



HAL
open science

Evaluation du potentiel thérapeutique d'un mannodendrimère anti-inflammatoire dans un modèle murin d'infection par *Francisella tularensis*

Camille Robert

► **To cite this version:**

Camille Robert. Evaluation du potentiel thérapeutique d'un mannodendrimère anti-inflammatoire dans un modèle murin d'infection par *Francisella tularensis*. Pharmacologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2017. Français. NNT : 2017TOU30299 . tel-01990416

HAL Id: tel-01990416

<https://theses.hal.science/tel-01990416>

Submitted on 23 Jan 2019

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 Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Camille ROBERT

Le Jeudi 30 Novembre 2017

Titre :

Evaluation du potentiel thérapeutique d'un mannodendrimère anti-inflammatoire dans un modèle murin d'infection par *Francisella tularensis*

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Pharmacologie

Unité de recherche :

Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale - UMR 5089

Directeur/trice(s) de Thèse :

Jérôme NIGOU et Alain VERCELLONE

Jury :

M. HENRY Thomas, Directeur de Recherche à l'INSERM, Lyon - Rapporteur

M. MAURIN Max, Professeur à l'Université de Grenoble - Rapporteur

Mme VILAPLANA Cristina, Assistant Professor, Autonomous University of Barcelona - Examinatrice

M. HUDRISIER Denis, Professeur à l'Université de Toulouse III - Président

Mme GUILLOT-COMBE Emmanuelle, Direction Générale de l'Armement - Membre Invité

M. NIGOU Jérôme, Directeur de Recherche au CNRS, Toulouse - Directeur de thèse

M. VERCELLONE Alain, Maître de Conférence à l'Université de Toulouse III - Directeur de thèse

Remerciements

Avant tout, je tiens à remercier les Drs Cristina Vilaplana et Thomas Henry ainsi que les Pr Max Maurin et Denis Hudrisier et Mme Emmanuelle Guillot-Combe d'avoir accepté de juger mon travail et de participer à mon jury de thèse.

Je tiens ensuite à remercier tout particulièrement mes directeurs de thèse, Jérôme Nigou et Alain Vercellone, qui ont su me guider et m'orienter tout au long de ma thèse. Merci pour tous vos conseils, votre soutien, votre patience ; merci pour tous les échanges scientifiques (ou non !) que nous avons pu avoir et qui ont fait de ma thèse une expérience enrichissante et formatrice. Jérôme, merci d'avoir été toujours présent et positif en toutes circonstances. Alain, merci pour ta disponibilité et pour ton aide précieuse pour les manip, sans toi j'aurais probablement passé encore plus de temps dans l'A3...

Je souhaite également remercier les membres de mon comité de thèse, les Dr Nicolas Cenac et Pierre Genevaux pour les conseils et les idées qu'ils ont pu m'apporter.

Je remercie ensuite toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ces travaux : le Dr Alain Charbit pour m'avoir accueillie dans son laboratoire au début de ma thèse afin de me former à la manipulation de *Francisella*, le Dr Gérard Larrouy-Maumus et Michael Thomson pour les analyses de spectrométrie de masse sur le lipide A de *Francisella* et le Dr Robert K. Ernst et Francesca Gardner pour les cultures des mutants ΔFlm . Je souhaite également remercier Florence Capilla et le Dr Talal Al Saati, de la plateforme d'histologie de Toulouse Purpan, pour la réalisation des coupes et le partage de leurs connaissances.

Je tiens à remercier toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance de travailler ou que j'ai pu solliciter à l'IPBS tout au long de ma thèse. Je remercie Antonio Peixoto de m'avoir apporté son aide et son expertise concernant l'immuno-monitoring, Etienne Meunier pour les discussions scientifiques que nous avons pu avoir, mais aussi pour avoir accepté de relire une partie de mon manuscrit de thèse. Je remercie également l'équipe de l'animalerie, notamment Thomas et Greg pour avoir pris soin de nos souris KO. Je tiens tout particulièrement à remercier Céline Berrone et Flavie Moreau pour m'avoir formée à manipuler dans l'ASB3, mais également pour leur aide précieuse lors des manip, pour leur patience, leur bonne humeur et pour m'avoir accompagnée de nombreux week-end à l'ASB3. Je souhaite par ailleurs remercier Alexia et Lucie de l'équipe Neyrolles pour avoir très souvent accepté d'être mon binôme de week-end ; sans vous, mes manip *in vivo* auraient pu être compromises !

Parmi les membres de l'équipe, je remercie particulièrement Jacques Prandi, pour la synthèse du M3T bien sûr, mais également pour avoir pris le temps de m'expliquer certaines bases de la chimie des sucres. Je remercie également Emilie Layre avec qui j'ai pu travailler brièvement sur les exosomes, ainsi qu'Alexiane, Landry, Sandro et Sophie pour l'aide qu'ils m'ont apportée au début de ma thèse. Je tiens également à remercier ma voisine de bureau Patricia, ainsi que les membres (anciens ou actuels) de l'équipe que je n'ai pas encore cités : Martine, Michel, Emeline, Jola, Naila,

Bashir et Laure pour avoir partagé leurs connaissances, leur expérience et leur bonne humeur tout au long de ma thèse. Je remercie également Sonia Touron que j'ai eu la chance d'encadrer pendant son stage de M1, et qui a beaucoup contribué à l'avancée de ma thèse, en réalisant entre autres, les manip sur cellules dendritiques. Je voudrais également remercier les derniers arrivés et copains du labo : Christophe, Fabien et Florence pour les cafés et les TLC, mes collègues thésards Aïcha, Richard et Laura et plus particulièrement Thomas, pour son soutien pendant ces trois ans et pour avoir toujours été là pour me dépanner en cas de besoin de plaques, de boîtes, d'antibiotiques, de café, etc... !

J'ai eu l'occasion pendant ma thèse d'encadrer des TD et des TP et je souhaite remercier tous les enseignants qui m'ont guidée dans cette expérience, Alain Vercellone, Manuelle Ducoux, Yannick Poquet, Fabienne Bardou, Maryelle Tropis, Anne Lemassu et Marie Poueymiro.

Enfin, je tiens à remercier ma famille et mes amis qui m'accompagnent et me soutiennent depuis quelques temps ou depuis toujours. Merci à Arno et Gab d'être là depuis toutes ces années ; merci à Aline, Antoine, Martin, Mathieu, Max et Sarah pour tous les moments qu'on a passés ensemble, mais surtout merci à Nico, merci pour tes encouragements, ton calme exemplaire et ta patience qui m'accompagnent au quotidien et qui m'ont été d'un grand soutien pendant ma thèse. Merci à ma cousine Steph, et sa petite famille, une véritable source de bonne humeur. Merci à mes deux « petits » frères Olivier et Téano, et enfin, merci à mes parents de m'avoir toujours supportée et encouragée dans mes différents choix.

Résumé

Francisella tularensis est une bactérie intracellulaire à Gram négatif et l'un des agents les plus infectieux connu à l'heure actuelle, en particulier par voie respiratoire. L'inhalation d'une dizaine de bactéries suffit à provoquer une maladie mortelle : la tularémie pulmonaire. Sa facilité de dissémination par aérosols, ainsi que le caractère létal de cette pathologie, ont contribué à considérer *F. tularensis* comme une arme biologique potentielle. La tularémie pulmonaire est une infection aigue qui s'accompagne d'une réponse immunitaire inadaptée. *F. tularensis* infecte en premier lieu les cellules phagocytaires, notamment les macrophages. Alors que ces derniers sont des acteurs majeurs de la défense contre les agents infectieux, de nombreux mécanismes d'échappement permettent à *F. tularensis* d'éviter ou de résister aux réponses de l'hôte et ainsi de se multiplier et de disséminer dans l'organisme. Ainsi, après un retard initial dans la mise en place de la réponse immunitaire, la présence d'un grand nombre de bactéries et de signaux de danger libérés par les cellules infectées, conduisent au déclenchement d'une réponse inflammatoire excessive. Celle-ci se caractérise par une tempête cytokinique provoquant un recrutement massif de cellules immunitaires, en particulier de neutrophiles, dans les tissus infectés. Les dommages tissulaires associés à cette réponse inflammatoire sont en grande partie responsable de la mortalité associée aux infections pulmonaires par *F. tularensis*.

La tularémie est actuellement traitée par antibiothérapie. Malheureusement, l'absence de symptômes spécifiques de cette maladie rend le diagnostic difficile et, par conséquent, retarde la prescription du traitement adapté. Or, l'efficacité des antibiotiques est considérablement réduite par cette administration tardive. De nouvelles stratégies thérapeutiques sont donc nécessaires pour remplacer ou compléter l'antibiothérapie. Dans ce contexte, nous avons cherché à déterminer si la modulation de la réponse inflammatoire excessive induite par *F. tularensis* pouvait être bénéfique pour l'hôte infecté et ainsi être utilisée comme thérapie accessoire. L'objectif de mon travail de thèse était d'évaluer les propriétés anti-inflammatoires et le potentiel bénéfique thérapeutique du mannodendrimère 3T (M3T), un composé synthétisé par l'équipe de J. Nigou, dans un modèle murin d'infection pulmonaire par *F. tularensis*.

Le M3T, conçu pour mimer les propriétés anti-inflammatoires d'un glycolipide de la paroi de *Mycobacterium tuberculosis*, a précédemment montré un effet inhibiteur sur la production de cytokines pro-inflammatoires et le recrutement de neutrophiles dans un modèle murin d'inflammation pulmonaire aigue induite par le LPS. La souche *F. novicida*, provoquant chez la souris une pathologie similaire à une infection pulmonaire par *F. tularensis*, a été utilisée comme souche de substitution dans ces travaux. *In vitro*, nous avons montré que le M3T inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires induite par *F. novicida* dans des macrophages et cellules dendritiques humaines. D'un point de vue mécanistique, l'ensemble des données suggère que le M3T inhibe la réponse inflammatoire induite par *F. novicida* via le récepteur TLR2, en activant une voie de signalisation dépendante du récepteur DC-SIGN. *In vivo*, le M3T a été administré par injection intraveineuse 6 h post-infection, puis quotidiennement pendant 3 jours, en combinaison avec un traitement antibiotique sous-optimal. Cette combinaison augmente la survie des souris infectées par *F. novicida* en comparaison aux souris traitées avec l'antibiotique seul. L'administration du M3T n'a aucun impact sur la charge bactérienne. En revanche, elle semble réduire les lésions inflammatoires, observées par analyse histologique dans les poumons, le foie et la rate. Nos résultats démontrent que le traitement par le M3T apporte un bénéfice thérapeutique dans un modèle murin d'infection pulmonaire par *F. novicida*. De façon plus générale, l'ensemble des résultats suggère que la réponse inflammatoire peut être envisagée comme cible pour la mise au point de stratégies thérapeutiques complémentaires aux antibiotiques dans le traitement des infections pulmonaires aiguës induites par *F. tularensis*.

