : les GI des patients septiques ont été extraits du sang des patients avec une activation immune contre un pathogène ; les GI des donneurs de cellules hématopoïétiques sont des cellules immatures de la moelle osseuse, libérées par l'induction du facteur stimulant des colonies granulocytaires. En absence d'infection, ces dernières n'ont pas rencontré de pathogènes ni de facteurs pro-inflammatoires circulants.

Comme les GI-sepsis et GI G-CSF ont le même niveau de production des ROS (**Figure 59**, MFI ROS), nous avons émis l'hypothèse que l'augmentation progressive et soutenue de la réponse SOS dans les GI de patients septiques pouvait être liée à leur niveau plus important de phagocytose par rapport aux GI G-CSF du fait des facteurs inflammatoires liés au contexte septique.

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons pré-incubé des GI G-CSF dans du plasma d'un patient septique (section I.1.3.1 de Matériels et méthodes, page 92), pour ensuite répéter le modèle d'incubation *ex vivo* de notre étude (section I.1.3 de Matériels et méthodes, page 91).

Les résultats de l'acquisition par cytométrie en flux pour les GI G-CSF pré-stimulés sont représentés dans la **Figure 69** (triangle, orange pâle). Pour comparaison, un aliquot des GI G-CSF non pré-stimulés (triangle, sable) a été étudié en parallèle, ainsi que des neutrophiles des donneurs sains avec (losange, bleu foncé) ou sans pré-stimulation (losange, bleu).

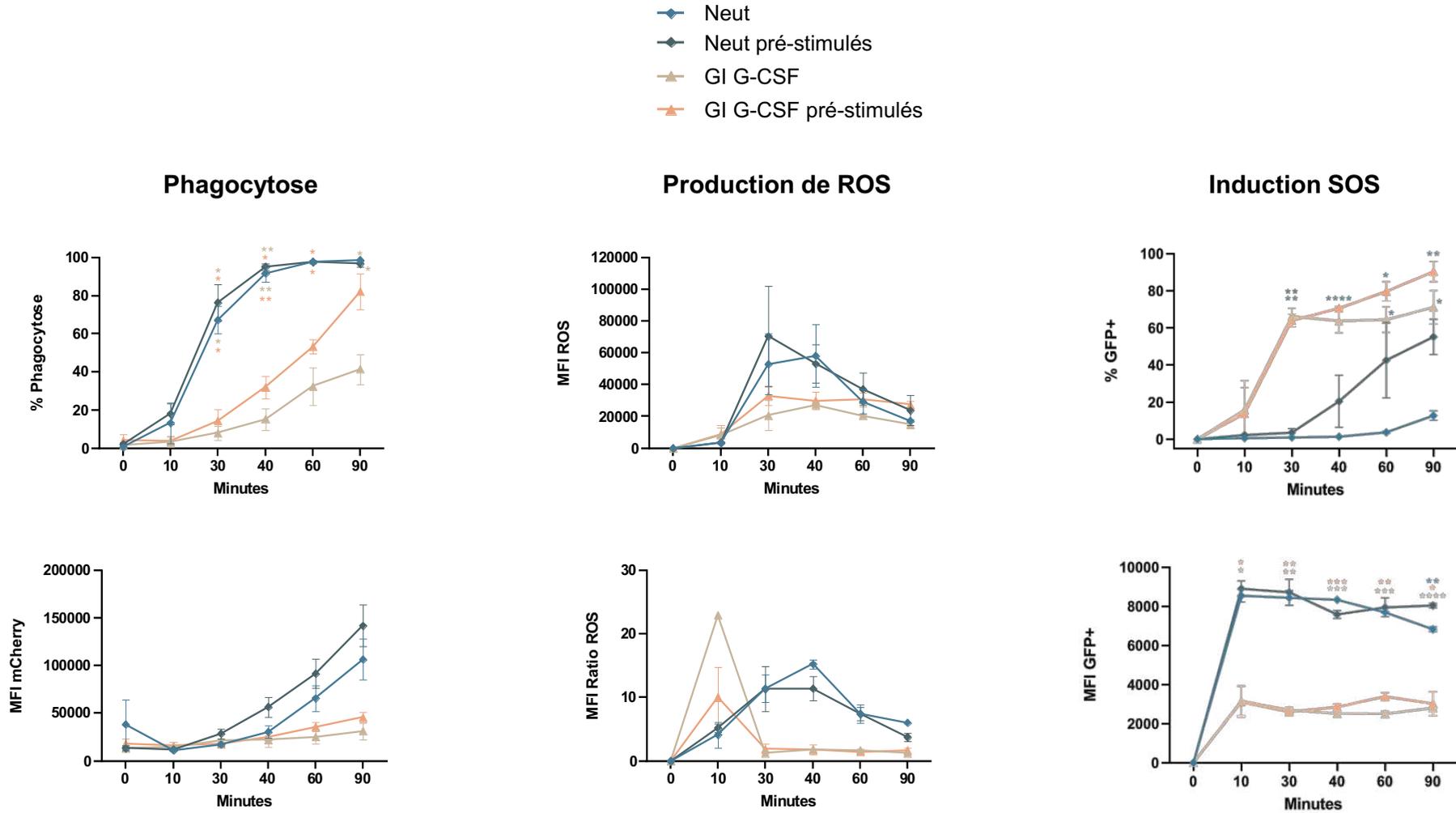


Figure 69. Phagocytose, production de ROS et induction SOS par les neutrophiles et GI des donneurs sains, après stimulation avec du plasma du patient septique

Neut n=3, Neut pré-stimulés n=3, GI G-CSF n=3, GI G-CSF préstimulés n=3. Test d'ANOVA, *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 ; ****p<0,0001

La pré-stimulation des neutrophiles n'a pas eu un effet apparent sur la phagocytose, la production de ROS ou l'induction de la réponse SOS par ce sous-type cellulaire. En revanche, la pré-stimulation des GI naïfs a entraîné une amélioration du niveau de phagocytose ($41.5 \pm 13.8 \%$ vs. $82.3 \pm 16.3 \%$ $p=0.09$ $n=3$), et d'induction de la réponse SOS par les bactéries phagocytées, sans effet sur le niveau de production de ROS.

L'ensemble des résultats présentés suggère que les bactéries phagocytées par les neutrophiles ou les GI peuvent induire la réponse SOS à la suite des dommages produits par les ROS phagocytaires. Les GI, et spécialement ceux activés par le milieu pro-inflammatoire du sepsis, activent dans une plus large mesure la réponse SOS bactérienne. Ce phénomène peut être lié à deux situations confluentes : l'engagement de plus de cellules dans l'activité phagocytaire (90% des GI pré-stimulés vs. 71% des non stimulés ; et 85% des GI-sepsis vs. 58% des GI G-CSF non stimulés) ; et la production limitée des ROS (30108 de MFI pour les GI-sepsis vs. 128203 pour les neutrophiles des donneurs sains), insuffisante pour entraîner la lyse bactérienne, mais suffisante pour induire la réponse bactérienne aux dommages.

I.3. Impact biologique de la réponse SOS intra-phagosomale : expression des résistances aux antibiotiques

Une fois confirmé la capacité des granulocytes, et principalement les GI, à induire la réponse SOS dans les bactéries phagocytées, nous avons évalué l'impact biologique de cette induction en analysant un indicateur de résistance aux antibiotiques. Nous avons pour cela utilisé deux modèles : l'expression du gène *qnrB2* et l'expression de l'intégrase de l'intégron de classe 1.

I.3.1. Induction de la résistance à la ciprofloxacine par l'expression du gène *qnrB2*

Comme expliqué précédemment (section I.1.2.3 de l'introduction, page 76), l'expression de certains gènes conférant la résistance aux antibiotiques est réprimée par le répresseur global de la réponse SOS : LexA. C'est le cas du gène *qnrB2*, dont l'expression, sous la régulation SOS protège l'ADN gyrase de l'action des quinolones^{151,152}.

Nous avons donc évalué l'expression de la résistance à la ciprofloxacine par des *E. coli* MG1656 portant le plasmide pPqnrB-*qnrB2*, et phagocytés par : des neutrophiles de donneurs sains et des GI GCSF (pour l'évaluation de la sensibilité à la ciprofloxacine par *E. test*) ; ou des neutrophiles des donneurs sains et patients septiques (pour la quantification du niveau d'expression du gène *qnrB2*). Pour confirmer le rôle de la régulation SOS, nous avons utilisé une condition d'incubation des granulocytes avec la souche *E. coli* MG1656-*lexA*Ind3/pPqnrB-*qnrB2* (mutant non clivable de LexA, où la réponse SOS ne peut pas être induite).

L'incubation des granulocytes et des bactéries a été effectuée de façon similaire au modèle utilisé dans les deux premières parties de cette étude : avec un ratio de 200 bactéries par cellule à 37°C pendant 90 minutes. Après incubation, les bactéries extracellulaires ont été éliminées, et les cellules lysées pour récupérer les bactéries phagocytées. Dans un premier temps, nous avons déterminé la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la ciprofloxacine. Dans un deuxième temps, ce modèle d'incubation a été utilisé pour récupérer les ARN des bactéries phagocytées, et quantifier le niveau d'expression du gène *qnrB2* (les protocoles détaillés de ces expériences sont décrits dans la section I.2.4 de la section Matériels et méthodes, page 99).

I.3.1.1. Résistance phénotypique

Afin d'évaluer une possible expression de la résistance aux fluoroquinolones secondaire à l'expression du gène *qnrB2* induit par l'interaction des bactéries avec les granulocytes, nous avons utilisé la résistance à la ciprofloxacine par expression du gène *qnrB2* sous son propre promoteur. Ce modèle a été choisi car nous avons montré antérieurement au laboratoire que l'expression du gène *qnrB2* était régulée par la réponse SOS¹⁵¹. La CMI de la ciprofloxacine a été mesurée par la méthode E-test selon les recommandations du fournisseur à partir des bactéries libérées des phagosomes.

La CMI de *E. coli* sans incubation avec les granulocytes (Bactéries seules) a été mesurée en parallèle. *E. coli* portant le plasmide sans *qnrB2* (pSU38 Δ tot) a une CMI de 0.012 μ g/mL.

Les CMI obtenues sont résumées dans le **Tableau 13**

Tableau 13. CMI de la ciprofloxacine

	Bactéries seules (n=2)	GI G-CSF (n=1)	Neutrophiles (n=5)
<i>E. coli</i> MG1656 / pSU38 Δ tot	0,012 μ g/mL		
<i>E. coli</i> MG1656 / pP <i>qnrB-qnrB2</i>	0,25 μ g/ml	0,25 μ g/ml	0,25 μ g/ml
<i>E. coli</i> MG1656- <i>LexAInd3</i> / pP <i>qnrB-qnrB2</i>	0,047 μ g/ml	0,047 μ g/ml	0,047 μ g/ml

Nous observons une CMI identique de 0,25 μ g/ml avec et sans granulocytes, alors que la CMI avec le plasmide vide sans *qnrB2* est de 0,012 μ g/mL pour *E. coli* incubé sans cellules. Cela n'est pas surprenant car la ciprofloxacine induit elle-même la réponse SOS et donc l'expression de *qnrB2*. Mais cela ne nous permet pas de voir si une différence existe entre conditions neutrophiles et GI-sepsis.

Les CMI obtenues avec la souche *E. coli* MG1656-*lexAInd3*/pP*qnrB-qnrB2* sont inférieures quelle que soit la condition utilisée, confirmant que l'augmentation de CMI est due à la réponse SOS.

I.3.1.2. Niveau d'expression du gène *qnrB2*

Nous avons ensuite évalué le niveau des transcrits de *qnrB2*. Ce niveau a été quantifié à l'état basal (bactéries seules), et dans la population de bactéries récupérées après lyse des phagosomes que ce soit à partir des neutrophiles de donneurs sains ; ou des GI de patients septiques (**Figure 70**).

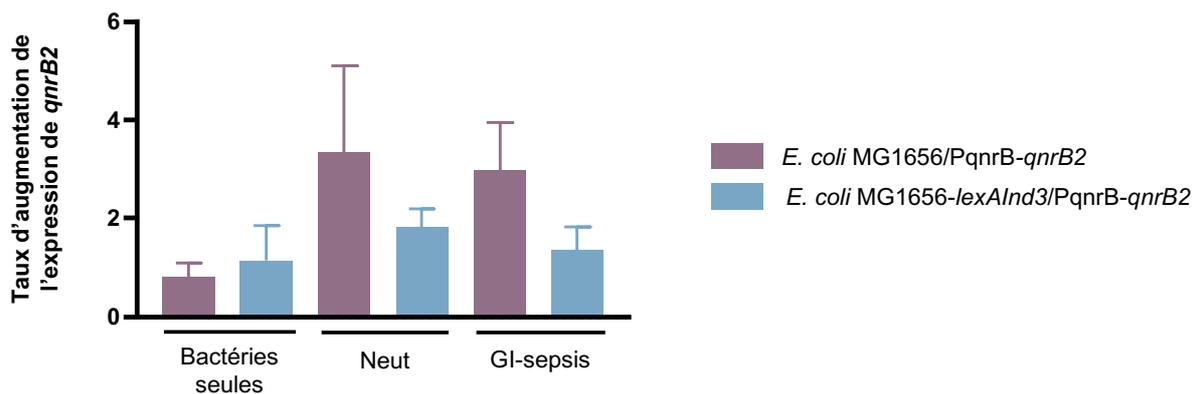


Figure 70. Taux d'augmentation en l'expression de *qnrB2*

Bactéries seules n=5, Neut n=5, GI-sepsis n=4

Le nombre de transcrits de *qnrB2* a été normalisé par rapport au nombre de transcrits du gène de ménage *rpoB*, et au nombre de copies de plasmide, en utilisant les nombre de de transcrits du gène *aph(3')-IIa* (gène plasmidique de résistance à la kanamycine et d'expression constitutive) (**Figure 54**).

Nous observons que le niveau d'expression augmente de façon significative, que ce soit avec les neutrophiles (de 3,34 fois, $p=0.0128$) ou les GI-sepsis (2,98 fois, $p=0.0021$). Comme attendu, avec la condition *E. coli* MG1656-*lexAInd3*, le nombre de transcrits revient au niveau basal, confirmant l'implication de la réponse SOS.

I.3.2. Optimisation d'un modèle pour quantifier l'activité d'excision de l'intégrase de l'intégron

L'intégrase de l'intégron de classe 1 est une des cibles extra-chromosomiques de la régulation SOS. L'intégrase, une fois exprimée après déclenchement de la réponse SOS, peut catalyser des événements de recombinaison aboutissant à des réarrangements de cassettes. Nous avons donc étudié si la réponse SOS déclenchée lors de l'incubation avec les neutrophiles ou GI pouvait induire une recombinaison avec excision de cassette.

Pour quantifier l'activité d'excision de l'intégrase, nous avons utilisé un système avec deux plasmides^{177,187}. Un premier plasmide inducteur pZE1-*IntI1w* porte le gène *intI1* sous son propre promoteur. Etait donné que le promoteur de *intI1* contient une boîte LexA, l'expression de l'intégrase est inductible par l'activation de la réponse SOS. Le deuxième plasmide pExCatGFP (pSU38::Plac::attC_{aadA7}-cat(T4)-attC_{VCR2}::gfp) contient une cassette composée d'un gène *cat* de résistance au chloramphénicol, entouré de deux sites *attC*, suivi du gène *gfp*. Une fois l'intégrase activée, la cassette *cat* est excisée, ce qui rapproche le gène *gfp* du promoteur P(lac) permettant l'émission de fluorescence verte (**Figure 53 A**, page 98).

Dans notre modèle, nous avons utilisé 3 types de plasmides inducteurs : pZE1-*IntI1w*, portant le gène *intI1* sous son propre promoteur, inductible par la réponse SOS ; pZE1-mcs1, où le gène de l'intégrase est absent qui ne devrait donc pas permettre d'excision (contrôle négatif) ; et pZE1-*IntI1wlexAmut2*, où le site de fixation de LexA a été muté, ainsi l'intégrase est constitutivement exprimée (contrôle positif) (**Tableau 9**, page 95).

Après incubation avec des neutrophiles ou des GI issus de la différenciation de la lignée cellulaire HL-60, la phagocytose, la production de ROS et le pourcentage de cellules GFP + ont été quantifiés par cytométrie en flux (**Figure 71**).

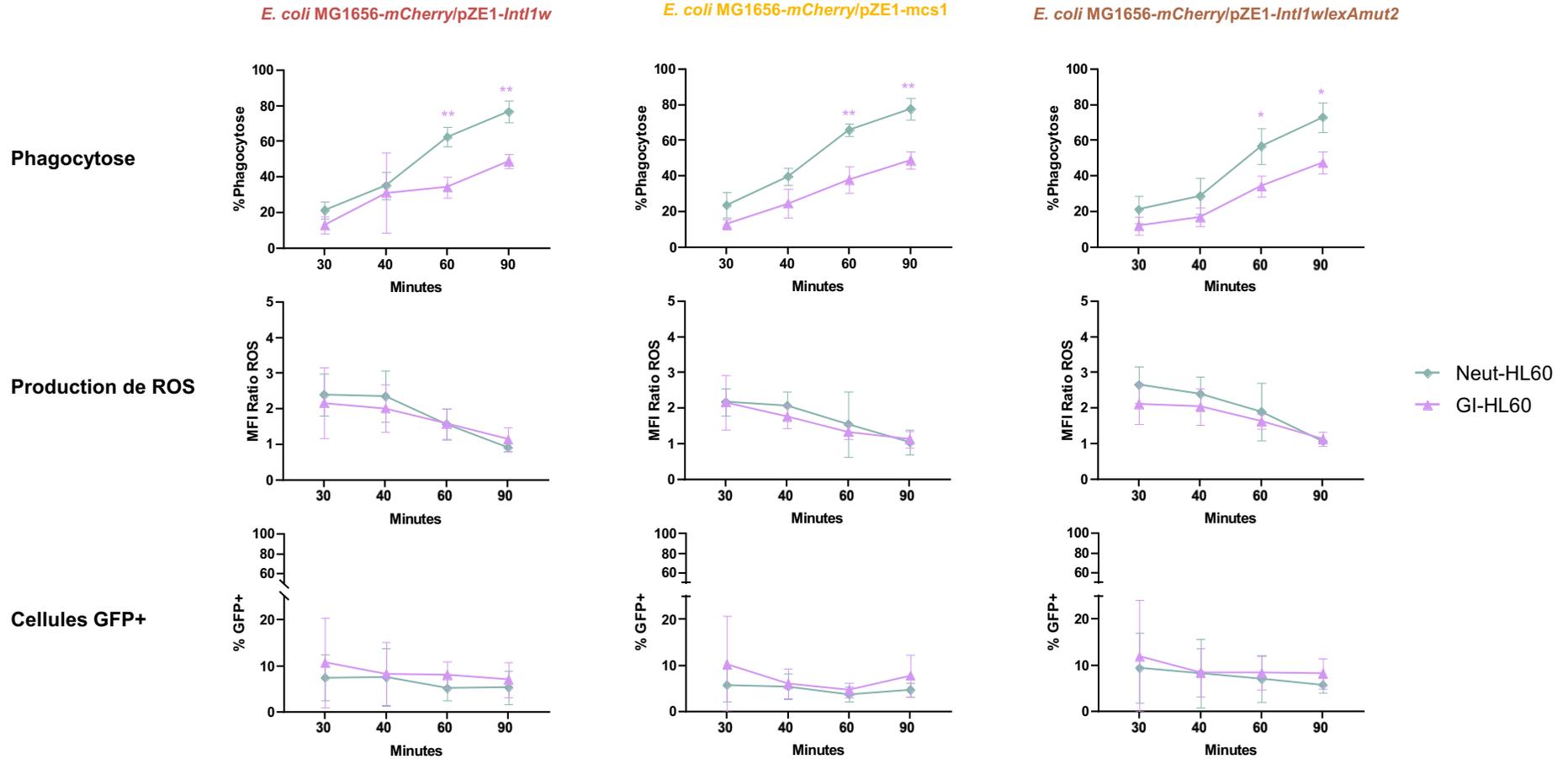


Figure 71. Quantification de la phagocytose, production de ROS et pourcentage de cellules marquées GFP après induction de la réponse SOS par les HL-60 différenciés en GI ou Neutrophiles

GI-HL60 n=4, Neut-HL60 n=4. Test d'ANOVA, *p<0,05 ; **p<0,01

Bien que les dérivés de la lignée HL-60 ont montré une activité de phagocytose et de production de ROS similaire à celle quantifiée précédemment (**Figure 56**, page 104 et **Figure 58**, 107), les résultats pour la quantification du % de GFP ne correspondaient pas aux attentes. Le niveau d'expression de *gfp* a été le même pour les trois souches, au cours de temps, y compris avec la souche qui contient le plasmide vide sans le gène *intl1*, pZE1-mcs1, ne pouvant donc pas entraîner de recombinaison. Le % de GFP observé quelle que soit la condition est donc attribuable à un bruit de fond. Nous n'avons pas non plus détecté d'événements de recombinaison avec le contrôle positif, *E. coli* MG1656-mCherry/pZE1-*Intl1wlexAmut2*/pExCatGFP, pour lequel *intl1* est exprimé de façon constitutive, suggérant que la fluorescence GFP attendue après excision est inférieure au niveau de sensibilité du cytomètre.

L'acquisition des bactéries non phagocytées, sans surprise, n'a pas montré de différence de % de GFP+ après incubation avec les GI et neutrophiles de la lignée cellulaire. L'acquisition des bactéries incubées avec ciprofloxacine (25ng/mL), inducteur de la réponse SOS n'a pas non plus montré une expression augmentée de GFP (**Figure 72**), alors que la ciprofloxacine avait permis l'expression de PsfiA-gfp dans le modèle précédent (Figure x).

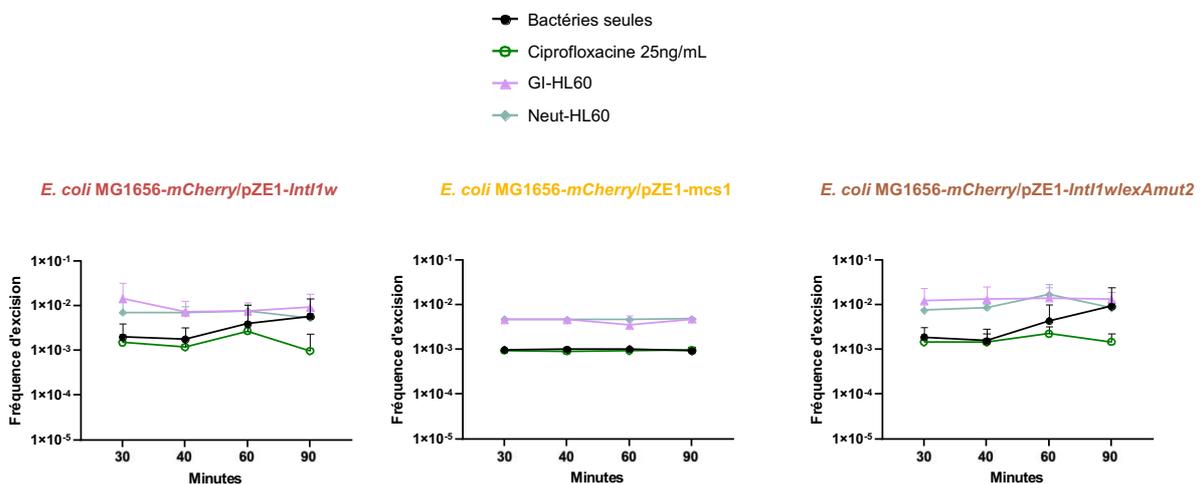


Figure 72. Fréquence d'excision parmi les bactéries non phagocytées

La fréquence d'excision a été estimée par la division du nombre d'événements mCherry+/GFP+, sur le total de bactéries acquises (mCherry+). Cette fréquence a été estimée sur le temps après 30, 40, 60 et 90 minutes d'incubation, pour les souches *E. coli* MG1656-mCherry/pZE1-*Intl1w*/pExCatGFP, *E. coli* MG1656-mCherry/pZE1-mcs1/pExCatGFP et *E. coli* MG1656-mCherry/pZE1-*Intl1wlexAmut2*/pExCatGFP, en incubation seules (cercle noir), avec Ciprofloxacine 25ng/mL (cercle vert), GI-HL60 (triangle violet pâle), ou Neut-HL60 (losange bleu pâle). GI-HL60 n=4, Neut-HL60 n=4.

L'ensemble des résultats confirme que la cytométrie en flux n'est pas adaptée pour l'analyse de l'activité de l'intégrase par un système rapporteur d'excision de l'intégrase de l'intégron, attendue autour de 10^{-7} pour la recombinaison des sites *attC* utilisés dans ce modèle¹⁹⁴, probablement dû au niveau faible de l'expression de l'intégrase sous son propre promoteur, même après induction SOS¹⁷⁷.

Nous avons donc modifié le plasmide inducteur et avons utilisé le plasmide p734 qui est un pBAD18 qui porte le gène de l'intégrase *intl1* sous contrôle du promoteur fort PBAD, inductible en présence d'arabinose (0,2%)¹⁸⁷ (**Tableau 9**, page 95).

Deux contrôles négatifs ont été utilisés dans ce modèle. Le premier étant l'incubation de la souche *E. coli*/p734/pExCatGFP dans un milieu contenant du Glucose 1% pour bloquer l'expression du promoteur PBAD. Le plasmide vide pBAD18 qui ne porte pas le gène de l'intégrase a été utilisé comme deuxième contrôle négatif.

La fréquence d'excision a été calculée comme le ratio entre le nombre de bactéries GFP+ sur le total des bactéries. L'estimation de la fréquence d'excision par cytométrie en flux (**Figure 52**, page 97) a été comparée au calcul fait par étalement sur boîtes (**Figure 73**).

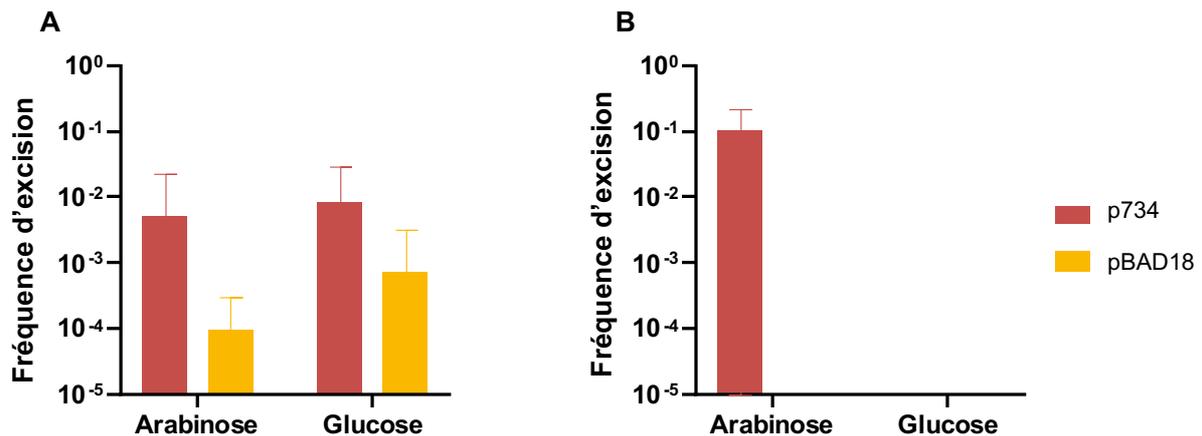


Figure 73. Comparaison de l'estimation de la fréquence d'excision entre la cytométrie (A) et le comptage sur boîte (B)

Les valeurs représentées sont la moyenne et l'écart-type de 10 expériences indépendantes.

Si le niveau d'excision quantifié pour *E. coli*/p734/pExCatGFP incubé avec arabinose est proche de 10^{-2} (niveau réporté précédemment pour cette construction^{172,187}), les résultats des deux témoins négatifs ne sont pas cohérents avec une fréquence d'excision identique en glucose et une fréquence d'excision avec le plasmide sans intégrase de 10^{-3} . Ces résultats confirment la limitation technique de la cytométrie en flux pour la quantification de la fréquence d'excision de l'intégrase.

En revanche, la quantification des colonies fluorescentes sur boîte a permis de voir une différence significative de la fréquence d'excision après induction par l'arabinose (Fréquence d'excision pour *E. coli*/p734/pExCatGFP en conditions Arabinose vs. Glucose : 10^{-1} vs. $5,2 \cdot 10^{-7}$, $p=0.0084$) (**Figure 73B**).

Cette performance différente entre les deux méthodes de quantification peut être expliquée par la capacité limitée du cytomètre d'identifier des événements rares, qui tombent dans le seuil de fréquence du bruit de fond du cytomètre.

Néanmoins, la quantification des colonies ayant eu un événement d'excision par comptage des colonies fluorescentes parmi des centaines de colonies non fluorescentes n'est pas très rigoureuse. Il est préférable d'utiliser un plasmide rapporteur portant un gène de résistance en aval de la cassette à exciser, pour faciliter le comptage sur milieu sélectif.

Nous avons donc utilisé le plasmide p6851 (pSU38::attC_{aadA7}-cat(T4)-attC_{VCR2}::aac6'-Ib*)¹⁷⁷ qui permet après excision l'expression du gène aac(6')-Ib et résistance à la tobramycine (TbR) (Figure 74).

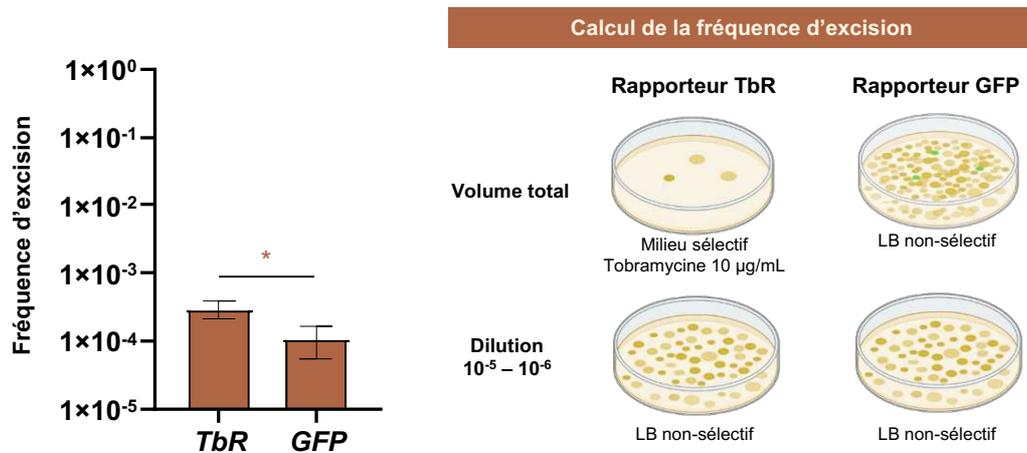


Figure 74. Comparaison de l'activité d'excision *E. coli* MG1656/pZE1-Int1wlexAmut2

Tel que mesuré par l'expression de résistance à la tobramycine (TbR), ou l'expression de fluorescence verte (GFP). Test t de student, * $p=0.03$. Les valeurs représentées sont la moyenne et l'écart-type de 3 réplicats biologiques sur une expérience

Nous avons d'abord fait cette expérience avec la souche *E. coli* MG1656/pZE1-Int1wlexAmut2 dans laquelle l'intégrase est exprimée de façon constitutive pour voir si le phénotype TbR pouvait être détecté. L'expression de résistance à la tobramycine a montré que c'était un rapporteur plus sensible pour la quantification de la fréquence d'excision sur boîte.

Nous nous sommes donc intéressés à adapter les conditions d'incubation des bactéries avec les différents inducteurs pour arriver à induire l'expression de l'intégrase et l'excision de la cassette attC_{aadA7}-cat(T4)-attC_{VCR2} en utilisant le plasmide p6851 et la résistance à la tobramycine comme indicateur de l'excision.

Prenant en compte la fréquence minimale d'excision attendue pour *E. coli* MG1656/p6851, en condition non induite, de l'ordre de 10^{-7} ¹⁹⁴ une quantité minimale de 10^8 bactéries est nécessaire pour voir un événement d'excision. Pour le test d'induction de la réponse SOS par les ROS dans les phagosomes des granulocytes, nous partons d'une quantité initiale de $5 \cdot 10^7$ bactéries, avec $2,5 \cdot 10^5$ cellules, pour une incubation de 30, 40, 60 et 90 minutes (Figure 71).

Sachant que ce nombre de bactéries n'est pas constant, en fonction de la division bactérienne, de la phagocytose et de lyse des bactéries dans le phagosome, la quantification du nombre total de bactéries phagocytées a été nécessaire. Cette quantification a été faite après l'incubation des bactéries *E. coli* MG1656/ pZE1-Int1w/p6851 avec des granulocytes HL-60 différenciés et non triés c'est-à-dire contenant un mélange de GI-HL60 et Neut-HL60. En vue d'augmenter le nombre final de bactéries récupérées, en respectant le ratio de bactéries par cellule fixé initialement (200:1), nous avons choisi une concentration initiale de $2 \cdot 10^9$ bactéries (incubées avec 10^6 et 10^7 cellules respectivement). Après 90 minutes d'incubation, les bactéries non phagocytées ont été éliminées, et les granulocytes ont été lysés pour récupérer les bactéries intra-cellulaires. Une dilution de 10^{-5} et 10^{-6} de cette suspension finale a été mise sur boîtes non sélectives pour la quantification du nombre total de bactéries, et la totalité du

volume restant sur une boîte sélective contenant de la tobramycine (10 µg/mL), pour calculer la fréquence d'excision (**Figure 53 B**, page 98) (**Tableau 14**).

Tableau 14. Nombre final et fréquence d'excision des bactéries phagocytées par des granulocytes issues de la maturation de la lignée HL-60

Sous-type cellulaire	E. coli MG1656/p6851	Quantité initiale de cellules	Quantité initiale de bactéries	Quantité finale de bactéries phagocytées	Fréquence d'excision
HL-60 différenciés (mélange de Neut et GI)	pZE1-Int11w	10^7	2.10^9	$1,8.10^5$	0
	pZE1-Int11wlexAmut2	10^7	2.10^9	$3,1.10^4$	$5,4.10^{-3}$

Étaient inférieur à 10^6 , le nombre total de bactéries phagocytées par les HL-60 différenciés après 90 minutes d'incubation est limité pour permettre la visualisation d'un évènement d'excision chez *E. coli* MG1656/ pZE1-Int11w/p6851. Ce nombre paraît suffisant pour calculer la fréquence d'excision chez *E. coli* MG1656/ pZE1-Int11wlexAmut2/p6851, exprimant *int11* de façon constitutive. Néanmoins, la fréquence de recombinaison connue de *int11wlexAmut2* pour les sites *attCaadA7-attCVCR* en culture planctonique est de 10^{-5} ¹⁹⁵. La fréquence d'excision observée dans cette expérience unique n'est donc pas interprétable. De plus, la quantité totale de bactéries récupérés reste inférieure à 10^5 , ce que diminue la sensibilité du test.

Malheureusement, le nombre maximal de bactéries incubées avec les cellules est à la fois limité par le nombre maximal de cellules disponibles pour cette expérience. Après 10 jours de maturation, marquage et tri cellulaire, le nombre maximal des neutrophiles et GI récupérés est de 10^7 .

Un dernier point d'optimisation que nous avons pu évaluer dans ce modèle est le temps d'incubation. Dans le protocole original d'évaluation de l'activité d'excision de l'intégrase par induction SOS (Guérin, 2009), les bactéries étaient incubées pendant 36 heures.

Par conséquent, le temps d'incubation de *E. coli* MG1656/ pZE1-Int11w/p6851 avec des Neut-HL60 ou des GI-HL60 a été prolongé à 36 heures. Ensuite, les bactéries extracellulaires ont été éliminées et les cellules lysées pour récupérer le total de bactéries phagocytées, et calculer la fréquence d'excision (**Tableau 15**).

Tableau 15. Quantité finale et fréquence d'excision de *E. coli* MG1656/ pZE1-Int11w/p6851 après 36 heures d'incubation avec des Neut-HL60 ou GI-HL60

Inducteur SOS	Quantité initiale de cellules	Quantité initiale de bactéries	Quantité finale de bactéries	Fréquence d'excision
Neut-HL60	10^7	2.10^9	$2,2.10^6$	0
GI-HL60			$3,1.10^6$	0

L'incubation pendant 36 heures a permis d'augmenter le nombre final de bactéries phagocytées de 1 log. Néanmoins, cette quantité reste limitée pour quantifier une fréquence d'excision par la recombinaison des sites *attC_{aadA7}* et *attC_{VCR2}*. Des futures expériences pourraient optimiser le modèle (**Figure 75**), en changeant les sites *attC* pour des sites plus recombinogènes (section I.3.2 de Discussion, page 164).

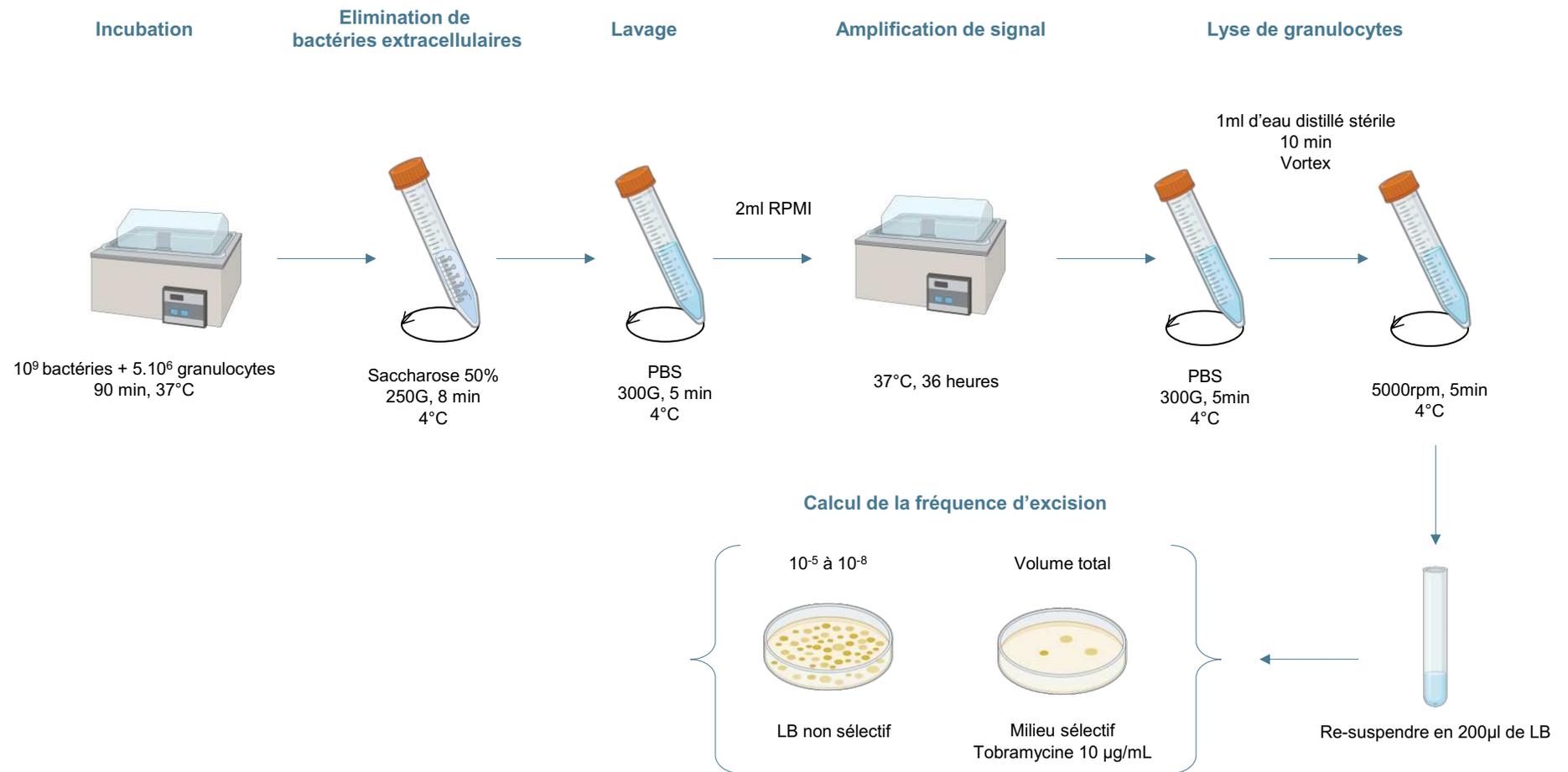


Figure 75. Proposition de protocole pour mesurer la fréquence d'excision des bactéries phagocytées

Valorisation scientifique

Les résultats de ce travail de thèse ont été divulgués dans le format de poster dans les congrès internationaux suivants :

Titre du poster	Nom du congrès	Date, Lieu
Immune Granulocytes induce the SOS response on phagocytosed bacteria	World Microbe Forum (WMF) 2021	20 au 24 juin 2021 Online
Granulocytic immune response in sepsis induces the bacterial SOS response	European Congress of clinical microbiology and infectious diseases (ECCMID) 2022	23 au 26 avril 2022 Lisbonne, Portugal
Granulocytic immune response in sepsis induces the bacterial SOS response	International Symposium on Plasmid biology (ISPB) 2022	18 au 23 septembre 2022 Toulouse, France

Les résultats sur les différences fonctionnelles entre granulocytes immatures et neutrophiles dans notre modèle *ex vivo*, ainsi que de leur capacité d'induire la réponse SOS bactérienne, et avec elle, l'expression du gène *qnrB2*, ont été préparés sous la forme d'article pour sa soumission dans le journal Science.