Abstract

Francisella tularensis is an intracellular Gram negative bacterium and the causative agent of tularemia. It is one of the most infectious agents known to date. Infection by the respiratory route leads to the deadly pulmonary form of tularemia. For these reasons, *F. tularensis* has been considered for years as a potential biological weapon. Pulmonary tularemia is characterized by an acute infection and a defect in immune responses. Particularly, the innate immune system plays a central role in *F. tularensis* infection and pathology. Macrophages, key cells of the innate immune system, are the main target for *F. tularensis*. This bacterium has evolved many strategies to escape host defenses that allow it to replicate within the cells and then disseminate into the whole organism. At this systemic stage, bacteria, along with alarm signals from infected cells, are recognized by innate immune receptors, triggering an inappropriate inflammatory response. The latter is characterized by a cytokine storm leading to a massive recruitment of immune cells, particularly neutrophils, in infected tissue. Tissue damages caused by this inflammation are a major cause of mortality associated with *F. tularensis* infections.

Today, the treatment of tularemia is based on antibiotherapy. However, no specific symptoms can be assigned to pulmonary tularemia making its diagnosis difficult. This delays the administration of an appropriate antibiotherapy whose efficacy is therefore decreased. Thus, new therapeutic strategies are needed to replace or complement antibiotics. In this context, we investigated whether reducing the excessive inflammation induced by *F. tularensis* could be beneficial for the host and be considered as an adjunctive host-directed therapy. The aim of my work was to evaluate the anti-inflammatory properties and the therapeutic potential of mannodendrimer 3T (M3T), a synthetic compound designed in the team, in a mouse model of pulmonary infection by *F. tularensis*. M3T was previously designed to mimic the anti-inflammatory traits of a specific glycolipid from *Mycobacterium tuberculosis*. It was previously shown to inhibit the production of pro-inflammatory cytokines and neutrophils recruitment in a mouse model of LPS-induced pulmonary inflammation.

Here, we used *F. novicida* as a surrogate for *F. tularensis* since it induces an identical inflammatory pathology.

In vitro, M3T was found to inhibit the production of pro-inflammatory cytokines in human macrophages and dendritic cells infected by *F. novicida*. M3T modulates inflammatory response triggered by *F. novicida* via TLR2 most likely by the activation of a DC-SIGN-dependant pathway. *In vivo*, M3T was administered 6 h post-infection and then, daily for 3 days, by intravenous injection and combined with a suboptimal antibiotic. This combination increases the survival rate of mice infected with *F. novicida* as compared to mice treated with antibiotic alone. M3T treatment has no impact on bacterial burden but seems to reduce tissue damages as observed by histological analyses of lungs, liver and spleen of infected mice.

Altogether, our data demonstrate that M3T administration provides a therapeutic benefit in a mouse model of pulmonary infection by *F. novicida*. On a more general perspective our results suggest that targeting inflammation can be considered as an adjunctive treatment in acute pulmonary infections.

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique	i.n. : Intranasal
AGP : Aminoalkyl glucosaminide phosphate	i.p. : Intrapéritonéal
AINS : Anti-inflammatoire non-stéroïdien	LPS : Lipopolysaccharide
AIM2 : Absent In Melanoma-2	LVS : Live vaccine strain
ARN : Acide ribonucléique	M3T : Mannodendrimère 3T
ASC : Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	ManLAM : Lipoarabinomannane mannosylé
BAL : Bronchoalveolar lavage	MDC : Monocyte-derived dendritic cell
BCG : Bacille de Calmette-Guérin	MDM : Monocyte-derived macrophage
BMDC : Bone marrow-derived DC	MMP : Matrix metalloproteinase
BMDM : Bone marrow-derived macrophage	MOI : Multiplicity of infection
CAP : Community-acquired pneumonia	MOT : Micro-organismes et toxines
CCL-2/MCP-1 : Chemokine Ligand 2/Monocyte chemotactic protein -1	MPI : mannosyl-phosphatidyl-myo-inositol
CDC : Center of Disease Control	MR : Mannose receptor
CFU : Colony Forming Unit	MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
COX : cyclooxygenase	MyD88 : Myeloid differentiation primary response 88
CR : Complement Receptor	NF- κ B : Nuclear factor kappa B
CRD : Carbohydrate recognition domain	NLRP3 : NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
DAI : DNA-dependent activator of IRF	NOD : nucleotide-binding oligomerization domain
DAMP : Damage-Associated Molecular Pattern	OMS : Organisation mondiale de la santé
DC : Dendritic cell	PAMP : Pathogen-associated molecular pattern
DC-SIGN : DC-specific ICAM-grabbing non-integrin	p.i. : post-infection
DO : Densité Optique	PMA : Phorbol 12-myristate 13-acetate
EF-Tu : Elongation Factor Tu	PRR : Pattern recognition receptor
FCP : Francisella-containing phagosome	ROS : Reactive Oxygen Species
FDA : Food and Drug Administration	RT-qPCR : Real time PCR
GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating factor	SOCS1 : Suppressor of Cytokine Signaling 1
GR : Glucocorticoïde Receptor	SP : Surfactant pulmonaire
HDT : Host-Directed Therapy	SR : Scavenger Receptor
HIV : Human Immunodeficiency virus	STING : Stimulator of Interferon gene
HMGB-1 : High Mobility Group Box 1	TLR : Toll-like receptor
HMG CoA : 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A	TNF- α : Tumor necrosis factor alpha
HSV : Herpès Simplex Virus	USAMRIID : United States army medical research institute of infectious Diseases
IFN : Interferon	
IL : Interleukine	

Table des matières

Chapitre 1 - Introduction	- 1 -
I- <i>Francisella tularensis</i> et la tularémie	- 1 -
A) Historique	- 1 -
B) Le genre <i>Francisella</i>	- 3 -
1) <i>F. tularensis</i> subsp <i>tularensis</i> , <i>holarctica</i> et <i>mediasiatica</i>	- 4 -
2) <i>F. tularensis</i> subsp. <i>novicida</i>	- 4 -
C) Epidémiologie	- 7 -
1) Répartition géographique	- 7 -
2) Réservoirs naturels	- 9 -
D) Modes d'infection et formes de tularémie associées	- 13 -
1) La tularémie ulcéro-ganglionnaire.....	- 13 -
2) La tularémie pulmonaire.....	- 14 -
3) Autres formes de tularémie.....	- 15 -
E) <i>F. tularensis</i> : une arme biologique potentielle	- 17 -
1) Les armes biologiques : histoire et contexte actuel	- 17 -
2) Caractéristiques et classement des armes biologiques.....	- 19 -
3) <i>F. tularensis</i> : une longue histoire en tant qu'arme biologique	- 20 -
F) Les approches thérapeutiques actuelles	- 21 -
1) Développement d'un vaccin contre la tularémie	- 21 -
a) La souche LVS.....	- 21 -
b) La recherche de nouveaux vaccins contre la tularémie	- 23 -
2) L'antibiothérapie contre la tularémie.....	- 25 -
a) Les antibiotiques recommandés	- 25 -
b) Les limites de l'antibiothérapie	- 25 -

II- Tularémie pulmonaire : cycle infectieux et réponse immunitaire	- 29 -
A) Cycle infectieux : des poumons à l'infection systémique.....	- 29 -
B) Réponse immunitaire innée à <i>Francisella</i>	- 33 -
1) Interaction de Francisella avec les TLR	- 33 -
2) Phagocytose et cycle intracellulaire dans les macrophages.....	- 38 -
a) Les récepteurs d'entrée	- 38 -
b) Le devenir du phagosome conditionné par la voie d'entrée.....	- 39 -
c) Résistance dans le phagosome	- 42 -
d) Croissance cytosolique et mort cellulaire.....	- 45 -
3) Réponse inflammatoire et sepsis.....	- 46 -
a) L'infection systémique et le déclenchement de la réponse inflammatoire	- 46 -
b) Le rôle ambigu des neutrophiles dans la pathologie.....	- 49 -
III – Thérapies ciblant l'hôte.....	- 51 -
A) Différentes stratégies thérapeutiques	- 52 -
1) Immunostimulation	- 52 -
2) Immunomodulation	- 53 -
a) Les glucocorticoïdes	- 55 -
b) Les statines.....	- 55 -
c) Les macrolides : antibiotiques anti-inflammatoires	- 57 -
d) Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens.....	- 59 -
e) Une nouvelle classe de composés anti-inflammatoires : les mannodendrimères....	- 61 -
i) Le ManLAM : structure et propriétés anti-inflammatoires	- 61 -
ii) DC-SIGN et ses homologues murins	- 63 -
iii) Les mannodendrimères : analogues fonctionnels du ManLAM	- 65 -
B) Cibler l'hôte pour traiter la tularémie pulmonaire.....	- 66 -
IV - Présentation des travaux.....	- 69 -