Le manuscrit et ses données supplémentaires sont disponibles ci-dessous.

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.

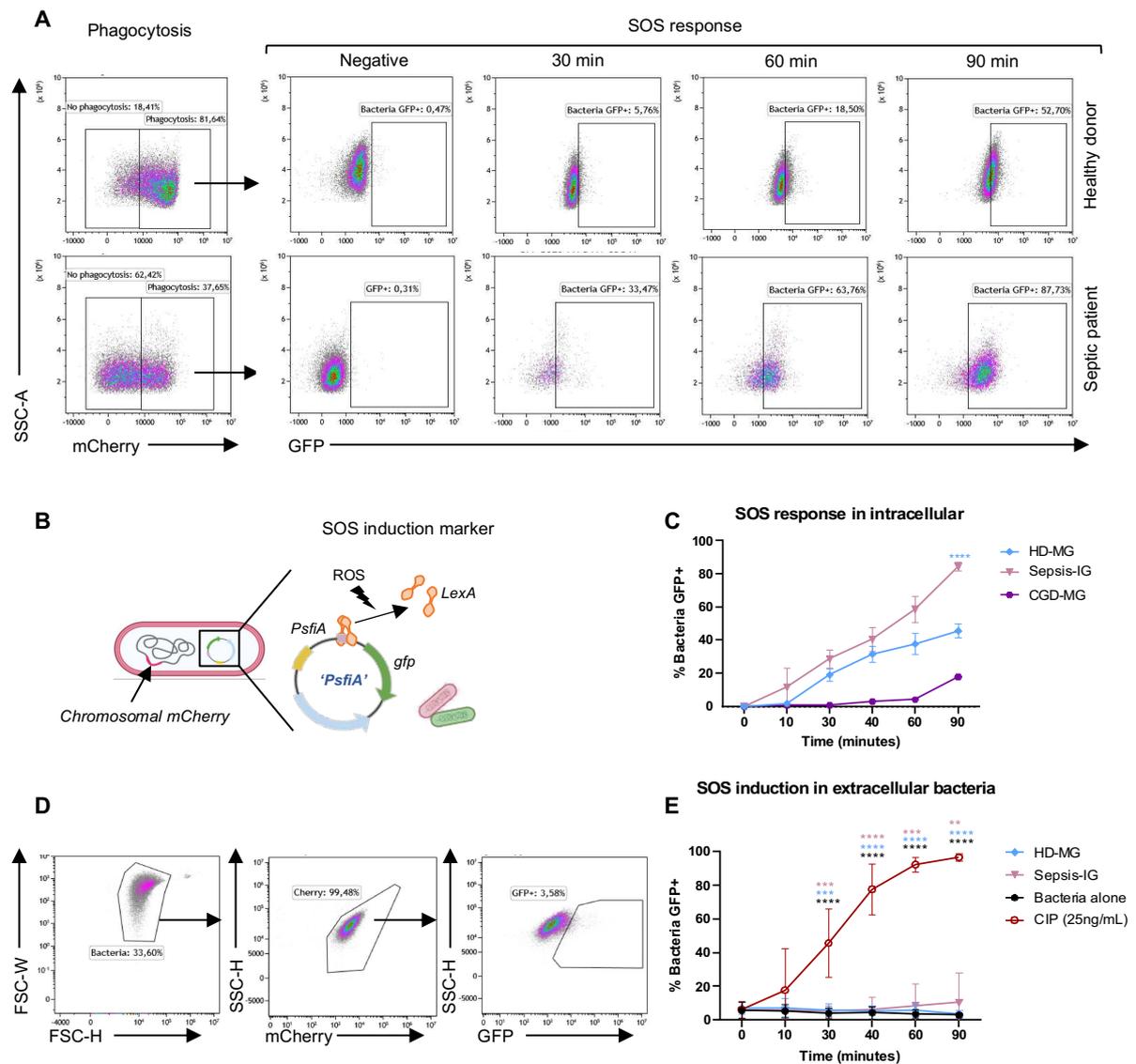


Fig. 1. Bacterial SOS response evidenced after phagocytosis by granulocytes. (A, B, C) Mature granulocytes (MG) from Healthy donors (HD-MG, n=10), immature granulocytes from septic patients (Sepsis-IG, n=5) and MG from a patient with chronic granulomatous disease (CGD-MG, n=1) were incubated with *mCherry-E.coli/pPsfIA::gfp* 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 ± 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.

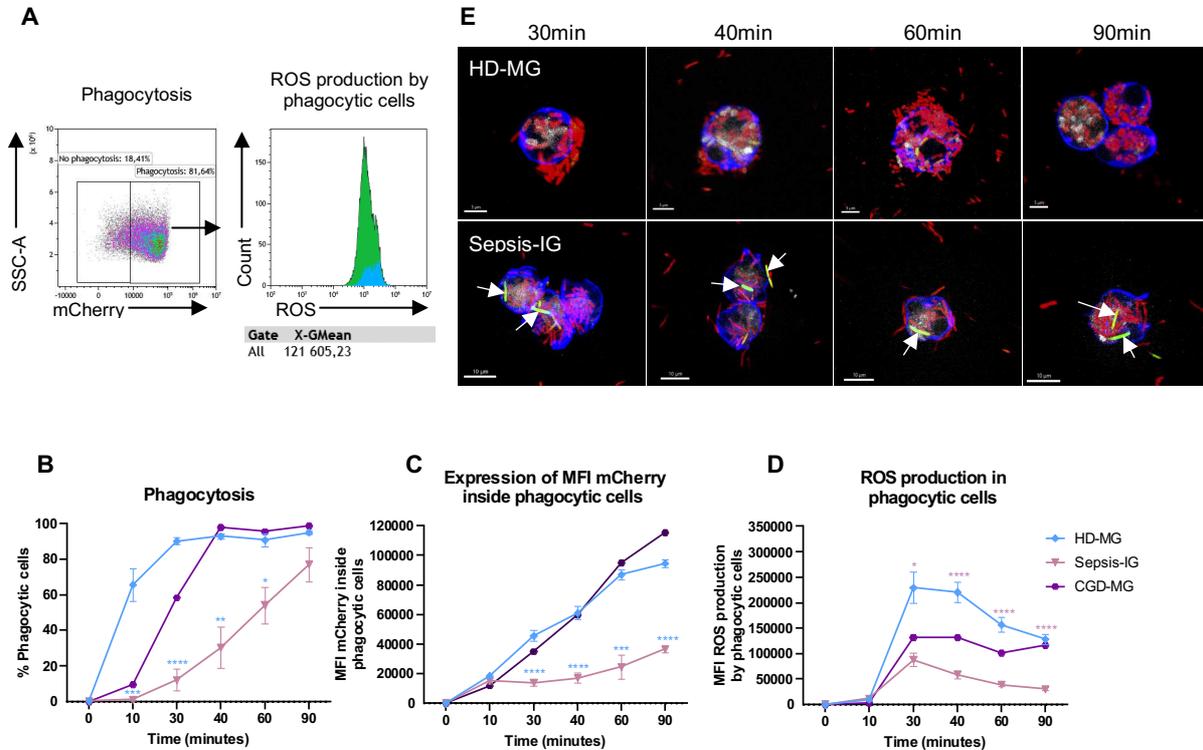


Fig. 2. Granulocyte phagocytosis and ROS production. mCherry-*E. coli*/pPsfIA::gfp were incubated with granulocytes over time and acquired by flow cytometry (A) and confocal microscopy (E). (A) Representative density plot of phagocytosis of mCherry-*E. coli* and histogram on ROS produced by phagocytic 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).

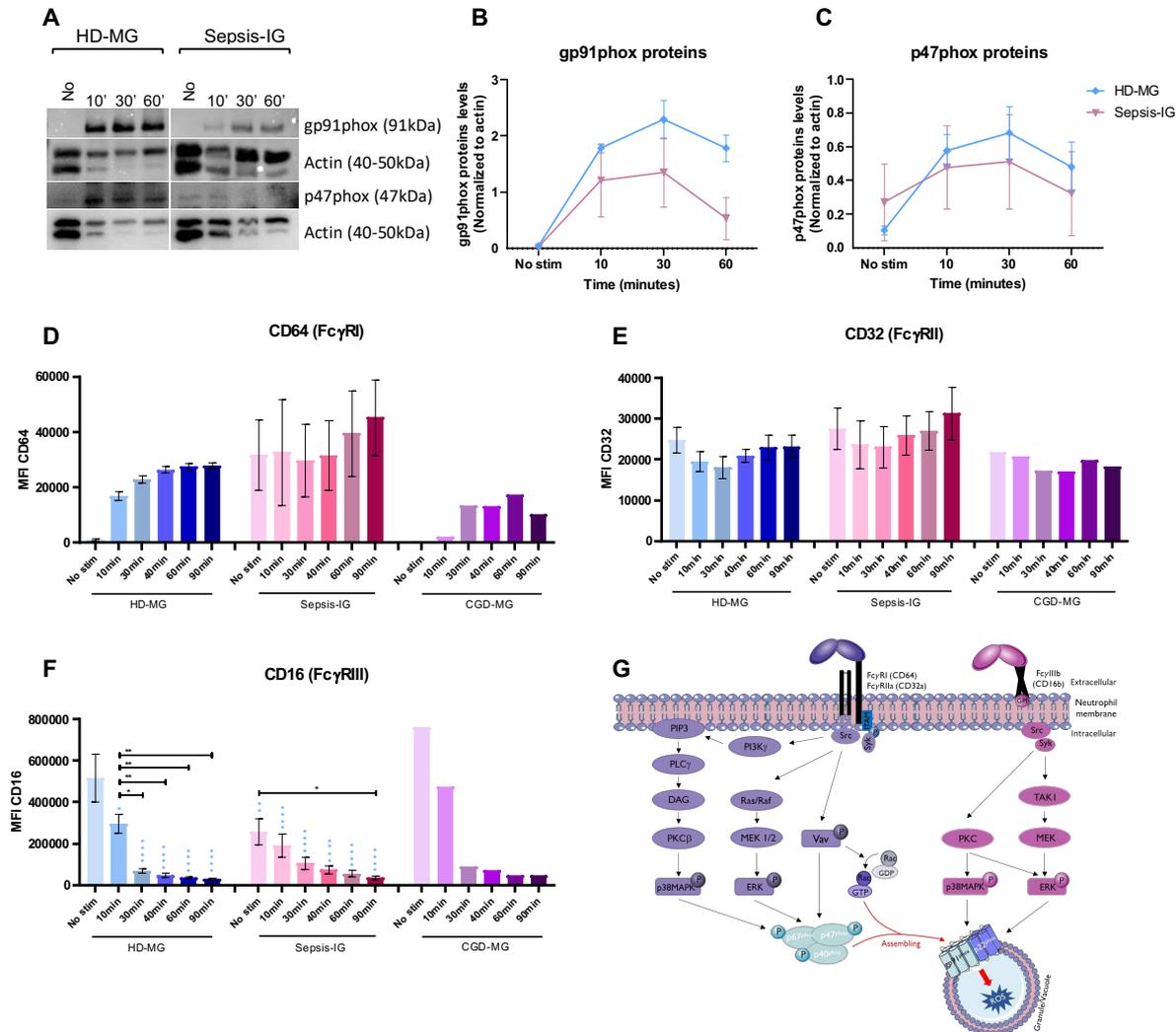


Fig. 3. Expression of NADPH oxidase complex subunits and membrane receptors implicated in phagocytosis and ROS production (A) Representative Western Blot (WB) of two subunits of the NADPH oxidase complex, gp91phox and p47phox, after incubation of granulocytes with mCherry-*E. coli* for different times (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). Extracellular bacteria were cleared out, and granulocytes recovered and lysed to access phagocytosed bacteria. *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).

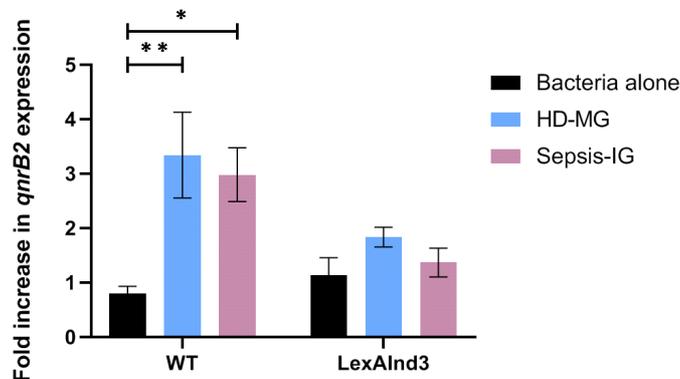


Fig. 4. Expression of *qnrB2* in phagocytic HD-MG and Sepsis-IG. *E. coli* MG1656 (WT) or expressing a mutated non-cleavable LexA (*LexAInd3*) carrying the pP_{qnrB}-*qnrB2* plasmid were incubated with granulocytes. Phagocytosed bacteria were recovered after 90 min incubation with HD-MG or Sepsis-IG. 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, Tsourouktoglou 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 released 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 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 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 $1 \cdot 10^6$ cells/mL. Then, 100 μL 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 25µg/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 5.10⁸ 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, sample 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 cell 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/*lexAInd3*/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 S_q , and the S_q 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 $300 \times g$. 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 $18000 \times g$ 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

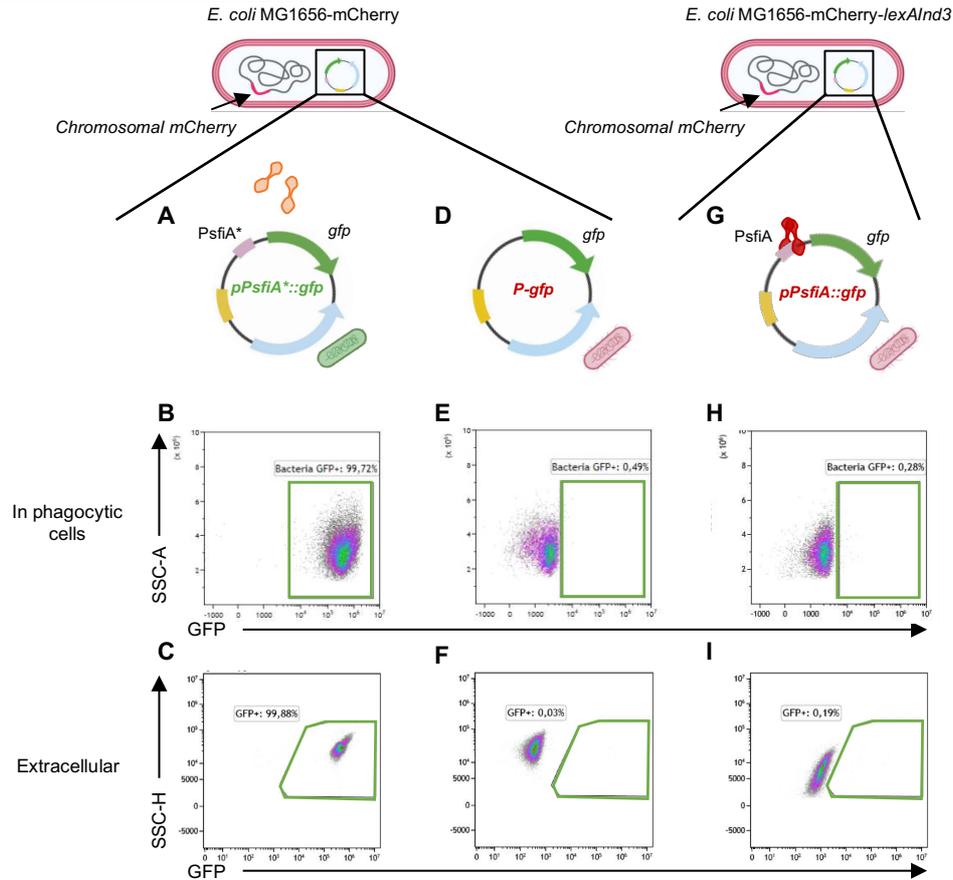


Fig. S1. Bacterial controls of SOS induction model. An mCherry-*E. coli* strain expressing constitutively the *mCherry* was used, allowing bacterial identification by flow cytometry and confocal microscopy. SOS induction was followed by the expression of the *gfp* gene under the control of the *sfiA* 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 “*pPsfiA::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).

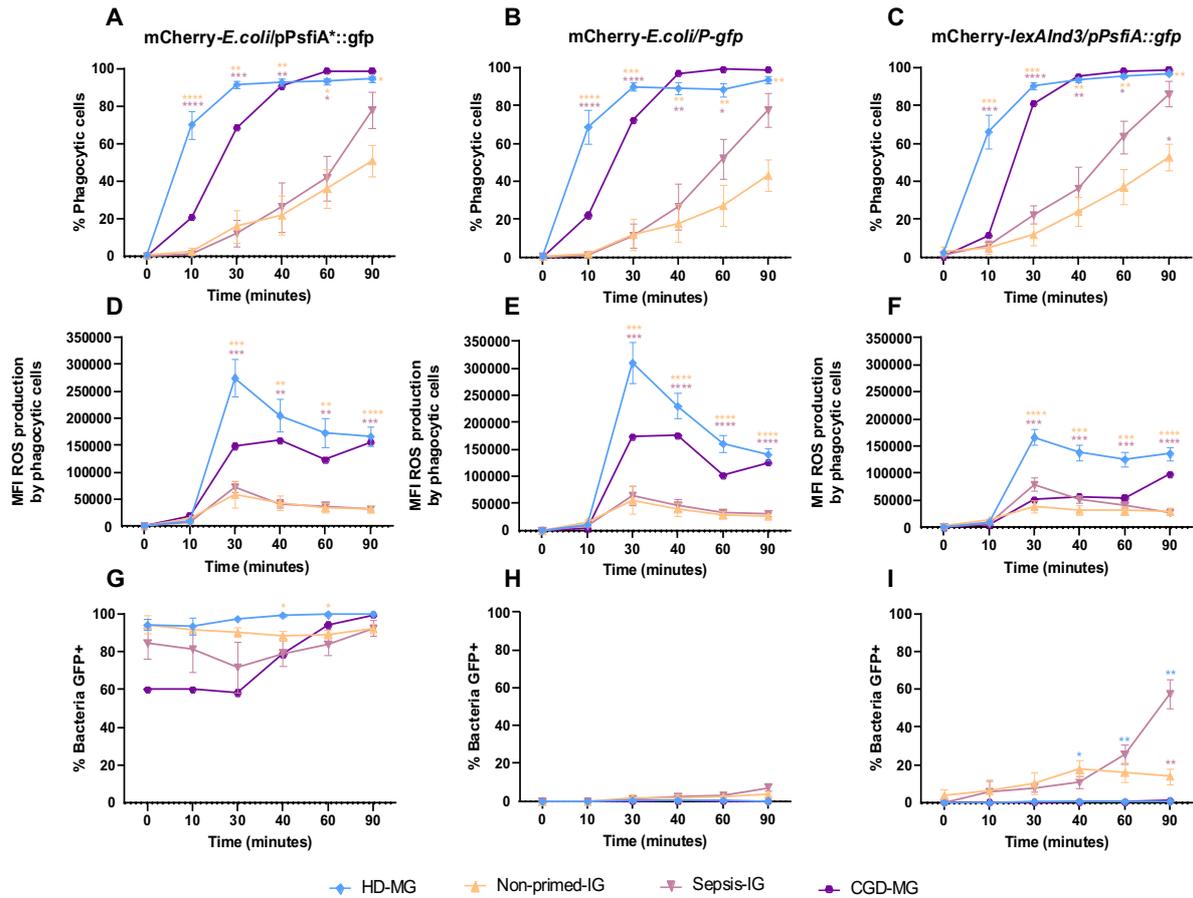


Fig. S2. Phagocytosis, ROS production and SOS response in control bacteria. The different granulocyte subsets (HD-MG, Non-primed-IG, Sepsis-IG and CGD-MG) were incubated in parallel with “*mCherry-E. coli/p-gfp*” (Negative control for GFP expression, **A, D, G**), “*mCherry-lexAInd3/pP(sfiA)::gfp*” (negative 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, * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; **** $p<0.0001$.