Chapitre 2 – Résultats et discussion	- 73 -
I – Evaluation du M3T <i>in vitro</i> dans deux modèles cellulaires : les macrophages et les cellules dendritiques infectés par <i>F. novicida</i>	- 73 -
A) Mise au point d’un modèle d’infection des cellules THP-1 par <i>F. novicida</i>	- 73 -
1) Croissance intracellulaire	- 73 -
2) Caractérisation de la réponse inflammatoire	- 75 -
a) Cinétique de la réponse et choix des paramètres d’infection (temps, MOI)	- 76 -
i) Cinétique de réponse et choix de la durée d’infection	- 76 -
ii) Choix de la MOI	- 79 -
b) PRR impliqués dans l’activation des cellules THP-1 par <i>F. novicida</i>	- 81 -
B) Evaluation de l’effet du mannodendrimère 3T sur la réponse inflammatoire induite par <i>F. novicida</i> dans les cellules THP-1	- 83 -
1) Effet du M3T sur la réponse induite par <i>F. novicida</i>	- 83 -
2) Etude mécanistique de l’effet du M3T	- 83 -
a) Effet du M3T sur la viabilité de <i>F. novicida</i>	- 85 -
b) M3T : inhibiteur compétitif pour l’internalisation de <i>F. novicida</i> ?	- 85 -
i) DC-SIGN : un récepteur de <i>F. novicida</i> ?	- 87 -
ii) Effet du M3T sur l’internalisation de <i>F. novicida</i>	- 87 -
c) M3T : antagoniste de TLR2 ?	- 89 -
d) Inhibition de la voie de signalisation induite par TLR2	- 89 -
i) Inhibition de la signalisation induite par des ligands de TLR2	- 91 -
ii) Rôle de DC-SIGN	- 95 -
3) Conclusion	- 97 -
C) Evaluation de l’effet anti-inflammatoire du mannodendrimère 3T <i>in vitro</i> dans des cellules primaires	- 97 -
a) Les cellules dendritiques humaines dérivées de monocytes	- 99 -
b) Les cellules dendritiques murines dérivées de moelle osseuse	- 99 -

II- Evaluation du potentiel thérapeutique du M3T <i>in vivo</i>	101 -
A) Mise au point du modèle d'infection pulmonaire.....	101 -
1) Ethique : détermination d'un point limite	103 -
2) Détermination de la dose d'infection	105 -
3) Mise au point d'un traitement antibiotique sous-optimal.....	107 -
a) Ciprofloxacine	107 -
b) Gentamicine.....	113 -
B) Evaluation du M3T.....	115 -
1) Effet du M3T sur la survie et implication de SIGNR1.....	115 -
a) Effet sur la survie	115 -
b) Rôle du récepteur SIGNR1	117 -
i) Rôle des récepteurs SIGNR1 et SIGNR3 dans la pathologie	117 -
ii) Rôle du récepteur SIGNR1 dans l'inhibition de la réponse inflammatoire par le M3T	118 -
2) Effet du M3T sur la charge bactérienne	123 -
3) Effet du M3T sur la réponse inflammatoire	124 -
a) Production de cytokines dans les poumons	127 -
b) Recrutement cellulaire dans les poumons	129 -
i) BAL	129 -
ii) Tissu pulmonaire	129 -
c) Effet du M3T sur la pathologie.....	131 -
Chapitre 3 – Conclusions et perspectives	137 -
Chapitre 4 – Matériel et méthodes.....	141 -
I- Expériences <i>in vitro</i>	141 -
A) Microbiologie.....	141 -
1) Cultures de <i>F. novicida</i>	141 -
2) Extraction des lipoprotéines de <i>F. novicida</i>	141 -
3) Test de viabilité des bactéries.....	142 -
4) Test de liaison de <i>F. novicida</i> à DC-SIGN-Fc.....	142 -

B) Biologie cellulaire.....	- 142 -
1) Lignées cellulaires	- 142 -
2) Cellules dendritiques murines dérivées de moelle osseuse (BMDC)	- 143 -
3) Cellules dendritiques dérivées de monocytes	- 143 -
4) Evaluation de la réponse inflammatoire	- 144 -
a) Infection, stimulation et traitement	- 144 -
b) Mesure de l'activation de NF-κB et dosage de cytokines.....	- 144 -
c) Mesure de l'expression des marqueurs d'activation par cytométrie en flux.....	- 145 -
5) Mesure de la croissance intracellulaire de <i>F. novicida</i>	- 145 -
II- Expérimentation animale.....	- 146 -
A) Infection intranasale.....	- 146 -
B) Administration du M3T et de la gentamicine.....	- 146 -
C) Evaluation de la charge bactérienne et de la réponse inflammatoire	- 146 -
1) Charge bactérienne.....	- 146 -
2) Immunomonitoring.....	- 147 -
3) Histologie	- 147 -
Annexe – Article : Identification par spectrométrie de masse sur bactéries entières d'une modification de la structure du lipide A de <i>Francisella novicida</i> en réponse à un stress acide	- 3 -
Bibliographie	- 147-

Chapitre 1 - Introduction

I- *Francisella tularensis* et la tularémie

F. tularensis est une bactérie intracellulaire à Gram négatif, responsable d'une zoonose appelée tularémie. Présente dans tout l'hémisphère Nord, *F. tularensis* est divisée en deux sous-espèces pathogènes pour l'homme dont la plus virulente, la sous-espèce de type A, n'est présente qu'en Amérique du Nord. Différentes formes de tularémie peuvent se manifester en fonction de la voie d'entrée dans l'organisme. La plus courante est la tularémie ulcéro-ganglionnaire, dont la pathologie est rarement létale, provoquée par un contact direct avec un animal infecté. La tularémie pulmonaire, en revanche, provoquée par l'inhalation des bactéries peut être mortelle si elle n'est pas traitée à temps avec les antibiotiques adaptés.

Par voie pulmonaire, *F. tularensis* (type A) est l'un des agents les plus infectieux connu à l'heure actuelle puisqu'une dizaine de bactéries suffit à provoquer une pathologie potentiellement mortelle. A ce caractère extrêmement infectieux, s'ajoute une facilité de dissémination de ces bactéries par aérosol ayant conduit de nombreux pays à considérer *F. tularensis* comme une arme biologique potentielle.

A) Historique

En 1911, une épidémie de « pseudo- peste » chez des rongeurs, principalement des écureuils, fut rapportée dans le comté de Tulare en Californie. Georges W. McCoy, alors médecin au Marine Hospital Service et en charge du laboratoire d'étude sur la peste, se rendit sur place afin d'étudier cette épidémie. Il constata en effet des lésions similaires à celles provoquées par la peste sur les écureuils infectés, sans pour autant isoler l'agent responsable de cette maladie. Ses recherches montrèrent que la plupart des rongeurs, ainsi que les lapins et les singes, pouvaient être expérimentalement infectés par cet agent pathogène *via* des tissus d'animaux contaminés. Un an plus tard, McCoy et Chapin parvinrent à isoler et à cultiver, bien que difficilement, un agent bactérien responsable de cette « pseudo- peste », transmis d'après leur étude, par les puces. Ils nommèrent alors cette bactérie *Bacterium tularense* en référence au lieu où elle fut découverte [1].

En 1914, à l'hôpital de Cincinnati, dans l'Ohio, Wherry et Lamb, isolèrent ce même agent infectieux chez un patient atteint d'une conjonctivite ulcéreuse par la méthode de culture décrite par McCoy et Chapin. Il s'agit du premier cas avéré et rapporté d'infection humaine par *Bacterium tularense* [2].

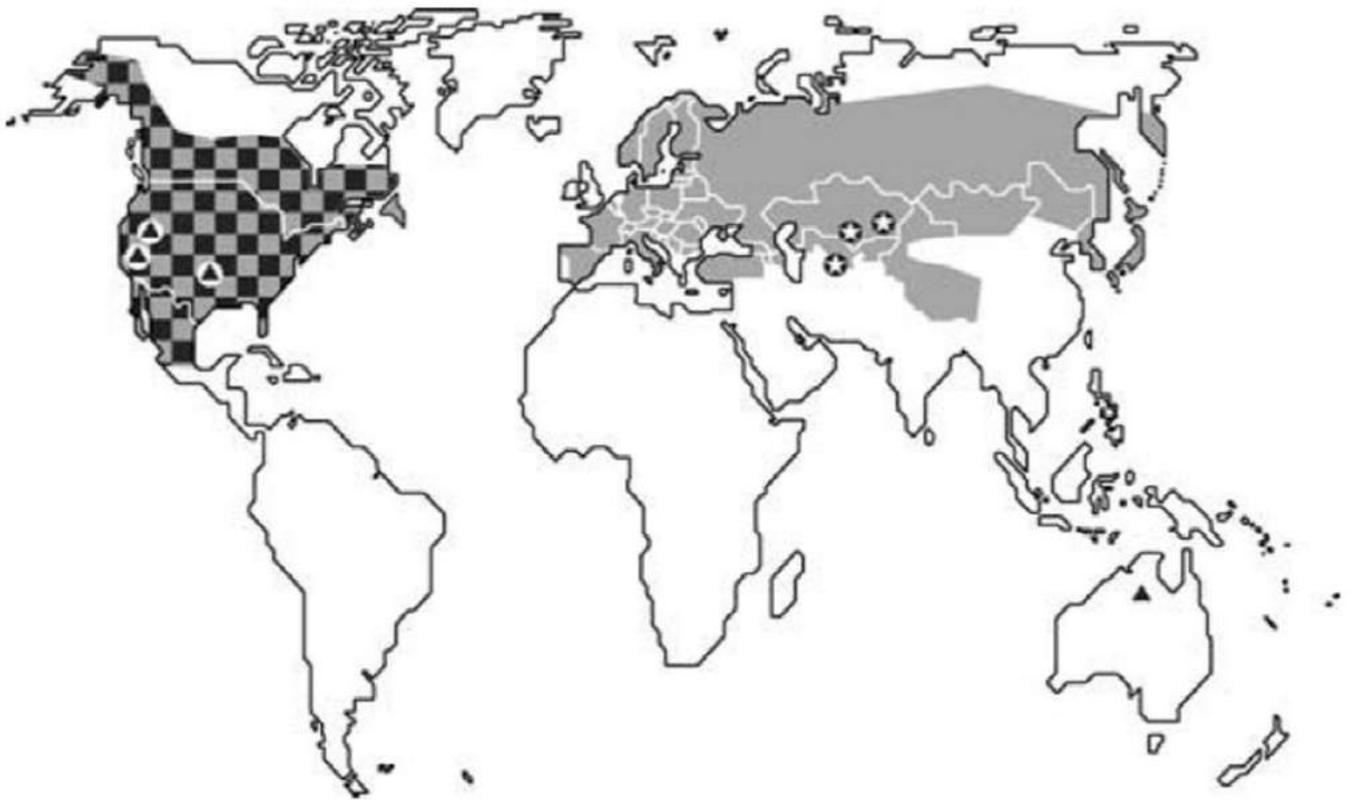


Figure 1-I-1 : Répartition des différentes souches de *Francisella* dans le monde

Sont indiquées, en noir, les souches de type A présentes en Amérique du Nord, en gris les souches de type B présentes dans tout l'hémisphère Nord. Les triangles noirs indiquent la localisation des cas d'infection par *F. novicida*, les étoiles celle des lieux où les souches *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* ont été isolées.