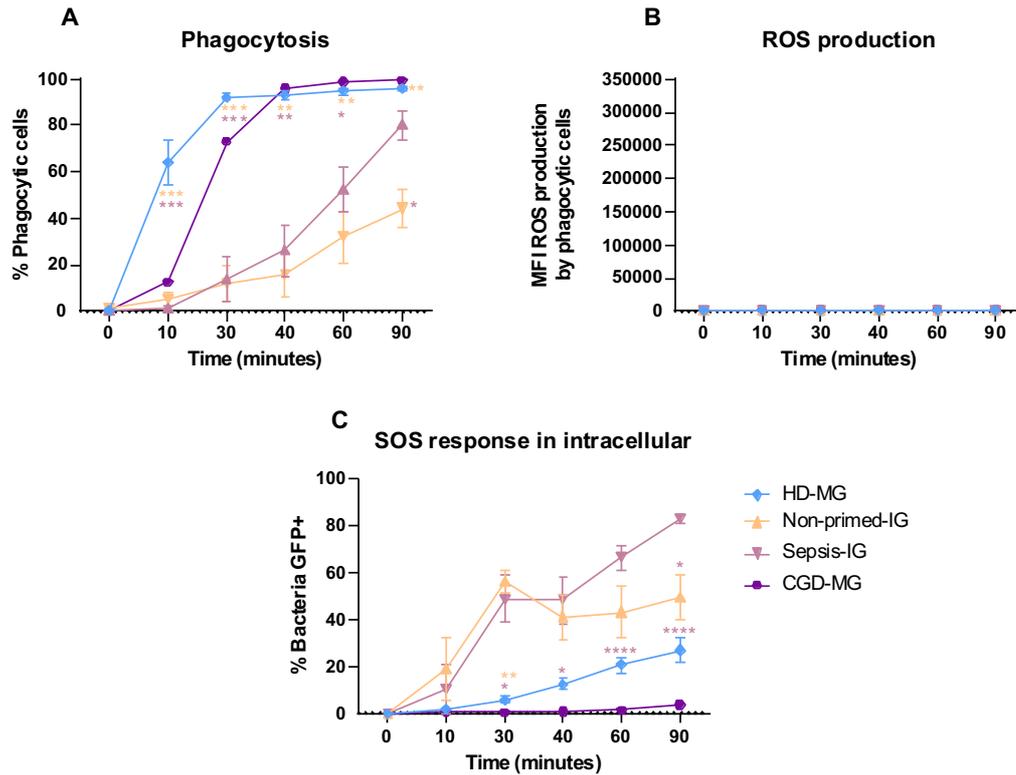


Fig. S3. Phagocytosis, ROS production and SOS response without Deep Red probe. Granulocytes were incubated with mCherry-*E. coli*/pSU38-P(*sfiA*)::*gfp* in the absence of the Deep-red probe for 0, 10, 30, 40, 60 and 90 minutes. **(A)** Proportion of phagocytic cells over time. Sepsis-IG (pink, $n=6$), 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, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

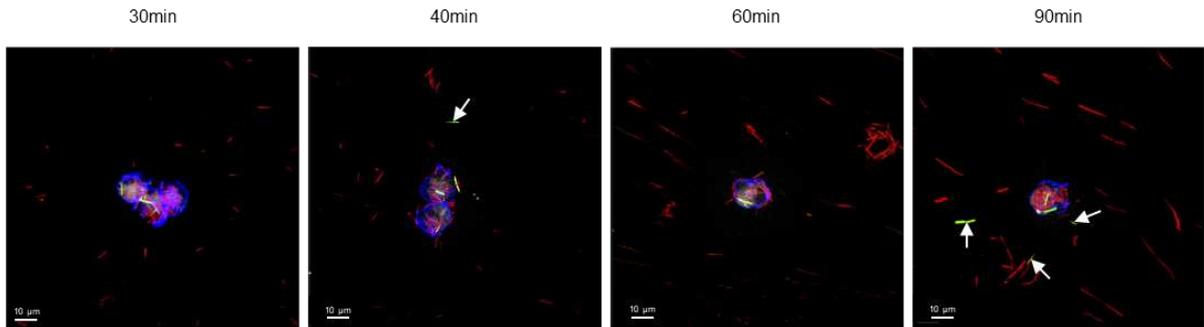


Fig. S4. SOS response induction on the extracellular environment with Sepsis-IG. mCherry-*E. coli*/pP(*sfiA*)::*gfp* were incubated with Sepsis-IG granulocytes over time and visualized by confocal microscopy. Granulocytes' actin filaments were stained using phalloidin (blue) and ROS presence identified 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.

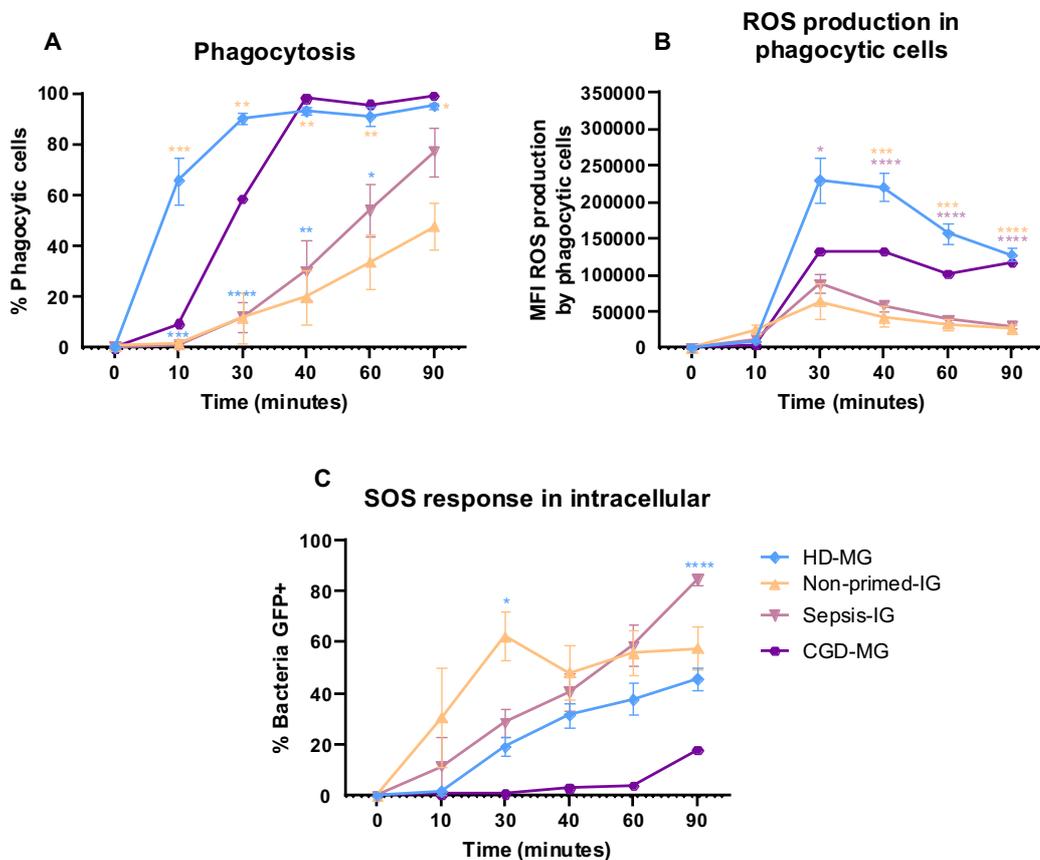


Fig. S5. Phagocytosis, ROS production and SOS response of Non-primed-IG vs HD-MG, Sepsis-IG or CGD-MG. Granulocytes (HD-MG, Non-primed-IG, Sepsis-IG and CGD-MG) incubated with mCherry-*E. coli*/pP(*sfiA*)::*gfp* were analyzed for (A) phagocytosis (% of granulocytes containing red bacteria); (B) ROS production (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, $n=1$).

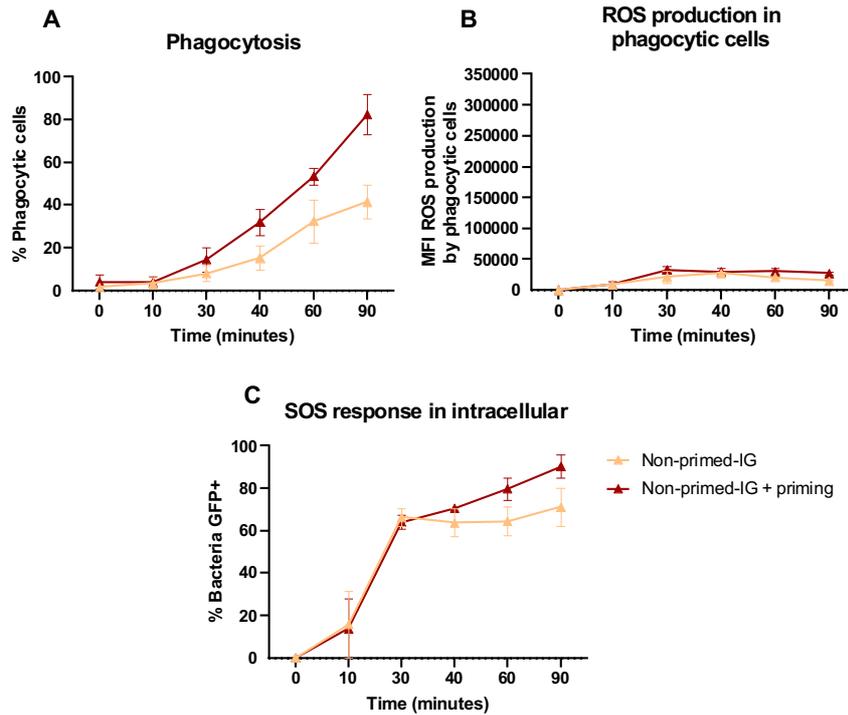


Fig. S6. Phagocytosis, ROS production and SOS response after priming of Non-primed-IG. Granulocytes from stem cells donors were incubated with plasma from septic patients during 10 min (Non-primed-IG + priming; red) or not (Non-primed-IG; yellow) before being incubated with mCherry-*E. coli/pP(sfiA)::gfp* 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.

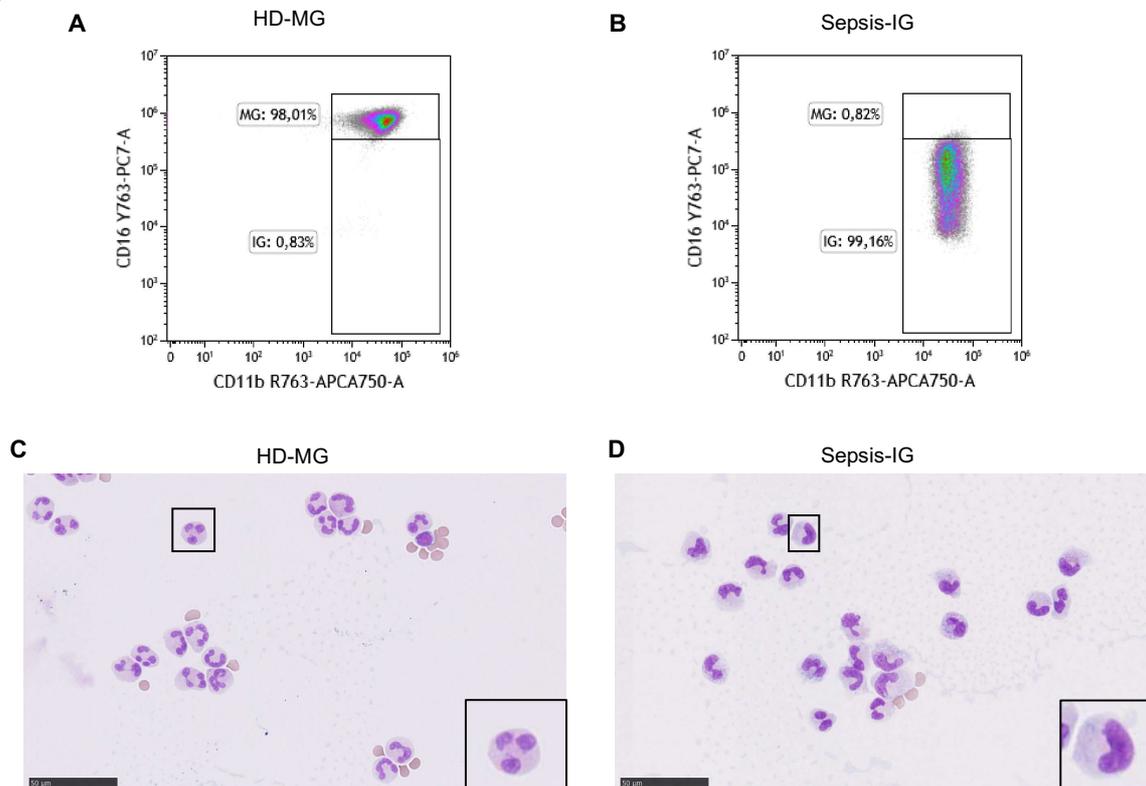


Fig. S7. Characterization of mature and immature granulocytes by flow cytometry and May-Grünwald-Giemsa staining. All patients and donor samples were screened by flow cytometry to quantify the proportion of mature (MG) and immature (IG) granulocytes. A sample of whole blood was stained with the antibodies 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 µg/mL	1:80	BV650	W6D3	Biologend
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
Fixable Viability Dye				1:160	Viakrome 808		Beckman coulter

Supplementary Table 3. Primers and probes

Construction	Primer name	Primer sequence (5'→ 3')	Reference
mCherry- <i>lexAInd3</i>	λATT-ext5	GGCGATAAATTGCCGCATCG	(2)
	λATT-ext3	TGCCACCATCAAGGGAAAGCCC	(2)
<i>p-gfp</i>	DelPsfIARev	GATCCATTATTTTCGTAGTTAAGAATTCGAT	This study
	DelPsfIAFwd	CGAAAATAATGGATCCTAAAGGAGAAGAACT	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]TGGGTGACTTAGATATTCGGCGCGTT(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

Ce travail a été élaboré à partir de l'hypothèse que la faible production de ROS produits par les GI pourrait déclencher la réponse SOS bactérienne qui elle-même serait responsable d'acquisition ou d'expression de résistances aux antibiotiques. Notre objectif principal était donc d'évaluer la capacité des GI et des neutrophiles d'induire la réponse SOS bactérienne, en fonction de leur activité phagocytaire et de production de ROS, et d'étudier l'impact biologique de cette induction sur l'expression SOS-dépendante de résistances aux antibiotiques.

La vérification de cette hypothèse a été réalisée en trois étapes : d'abord, la comparaison entre la phagocytose et la production de ROS par les GI et les neutrophiles, puis l'identification de l'induction de la réponse SOS bactérienne secondaire à l'interaction avec les ROS produits par ces cellules, pour enfin évaluer l'impact biologique de l'activation de la réponse SOS par cette interaction. Les résultats de ces trois étapes seront discutés en suivant la même structure que celle des chapitres précédents.

I.1. Phagocytose et production de ROS par les Granulocytes Immatures et les Neutrophiles

Le modèle ici développé a permis de mesurer simultanément la phagocytose et la production de ROS par les différents sous-types cellulaires. Nos résultats ont confirmé des données auparavant publiées sur les différences fonctionnelles entre les granulocytes immatures (GI) et ses formes matures (Neutrophiles)^{64,65,68}, avec une activité phagocytaire plus importante et une production majeure de ROS des neutrophiles par rapport aux GI. Nous avons montré que les neutrophiles s'activent plus rapidement que les GI : après seulement 10 minutes d'incubation avec des bactéries, 66 ± 29 % d'entre eux semblent avoir déjà phagocyté des bactéries, contre seulement 1.2 ± 1 % des GI (**Figure 57**, page 105).

La proportion de GI-sepsis phagocytaires augmente graduellement au cours du temps et atteint un maximum significativement inférieur à celle des neutrophiles ($48 \pm 20\%$ vs. $95 \pm 4\%$ $p=0.012$) (**Figure 57**, page 105). Ce niveau semble augmenter à 90 minutes d'incubation pour les GI-sepsis ($77 \pm 21\%$) et les GI pré-stimulés par les médiateurs inflammatoires produits dans le sepsis ($82 \pm 16\%$) (**Figure 57**, page 105 et **Figure 69**, page 120) alors que ces médiateurs n'ont pas d'effet sur la quantité de bactéries phagocytées par cellule (**Figure 69**, MFI mCherry, page 120). Dans ce travail, l'effet de la pré-stimulation par le plasma de patients septiques est démontré, mais ne permet pas de conclure quant aux facteurs responsables de cette récupération fonctionnelle. Lors d'un sepsis, la dérégulation inflammatoire a été associée à l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires, phénomène appelé « orage cytokinique »¹⁹⁶.

Les cytokines sont une large catégorie de protéines de petite taille (<40kDa), produites et secrétées pour aider la signalisation cellulaire. Les interleukines, chemokines, interférons, facteur de nécrose tumorale et facteurs de croissance sont des cytokines. Les interleukines (IL) sont le groupe le plus important des cytokines libérées lors d'un processus infectieux, et les IL pro-inflammatoires les plus étudiées dans le sepsis sont l'IL-1 β , IL-6, IL-12 et IL-17¹⁹⁶. Les produits chimiotactiques (fMLF, C5a, LTB4, PAF), les cytokines (TNF α , IFN-g, IL-8, IL-15, IL-33), et les produits bactériens (LPS, lipopeptides, flagelines), augmentent la phagocytose chez les neutrophiles par la hausse de l'expression et de l'affinité des récepteurs liés à la phagocytose¹⁹⁷. Il est possible que de façon similaire à la pré-stimulation chez les neutrophiles,

l'augmentation du nombre de cellules phagocytaires grâce à la pré-stimulation (comme démontré par les résultats des GI-sepsis, et GI pré-stimulés) soit secondaire à ce mécanisme. Néanmoins, ce résultat reste à confirmer par dosage de ces cytokines, ainsi que par des études de pré-stimulation en présence de ces cytokines isolées indépendamment.

La récupération fonctionnelle des GI libérés lors de la granulopoïèse d'urgence a un intérêt dans le sepsis pour les rendre plus performants. Cependant, elle est limitée, car la quantité totale de ROS produits par les GI reste inchangée entre les GI-sepsis, GI G-CSF et GI pré-stimulés (**Figure 59**, page 108 et **Figure 69**, page 120). Malgré l'augmentation de la production globale de ROS en comparaison à leur production basale (**Figure 59**, page 108), la quantité totale de ROS est significativement inférieure chez les GI que chez les neutrophiles.

La production diminuée de ROS par les GI a été décrite préalablement ^{64,65}, mais les mécanismes exacts sont méconnus. Cependant, différentes observations basées sur l'analyse des niveaux de transcrits des gènes du complexe NADPH-oxydase, sur la quantification des sous-unités protéiques de ce complexe ainsi que sur l'évaluation des quantités de récepteurs de surface impliqués dans l'induction de l'assemblage du complexe, permettent d'établir de premières explications ⁶⁷. En effet, l'expression basale des sous-unités gp91^{phox} et p47^{phox} est significativement réduite chez les GI, et cette expression n'augmente pas après phagocytose. De plus, l'expression diminuée de CD16 ⁶⁷ a également un impact sur le niveau de production de ROS, puisque la stimulation du récepteur CD16 est une des voies d'activation de l'assemblage du complexe NADPH-oxydase ¹⁹⁸.

La méthode de quantification de ROS que nous avons utilisé dans ce travail n'est pas spécifique aux ROS produits par la NADPH-oxydase. De plus, le dosage des ROS n'est pas techniquement facile au vu de leur courte demi-vie ¹⁹⁹. Les méthodes disponibles pour leur quantification dépendent de la visualisation des effets de l'oxydation sur des sondes fluoro-²⁰⁰ ou chemo-luminescentes ²⁰¹⁻²⁰³. Ces sondes peuvent réagir avec des ROS dérivés de l'activité métabolique cellulaire, ce qui démarque la présence des ROS indépendamment de la fonctionnalité du complexe NADPH-oxydase, comme démontré par les résultats MFI ROS et MFI Ratio ROS pour les neutrophiles provenant d'un patient CGD (**Figure 59**, page 108). Cependant, ce patient porte une mutation documentée du gène qui code la protéine gp91^{phox}, et souffre d'infections récurrentes comme observé au décours de la granulomateuse chronique familiale ^{204,205}. Les patients septiques et les donneurs de cellules n'ont normalement pas cette mutation. De plus, le dosage du niveau des protéines et des transcrits de gp91^{phox} confirme la présence de cette sous-unité du complexe ⁶⁷. Il est possible donc de conclure que les GI ont une production de ROS diminuée par rapport aux neutrophiles, à la fois comme conséquence du nombre limité de complexes NADPH-oxydase disponibles et assemblés ; et de leur activité phagocytaire diminuée.