D'après Keim *et al*, 2007 [4]

A partir de 1920, Edward Francis, microbiologiste de l'U.S. Public Health Service, entama des recherches approfondies sur cet agent infectieux provoquant chez l'animal, comme chez l'Homme, une pathologie qu'il appellera tularémie. Entre autres, il identifia les différents moyens de transmission de cette bactérie de l'animal à l'homme : piqûre ou morsure d'insecte, ou manipulation d'animal infecté. Francis a apporté de nombreuses connaissances sur cette bactérie, et établi notamment que plusieurs maladies similaires rapportées en Europe du Nord et au Japon sont en fait une seule et même pathologie : la tularémie causée par *B. tularensis* [3-5].

B) Le genre *Francisella*

Depuis sa découverte, la bactérie responsable de la tularémie a été baptisée plusieurs fois. De *Bacterium tularensis*, elle a été classée dans les années 1920 dans le genre *Pasteurella*, renommée ainsi *Pasteurella tularensis*, puis brièvement dans le genre *Brucella*. En 1947, Dorofé'ev constata que cette bactérie possède des caractéristiques biochimiques particulières, notamment sa composition en acide gras, ne correspondant pas aux genres existants. Il propose alors de la classer dans un nouveau genre dont elle sera le seul membre : *Francisella*, en l'honneur des travaux d'Edward Francis [6, 7].

En 1994, Forsman *et al.* [8] ont réalisé une analyse de l'ADN ribosomal 16S permettant de classer la famille des *Francisellaceae*, comportant uniquement le genre *Francisella*, parmi la sous-division gamma des *Proteobacteria*. Aujourd'hui, le genre *Francisella* contient sept espèces distinctes. Après *F. tularensis*, l'espèce *philomiragia* a été reclassée du genre *Yersinia* à *Francisella* dans les années soixante. Cette dernière est considérée comme non-pathogène puisque seuls quelques rares cas d'infection humaine ont été signalés chez des patients préalablement fragilisés par d'autres pathologies [6]. Dans la dernière décennie, 5 autres espèces ont été identifiées ou reclassées comme *Francisella*. Ce genre comprend à présent des espèces pathogènes pour les poissons ou les mollusques, *F. noatunensis* et *F. halioticida*, une espèce d'endosymbionte de tiques, *F. persica*, et une espèce *a priori* non-pathogène isolée en Chine dans un circuit d'eau de climatisation : *F. guangzhouensis* [9-12]. Une autre espèce pathogène pour l'homme a été isolée en 2003, en Espagne, dans le sang d'un patient souffrant de septicémie : *F. hispaniensis* [13]. Ce cas représente à l'heure actuelle le seul cas d'infection par cette souche décrit dans la littérature.

F. tularensis comprend, quant à elle, 4 sous-espèces : *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* et *novicida*; les trois premières sont les agents de la tularémie humaine [14, 15].

1) *F. tularensis* subsp. *tularensis*, *holarctica* et *mediasiatica*

Les travaux de Olsufiev et al. [16], en 1959, ont montré que certaines souches de *F. tularensis*, bien que provoquant toutes la tularémie, présentaient une virulence différente chez le lièvre. En particulier, la majorité des isolats d'Amérique du Nord, en comparaison aux souches isolées en Europe ou en Asie, s'est avérée plus virulente de par la rapidité et la gravité de la pathologie, et ce pour diverses espèces, y compris l'homme. Suite à ces observations, une classification distincte de ces sous-espèces de *F. tularensis* a été adoptée en 1970, basée sur la répartition géographique et la virulence. L'espèce la plus virulente a alors été nommée *F. tularensis* subsp. *tularensis*, ou type A et n'est toujours présente à l'heure actuelle qu'en Amérique du Nord (Figure 1-I-1). La souche Schu S4, isolée à partir d'un ulcère de patient dans l'Ohio, est utilisée dans la littérature comme modèle pour les souches de type A [17].

La deuxième sous-espèce, moins virulente mais sévissant dans tout l'hémisphère Nord, a été baptisée *F. tularensis* subsp. *holarctica* ou type B (Figure 1-I-1) [14].

De plus, une autre sous-espèce a été créée, *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, désignant principalement les souches présentes dans les pays d'Asie Centrale pour lesquelles aucun cas d'infection humaine n'a été rapporté mais qui présentent une virulence semblable aux souches de type B chez le lapin (Figure 1-I-1) [4].

2) *F. tularensis* subsp. *novicida*

En 1950, près d'Ogden dans l'Utah, un micro-organisme provoquant une pathologie évocatrice de la tularémie chez des cochons d'Inde et des souris fut découverte dans un échantillon d'eau. Cette bactérie, ayant pourtant la même morphologie que *F. tularensis* ne montra aucune réaction croisée avec du sérum anti-*F. tularensis*. Des différences phénotypiques, notamment une capacité à fermenter le sucrose, ont conduit, à l'époque, à sa classification comme espèce à part entière et elle fut alors nommée *Francisella novicida* [18]. En 1989, des caractéristiques biochimiques et génotypiques montrèrent un lien étroit entre les espèces *F. novicida* et *F. tularensis*. Hollis et al. [19] proposèrent alors de reclasser l'espèce *F. novicida* en sous-espèce de *F. tularensis*. Encore aujourd'hui, la classification de *F. novicida* est controversée mais la dénomination *F. tularensis* subsp. *novicida* est admise [19, 20].

Une différence majeure distingue *F. novicida* des autres sous-espèces de *F. tularensis* : son caractère très atténué chez l'homme. En effet, les cas d'infection humaine par *F. novicida* sont extrêmement rares et n'ont concerné jusqu'à présent que des personnes immuno-déficientes ou souffrant d'une pathologie sous-jacente (voir revue [20]).

Malgré cette différence évidente, *F. novicida* possède de nombreux points communs avec les sous-espèces pathogènes de *F. tularensis*. D'un point de vue génétique, une homologie de plus de 97% a été démontrée [21]. En termes de pathologie, *F. novicida* présente une virulence similaire chez la plupart des animaux de laboratoire, et notamment la souris. En effet, dans ces modèles animaux, *F. novicida* est létale à des doses similaires aux souches pathogènes et

provoque le même type de lésions [22]. Au cours du temps, *F. novicida* a été fréquemment substituée aux souches pathogènes pour l'étude de la tularémie. En effet, elle présente plusieurs avantages par rapport aux autres espèces de *F. tularensis*, elle peut notamment être manipulée dans des conditions moins strictes. Etant non-pathogène pour l'homme, elle peut être manipulée en laboratoire de niveau 2 contrairement aux autres sous-espèces de *F. tularensis* qui requièrent un niveau de confinement supérieur.

L'utilisation de *F. novicida* comme modèle d'étude de la tularémie humaine reste néanmoins controversée. En effet, si elle permet de simplifier les recherches dans des modèles *in vitro* ou animaux, elle n'est pas tout à fait représentative des infections humaines à *F. tularensis* subsp. *tularensis* ou *holarctica* mais ces différences seront discutées dans le paragraphe « IV- Présentation des travaux ».

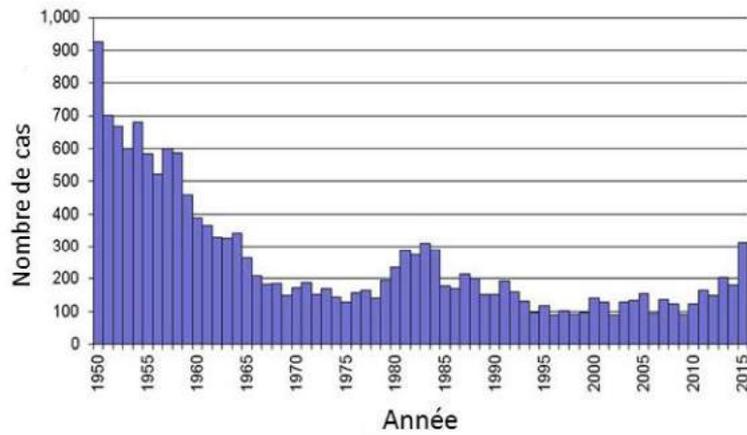


Figure 1-I-2 : Incidence de la tularémie aux Etats-Unis

Nombre de cas rapportés chaque année entre 1950 et 2015

Source CDC : <https://www.cdc.gov/tularemia/statistics/index.html>

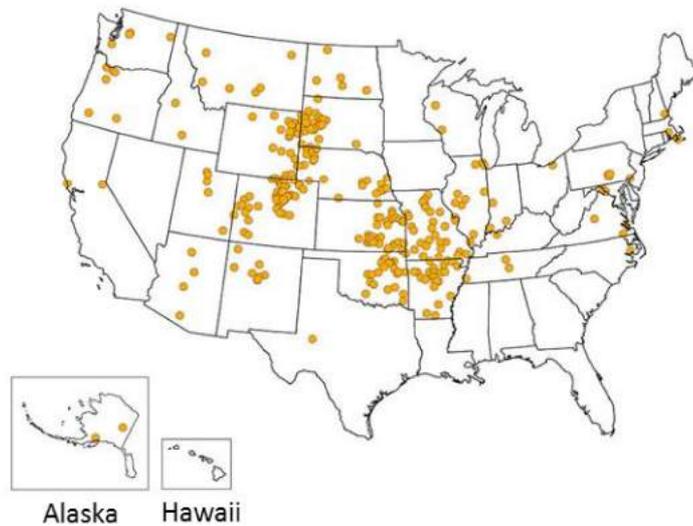


Figure 1-I-3 : Répartition de la tularémie aux Etats-Unis

Chaque point représente un cas rapporté en 2015, placé aléatoirement dans le comté correspondant.