Afin de mieux comprendre les processus impliqués dans la fonctionnalité des GI, nous pourrions utiliser d'autres inducteurs de maturation que ceux utilisés dans notre modèle *in vitro* de maturation des HL-60, optimisé en collaboration avec S. Chollet ⁶⁷. En effet, bien que les cellules possédaient une morphologie et une expression des récepteurs de membrane caractéristique des neutrophiles (**Figure 47**, page 85), elles montraient une cinétique de phagocytose et de production de ROS plus proche de celle des GI que des neutrophiles humains. L'identification des molécules capables d'améliorer la fonctionnalité des GI circulants aurait un intérêt comme alternative d'immunothérapie dans le sepsis ainsi que dans la transfusion de cellules souches hématopoïétiques à des patients neutropéniques.

I.2. Induction de la réponse SOS bactérienne

Les résultats ici présentés ont montré pour la première fois, que la réponse SOS bactérienne est induite dans les phagosomes des neutrophiles et des granulocytes immatures humains. La proportion de granulocytes contenant des bactéries ayant eu une induction SOS augmente avec le temps pour tous les sous-types cellulaires, et est plus importante pour les GI. A 90 minutes d'incubation, 85% des GI contiennent des bactéries avec une réponse SOS activée, alors que cette proportion est 1,8 fois inférieure pour les neutrophiles (46%).

Les ROS sont des inducteurs connus de la réponse SOS^{106,114}, et sont aussi la principale molécule bactéricide dans le phagosome des neutrophiles^{51,53}. La relation entre la présence des ROS et l'induction SOS dans ce contexte est confirmée dans notre modèle par le fait que cette induction est absente chez le patient CGD pour lequel il n'y a pas de ROS (**Figure 62**, page 112). L'association entre les ROS et le niveau d'induction SOS semble dose-dépendante : les GI avec une production limitée de ROS induisent plus la réponse SOS que les neutrophiles, ayant une production de ROS plus importante (**Figure 59**, page 108 et **Figure 62**, page 112). De façon illustrative, un essai *in vitro* d'incubation de *E. coli* MG1656-mCherry/pPsfIA::gfp avec des doses croissantes de H₂O₂ montre que l'induction SOS est plus importante à des doses inférieures à 2mM, tandis que les doses supérieures causent la mort bactérienne sans donner l'opportunité aux bactéries d'activer ce mécanisme adaptatif (**Figure 76**).

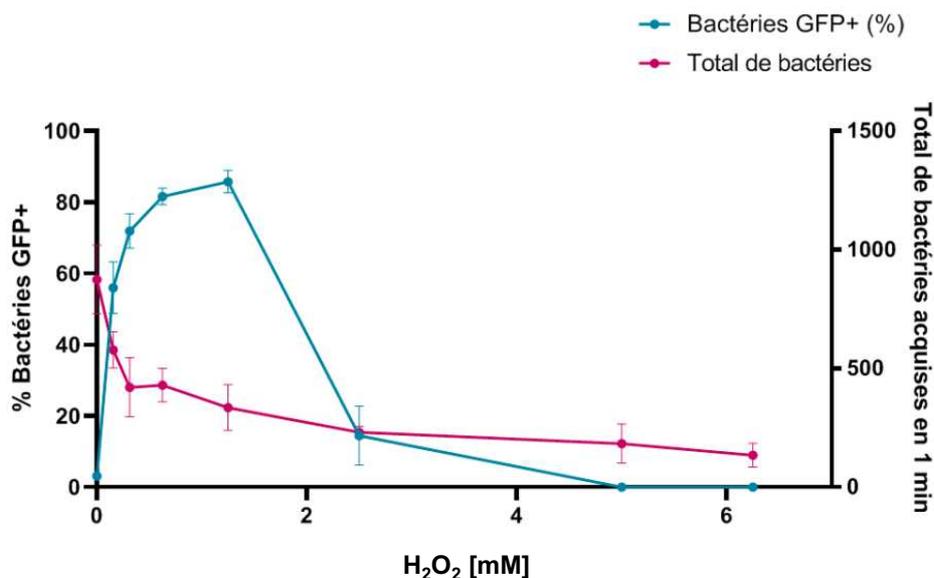


Figure 76. Proportion de bactéries GFP+ (ligne bleue) parmi le total de bactéries (ligne rouge), en fonction de la concentration de H₂O₂

E. coli MG1656-mCherry/pPsfIA::gfp a été incubé à des doses croissantes de H₂O₂ pendant 30 minutes, dans un bain marie à 37°C. Les différents échantillons ont été fixés et acquis au cytomètre. Un volume fixe de culture a été acquis par échantillon (60µL pendant 1 minute), pour quantifier les variations en nombre total de bactéries restant dans la culture (grâce à leur fluorescence mCherry), et la proportion des bactéries ayant une induction SOS (grâce à leur expression de fluorescence GFP+).

Le pourcentage de cellules contenant des bactéries GFP+ montre qu'au niveau populationnel, les GI induisent plus la réponse SOS que la population de neutrophiles (**Figure 62**, % GFP+, page 112). Cependant, la différence du niveau d'induction à l'intérieur de chaque cellule est

moins marquée, d'après l'interprétation des résultats de MFI. La moyenne d'intensité de fluorescence MFI GFP est corrélée avec le niveau d'induction de la réponse SOS : une induction plus forte conduit à l'expression de plus de protéines GFP et donc une intensité de fluorescence plus élevée. Les résultats de MFI GFP ne donnent pas d'information au niveau individuel mais au niveau des sous-ensembles de populations bactériennes : au moment de l'acquisition par le cytomètre, la MFI de GFP émise par une cellule correspond au nombre total de bactéries dans la cellule. Comme confirmé par les images de microscopie confocale (**Figure 68**, page 118) le nombre total de bactéries phagocytées est variable d'une cellule à l'autre, et étant donné que l'activation de la réponse SOS est hétérogène dans une population¹²⁶, le nombre de bactéries GFP+ parmi cette sous-population doit être variable également.

De plus, l'intensité de fluorescence GFP émise par bactérie n'est pas fixe, et l'expression de la GFP sous contrôle du promoteur PsfiA peut avoir différents niveaux^{183,206}.

Une dernière considération qui complexifie l'interprétation de la MFI acquise au niveau cellulaire, est la variabilité du nombre total de bactéries dans le phagosome au cours du temps. Les points de suivi sélectionnés pour notre modèle d'induction SOS (0, 10, 30, 40, 60, et 90 minutes) sont des images fixes d'un évènement actif et dynamique. Entre chaque 'image', le nombre total de bactéries change : des nouvelles bactéries sont phagocytées tandis que d'autres sont lysées. De plus, l'expression augmentée de LexA sous l'induction SOS, et la diminution du stress environnemental retournent le système vers l'état de répression basal¹²⁸, ce qui permet aux bactéries de reprendre la division cellulaire¹⁰⁵. Dans notre modèle, le retour à l'état réprimé de PsfiA::*gfp* et la reprise de la division cellulaire causerait une dilution de la protéine GFP produite par l'induction SOS préalable.

En conséquence, le changement de la MFI pour la GFP dans le phagosome peut être secondaire i) à l'augmentation du nombre total de bactéries dans le phagosome due à la phagocytose, ii) à la lyse des bactéries, iii) au processus dynamique d'augmentation du nombre de bactéries qui activent la réponse SOS, iv) à l'augmentation de l'expression de GFP dans une bactérie, et v) à la division des bactéries avec une réponse SOS éteinte (**Figure 77**).

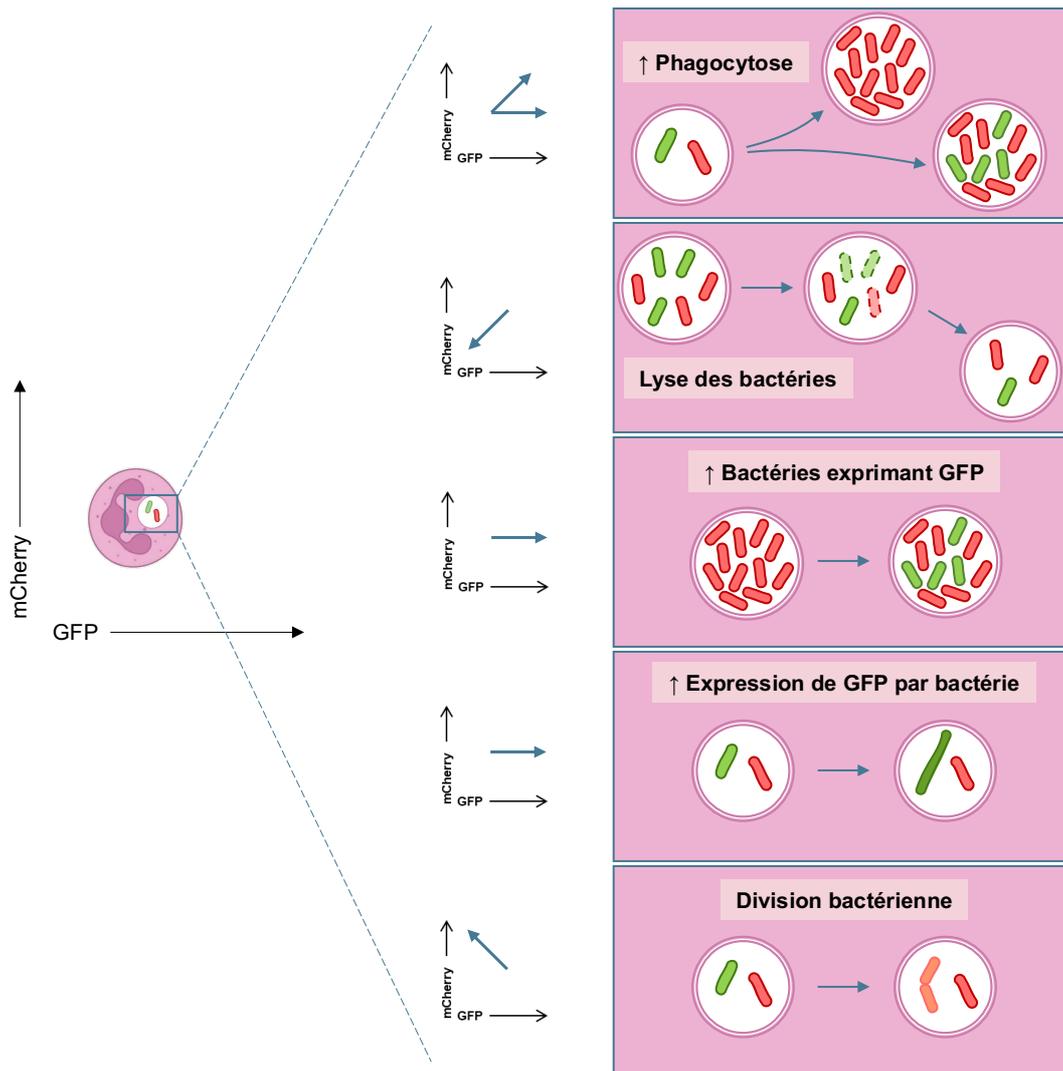


Figure 77. Résumé d'évènements qui peuvent causer un changement de niveau de fluorescence mCherry et GFP dans le phagosome

Une méthode qui pourrait éclairer l'impact des différents évènements décrits dans la **Figure 77** sur l'expression de la réponse SOS par les bactéries phagocytées au niveau individuel est l'application de la microscopie en suivi sur le temps ou « *timelapse* ». Avec cette technique, le nombre de bactéries phagocytées, le moment de l'induction de la réponse SOS, la lyse bactérienne, la persistance et la division cellulaire pourraient être suivis plus en détail en utilisant notre système de fluorescence au cours du temps.

Il a été montré que les bactéries peuvent survivre dans le phagosome par un mécanisme de persistance²⁰⁷. La persistance est définie comme la capacité d'un sous-ensemble de la population bactérienne de survivre à un environnement toxique (généralement par la présence d'un antibiotique)²⁰⁸, par la limitation de ses activités métaboliques et l'arrêt du cycle cellulaire^{208,209}. La persistance diffère de la résistance en ce que la première n'est pas associée à un changement génotypique héritable²⁰⁸. Il existe des preuves de l'association entre le phénotype de persistance et l'induction SOS²⁰⁹.

La comparaison de la capacité différentielle de division cellulaire ainsi que de la survie après être libérées du phagosome granulocytaire, entre les bactéries mCherry/GFP+ et celles mCherry/GFP- devrait donner des indices sur cet état de persistance. Encore une fois, le système de fluorescence utilisé ici pourrait s'adapter à l'analyse du *timelapse* sous

microscopie, pour suivre la division cellulaire des bactéries phagocytées GFP+ vs. GFP-. La libération du phagosome et séparation des bactéries GFP+ des GFP- à l'aide du trieur BD FACSAria III permettrait d'analyser leur survie après arrêt du stimulus engendrant le stress.

Même si les GI et les neutrophiles sont capables d'induire la réponse SOS, leur niveau d'induction n'est pas le même. Une proportion plus importante de GI contient des bactéries pour lesquelles la réponse SOS a été induite. Cette induction est d'autant plus forte quand les GI sont pré-stimulés par les facteurs solubles, soit *in vivo* (parmi les GI des patients septiques), ou *ex vivo* (par les GI des donneurs de cellules hématopoïétiques pré-stimulées avec du plasma de patients septiques) (**Figure 62** page 112 et **Figure 69** page 120).

Le phagosome des neutrophiles est caractérisé pour son pH alcalin. Le pH basique peut entraîner le clivage des dimères de LexA¹⁹³, ce qui contribue à la dérégulation du régulon SOS indépendamment de RecA. Ce mécanisme pourrait expliquer l'apparition d'un signal tardif (à partir de 40 minutes d'incubation) d'expression de GFP chez la souche *E. coli* MG1656-*mCherry-lexAInd3/pPsfia::gfp* parmi les bactéries phagocytées (**Figure 62**, page 112). Le niveau d'acidité du phagosome dépend à la fois de l'activité des canaux Na⁺/H⁺, et de leur production de ROS⁴⁹ (par l'activité de la myéloperoxydase qui transforme le H₂O₂ en HOCl)^{47,52,54}. L'induction plus élevée de la réponse SOS chez les GI pourrait ainsi être due à la fois à la production de plus faibles quantités de ROS et au pH plus élevé comparativement aux neutrophiles. Cependant, la quantification du pH à l'intérieur du phagosome des granulocytes immatures par rapport aux neutrophiles est nécessaire pour confirmer cette hypothèse.

Grâce à la granulopoïèse d'urgence⁴³, la proportion des GI, normalement absents du sang périphérique (3±6%), augmente chez les patients ayant un sepsis (20±27%), ou un choc septique (59±35%)⁶⁹. L'augmentation des granulocytes et l'amélioration de leur capacité phagocytaire par la réponse immune à l'infection est un mécanisme adaptatif de l'hôte qui peut donc déclencher un mécanisme adaptatif chez la bactérie infectante.

I.3. Impact biologique de la réponse SOS intra-phagosomale

L'activation de la réponse SOS permet aux bactéries d'induire l'expression et la dissémination de la résistance aux antibiotiques. Comme développé dans le chapitre III (page 71), la dérégulation des gènes sous la régulation de LexA peut causer i) l'augmentation des mutations ponctuelles, ce qui peut conduire à l'apparition de résistance aux fluoroquinolones et à la rifampicine^{138,143,144} ; ii) l'expression de gènes de résistance réprimés par LexA, comme le gène *qnrB2*, qui confère la résistance aux quinolones¹⁵¹ ; iii) l'expression de *intI1*, codant l'intégrase de l'intégron, responsable de la recombinaison de cassettes au sein de cette structure¹⁷⁷, ce qui facilite l'insertion des nouveaux gènes de résistance et l'expression de nouveaux phénotypes de résistance par réarrangement des cassettes²¹⁰.

I.3.1. Expression de *qnrB2* et résistance aux fluoroquinolones

Plusieurs allèles de *qnrB* – gène codant Qnr qui protège l'ADN gyrase et la topoisomérase de l'action des fluoroquinolones – sont réprimés par LexA^{151,152}. Nous nous sommes intéressés à la capacité des GI et des neutrophiles d'induire l'expression de *qnrB2*.

Nous avons montré lors de l'incubation de la souche *E. coli* MG1656/pPqnrB-*qnrB2* avec les GI des patients septiques ou les neutrophiles que le nombre de transcrits de *qnrB2* dans les bactéries phagocytées était augmentée respectivement d'un facteur 2,18 ou 3,34 par rapport aux bactéries incubées sans cellules. Cette augmentation est SOS dépendante, puisque le nombre des transcrits n'augmente pas par rapport au niveau basal quand on utilise la souche *E. coli* MG1656/*lexAInd3*/pPqnrB-*qnrB2* dans laquelle LexA n'est plus clivable (**Figure 70**, page 123).

L'expression phénotypique d'une résistance aux fluoroquinolones par l'expression augmentée de *qnrB2* a été évaluée par la quantification de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de ciprofloxacine par E-test. Malheureusement, cette méthode n'est pas la plus adaptée pour quantifier l'expression de résistance après induction SOS, puisque la ciprofloxacine elle-même peut induire cette réponse. En effet, la CMI de la ciprofloxacine était identique (0,25µg/ml) quelle que soit la souche utilisée, en incubation avec et sans les granulocytes. Il est probable que la ciprofloxacine contenue dans la bandelette E-test utilisée ait induit l'expression de *qnrB2* sur les bactéries récupérées des phagosomes granulocytaires, en cachant l'effet de l'induction préalable par les ROS phagocytaires (**Tableau 13**, page 122).

Jusqu'ici, les résultats de ce travail peuvent être résumés par la **Figure 78**.

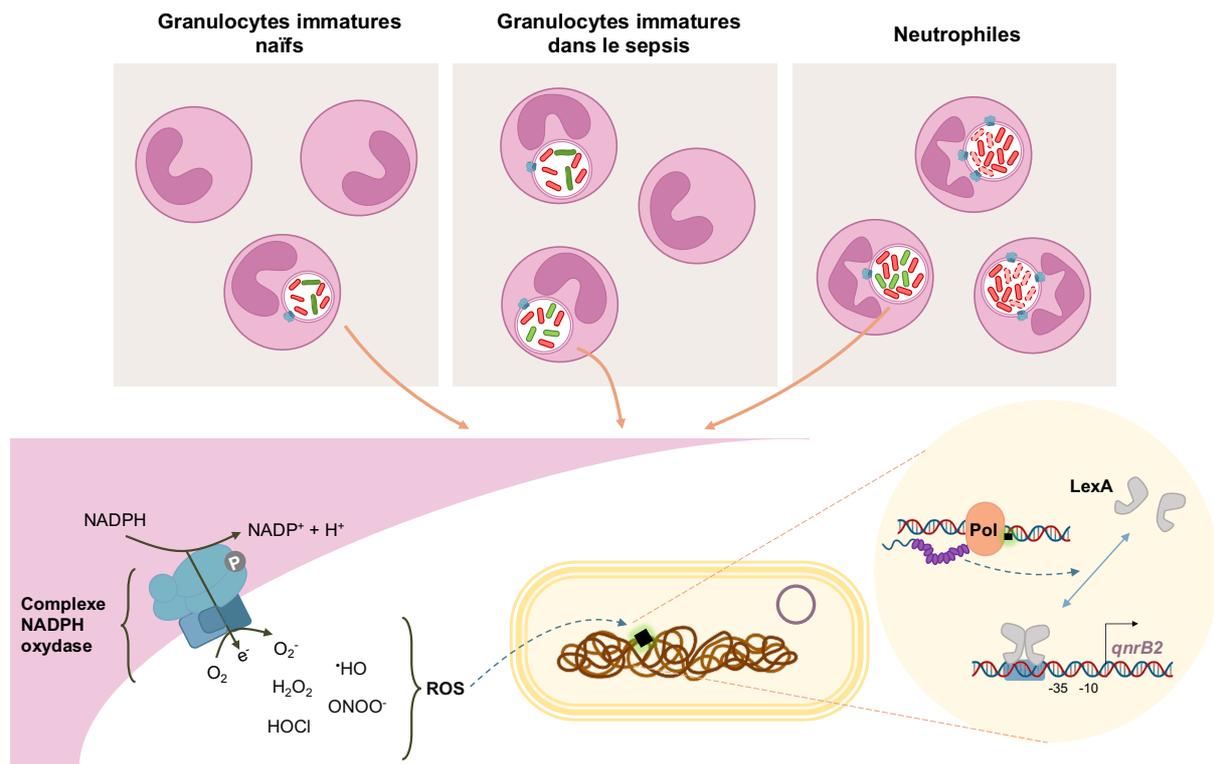


Figure 78. Résumé des résultats obtenus dans ce travail

Les GI naïfs (gauche), GI des patients septiques (centre) et les neutrophiles (droite) ont montré des activités de phagocytose et production de ROS significativement différentes. Tous les granulocytes ont été capables d'induire la réponse SOS, mais la proportion des granulocytes immatures contenant des bactéries avec une réponse SOS active a été plus importante chez les GI de patients septiques. La production de ROS dans le phagosome, lorsqu'elle n'est pas mortelle pour les bactéries, cause des lésions à l'ADN et la formation d'ADNsb. Ce signal déclenche la réponse SOS, ce qui induit l'expression du gène de résistance aux quinolones : *qnrB2*.