Source CDC : <https://www.cdc.gov/tularemia/statistics/index.html>

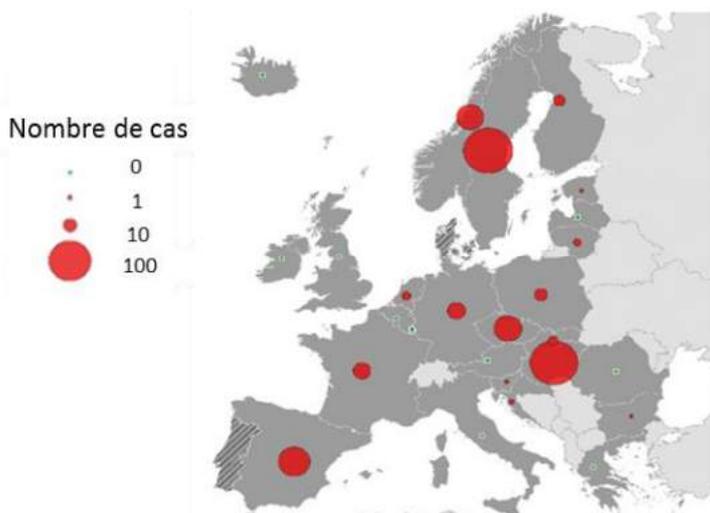


Figure 1-I-4 : Incidence et répartition de la tularémie en Europe en 2014

Nombre de cas rapportés en 2014 par pays européen. Les pays de l'Union Européenne sont représentés en gris foncé. Aucune donnée n'a été rapportée pour les pays hachurés.

Source : European center for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2015. Tularemia. Stockholm: EDC; 2016

C) Epidémiologie

1) Répartition géographique

La tularémie est endémique de la plupart des pays de l'hémisphère Nord où les régions les plus touchées sont l'Amérique du Nord, l'Europe du Nord et de l'Est.

Sur le continent américain, les Etats-Unis et le Canada sont les principaux pays concernés par la tularémie, même si quelques rares cas ont été signalés au Mexique. Dans cette partie du monde, les souches de type A sont mises en cause dans 70% des cas [23].

L'incidence de la tularémie aux Etats-Unis a chuté drastiquement au cours du siècle dernier. En effet, entre les années 1930 et 1950, on comptait plusieurs milliers de cas par an contre une centaine depuis les années 1990 (Figure 1-I-2). Même si tous les Etats américains, excepté Hawaï, ont déclaré des cas de tularémie au cours de l'histoire, la plupart semble être regroupée en un foyer situé dans les Etats du Sud et du Midwest (Arkansas, Missouri, Dakota du Sud et Oklahoma). L'île de Martha's Vineyard, dans le Massachusetts, constitue aussi un foyer très localisé dans lequel plusieurs épidémies ont été déclarées (Figure 1-I-3) (voir revues [14, 24, 25]).

En Europe, seuls le Portugal, l'Islande et les îles Britanniques semblent à ce jour être exemptés de tularémie (Figure 1-I-4). Même si cette maladie semble sévir dans toute l'Europe jusqu'aux frontières asiatiques, notamment en Turquie, certaines régions sont plus touchées que d'autres. Les pays scandinaves, en particulier la Suède, ainsi que la Russie et les pays de l'ex-URSS, ont dénombré plusieurs épidémies depuis les années 1930. En Suède, pays qui compte le plus grand nombre de cas en Europe, la tularémie est souvent associée à des activités agricoles ou aux régions dans lesquelles les moustiques sont particulièrement présents. Ce pays subit une à deux épidémies de plus de 100 cas environ tous les dix ans depuis les années 1930. La Turquie représente aujourd'hui, avec la Suède, l'une des régions d'Europe les plus touchées par la tularémie, avec une augmentation du nombre d'épidémies depuis 2009, la plupart liées à la consommation d'eau contaminée [26, 27]. Ailleurs en Europe, les cas sont le plus souvent sporadiques, hormis quelques épidémies déclarées de façon isolée en Hongrie ou en Espagne [28].

A plusieurs reprises, la tularémie a été associée aux périodes de guerre. Les plus grandes épidémies connues en Europe sont survenues pendant la seconde guerre mondiale en Union Soviétique, où plus de 100 000 cas étaient rapportés annuellement au début des années 1940. Après la guerre, l'incidence de la tularémie en Russie a drastiquement diminué jusqu'à atteindre une centaine de cas par an aujourd'hui. De la même façon, entre 2000 et 2003, deux épidémies majeures de plus de 300 cas sont apparues dans la région du Kosovo jusqu'alors exempte de tularémie [28, 29].

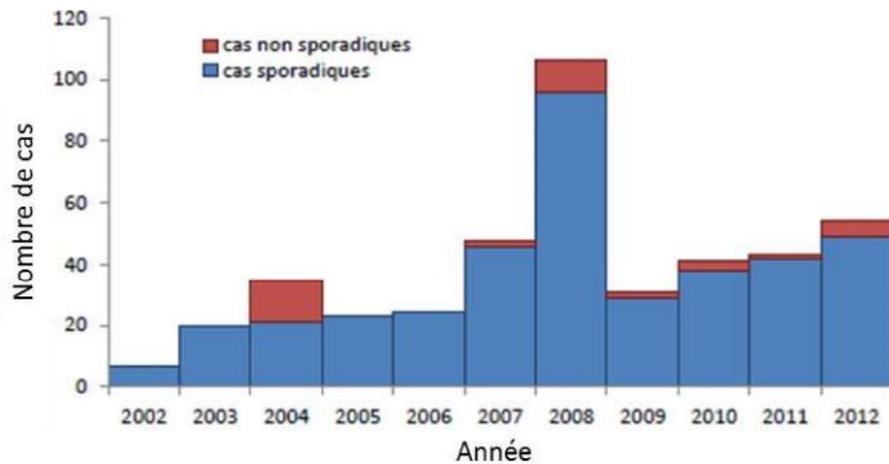


Figure 1-I-5 : Incidence de la tularémie en France

Nombre de cas de tularémie déclarés en France chaque année entre 2002 et 2012. Les cas sporadiques sont représentés en bleu; les cas associés à des épidémies sont représentés en rouge.

Source : Institut de veille sanitaire (Mailles *et al.*, 2013) [25]

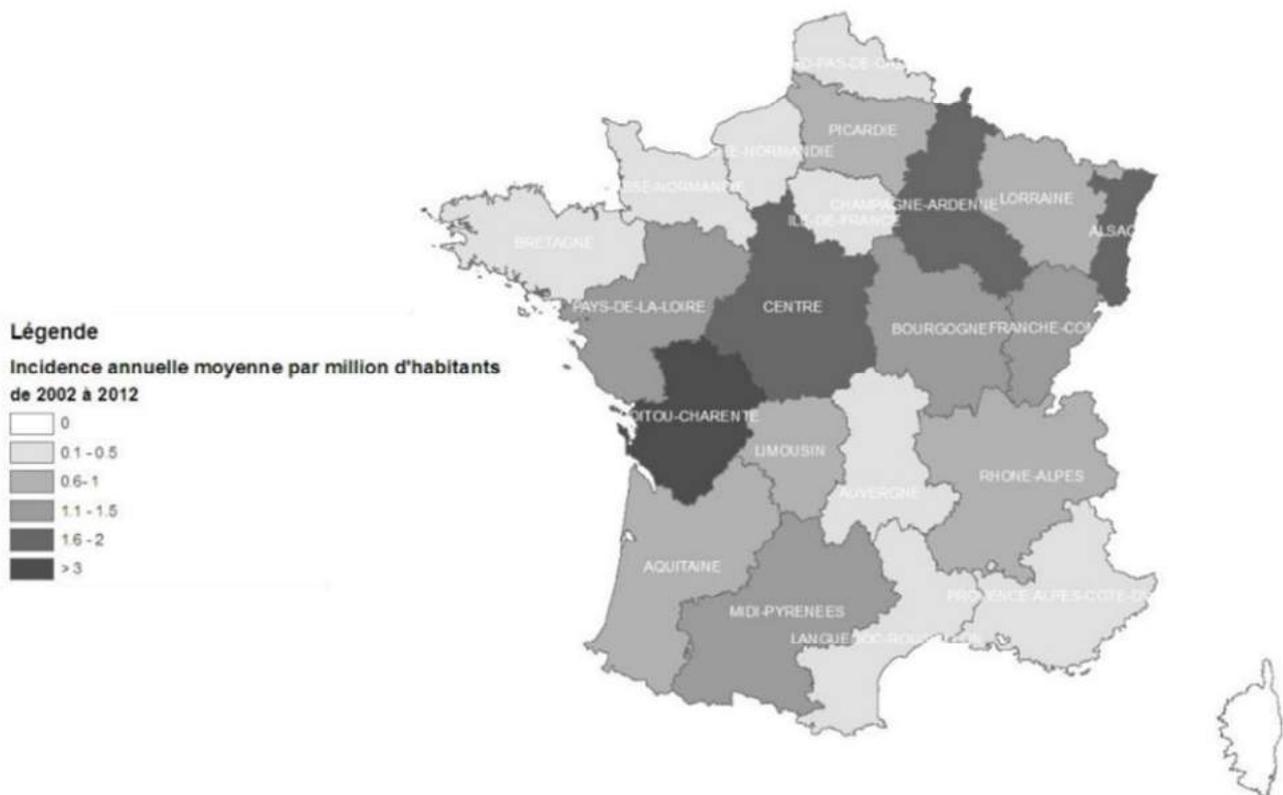


Figure 1-I-6 : Répartition de la tularémie en France

Nombre de cas de tularémie déclarés en France entre 2002 et 2012 par million d'habitants dans chaque région.

Source : Institut de veille sanitaire (Mailles *et al.*, 2013) [25]

La propagation plus importante de cette maladie en temps de guerre peut être attribuée à de multiples facteurs. Premièrement, les conditions sanitaires générales sont souvent sommaires dans les zones de conflits. De plus, les terres agricoles laissées à l'abandon engendrent la prolifération des rongeurs qui participent eux-mêmes à la transmission de la maladie.

Enfin, dans le cas du Kosovo, l'hypothèse d'une libération intentionnelle de *F. tularensis* a été évoquée mais encore jamais vérifiée à l'heure actuelle [14, 28, 30].