Toutefois, les impacts biologiques de l'induction de la réponse SOS à la suite des dommages liés aux ROS dans le phagosome granulocytaire sont multiples. Deux autres possibles conséquences de cette interaction sont discutées ci-dessous.

I.3.2. Optimisation d'un modèle pour quantifier l'activité d'excision de l'intégrase de l'intégron

Dans le cadre de cette thèse, l'adaptation de l'essai d'excision développé préalablement^{177,187} aux conditions d'incubation de *E. coli* avec des granulocytes a été réalisée en plusieurs étapes.

Dans un premier temps, nous avons évalué la capacité d'un système plasmidique rapporteur basé sur la fluorescence pour quantifier la fréquence d'excision par cytométrie en flux (**Figure 71**, page 125). Cette méthode a montré ne pas être adaptée à la quantification d'évènements rares. En effet, la cytométrie en flux a une sensibilité estimée de 10^{-4} - 10^{-5} ²¹¹. L'identification d'un évènement survenant à une fréquence inférieure demande l'acquisition d'un nombre total plus important, qui est limité dans notre modèle par le nombre total de cellules disponibles pour l'essai. Le modèle original de quantification des colonies sur boîtes, basé sur l'expression d'un gène de résistance à la tobramycine a donc été choisi¹⁷⁷ pour continuer l'optimisation.

Néanmoins, l'estimation de la fréquence d'excision parmi les bactéries phagocytées a deux points limitants : la récupération des bactéries intra-cellulaires, proportionnellement inférieures à la quantité de bactéries au départ de l'incubation ; et l'occurrence, parmi ce sous-ensemble de bactéries, d'un évènement d'excision.

Pour faire face à la première limitation, le nombre total de bactéries et de cellules a été augmenté au maximum possible pour le modèle *in vitro*. Un nombre initial de 10^7 bactéries permet de récupérer entre 10^4 - 10^5 bactéries phagocytées par les granulocytes après 90 minutes. Ce nombre pourrait être encore augmenté avec une expérience *ex vivo*, avec des neutrophiles et GI humains, ayant une activité phagocytaire et une induction SOS plus élevées que celles des cellules HL-60 différenciées. Avec un tel modèle, le nombre total de cellules récupérées augmente aussi, ce qui permettrait d'augmenter la quantité initiale de bactéries. Nous avons privilégié l'utilisation des cellules provenant de la lignée cellulaire pour les expériences d'optimisation pour des raisons de disponibilité de prélèvements *ex vivo* et pour éviter de gaspiller de précieux échantillons humains avant d'avoir un protocole pleinement performant.

De plus, une incubation prolongée des bactéries avec les granulocytes pourrait permettre d'augmenter la probabilité de voir des évènements rares. En effet, comme le nombre total de bactéries mises en culture au départ est limité, l'augmentation du temps d'incubation peut palier à cette limitation en augmentant le nombre de bactéries au cours de temps grâce à leur réplication. La réplication bactérienne est également nécessaire pour résoudre le mécanisme de recombinaison des sites *attC*²¹². En absence de réplication, l'intégrase peut reconnaître les sites *attC* et catalyser la formation d'une structure intermédiaire d'échange des simples brins type jonction de Holliday, mais sa résolution par la voie classique de recombinaison site-spécifique produirait soit la réversion vers les substrats originaux, soit un produit linéaire abortif^{168,212,213}. Comme les bactéries non phagocytées n'ont pas d'induction SOS par effet de la présence des granulocytes (**Figure 66**, page 116), l'élimination des bactéries extracellulaires à 90 minutes d'incubation peut aider à conserver uniquement les bactéries pour lesquelles la réponse SOS a pu être induite et ainsi favoriser leur multiplication. De plus, les GI et les neutrophiles peuvent contenir des bactéries pendant 30 heures avant de mourir²¹⁴. Prolonger l'incubation des cellules phagocytaires peut donc augmenter ce « signal d'excision » pour faciliter sa quantification ultérieure.

Un deuxième facteur qui joue sur l'apparition d'un évènement d'excision est la capacité recombinogène des sites *attC*. Intl1 est capable de reconnaître des sites *attC* très différents grâce à l'identification des structures simple brin tige-boucle. L'efficacité d'excision de Intl1 est néanmoins variable selon les sites *attC*, en fonction de l'identité, du nombre, de l'emplacement et de l'espacement des bases extra-hélicales à cette structure secondaire^{168,215}.

Les sites utilisés dans la cassette synthétique de notre système sont les sites *attC_{aadA7}* et *attC_{VCR}*. Ce dernier, extrait d'une cassette sédentaire chez *Vibrio cholerae*, de taille plus importante, a un faible pouvoir recombinogène. Le remplacement de ce site par un site *attC* avec une fréquence d'excision attendue plus élevée pourrait encore optimiser ce modèle. Parmi la grande variété des cassettes répertoriées chez *E. coli*¹⁶⁵ nous proposons les sites *attC_{Oxa2}*, *attC_{aadA5}*, ou *attC_{dfrB3}*, du fait leur capacité recombinogène plus élevée²¹⁵.

I.3.3. Virulence

Dans le cadre de ce travail nous avons développé des modèles centrés sur l'identification de l'expression de résistances aux antibiotiques comme conséquences biologiques de l'induction SOS. Toutefois, au-delà de la résistance aux antibiotiques, l'expression et la dissémination de certains facteurs de virulence²¹⁶⁻²²¹ sont aussi soumises à la régulation SOS.

La présence de bactéries infectantes n'est pas le seul facteur conduisant à l'invasion et à l'infection. L'expression des facteurs de virulence peut faciliter la croissance et l'invasion de la bactérie pathogène.

La libération de LexA peut directement induire l'expression des facteurs de virulence portés par des phages, et faciliter leur dissémination. La protéine d'attachement à la fibronectine chez *S. aureus*²¹⁶, importante pour l'invasion tissulaire, est un des facteurs de virulence induits par la réponse SOS. La colicine, toxine produite par *E. coli*²¹⁷ et *Salmonella enterica*²¹⁹ est également sous le contrôle de la réponse SOS, et son expression entraîne la lyse des bactéries à ses alentours, ce qui leur donne un avantage d'espace de croissance et d'accès aux nutriments (et provoque accessoirement des perturbations pathologiques de la flore intestinale normale).

De façon intéressante, la toxine cholérique chez *V. cholerae*, clé dans la physiopathologie des diarrhées profuses typiques du choléra, est à la fois exprimée et disséminée par l'activation de la réponse SOS^{218,222}. L'activation de la phase lytique du phage CTX ϕ portant la toxine cholérique chez *V. cholerae*²²⁰ est régulée par LexA. La libération des îlots de pathogénicité chez *S. aureus*, portant la toxine du syndrome de choc toxique (TSST) est également contrôlée par LexA^{221,223}.

Au-delà de l'activation du régulon SOS, grâce à la co-évolution des microorganismes avec leurs hôtes²²⁴, certaines bactéries pathogènes ont développé la capacité d'exploiter les signaux de la réponse immune pour activer l'expression de gènes de virulence pour faciliter leur survie dans les tissus. *S. aureus* par exemple, augmente l'expression des gènes *EssC* (système de sécrétion ESAT-6), et *hlgB* (sous-unité B de l'hémolysine gamma) après contact avec la palmitine, composant du surfactant pulmonaire. Cette induction est médiée par le réseau de réponse générale au stress. L'expression de ces facteurs peut contribuer à la survie de la bactérie et à une clairance diminuée au sein du tissu pulmonaire²²⁵. Enfin, l'interaction de *Listeria monocytogenes* avec l'hôte active le métabolisme de la paroi cellulaire et l'expression des régulateurs de virulence PrfA et VirR via l'activation des réponses aux stress général et oxydant. PrfA est le régulateur principal de l'expression du cluster de virulence chez *L. monocytogenes*, et des gènes impliqués dans la survie dans le milieu intra-cellulaire²²⁶.

Perspectives

Arrivant à la fin de ce manuscrit et de ce projet de recherche, le nombre de questions qui se posent est supérieur à celles adressées dans ce court temps. Le système rapporteur de l'induction SOS basé sur la fluorescence ici utilisé possède l'avantage de son adaptabilité à des modèles *in vitro*, *ex vivo* et même *in vivo*.

Ex vivo, l'incubation de *E. coli* MG1656/pPsfIA::gfp avec des granulocytes immatures et neutrophiles des patients septiques, pour la visualisation par microscopie en *timelapse*, pourrait informer au niveau bactérien (et non cellulaire) sur l'induction SOS dans la population bactérienne phagocytée^{49,207} : la proportion de bactéries ayant induit cette réponse ; la force de cette induction dans chaque bactérie ; et l'impact de l'induction SOS sur la survie dans le phagosome.

L'évaluation de l'induction SOS peut également être adaptée *in vivo*, spécialement dans un modèle zebrafish d'infection. Le zebrafish, en état larvaire est transparent, ce qui facilite la visualisation en temps réel des changements dans notre système. De plus, pendant cette étape, le système immunitaire du zebrafish est exclusivement inné, et les cellules atteignent la maturité après 4 semaines de vie^{227,228}. Ce modèle *in vivo* est donc idéal pour l'étude de l'induction SOS suivie par fluorescence avec les granulocytes immatures et les neutrophiles.

Concernant les conséquences de l'induction SOS sur l'expression des résistances aux antibiotiques, deux modèles restent à tester.

Le modèle de quantification de la fréquence d'excision par l'intégrase de l'intégron peut être encore optimisé par le changement des sites *attC* de la cassette synthétique du plasmide rapporteur. Cette optimisation pourrait augmenter le taux d'excision attendu, facilitant la quantification de la fréquence d'excision à la suite de l'induction SOS par les ROS du phagosome cellulaire. Le système pourrait être testé *ex vivo*, mais également *in vivo* dans un modèle murin de sepsis par exemple. L'utilisation de souris portant des mutations sur la NADPH-oxydase pourrait aider à isoler l'importance des ROS dans cette induction²²⁹.

L'activation de la réponse SOS peut également conduire à une augmentation de l'expression de résistance aux antibiotiques par un mécanisme de mutation ponctuelle^{138,143,144}. Le protocole de quantification de taux de mutation proposé par²³⁰ peut être adapté à notre modèle d'incubation des granulocytes avec alternativement *E. coli*, *E. coli lexAInd3* (réponse SOS non inductible) ou *E. coli ΔlexA* (Régulon SOS d'expression constitutive). Le taux de mutation parmi les bactéries phagocytées peut être calculé à partir du ratio entre le nombre de colonies résistantes à la rifampicine, sur le total de colonies intra-phagocytaires récupéré. Les différences des taux de mutation avec les mutants *ΔlexA* et *lexAInd3* confirmeraient le rôle de cette réponse sur l'induction des mutations après interaction avec les cellules.

En revenant au côté translationnel de ce travail, la pertinence clinique de la capacité d'induction SOS par les neutrophiles et GI dans le sepsis peut être explorée d'un point de vue épidémiologique. En partant de notre hypothèse, les patients admis avec un sepsis et un taux élevé des GI dans le sang (>30%)⁶⁹, ont aussi une probabilité élevée d'héberger des bactéries avec une réponse SOS active, ce qui peut entraîner une expression augmentée de gènes de résistance aux antibiotiques ainsi que des gènes de virulence. Le suivi épidémiologique des isolats de ce type de patients serait intéressant pour caractériser l'induction de la réponse SOS dans un modèle « *in vivo* humain », et ses impacts biologiques en termes d'augmentation de leur virulence et résistance. Une meilleure compréhension des mécanismes qui déclenchent

l'activation des facteurs de virulence dans l'interaction hôte-pathogène permettrait d'affiner l'identification des nouvelles cibles de traitement prophylactique.

Enfin, d'un point de vue immunologique, plusieurs questions restent ouvertes sur les différences fonctionnelles entre les GI et les neutrophiles. Nous nous sommes concentrés sur l'activité de phagocytose et de production de ROS, mais il y a encore un espace pour l'exploration sur la dégranulation, la netose, et le possible effet régulateur sur d'autres cellules de l'immunité innée et adaptative. L'exploration d'autres inducteurs de différenciation, pourrait également mettre en évidence des cibles potentielles pour une immunothérapie visant à améliorer la fonctionnalité des granulocytes immatures.

Conclusion

L'ensemble des résultats de ce travail confirme que les neutrophiles et les granulocytes immatures peuvent induire la réponse SOS bactérienne d'une façon dépendante de leur phagocytose et production de ROS. L'induction de cette réponse met en place les systèmes de réparation de l'ADN et assure la survie bactérienne au stress oxydatif. Cependant, les conséquences de l'activation du mécanisme de régulation SOS, médié par le répresseur LexA, vont au-delà de la réparation de l'ADN, et peuvent induire l'expression et la dissémination de gènes de résistance aux antibiotiques, et de facteurs de virulence.

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence l'augmentation de l'expression du gène *qnrB2*, responsable de la résistance aux fluoroquinolones. Toutefois, les multiples conséquences de l'induction SOS par les granulocytes restent à explorer : l'augmentation des mutations ponctuelles, l'expression de l'intégrase de l'intégron, l'expression des facteurs de virulence portés par des phages et sa dissémination par l'activation du cycle lytique (**Figure 79**).

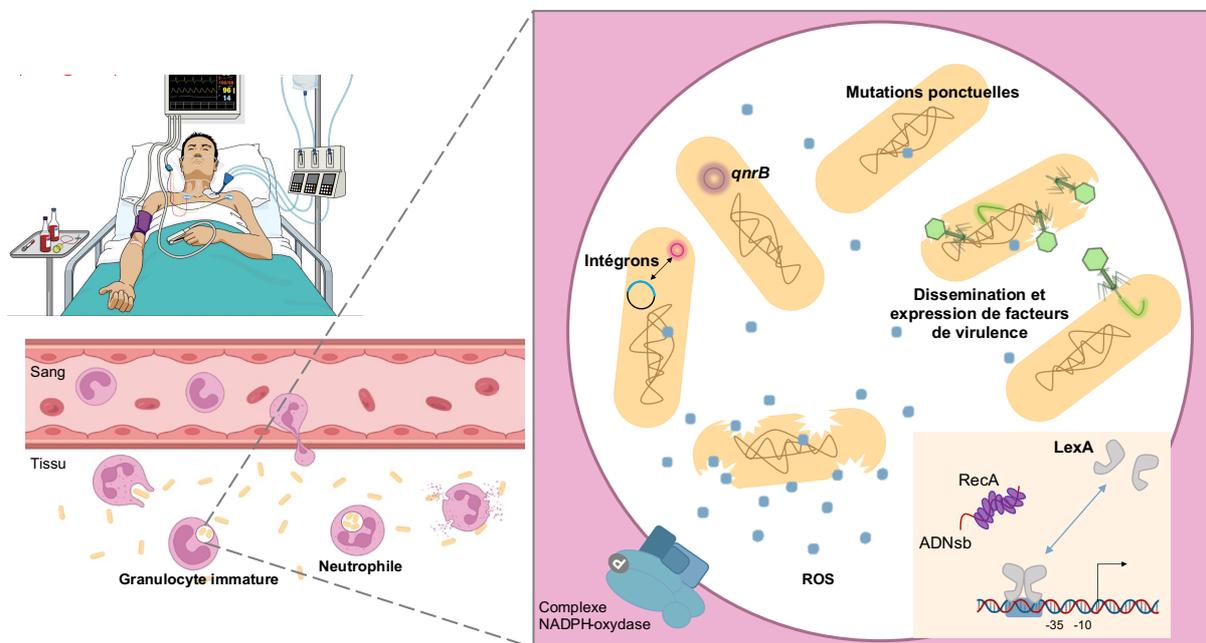


Figure 79. Possibles impacts de l'induction de la Réponse SOS dans le phagosome granulocyttaire

Dans le contexte clinique, la définition de la frontière entre colonisation et infection, ou entre une description *in vitro* de sensibilité à un antibiotique et la réponse clinique du patient au traitement sont parfois intrigantes. Compte tenu des siècles d'évolution des bactéries, et de la sélection des systèmes régulateurs pour s'adapter à des milieux hostiles, il n'est pas surprenant que l'expression des gènes augmentant leur pathogénicité et résistance puisse être induite par l'hôte. L'étude de l'interaction hôte-pathogène est nécessaire pour mieux comprendre les systèmes régulateurs derrière ces événements. Une meilleure compréhension de l'impact de la réponse immune sur l'induction des mécanismes de résistance et virulence bactériennes pourrait également démasquer des cibles thérapeutiques pour améliorer la prise en charge des patients septiques.

Références bibliographiques

1. Fleischmann, C. *et al.* Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **193**, 259–272 (2016).
2. Shankar-Hari, M., Harrison, D. A., Rowan, K. M. & Rubenfeld, G. D. Estimating attributable fraction of mortality from sepsis to inform clinical trials. *J. Crit. Care* **45**, 33–39 (2018).
3. Singer, M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **315**, 801 (2016).
4. Rudd, K. E. *et al.* Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet* **395**, 200–211 (2020).
5. Galiatsatos, P. *et al.* The effect of community socioeconomic status on sepsis-attributable mortality. *J. Crit. Care* **46**, 129–133 (2018).
6. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Masson, P. L. *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique.* (Elsevier-Masson, 2008).
7. Janeway, C. A. *et al.* *Immunobiologie: le système immunitaire fondamental et pathologique.* (De Boeck université, 2003).
8. Oberlin, M. *et al.* Sepsis prevalence among patients with suspected infection in emergency department: a multicenter prospective cohort study. *Eur. J. Emerg. Med.* **27**, 373–378 (2020).
9. Venet, F. & Monneret, G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nat. Rev. Nephrol.* **14**, 121–137 (2018).
10. Cecconi, M., Evans, L., Levy, M. & Rhodes, A. Sepsis and septic shock. *The Lancet* **392**, 75–87 (2018).
11. Angus, D. C. & van der Poll, T. Severe Sepsis and Septic Shock. *N. Engl. J. Med.* **369**, 840–851 (2013).
12. Annane, D., Bellissant, E. & Cavaillon, J.-M. Septic shock. *The Lancet* **365**, 63–78 (2005).
13. Caraballo, C. & Jaimes, F. Organ Dysfunction in Sepsis: An Ominous Trajectory From Infection To Death. *Yale J. Biol. Med.* **92**, 629–640 (2019).
14. Bone, R. C. *et al.* Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *Chest* **101**, 1644–1655 (1992).
15. Damiani, E. *et al.* Effect of Performance Improvement Programs on Compliance with Sepsis Bundles and Mortality: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *PLOS ONE* **10**, e0125827 (2015).
16. Lelubre, C. & Vincent, J.-L. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis. *Nat. Rev. Nephrol.* **14**, 417–427 (2018).
17. Dellinger, R. P. *et al.* Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock: *Crit. Care Med.* **32**, 858–873 (2004).
18. Evans, L. *et al.* Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2021. *Crit. Care Med.* **49**, e1063–e1143 (2021).
19. Levy, M. M., Evans, L. E. & Rhodes, A. The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update. *Intensive Care Med.* **44**, 925–928 (2018).
20. Kumar, A. *et al.* Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock*: *Crit. Care Med.* **34**, 1589–1596 (2006).

21. Spiegel, R. *et al.* The 2018 Surviving Sepsis Campaign's Treatment Bundle: When Guidelines Outpace the Evidence Supporting Their Use. *Ann. Emerg. Med.* **73**, 356–358 (2019).
22. Swenson, K. E. & Winslow, D. L. Impact of Sepsis Mandates on Sepsis Care: Unintended Consequences. *J. Infect. Dis.* **222**, S166–S173 (2020).
23. Sterling, S. A., Miller, W. R., Pryor, J., Puskarich, M. A. & Jones, A. E. The Impact of Timing of Antibiotics on Outcomes in Severe Sepsis and Septic Shock: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *Crit. Care Med.* **43**, 1907–1915 (2015).
24. Serafim, R., Gomes, J. A., Salluh, J. & Póvoa, P. A Comparison of the Quick-SOFA and Systemic Inflammatory Response Syndrome Criteria for the Diagnosis of Sepsis and Prediction of Mortality. *Chest* **153**, 646–655 (2018).
25. Klein Klouwenberg, P. M. C. *et al.* Likelihood of infection in patients with presumed sepsis at the time of intensive care unit admission: a cohort study. *Crit. Care* **19**, 319 (2015).
26. Rhee, C. *et al.* Prevalence of Antibiotic-Resistant Pathogens in Culture-Proven Sepsis and Outcomes Associated With Inadequate and Broad-Spectrum Empiric Antibiotic Use. *JAMA Netw. Open* **3**, e202899 (2020).
27. Murray, C. J. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* **399**, 629–655 (2022).
28. Opal, S. M. & van der Poll, T. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. *J. Intern. Med.* **277**, 277–293 (2015).
29. Bauer, M. *et al.* Deterioration of Organ Function As a Hallmark in Sepsis: The Cellular Perspective. *Front. Immunol.* **9**, 1460 (2018).
30. Brealey, D. *et al.* Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *The Lancet* **360**, 219–223 (2002).
31. Singer, M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence* **5**, 66–72 (2014).
32. Hotchkiss, R. S. & Nicholson, D. W. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 813–822 (2006).
33. Biswas, S. K. & Lopez-Collazo, E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol.* **30**, 475–487 (2009).
34. Carson, W. F., Cavassani, K. A., Dou, Y. & Kunkel, S. L. Epigenetic regulation of immune cell functions during post-septic immunosuppression. *Epigenetics* **6**, 273–283 (2011).
35. Hoogendijk, A. J. *et al.* Sepsis Patients Display a Reduced Capacity to Activate Nuclear Factor- κ B in Multiple Cell Types. *Crit. Care Med.* **45**, e524–e531 (2017).
36. Seeley, J. J. & Ghosh, S. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. *J. Leukoc. Biol.* **101**, 107–119 (2017).
37. Sfeir, T., Saha, D. C., Astiz, M. & Rackow, E. C. Role of interleukin-10 in monocyte hyporesponsiveness associated with septic shock. *Crit. Care Med.* **29**, 129–133 (2001).
38. Cheng, S.-C. *et al.* Broad defects in the energy metabolism of leukocytes underlie immunoparalysis in sepsis. *Nat. Immunol.* **17**, 406–413 (2016).
39. MacIver, N. J., Michalek, R. D. & Rathmell, J. C. Metabolic regulation of T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 259–283 (2013).
40. Stienstra, R., Netea-Maier, R. T., Riksen, N. P., Joosten, L. A. B. & Netea, M. G. Specific and Complex Reprogramming of Cellular Metabolism in Myeloid Cells during Innate Immune Responses. *Cell Metab.* **26**, 142–156 (2017).
41. Chavan, S. S. & Tracey, K. J. Essential Neuroscience in Immunology. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **198**, 3389–3397 (2017).

42. Sternberg, E. M. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 318–328 (2006).
43. Manz, M. G. & Boettcher, S. Emergency granulopoiesis. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 302–314 (2014).
44. Borregaard, N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity* **33**, 657–670 (2010).
45. Leliefeld, P. H. C., Wessels, C. M., Leenen, L. P. H., Koenderman, L. & Pillay, J. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. *Crit. Care* **20**, 73 (2016).
46. Hallett, M. B. An Introduction to Phagocytosis. in *Molecular and Cellular Biology of Phagocytosis* (ed. Hallett, M. B.) vol. 1246 1–7 (Springer International Publishing, 2020).
47. Winterbourn, C. C., Kettle, A. J. & Hampton, M. B. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annu. Rev. Biochem.* **85**, 765–792 (2016).
48. Futosi, K., Fodor, S. & Mócsai, A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int. Immunopharmacol.* **17**, 638–650 (2013).
49. Leliefeld, P. H. C. *et al.* Differential antibacterial control by neutrophil subsets. *Blood Adv.* **2**, 1344–1355 (2018).
50. Nunes-Hasler, P., Kaba, M. & Demaurex, N. Molecular Mechanisms of Calcium Signaling During Phagocytosis. in *Molecular and Cellular Biology of Phagocytosis* (ed. Hallett, M. B.) vol. 1246 103–128 (Springer International Publishing, 2020).
51. Valenta, H., Erard, M., Dupré-Crochet, S. & Nüße, O. The NADPH Oxidase and the Phagosome. in *Molecular and Cellular Biology of Phagocytosis* (ed. Hallett, M. B.) vol. 1246 153–177 (Springer International Publishing, 2020).
52. Piacenza, L., Trujillo, M. & Radi, R. Reactive species and pathogen antioxidant networks during phagocytosis. *J. Exp. Med.* **216**, 501–516 (2019).
53. Dahlgren, C., Karlsson, A. & Bylund, J. Intracellular Neutrophil Oxidants: From Laboratory Curiosity to Clinical Reality. *J. Immunol.* **202**, 3127–3134 (2019).
54. Kuhns, D. B., Priel, D. A. L., Chu, J. & Zarembek, K. A. Isolation and Functional Analysis of Human Neutrophils. *Curr. Protoc. Immunol.* **111**, (2015).
55. Malcolm, K. C. Measuring Neutrophil Bactericidal Activity. in *Lung Innate Immunity and Inflammation* (eds. Alper, S. & Janssen, W. J.) vol. 1809 139–144 (Springer New York, 2018).
56. Richards, D. M. Receptor Models of Phagocytosis: The Effect of Target Shape. in *Molecular and Cellular Biology of Phagocytosis* (ed. Hallett, M. B.) vol. 1246 55–70 (Springer International Publishing, 2020).
57. Warnatsch, A. *et al.* Reactive Oxygen Species Localization Programs Inflammation to Clear Microbes of Different Size. *Immunity* **46**, 421–432 (2017).
58. Björnsdóttir, H. *et al.* Neutrophil NET formation is regulated from the inside by myeloperoxidase-processed reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* **89**, 1024–1035 (2015).
59. Imlay, J. A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 443–454 (2013).
60. Imlay, J. A. Where in the world do bacteria experience oxidative stress?: Oxidative stress in natural environments. *Environ. Microbiol.* **21**, 521–530 (2019).
61. Slauch, J. M. How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question: How do phagocytic ROS kill bacteria? *Mol. Microbiol.* **80**, 580–583 (2011).
62. Arnold, D. E. & Heimall, J. R. A Review of Chronic Granulomatous Disease. *Adv. Ther.* **34**, 2543–2557 (2017).

63. Pillay, J. *et al.* A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J. Clin. Invest.* **122**, 327–336 (2012).
64. Pillay, J. *et al.* Functional heterogeneity and differential priming of circulating neutrophils in human experimental endotoxemia. *J. Leukoc. Biol.* **88**, 211–220 (2010).
65. 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*: *Crit. Care Med.* **41**, 820–832 (2013).
66. Mare, T. A. *et al.* The diagnostic and prognostic significance of monitoring blood levels of immature neutrophils in patients with systemic inflammation. *Crit. Care* **19**, 57 (2015).
67. Chollet, S. Etude des différences fonctionnelles entre les granulocytes matures et immatures sur l'induction de la réponse SOS bactérienne au cours de la phase aiguë du sepsis. (Université de Limoges, 2022).
68. Taneja, R., Sharma, A. P., Hallett, M. B., Findlay, G. P. & Morris, M. R. IMMATURE CIRCULATING NEUTROPHILS IN SEPSIS HAVE IMPAIRED PHAGOCYTOSIS AND CALCIUM SIGNALING. *Shock* **30**, 618–622 (2008).
69. Daix, T. *et al.* Multicentric Standardized Flow Cytometry Routine Assessment of Patients With Sepsis to Predict Clinical Worsening. *Chest* **154**, 617–627 (2018).
70. van Grinsven, E. *et al.* Immature Neutrophils Released in Acute Inflammation Exhibit Efficient Migration despite Incomplete Segmentation of the Nucleus. *J. Immunol.* **202**, 207–217 (2019).
71. Nováková, M. *et al.* How to make usage of the standardized EuroFlow 8-color protocols possible for instruments of different manufacturers. *J. Immunol. Methods* **475**, 112388 (2019).
72. Guérin, E. *et al.* Circulating Immature Granulocytes With T-Cell Killing Functions Predict Sepsis Deterioration*: *Crit. Care Med.* **42**, 2007–2018 (2014).
73. van der Geest, P. J. *et al.* Immature granulocytes predict microbial infection and its adverse sequelae in the intensive care unit. *J. Crit. Care* **29**, 523–527 (2014).
74. Suwa, T., Hogg, J. C., English, D. & Van Eeden, S. F. Interleukin-6 induces demargination of intravascular neutrophils and shortens their transit in marrow. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **279**, H2954–H2960 (2000).
75. Kamp, V. M. *et al.* Human suppressive neutrophils CD16^{bright} /CD62L^{dim} exhibit decreased adhesion. *J. Leukoc. Biol.* **92**, 1011–1020 (2012).
76. Fang, F. C., Frawley, E. R., Tapscott, T. & Vázquez-Torres, A. Bacterial Stress Responses during Host Infection. *Cell Host Microbe* **20**, 133–143 (2016).
77. Gadgil, M., Kapur, V. & Hu, W.-S. Transcriptional Response of Escherichia coli to Temperature Shift. *Biotechnol. Prog.* **21**, 689–699 (2008).
78. White-Ziegler, C. A. & Davis, T. R. Genome-Wide Identification of H-NS-Controlled, Temperature-Regulated Genes in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **191**, 1106–1110 (2009).
79. Quan, J. A. *et al.* Regulation of carbon utilization by sulfur availability in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiology* **148**, 123–131 (2002).
80. Zhu, M. & Dai, X. Bacterial stress defense: the crucial role of ribosome speed. *Cell. Mol. Life Sci.* **77**, 853–858 (2020).
81. Török, I. & Kari, C. Accumulation of ppGpp in a relA mutant of *Escherichia coli* during amino acid starvation. *J. Biol. Chem.* **255**, 3838–3840 (1980).
82. Johnson, G. S., Adler, C. R., Collins, J. J. & Court, D. Role of the spoT gene product and manganese ion in the metabolism of guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **254**, 5483–5487 (1979).

83. Paul, B. J. *et al.* DksA. *Cell* **118**, 311–322 (2004).
84. Dwyer, D. J., Kohanski, M. A., Hayete, B. & Collins, J. J. Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.* **3**, 91 (2007).
85. Hoeksema, M., Brul, S. & ter Kuile, B. H. Influence of Reactive Oxygen Species on *De Novo* Acquisition of Resistance to Bactericidal Antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, e02354-17 (2018).
86. Chiang, S. M. & Schellhorn, H. E. Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* **525**, 161–169 (2012).
87. Ezraty, B., Gennaris, A., Barras, F. & Collet, J.-F. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**, 385–396 (2017).
88. *DNA repair and mutagenesis.* (ASM Press, 2006).
89. Litter, M. I. & Slodowicz, M. An overview on heterogeneous Fenton and photoFenton reactions using zerovalent iron materials. *J. Adv. Oxid. Technol.* **20**, (2017).
90. Baharoglu, Z. & Mazel, D. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 1126–1145 (2014).
91. Hutchinson, F. Chemical Changes Induced in DNA by Ionizing Radiation. in *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* vol. 32 115–154 (Elsevier, 1985).
92. Edmisson, J. S. *et al.* *Fillifactor alocis* modulates human neutrophil antimicrobial functional responses. *Cell. Microbiol.* **20**, e12829 (2018).
93. Smirnov, A., Daily, K. P. & Criss, A. K. Assembly of NADPH Oxidase in Human Neutrophils Is Modulated by the Opacity-Associated Protein Expression State of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.* **82**, 1036–1044 (2014).
94. Dudte, S. C., Hinnebusch, B. J. & Shannon, J. G. Characterization of *Yersinia pestis* Interactions with Human Neutrophils *In vitro*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 358 (2017).
95. Buvelot, H. *et al.* Hydrogen Peroxide Affects Growth of *S. aureus* Through Downregulation of Genes Involved in Pyrimidine Biosynthesis. *Front. Immunol.* **12**, 673985 (2021).
96. Narni-Mancinelli, E. *et al.* Inflammatory Monocytes and Neutrophils Are Licensed to Kill during Memory Responses *In Vivo*. *PLoS Pathog.* **7**, e1002457 (2011).
97. Poerio, N. *et al.* Combined Host- and Pathogen-Directed Therapy for the Control of *Mycobacterium abscessus* Infection. *Microbiol. Spectr.* **10**, e02546-21 (2022).
98. Fasnacht, M. & Polacek, N. Oxidative Stress in Bacteria and the Central Dogma of Molecular Biology. *Front. Mol. Biosci.* **8**, 671037 (2021).
99. Li, H. *et al.* Reactive Oxygen Species in Pathogen Clearance: The Killing Mechanisms, the Adaption Response, and the Side Effects. *Front. Microbiol.* **11**, 622534 (2021).
100. Wang, X. *et al.* Mutational Analysis To Define an Activating Region on the Redox-Sensitive Transcriptional Regulator OxyR. *J. Bacteriol.* **188**, 8335–8342 (2006).
101. Choi, H.-J. *et al.* Structural Basis of the Redox Switch in the OxyR Transcription Factor. *Cell* **105**, 103–113 (2001).
102. Watanabe, S., Kita, A., Kobayashi, K. & Miki, K. Crystal structure of the [2Fe-2S] oxidative-stress sensor SoxR bound to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 4121–4126 (2008).
103. Blanchard, J. L., Wholey, W.-Y., Conlon, E. M. & Pomposiello, P. J. Rapid Changes in Gene Expression Dynamics in Response to Superoxide Reveal SoxRS-Dependent and Independent Transcriptional Networks. *PLoS ONE* **2**, e1186 (2007).

104. Christodoulou, D. *et al.* Reserve Flux Capacity in the Pentose Phosphate Pathway Enables *Escherichia coli*'s Rapid Response to Oxidative Stress. *Cell Syst.* **6**, 569-578.e7 (2018).
105. Crowley, D. J. & Courcelle, J. Answering the Call: Coping with DNA Damage at the Most Inopportune Time. *J. Biomed. Biotechnol.* **2**, 66–74 (2002).
106. Erill, I., Campoy, S. & Barbé, J. Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**, 637–656 (2007).
107. Fuchs, R. P. Tolerance of lesions in *E. coli*: Chronological competition between Translesion Synthesis and Damage Avoidance. *DNA Repair* **44**, 51–58 (2016).
108. Kreuzer, K. N. DNA Damage Responses in Prokaryotes: Regulating Gene Expression, Modulating Growth Patterns, and Manipulating Replication Forks. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a012674–a012674 (2013).
109. Masłowska, K. H., Makiela-Dzbenska, K. & Fijałkowska, I. J. The SOS system: A complex and tightly regulated response to DNA damage. *Environ. Mol. Mutagen.* **60**, 368–384 (2019).
110. Fornelos, N., Browning, D. F. & Butala, M. The Use and Abuse of LexA by Mobile Genetic Elements. *Trends Microbiol.* **24**, 391–401 (2016).
111. Courcelle, J., Khodursky, A., Peter, B., Brown, P. O. & Hanawalt, P. C. Comparative Gene Expression Profiles Following UV Exposure in Wild-Type and SOS-Deficient *Escherichia coli*. *Genetics* **158**, 41–64 (2001).
112. Indiani, C. A Proposal: Source of single strand DNA that elicits the SOS response. *Front. Biosci.* **18**, 312 (2013).
113. Sassanfar, M. & Roberts, J. W. Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **212**, 79–96 (1990).
114. Baharoglu, Z., Bikard, D. & Mazel, D. Conjugative DNA Transfer Induces the Bacterial SOS Response and Promotes Antibiotic Resistance Development through Integron Activation. *PLoS Genet.* **6**, e1001165 (2010).
115. Fernández de Henestrosa, A. R. *et al.* Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*: Novel LexA-regulated genes in *E. coli*. *Mol. Microbiol.* **35**, 1560–1572 (2002).
116. Luo, Y. *et al.* Crystal Structure of LexA. *Cell* **106**, 585–594 (2001).
117. Zhang, A. P. P., Pigli, Y. Z. & Rice, P. A. Structure of the LexA–DNA complex and implications for SOS box measurement. *Nature* **466**, 883–886 (2010).
118. Butala, M., Žgur-Bertok, D. & Busby, S. J. W. The bacterial LexA transcriptional repressor. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 82–93 (2009).
119. Prentiss, M., Prévost, C. & Danilowicz, C. Structure/function relationships in RecA protein-mediated homology recognition and strand exchange. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **50**, 453–476 (2015).
120. Boyer, B., Danilowicz, C., Prentiss, M. & Prévost, C. Weaving DNA strands: structural insight on ATP hydrolysis in RecA-induced homologous recombination. *Nucleic Acids Res.* **47**, 7798–7808 (2019).
121. Joo, C. *et al.* Real-Time Observation of RecA Filament Dynamics with Single Monomer Resolution. *Cell* **126**, 515–527 (2006).
122. Robu, M. E., Inman, R. B. & Cox, M. M. RecA protein promotes the regression of stalled replication forks *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 8211–8218 (2001).
123. Chen, Z., Yang, H. & Pavletich, N. P. Mechanism of homologous recombination from the RecA–ssDNA/dsDNA structures. *Nature* **453**, 489–494 (2008).

124. Gruenig, M. C. *et al.* RecA-mediated SOS induction requires an extended filament conformation but no ATP hydrolysis. *Mol. Microbiol.* (2008) doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06341.x.
125. Little, J. W. Mechanism of specific LexA cleavage: Autodigestion and the role of RecA coprotease. *Biochimie* **73**, 411–421 (1991).
126. Jones, E. C. & Uphoff, S. Single-molecule imaging of LexA degradation in *Escherichia coli* elucidates regulatory mechanisms and heterogeneity of the SOS response. *Nat. Microbiol.* **6**, 981–990 (2021).
127. Neher, S. B., Flynn, J. M., Sauer, R. T. & Baker, T. A. Latent ClpX-recognition signals ensure LexA destruction after DNA damage. *Genes Dev.* **17**, 1084–1089 (2003).
128. Butala, M. *et al.* Interconversion between bound and free conformations of LexA orchestrates the bacterial SOS response. *Nucleic Acids Res.* **39**, 6546–6557 (2011).
129. Rudolph, C. J., Upton, A. L. & Lloyd, R. G. Replication fork stalling and cell cycle arrest in UV-irradiated *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **21**, 668–681 (2007).
130. Trusca, D., Scott, S., Thompson, C. & Bramhill, D. Bacterial SOS Checkpoint Protein SulA Inhibits Polymerization of Purified FtsZ Cell Division Protein. *J. Bacteriol.* **180**, 3946–3953 (1998).
131. Banda, S., Tiwari, P. B., Darici, Y. & Tse-Dinh, Y.-C. Investigating direct interaction between *Escherichia coli* topoisomerase I and RecA. *Gene* **585**, 65–70 (2016).
132. D’Costa, V. M. *et al.* Antibiotic resistance is ancient. *Nature* **477**, 457–461 (2011).
133. Munita, J. M. & Arias, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Spectr.* **4**, 4.2.15 (2016).
134. Sakai, A., Nakanishi, M., Yoshiyama, K. & Maki, H. Impact of reactive oxygen species on spontaneous mutagenesis in *Escherichia coli*. *Genes Cells* **11**, 767–778 (2006).
135. Benov, L. & Fridovich, I. The rate of adaptive mutagenesis in *Escherichia coli* is enhanced by oxygen (superoxide). *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **357**, 231–236 (1996).
136. Bhamre, S., Gadea, B. B., Koyama, C. A., White, S. J. & Fowler, R. G. An aerobic recA-, umuC-dependent pathway of spontaneous base-pair substitution mutagenesis in *Escherichia coli*. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **473**, 229–247 (2001).
137. Kuban, W., Banach-Orlowska, M., Schaaper, R. M., Jonczyk, P. & Fijalkowska, I. J. Role of DNA Polymerase IV in *Escherichia coli* SOS Mutator Activity. *J. Bacteriol.* **188**, 7977–7980 (2006).
138. Ni, M., Yang, L., Liu, X.-L. & Qi, O. Fluence-Response Dynamics of the UV-Induced SOS Response in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* **57**, 521–526 (2008).
139. Napolitano, R. All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis. *EMBO J.* **19**, 6259–6265 (2000).
140. Cirz, R. T. *et al.* Inhibition of Mutation and Combating the Evolution of Antibiotic Resistance. *PLoS Biol.* **3**, e176 (2005).
141. Boshoff, H. I. M., Reed, M. B., Barry, C. E. & Mizrahi, V. DnaE2 Polymerase Contributes to In Vivo Survival and the Emergence of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell* **113**, 183–193 (2003).
142. Galhardo, R. S. An SOS-regulated operon involved in damage-inducible mutagenesis in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Res.* **33**, 2603–2614 (2005).
143. Crane, J. K., Alvarado, C. L. & Sutton, M. D. Role of the SOS Response in the Generation of Antibiotic Resistance *In Vivo*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **65**, e00013-21 (2021).
144. Meunier, A. *et al.* Enhanced emergence of antibiotic-resistant pathogenic bacteria after in vitro induction with cancer chemotherapy drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* **74**, 1572–1577 (2019).