En Asie, le Japon était historiquement le seul pays touché par la tularémie. Dès 1925, *F. tularensis* y est découverte, parallèlement aux travaux de Francis aux Etats-Unis. Après un pic d'épidémie constaté dans les années 1950, l'incidence de la tularémie a nettement diminué dans ce pays. Le Japon dénombre aujourd'hui environ 10 cas par an [14, 31]. Récemment, au moins un cas de tularémie a été rapporté en Chine, cependant l'absence de déclaration obligatoire dans ce pays ne permet pas de déterminer l'ampleur de la maladie dans cette région [32].

Comme pour la plupart des pays Européens, la France compte chaque année quelques cas de tularémie qui est devenue une Maladie à Déclaration Obligatoire en 2002. L'institut de veille sanitaire a réalisé une surveillance de la tularémie en France entre les années 2002 et 2012, permettant d'avoir une vue globale sur cette maladie. Pendant cette période, 433 cas ont été signalés, isolés pour la plupart (Figure 1-I-5). Toutes les régions françaises semblent être touchées, à l'exception de la Corse, avec une incidence plus forte pour les régions du centre et de l'Est (Figure 1-I-6) [33].

Plus récemment, entre 2012 et 2015, des cas isolés de tularémie ont été rapportés en dehors de l'hémisphère nord, en Australie [34].

De façon générale, en Europe ou en Amérique du Nord, la tularémie est souvent associée à des activités agricoles, ou de plein air, ou à des contacts avec certaines espèces animales, mettant en évidence le caractère zoonotique de cette maladie.

2) Réservoirs naturels

Les réservoirs de *Francisella* sont encore mal connus. *F. tularensis* est capable d'infecter de nombreuses espèces, aussi bien de mammifères que d'oiseaux ou d'invertébrés. Ces animaux agissent très certainement comme réservoir temporaire permettant la transmission à l'homme mais ne peuvent constituer un réservoir permanent puisqu'à l'heure actuelle aucun porteur sain n'a été identifié. Les animaux sensibles succombent rapidement à l'infection tandis que les résistants sont capables d'éliminer totalement les bactéries.

Cependant, les études épidémiologiques réalisées depuis les années 1930 ont permis de relier les zones endémiques de la tularémie à certaines espèces animales, en particulier les lagomorphes et les rongeurs. A titre d'exemple, aux Etats-Unis, dès les années 1940, de nombreux cas se sont produits suite à un contact avec l'espèce de lapin *Sylvilagus*, l'une des plus sensible aux infections par *F. tularensis* et la plus chassée à l'époque. De plus, des cas de tularémie sont apparus dans des zones non-endémiques comme la Nouvelle Angleterre suite à l'importation de cette espèce, démontrant alors un lien étroit entre ces animaux et les infections humaines [4, 14]. Ailleurs dans le monde, de nombreux liens ont été établis entre les cas humains de tularémie et des contacts avec des lagomorphes ou des rongeurs. Même s'ils ne constituent pas un réservoir permanent, les études montrent qu'ils jouent bel et bien un rôle dans la transmission à l'homme [28].

Les tiques ou les moustiques semblent jouer quant à eux un rôle de vecteur de transmission entre l'animal et l'homme. Aux Etats-Unis, comme en Europe, et notamment en France, de nombreux cas de tularémie apparaissent suite à une morsure de tique. En Suède, les épidémies surviennent le plus souvent en été, période où les moustiques sont les plus nombreux [28, 33].

Enfin, l'eau apparaît aussi comme source d'infection. En effet, plusieurs épidémies de tularémie de type B se sont avérées être dues à l'ingestion d'eau contaminée, notamment dans le nord et l'est de l'Europe et en Turquie. De plus, la capacité de *Francisella* à survivre dans l'eau a déjà été démontrée et l'hypothèse selon laquelle des protozoaires présents dans l'eau pourraient servir de réservoir naturel de *Francisella* est envisagée [24, 28]. Cette capacité à persister dans l'environnement pourrait aussi expliquer le laps de temps, parfois de plusieurs années, entre différentes épidémies dans les zones endémiques.

A



B



Figure I-7 : Lésions externes observées dans le cas de tularémie ulcéro-ganglionnaire

- A) Ulcère visible au niveau du site primaire d'infection par *F. tularensis* type B.
- B) Gonflements des ganglions lymphatiques apparaissant 2 à 3 jours après une infection par *F. tularensis* (type B).

Source : OMS, Guideline on tularemia (2007)

D) Modes d'infection et formes de tularémie associées

Morsure de tique, pique de moustique, ingestion d'eau ou de viande contaminée, constituent des moyens d'infection par *F. tularensis* provoquant des pathologies différentes. En effet, la voie d'entrée des bactéries dans l'organisme conditionne la forme clinique de tularémie qui sera alors : ulcéro-ganglionnaire, ganglionnaire, oculo-ganglionnaire, oropharyngée, pulmonaire ou typhoïde [35].

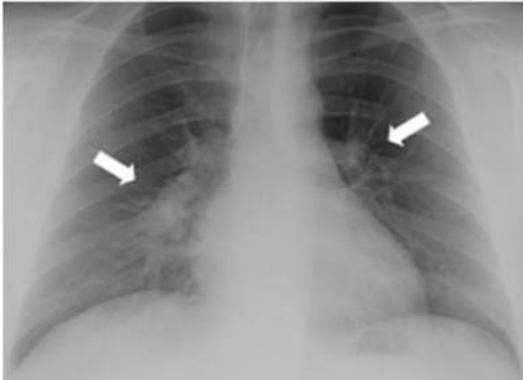
1) La tularémie ulcéro-ganglionnaire

Provoquée le plus souvent par morsure de tique ou pique de moustique, ou encore par contact direct de la peau avec des animaux contaminés, la tularémie ulcéro-ganglionnaire est de loin la forme la plus fréquente. On estime qu'elle représente environ 95% des cas de tularémie dans le monde [36]. Elle se manifeste par l'apparition d'un ulcère au niveau du site d'infection après 3 à 6 jours d'incubation (Figure 1-I-7A), accompagné de fièvre et de douleurs généralisées. Les bactéries disséminent ensuite vers les ganglions lymphatiques provoquant alors une adénopathie (Figure 1-I-7B). Lorsque l'infection n'est pas traitée, des suppurations peuvent être observées dans 30 à 40% des cas, ce qui constitue la complication la plus fréquente de cette maladie. Une pneumonie, due à la présence de bactéries dans les poumons, est aussi susceptible d'apparaître. Malgré ces complications, la tularémie ulcéro-ganglionnaire est très rarement létale : un taux de mortalité inférieur à 3% a été rapporté par l'étude de 88 cas cliniques d'Evans *et al* [6, 31].

La forme ganglionnaire est très similaire. Néanmoins, aucune lésion n'est observée au niveau du site d'infection, pouvant entraîner un diagnostic plus tardif.

Bien que les souches de type A soient décrites comme plus virulentes que les souches de type B, aucune distinction n'est faite entre les deux d'un point de vue clinique lors d'infections ulcéro-ganglionnaires.

A



B

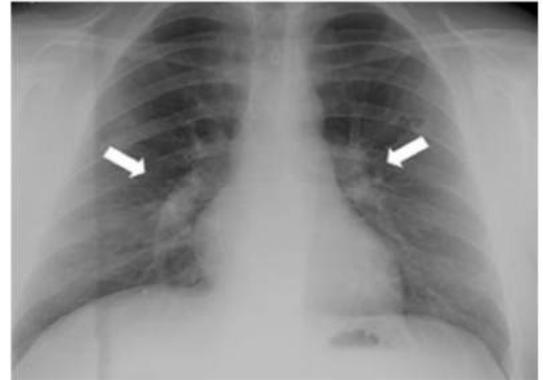


Figure 1-I-8 : Lésions observées par radiographie dans le cas de tularémie pulmonaire

- A) Elargissement des ganglions hilaires 3 jours après une infection pulmonaire par *F. tularensis* de type B
- B) Lésions observées chez le même patient après un traitement efficace de 10 semaines avec de la doxycycline

Source : Tärnvik & Berglund, 2003 [19]

2) La tularémie pulmonaire

Beaucoup plus rare, la tularémie pulmonaire est néanmoins la forme la plus sévère et la plus létale de cette maladie. Elle est provoquée par l'inhalation de bactéries, et le plus souvent associée à des activités agricoles. L'une des principales épidémies de tularémie pulmonaire est survenue en Suède dans les années 1960 où plus de 600 personnes ont été infectées après avoir manipulé du foin contaminé, et ainsi provoqué des aérosols bactériens [35]. Bien que les épidémies de tularémie pulmonaire soient plus rares, elles touchent néanmoins un plus grand nombre de personnes.

La tularémie pulmonaire se manifeste par l'apparition soudaine d'une forte fièvre sous 3 à 5 jours et de symptômes grippaux (maux de tête, douleurs articulaires, ...). Des symptômes pulmonaires peuvent apparaître mais ne sont pas systématiques, rendant le diagnostic moins aisé [31, 35]. Lorsqu'ils sont présents, ces symptômes pulmonaires consistent en infiltrats péri-bronchiaux visibles aux rayons X, souvent accompagnés d'un épanchement pleural et d'une lymphadénopathie hilare (Figure 1-I-8) [24].

La tularémie pulmonaire de type A, décrite comme la plus virulente, est associée à des complications graves en l'absence de traitement, telles que septicémie, choc septique, méningite, endocardite et insuffisances hépatique et rénale [24]. Avant la découverte des antibiotiques, le taux de mortalité associée à une tularémie pulmonaire de type A pouvait s'élever à 60%. Il est aujourd'hui en dessous des 2% aux Etats-Unis. Les infections avec les souches de type B sont, elles, rarement fatales [35, 37].

3) Autres formes de tularémie

La tularémie oropharyngée ou gastrointestinale est généralement due à l'ingestion d'eau ou d'aliment contaminés. Peu fréquente en Europe du Nord et en Amérique du Nord, elle survient plus régulièrement en Europe centrale ou en Turquie où des sources d'eau contaminées sont souvent mises en causes [28, 38]. Les manifestations cliniques sont généralement : une pharyngite, des lésions buccales et une lymphadénopathie cervicale pour la forme oropharyngée, et des diarrhées pour la forme gastrointestinale [35].

La forme oculo-ganglionnaire de la tularémie est provoquée par contact direct entre *F. tularensis* et l'œil, probablement par l'intermédiaire des mains ou par projection. Cette infection se manifeste principalement par une conjonctivite qui s'étend aux ganglions lymphatiques en absence de traitement. [24]

L'appellation « typhoïde » concernant la tularémie est attribuée lorsque la voie d'entrée des bactéries est indéterminée et les symptômes sont similaires à l'infection pulmonaire.

Année	Evènement
14 ^{ème} siècle avant JC	Les Hittites libérèrent des béliers malades, probablement de la tularémie, vers leurs ennemis
4 ^{ème} siècle avant JC	D'après Herodote, les archers Scythes contaminaient leurs flèches en les plongeant dans des cadavres en décomposition
1155	Barbarossa empoisonna l'eau des puits de Tortone en y jetant des corps humains
1346	Les Mongols jetèrent les corps des victimes de la peste par-dessus les remparts de la ville de Caffa assiégée
1495	Les Espagnols mélangèrent du vin avec du sang de lépreux pour le vendre à leur ennemis français à Naples
1650	L'armée polonaise utilisait la salive de chiens enragés contre ses ennemis
1763	Des officiers britanniques offrirent des couvertures provenant d'hôpitaux soignant la variole aux Natifs américains
1797	Les armées napoléoniennes inondèrent les plaines alentours de Mantoue pour répandre la malaria

Tableau 1-I-1 : Exemples historiques de l'utilisation d'armes biologiques

D'après Barras & Greub, 2014 [30]

E) *F. tularensis* : une arme biologique potentielle

Face à la létalité potentielle des souches de type A de *F. tularensis* et à leur capacité à provoquer une maladie par l'inhalation de très peu de bactéries, plusieurs gouvernements ont classé cette espèce comme arme biologique.

1) *Les armes biologiques : histoire et contexte actuel*

Le potentiel meurtrier des maladies infectieuses a été reconnu, et utilisé par l'Homme à des fins militaires, depuis plusieurs centaines d'années. On trouve des exemples d'attaques biologiques dans la plupart des plus grands conflits de l'Histoire (Tableau 1-I-1). Du Moyen-Age, où les corps de victimes de la peste étaient jetés à l'ennemi, ou depuis l'époque des guerres coloniales, où les Européens offrirent des vêtements contaminés par la variole aux Natifs américains, les armes biologiques ont beaucoup évolué. Notamment, les travaux des fondateurs de la microbiologie moderne, Louis Pasteur et Robert Koch, au 19^{ème} siècle, ont rendu possible l'isolement et la production à large échelle d'agents bactériologiques pathogènes [39, 40]. Bien que le Protocole de Genève, signé en 1925, interdise l'utilisation d'armes biologiques, la seconde guerre mondiale et la guerre froide furent le théâtre de véritables programmes nationaux d'armement biologiques [39, 41]. Les trois principaux exemples sont :

- Le Japon, avec la tristement célèbre « Unité 731 » en activité entre 1932 et 1945 dans laquelle on estime que plus de 10 000 prisonniers sont morts des expériences conduites avec divers agents pathogènes [39, 40].
- Les Etats-Unis avec « The US War Reserve Service » débuté en 1942 à Fort Detrick [39, 40].
- L'Union Soviétique, notamment avec le programme « Biopreparat » qui fut officiellement stoppé en 1989 [40].

En 1970, le protocole de Genève n'ayant eu qu'un impact limité sur le développement de ces programmes, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) [42] fit pression pour la signature d'une nouvelle Convention pour l'interdiction de développer, de produire et de stocker des armes biologiques ou toxines, et pour leur destruction. Cette convention fut ratifiée en 1972 par plus de 100 pays, y compris les Etats-Unis et l'Union Soviétique. Toutefois, cette convention ne prévoyant pas de mesures de vérification, elle n'a pas empêché certains pays de maintenir des programmes dits « défensifs » concernant des agents biologiques pathogènes (voir revues [39-41, 43]).

	Catégorie A	Catégorie B	Catégorie C
Caractéristiques	<ul style="list-style-type: none"> - Facilité de dissémination ou de transmission d'une personne à l'autre - Fort taux de mortalité et fort impact sur la santé publique - Susceptible de causer la panique générale - Nécessite une préparation particulière des organisations de santé publique 	<ul style="list-style-type: none"> - Facilité de dissémination modérée - Taux de morbidité modéré et mortalité faible - Nécessite une capacité de diagnostic et une surveillance importante 	<ul style="list-style-type: none"> - Pathogènes émergents pouvant être modifiés pour une dissémination massive
Agents biologiques et pathologies	<p>Bactéries</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Bacillus anthracis</i> : Anthrax - <i>Yersinia pestis</i> : Peste - <i>Francisella tularensis</i> : Tularémie - <i>Clostridium botulinum</i> (Toxine) : Botulisme <p>Virus</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Variola major</i> : Variole - Filovirus (<i>Ebola</i>, <i>Marburg</i>) - Arenaviruses (<i>Lassa</i>, <i>Machupo</i>) Fièvres hémorragiques 	<p>Bactéries</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Brucella sp</i> : Brucellose - <i>Clostridium perfringens</i> (Toxine Epsilon) - <i>Salmonella species</i> - <i>Escherichia coli</i> O157:H7 - <i>Shigella</i> : Maladies gastro-intestinales - <i>Burkholderia mallei</i> : Morve - <i>Burkholderia pseudomallei</i> : Melioidose - <i>Chlamydia psittaci</i> : Psittacose - <i>Coxiella burnetii</i> : Fièvre Q - <i>Staphylococcus aureus</i> (Enterotoxine B) - <i>Rickettsia prowazekii</i> : Fièvre typhoïde - <i>Vibrio cholerae</i> : Choléra <p>Virus</p> <ul style="list-style-type: none"> - Alphavirus : Encéphalites virales <p>Autres</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cryptosporidium parvum</i> : Cryptosporidiose (eau) - <i>Ricinus communis</i> (toxine ricine) 	<p>Virus émergents</p> <ul style="list-style-type: none"> - Virus Nipah : Syndrome respiratoire aigu/ encéphalite - Hantavirus : Fièvre hémorragique ou syndrome cardiopulmonaire

Tableau 1-I-2 : Classement et caractéristiques des agents biologiques

D'après CDC : <https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>

En dehors des programmes gouvernementaux, les armes biologiques ont aussi été développées et utilisées à des fins terroristes. Les exemples les plus marquants sont survenus aux Etats-Unis en 1984 et 2001. Le premier fut perpétré par un groupe religieux qui contamina intentionnellement la nourriture servies dans plusieurs restaurants par *Salmonella typhimurium*, ayant pour conséquence l'hospitalisation de 45 personnes. L'attaque bioterroriste la plus récente est celle des enveloppes contaminées à l'anthrax qui furent envoyées à plusieurs responsables politiques ou journalistes, parmi lesquels 5 sont morts de l'infection [39, 43]. Ce dernier exemple a permis de réaliser la menace réelle que constitue les agents biologiques en cas d'utilisation à des fins terroristes, tant sur le plan de la Santé Publique que sur l'impact psychologique qu'une telle attaque peut avoir sur la population. Depuis 2001, afin de mieux se préparer à une attaque éventuelle, de nombreux pays intensifient leurs recherches pour mieux comprendre les agents pathogènes pouvant être utilisés comme arme biologique et ainsi développer des solutions thérapeutiques.

2) *Caractéristiques et classement des armes biologiques*

Dès 1949, le microbiologiste Théodor Rosebury proposa 11 critères que doit remplir un agent biologique pour constituer une arme potentielle [44] :

- Un faible seuil infectieux
- Une forte virulence avec la capacité de provoquer une maladie aigüe, mortelle ou incapacitante
- Un pouvoir pathogène stable pendant la fabrication, le stockage et le transport
- Une courte période d'incubation
- Une faible contagiosité (afin d'éviter de toucher les populations non-ciblées)
- L'absence de vaccin ou d'immunité naturelle dans la population ciblée
- Une résistance aux antibiotiques classiquement utilisés
- La capacité à supporter l'aérosolisation
- La capacité à résister dans l'environnement
- Un transport facile et une capacité à survivre lors du stockage et de la dispersion
- Une production à grande échelle à faible coût

Le Center for Disease Control and Prevention (CDC) américain s'est basé sur cette description pour établir un classement des agents pathogènes en fonction du risque de leur utilisation en tant qu'arme et des conséquences qu'ils pourraient avoir s'ils étaient utilisés en tant que tel. Ce classement comprend 3 catégories (A, B et C) détaillées dans le tableau 1-I-2. La catégorie A comprend les agents qui posent un problème de sécurité nationale en raison de leur facilité de dissémination, leur fort taux de mortalité ou leur impact majeur sur la santé publique, leur capacité à provoquer un état de panique général et qui, enfin, requièrent une préparation particulière des autorités de santé publique pour faire face à une attaque potentielle.

La catégorie B comprend des agents pathogènes moins mortels ou moins faciles à disséminer, représentant donc une menace moins élevée. Enfin, la catégorie C rassemble des agents pathogènes émergents nécessitant des modifications afin d'augmenter leur pouvoir de dissémination.

3) *F. tularensis* : une longue histoire en tant qu'arme biologique

F. tularensis semble avoir été la première arme biologique jamais utilisée par l'Homme. En effet, d'après une étude publiée en 2007 par S.I. Trevisanato, au 14^{ème} siècle avant JC, les Hittites, un peuple occupant l'actuelle région entre la Turquie et la Syrie, alors touchés par une épidémie, identifiée par ce biologiste italien comme la tularémie, auraient relâché des béliers potentiellement infectés dans le but de contaminer et d'affaiblir les Arzawas ennemis [45].

Bien plus tard, *F. tularensis* fut au cœur des programmes de recherche sur les armes biologiques menés entre les années 1930 et 1990 par les Japonais, les Américains et les Soviétiques. Ces derniers seraient par ailleurs parvenus à créer des souches de *F. tularensis* résistantes aux antibiotiques, alors que les Américains auraient, eux, mis au point un système permettant de disséminer des aérosols de *F. tularensis* [35, 46].