145. Lacotte, Y., Ploy, M.-C. & Raheison, S. Class 1 integrons are low-cost structures in *Escherichia coli*. *ISME J.* **11**, 1535–1544 (2017).
146. Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O. & Toussaint, A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 722–732 (2005).
147. Thomas, C. M. & Nielsen, K. M. Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 711–721 (2005).
148. Little, J. W. Lysogeny, Prophage Induction, and Lysogenic Conversion. in *Phages* (eds. Waldor, M. K., Friedman, D. I. & Adhya, S. L.) 37–54 (ASM Press, 2014). doi:10.1128/9781555816506.ch3.
149. Lemire, S., Figueroa-Bossi, N. & Bossi, L. Bacteriophage Crosstalk: Coordination of Prophage Induction by Trans-Acting Antirepressors. *PLoS Genet.* **7**, e1002149 (2011).
150. Bearson, B. L. & Brunelle, B. W. Fluoroquinolone induction of phage-mediated gene transfer in multidrug-resistant *Salmonella*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **46**, 201–204 (2015).
151. Da Re, S. *et al.* The SOS response promotes *qnrB* quinolone-resistance determinant expression. *EMBO Rep.* **10**, 929–933 (2009).
152. Wang, M., Jacoby, G. A., Mills, D. M. & Hooper, D. C. SOS Regulation of *qnrB* Expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 821–823 (2009).
153. Jacoby, G. A., Strahilevitz, J. & Hooper, D. C. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance. *Microbiol. Spectr.* **2**, 2.5.33 (2014).
154. Saga, T. *et al.* Characterization of *qnrB* -Like Genes in *Citrobacter* Species of the American Type Culture Collection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 2863–2866 (2013).
155. Babosan, A. *et al.* A *qnr*-plasmid allows aminoglycosides to induce SOS in *Escherichia coli*. *eLife* **11**, e69511 (2022).
156. Beaber, J. W., Hochhut, B. & Waldor, M. K. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* **427**, 72–74 (2004).
157. Stokes, H. W. & Hall, R. M. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol. Microbiol.* **3**, 1669–1683 (1989).
158. Boucher, Y., Labbate, M., Koenig, J. E. & Stokes, H. W. Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends Microbiol.* **15**, 301–309 (2007).
159. Cambray, G., Guerout, A.-M. & Mazel, D. Integrons. *Annu. Rev. Genet.* **44**, 141–166 (2010).
160. Cury, J., Jové, T., Touchon, M., Néron, B. & Rocha, E. P. Identification and analysis of integrons and cassette arrays in bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **44**, 4539–4550 (2016).
161. Díaz-Mejía, J. J., Amábile-Cuevas, C. F., Rosas, I. & Souza, V. An analysis of the evolutionary relationships of integron integrases, with emphasis on the prevalence of class 1 integrons in *Escherichia coli* isolates from clinical and environmental origins. *Microbiology* **154**, 94–102 (2008).
162. Domingues, S., da Silva, G. J. & Nielsen, K. M. Integrons: Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. *Mob. Genet. Elem.* **2**, 211–223 (2012).
163. Partridge, S. R., Tsafnat, G., Coiera, E. & Iredell, J. R. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**, 757–784 (2009).
164. Rowe-Magnus, D. A., Guerout, A.-M., Biskri, L., Bouige, P. & Mazel, D. Comparative Analysis of Superintegrons: Engineering Extensive Genetic Diversity in the Vibrionaceae. *Genome Res.* **13**, 428–442 (2003).
165. INTEGRALL The Integron Database. <http://integrall.bio.ua.pt/> (2022).

166. Loot, C. *et al.* Differences in Integron Cassette Excision Dynamics Shape a Trade-Off between Evolvability and Genetic Capacitance. *mBio* **8**, e02296-16 (2017).
167. Escudero*, J. A., Loot*, C., Nivina, A. & Mazel, D. The Integron: Adaptation On Demand. *Microbiol. Spectr.* **3**, 3.2.10 (2015).
168. Larouche, A. & Roy, P. H. Effect of attC structure on cassette excision by integron integrases. *Mob. DNA* **2**, 3 (2011).
169. Loot, C., Bikard, D., Rachlin, A. & Mazel, D. Cellular pathways controlling integron cassette site folding. *EMBO J.* **29**, 2623–2634 (2010).
170. Loot, C. *et al.* The Integron Integrase Efficiently Prevents the Melting Effect of Escherichia coli Single-Stranded DNA-Binding Protein on Folded attC Sites. *J. Bacteriol.* **196**, 762–771 (2014).
171. Nivina, A., Escudero, J. A., Vit, C., Mazel, D. & Loot, C. Efficiency of integron cassette insertion in correct orientation is ensured by the interplay of the three unpaired features of attC recombination sites. *Nucleic Acids Res.* **44**, 7792–7803 (2016).
172. Jové, T., Da Re, S., Denis, F., Mazel, D. & Ploy, M.-C. Inverse Correlation between Promoter Strength and Excision Activity in Class 1 Integrons. *PLoS Genet.* **6**, e1000793 (2010).
173. Gillings, M. R. Integrons: Past, Present, and Future. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **78**, 257–277 (2014).
174. Gillings, M. *et al.* The Evolution of Class 1 Integrons and the Rise of Antibiotic Resistance. *J. Bacteriol.* **190**, 5095–5100 (2008).
175. Escudero, J. A., Loot, C. & Mazel, D. Integrons as Adaptive Devices. in *Molecular Mechanisms of Microbial Evolution* (ed. Rampelotto, P. H.) 199–239 (Springer International Publishing, 2018). doi:10.1007/978-3-319-69078-0_9.
176. Barraud, O. *et al.* Integrons, a predictive biomarker for antibiotic resistance in acute sepsis: the IRIS study. *J. Antimicrob. Chemother.* **77**, 213–217 (2021).
177. Guerin, É. *et al.* The SOS Response Controls Integron Recombination. *Science* **324**, 1034–1034 (2009).
178. Cambray, G. *et al.* Prevalence of SOS-mediated control of integron integrase expression as an adaptive trait of chromosomal and mobile integrons. *Mob. DNA* **2**, 6 (2011).
179. Jové, T., Da Re, S., Tabesse, A., Gassama-Sow, A. & Ploy, M.-C. Gene Expression in Class 2 Integrons Is SOS-Independent and Involves Two Pc Promoters. *Front. Microbiol.* **8**, 1499 (2017).
180. Hocquet, D. *et al.* Evidence for Induction of Integron-Based Antibiotic Resistance by the SOS Response in a Clinical Setting. *PLoS Pathog.* **8**, e1002778 (2012).
181. Brooks, S. C., Kazmer, S., Levin, A. A. & Yen, A. Myeloid differentiation and retinoblastoma phosphorylation changes in HL-60 cells induced by retinoic acid receptor- and retinoid X receptor-selective retinoic acid analogs. *Blood* **87**, 227–237 (1996).
182. Tasseff, R. *et al.* An Effective Model of the Retinoic Acid Induced HL-60 Differentiation Program. *Sci. Rep.* **7**, 14327 (2017).
183. Tlili, L., Ploy, M.-C. & Da Re, S. *Microniches in biofilm depth are hot-spots for antibiotic resistance acquisition in response to in situ stress.* <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.11.03.467100> (2021) doi:10.1101/2021.11.03.467100.
184. Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 6640–6645 (2000).

185. Andrade, N. M. & Arismendi, N. L. DAPI Staining and Fluorescence Microscopy Techniques for Phytoplasmas. in *Phytoplasma* (eds. Dickinson, M. & Hodgetts, J.) vol. 938 115–121 (Humana Press, 2013).
186. Galbusera, L., Bellement-Theroué, G., Urchueguia, A., Julou, T. & van Nimwegen, E. Using fluorescence flow cytometry data for single-cell gene expression analysis in bacteria. *PLOS ONE* **15**, e0240233 (2020).
187. Demarre, G., Frumerie, C., Gopaul, D. N. & Mazel, D. Identification of key structural determinants of the IntI1 integron integrase that influence attC×attI1 recombination efficiency. *Nucleic Acids Res.* **35**, 6475–6489 (2007).
188. Marschall, L., Sagmeister, P. & Herwig, C. Tunable recombinant protein expression in *E. coli*: promoter systems and genetic constraints. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **101**, 501–512 (2017).
189. Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J. & Beckwith, J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.* **177**, 4121–4130 (1995).
190. Da Re, S., Le Quéré, B., Ghigo, J.-M. & Beloin, C. Tight Modulation of *Escherichia coli* Bacterial Biofilm Formation through Controlled Expression of Adhesion Factors. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 3391–3403 (2007).
191. Drevets, D. A., Canono, B. P. & Campbell, P. A. Measurement of Bacterial Ingestion and Killing by Macrophages. *Curr. Protoc. Immunol.* **109**, (2015).
192. Lin, L. L. & Little, J. W. Isolation and characterization of noncleavable (Ind-) mutants of the LexA repressor of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **170**, 2163–2173 (1988).
193. Sliatay, S. N., Rupley, J. A. & Little, J. W. Intramolecular cleavage of *lexA* and phage λ . repressors: dependence of kinetics on repressor concentration, pH, temperature, and solvent. *Biochemistry* **25**, 6866–6875 (1986).
194. Strugeon, E., Tilloy, V., Ploy, M.-C. & Da Re, S. The Stringent Response Promotes Antibiotic Resistance Dissemination by Regulating Integron Integrase Expression in Biofilms. *mBio* **7**, e00868-16 (2016).
195. Strugeon, E. étude de la régulation de l'intégrase des intégrons de classe 1 dans un modèle de biofilm bactérien. (Université de Limoges, 2013).
196. Chousterman, B. G., Swirski, F. K. & Weber, G. F. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin. Immunopathol.* **39**, 517–528 (2017).
197. Miralda, I., Uriarte, S. M. & McLeish, K. R. Multiple Phenotypic Changes Define Neutrophil Priming. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 217 (2017).
198. Belambri, S. A. *et al.* NADPH oxidase activation in neutrophils: Role of the phosphorylation of its subunits. *Eur. J. Clin. Invest.* **48**, e12951 (2018).
199. Winterbourn, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 278–286 (2008).
200. Gomes, A., Fernandes, E. & Lima, J. L. F. C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Biophys. Methods* **65**, 45–80 (2005).
201. A., C. *et al.* Cryopreservation of reduced cytochrome C for determination of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-stimulated superoxide anion production in human whole blood. *Eur. J. Appl. Physiol.* **87**, 365–372 (2002).
202. Griendling, K. K. *et al.* Measurement of Reactive Oxygen Species, Reactive Nitrogen Species, and Redox-Dependent Signaling in the Cardiovascular System: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circ. Res.* **119**, (2016).
203. Kuhns, D. B., Priel, D. A. L., Chu, J. & Zarembek, K. A. Isolation and Functional Analysis of Human Neutrophils. *Curr. Protoc. Immunol.* **111**, (2015).

204. Roos, D. Chronic Granulomatous Disease. in *NADPH Oxidases* (eds. Knaus, U. G. & Leto, T. L.) vol. 1982 531–542 (Springer New York, 2019).
205. Yu, H.-H., Yang, Y.-H. & Chiang, B.-L. Chronic Granulomatous Disease: a Comprehensive Review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **61**, 101–113 (2021).
206. Tlili, L. Stress endogènes et acquisition de résistance aux antibiotiques par les intégrons en biofilm. (Université de Limoges, 2021).
207. Demarre, G. *et al.* The Crohn's disease-associated *Escherichia coli* strain LF82 relies on SOS and stringent responses to survive, multiply and tolerate antibiotics within macrophages. *PLOS Pathog.* **15**, e1008123 (2019).
208. Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O. & Balaban, N. Q. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 320–330 (2016).
209. Harms, A., Maisonneuve, E. & Gerdes, K. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science* **354**, aaf4268 (2016).
210. Barraud, O. & Ploy, M.-C. Diversity of Class 1 Integron Gene Cassette Rearrangements Selected under Antibiotic Pressure. *J. Bacteriol.* **197**, 2171–2178 (2015).
211. Allan, A. L. & Keeney, M. Circulating Tumor Cell Analysis: Technical and Statistical Considerations for Application to the Clinic. *J. Oncol.* **2010**, 1–10 (2010).
212. Bouvier, M., Demarre, G. & Mazel, D. Integron cassette insertion: a recombination process involving a folded single strand substrate. *EMBO J.* **24**, 4356–4367 (2005).
213. Loot, C., Bikard, D., Rachlin, A. & Mazel, D. Cellular pathways controlling integron cassette site folding. *EMBO J.* **29**, 2623–2634 (2010).
214. Leliefeld, P. H. C. *et al.* Differential antibacterial control by neutrophil subsets. *Blood Adv.* **2**, 1344–1355 (2018).
215. Nivina, A., Escudero, J. A., Vit, C., Mazel, D. & Loot, C. Efficiency of integron cassette insertion in correct orientation is ensured by the interplay of the three unpaired features of *attC* recombination sites. *Nucleic Acids Res.* **44**, 7792–7803 (2016).
216. Bisognano, C. *et al.* A RecA-LexA-dependent Pathway Mediates Ciprofloxacin-induced Fibronectin Binding in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **279**, 9064–9071 (2004).
217. Gillor, O., Vriezen, J. A. C. & Riley, M. A. The role of SOS boxes in enteric bacteriocin regulation. *Microbiology* **154**, 1783–1792 (2008).
218. Kimsey, H. H. & Waldor, M. K. *Vibrio cholerae* LexA Coordinates CTX Prophage Gene Expression. *J. Bacteriol.* **191**, 6788–6795 (2009).
219. Nedialkova, L. P. *et al.* Inflammation Fuels Colicin Ib-Dependent Competition of *Salmonella* Serovar Typhimurium and *E. coli* in Enterobacterial Blooms. *PLoS Pathog.* **10**, e1003844 (2014).
220. Quinones, M., Kimsey, H. H. & Waldor, M. K. LexA Cleavage Is Required for CTX Prophage Induction. *Mol. Cell* **17**, 291–300 (2005).
221. Úbeda, C. *et al.* Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-encoded virulence factors in staphylococci: Horizontal dissemination of virulence genes. *Mol. Microbiol.* **56**, 836–844 (2005).
222. Dey, A. K., Bhagat, A. & Chowdhury, R. Host Cell Contact Induces Expression of Virulence Factors and *VieA*, a Cyclic di-GMP Phosphodiesterase, in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **195**, 2004–2010 (2013).
223. Úbeda, C. *et al.* SaPI operon I is required for SaPI packaging and is controlled by LexA. *Mol. Microbiol.* **65**, 41–50 (2007).
224. Koskella, B. & Bergelson, J. The study of host–microbiome (co)evolution across levels of selection. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **375**, 20190604 (2020).

225. Ishii, K. *et al.* Induction of Virulence Gene Expression in *Staphylococcus aureus* by Pulmonary Surfactant. *Infect. Immun.* **82**, 1500–1510 (2014).
226. Camejo, A. *et al.* In Vivo Transcriptional Profiling of *Listeria monocytogenes* and Mutagenesis Identify New Virulence Factors Involved in Infection. *PLoS Pathog.* **5**, e1000449 (2009).
227. Miskolci, V. *et al.* In vivo fluorescence lifetime imaging of macrophage intracellular metabolism during wound responses in zebrafish. *eLife* **11**, e66080 (2022).
228. Novoa, B. & Figueras, A. Zebrafish: Model for the Study of Inflammation and the Innate Immune Response to Infectious Diseases. in *Current Topics in Innate Immunity II* (eds. Lambris, J. D. & Hajishengallis, G.) vol. 946 253–275 (Springer New York, 2012).
229. Sirokmány, G., Donkó, Á. & Geiszt, M. Nox/Duox Family of NADPH Oxidases: Lessons from Knockout Mouse Models. *Trends Pharmacol. Sci.* **37**, 318–327 (2016).
230. Krašovec, R. *et al.* Measuring Microbial Mutation Rates with the Fluctuation Assay. *J. Vis. Exp.* 60406 (2019) doi:10.3791/60406.

Effect of the innate immune response at the acute phase of sepsis on the induction of the bacterial SOS response

Le sepsis est caractérisé par une dérégulation de la réponse immune associée à une augmentation du nombre de Granulocytes Immatures (GI) dans la circulation sanguine, ce qui est observé dans la granulopoïèse d'urgence. Les fonctions de défense face aux pathogènes telles que la phagocytose et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont diminuées chez les GI par rapport aux Neutrophiles (Neut). Toutefois, ces fonctions pourraient déclencher la réponse SOS bactérienne, responsable de la réparation de l'ADN endommagé par ces ROS. En plus de son activité réparatrice, la réponse SOS facilite l'adaptation bactérienne aux milieux hostiles, par l'expression et dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques. Nous avons émis l'hypothèse que pendant la réponse immune innée du sepsis, les ROS produites par les Neut et les GI peuvent induire la réponse SOS bactérienne et en conséquence, faciliter l'apparition des résistances aux antibiotiques. Nous avons développé un modèle *in vitro* et *ex vivo* d'incubation pour évaluer l'interaction entre les Neut/GI et *E. coli* comme bactérie modèle. Cela nous a permis de tester à la fois la fonction phagocytaire et la production des ROS par les granulocytes, ainsi que l'induction de la réponse SOS par l'utilisation d'un système de fluorescence bactérien. Dans ce travail, nous avons mis en évidence l'induction de la réponse SOS chez les GI des patients septiques et nous avons montré l'augmentation d'expression du gène *qnrB2*, conférant la résistance aux quinolones de façon SOS-dépendante. Un modèle *in vitro* pour évaluer l'activité d'excision de l'intégrase de l'intégron parmi les bactéries phagocytées a été également optimisée.

Mots-clés : Sepsis, Granulocytes, Réponse SOS, Intégrons, Résistance aux antibiotiques

Effect of the innate immune response at the acute phase of sepsis on the induction of the bacterial SOS response

Sepsis is defined as a dysregulated immune response to infection, and in severe cases is associated to an increase in the proportion of circulating Immature Granulocytes (IG), secondary to an emergency granulopoiesis. Pathogen control functions such as phagocytosis and reactive oxygen species (ROS) production are decreased in GIs compared to Neutrophils (Neut). However, these functions could trigger the bacterial SOS response, a genetic network triggered by DNA damage and responsible for the DNA repair. Additionally to the DNA repair functions, the SOS response facilitates bacterial adaptation to hostile environments by, among others, the expression and dissemination of antimicrobial resistance genes. We hypothesized that during the innate immune response of sepsis, ROS produced by Neut and GI may induce the bacterial SOS response and consequently facilitate the development of antibiotic resistance. We developed an *in vitro* and *ex vivo* incubation model to evaluate the interaction between Neut/GI and *E. coli* as model bacteria. This allowed us to test simultaneously the phagocytic function and ROS production by granulocytes, as well as the induction of the SOS response using a bacterial fluorescence system. In this work, we demonstrated the induction of the SOS response in the GI of septic patients and showed the increased expression of the *qnrB2* gene, conferring quinolone resistance in an SOS-dependent manner. An *in vitro* model to assess the excision frequency of the Integron's integrase among phagocytosed bacteria was also studied and optimized.

Keywords : Sepsis, Granulocytes, SOS response, Integrons, Antimicrobial resistance