Le fait que cette bactérie ait déjà été répandue intentionnellement est controversé. Néanmoins, des soupçons ont été émis concernant des épidémies massives touchant des centaines de milliers d'Allemands et de Soviétiques pendant la seconde guerre mondiale. De même, lors de la guerre du Kosovo au début des années 2000, de larges épidémies de tularémies sont survenues, faisant alors l'objet d'hypothèse de contamination intentionnelle [28, 30].

F. tularensis faisait déjà partie en 1970, des agents signalés par l'OMS comme constituant une menace en tant qu'arme biologique. A l'occasion de la publication du rapport intitulé « Health Aspects of Chemical and Biological Weapons », l'OMS réalisa une modélisation de l'impact qu'aurait la dissémination de 50 kg d'aérosols de *F. tularensis* sur une zone urbaine de 5 millions d'habitants. Une telle attaque provoquerait, d'après ce modèle, une maladie incapacitante pour 250 000 personnes se prolongeant sur plusieurs semaines et la mort de 19 000 d'entre elles. En outre, la capacité de cette bactérie à persister dans l'environnement provoquerait une contamination globale de la zone conduisant à la prolongation de l'épidémie [42]. Sur la base de ce modèle, le CDC a évalué les conséquences économiques d'une telle attaque à 5,4 milliards de dollars pour 100 000 personnes exposés [35, 42, 47].

Bien que cette étude date de 1970, elle reflète l'ampleur des dégâts que causerait une attaque biologique par *F. tularensis* et souligne les besoins actuels de solutions thérapeutiques pour faire face à ce type d'évènements.

F) Les approches thérapeutiques actuelles

Afin de protéger la population de façon préventive, un vaccin contre la tularémie serait l'outil idéal. Malheureusement, encore aujourd'hui, aucun vaccin n'est disponible ni en Europe de l'Ouest ni en Amérique du Nord, bien que les recherches de candidats potentiels se soient accélérées depuis le début du 21^{ème} siècle. L'antibiothérapie est donc le seul traitement prescrit à l'heure actuelle, malgré son efficacité parfois limitée.

1) Développement d'un vaccin contre la tularémie

a) La souche LVS

Les premières recherches autour d'un vaccin contre la tularémie remontent aux années 1930 et furent conduites par le chercheur américain Lee Foshay. A l'époque, Foshay entreprit d'inactiver des cellules bactériennes de *F. tularensis* par traitements thermique et chimique afin de créer un vaccin constitué de bactéries entières inactivées. L'efficacité du vaccin de Foshay s'avéra limitée lorsqu'il fut testé sur des primates non-humains, ne protégeant les animaux que contre de faibles doses infectieuses de la souche virulente *F. tularensis* Schu S4. Chez l'homme cependant, ce vaccin eut un effet protecteur plus encourageant mais provoqua aussi des réactions locales importantes [6].

A quelques années d'intervalle, les Soviétiques menèrent, eux aussi, des recherches sur des vaccins potentiels. Contrairement aux tentatives américaines, les Soviétiques concentrèrent leurs efforts sur l'élaboration d'un vaccin vivant atténué à partir de souches de *F. tularensis* subsp. *holarctica*. Les travaux menés par Gaiskii et El'bert conduisirent en 1942, à la production de la souche « Moscou » atténuée par passage sur du sérum immun anti-*F. tularensis*. Cette souche, ayant d'abord montré une protection satisfaisante sur des volontaires exposés à des souches virulentes, servit ensuite à vacciner plusieurs milliers de personnes avant d'être perdue [48]. Pendant cette période, les mêmes chercheurs mirent au point au moins deux nouvelles souches, nommées n°15 et Ondatra IV, atténuées par passage successifs sur un milieu artificiel. De nouveaux essais cliniques conduits avec ces deux souches administrées en injection sous-cutanée, permirent de confirmer leur caractère inoffensif et protecteur. Entre 1946 et 1960, on estime que plus de 60 millions de personnes ont été vaccinées par l'une de ces souches en ex-URSS, ce qui aurait participé activement à la diminution de l'incidence de la tularémie dans cette région. Par ailleurs, la souche n° 15 est toujours disponible pour la vaccination en Russie et dans les pays de l'ex-Union Soviétique dans les zones où la tularémie est endémique [48, 49].

En 1956, la souche n°15 ainsi qu'une autre, dérivée aussi de *F. tularensis* subsp. *holarctica*, nommée n°155, furent importées de l'Institut Gamaleia (Institut d'Epidémiologie et de Microbiologie) de Moscou vers l'Institut de l'armée américaine pour les recherches médicales sur les maladies infectieuses (USAMRIID) de Fort Detrick. Une fois mises en culture, ces deux souches s'avérèrent être un mélange donnant deux types de colonie sur milieu solide : bleues

ou grises. Chaque variant fut isolé et testé chez la souris et le cochon d'Inde pour ses propriétés immunogènes et protectrices contre une infection par la souche virulente Schu S4. Ayant montré une meilleure efficacité chez l'animal, la souche « bleue » fut alors atténuée de nouveau par 5 passages successifs chez la souris et fut rebaptisée Live Vaccine Strain (LVS) [6, 49, 50].

Chez l'animal, cette souche vaccinale, bien que dérivée de la sous-espèce *holarctica*, se montra efficace pour protéger contre une infection pulmonaire par la souche virulente de Type A Schu S4 [6].

La même étude fut réalisée chez l'homme où seulement 3 des 18 personnes vaccinées exposées à des aérosols bactériens montrèrent des signes d'infection contre 8 sur 10 dans le groupe contrôle, permettant de conclure à une protection significative engendrée par l'immunisation avec la souche LVS. Une autre étude démontra qu'un an après une vaccination par LVS, seules des personnes exposées à de fortes doses infectieuses (environ 20 000 bactéries) par aérosols contractèrent une maladie, les symptômes étant tout de même moins importants que pour les individus non-vaccinés. Ces études ont appuyé la décision de la Food and Drug Administration américaine (FDA), qui en 1960, autorisa l'utilisation de la souche LVS comme vaccin, mais uniquement pour les employés de laboratoire manipulant des souches de *F. tularensis*, considérées comme « personnes à risque ». Une étude rétrospective a par ailleurs été réalisée en 1977 sur l'incidence de la tularémie acquise en laboratoire. Cette étude compara la période de 1950 à 1959 où la vaccination n'était pas encore mise en place, et celle de 1960 à 1969 où de nombreux employés étaient vaccinés. Entre ces deux périodes, l'incidence de la forme typhoïde de la tularémie est passée de 5,7 à 0,27 cas pour 1000 employés. En revanche, aucune influence du vaccin n'a été montrée sur l'incidence de la forme ulcéro-ganglionnaire. Toutefois, les signes cliniques de cette dernière sont apparus plus modérés post-vaccination [6, 50, 51].

Malgré les preuves de son efficacité, le vaccin LVS n'a jamais obtenu d'autorisation de mise sur le marché ni aux Etats-Unis, ni en Europe. Le principal frein pour les autorités est probablement l'absence de caractérisation précise des mécanismes d'atténuation et de protection. De plus, lorsqu'elle est administrée par voie intrapéritonéale (i.p.), la souche LVS est aussi virulente que la souche non-atténuée chez la souris, avec une dose létale très faible d'environ 10 bactéries, contre 10^7 en injection sous-cutanée. Pour ces différentes raisons, soulevant des questionnements quant au risque de contracter une maladie suite à une vaccination par la souche LVS, d'autres pistes sont envisagées pour élaborer un vaccin contre la tularémie [50] [6, 50].

b) La recherche de nouveaux vaccins contre la tularémie

Deux grandes familles de vaccins sont envisagées pour lutter contre la tularémie : les vaccins vivants atténués, comme la souche LVS, et les vaccins sous-unitaires.

Ces derniers, constitués de composants isolés de la bactérie et non de la cellule entière, offrent de nombreux avantages comparés aux vaccins vivants. Ils sont plus faciles à stocker et à transporter, et ne comportent pas d'espèce vivante. Le risque de contracter une pathologie infectieuse, existant avec les vaccins vivants, ne se pose donc pas.

Plusieurs études ont été conduites pour l'élaboration d'un vaccin contre la tularémie comportant des composés antigéniques spécifiques de *F. tularensis*, tels que des protéines, des lipoprotéines, ou encore des polysaccharides. Ces vaccins potentiels ont montré une protection très relative malgré une immunogénicité significative (voir revues [49, 52, 53]). En revanche, plus récemment, plusieurs équipes ont montré qu'une immunisation avec un mélange de plusieurs composants de *F. tularensis*, comme une fraction de la membrane externe, pouvait offrir une meilleure protection contre une exposition à des souches virulentes [54, 55]. Ces recherches laissent donc entrevoir la possibilité d'un vaccin sous-unitaire contre la tularémie.

Bien que les vaccins vivants atténués présentent des inconvénients majeurs cités plus haut, leur efficacité a néanmoins déjà été démontrée dans le cadre de la tularémie, mais aussi dans le cas d'autres maladies infectieuses, notamment la tuberculose avec le vaccin BCG. Cependant, une plus grande exigence est requise aujourd'hui pour le développement de vaccins vivants, notamment en caractérisant plus précisément l'origine de l'atténuation, en identifiant les mutations sur les gènes essentiels à sa virulence. Dans le cadre de la tularémie, de nombreux mutants ont été créés à partir des différentes sous-espèces de *F. tularensis* et testés chez l'animal. Tandis que les dérivés de *F. novicida* ne semblent offrir aucune protection croisée contre les souches virulentes, certains mutants de la sous-espèce *tularensis* ont montré une capacité de protection significative. Toutefois, le caractère extrêmement virulent de cette sous-espèce comporte un risque non négligeable quant à son utilisation en tant que vaccin [52, 53]. Les souches de type B semblent donc être des candidats plus sérieux. Les avancées de ces dernières années sur l'étude du génome de *F. tularensis* devraient contribuer à l'identification de gènes cibles d'atténuation et de ce fait, à l'élaboration d'un vaccin vivant atténué mieux caractérisé que l'actuelle souche LVS.

A

Epidémie massive	Antibiotique	Dose (14 jours)	Voie d'administration
Adultes	Doxycycline	100 mg, 2 fois/jour	Orale
	ou Ciprofloxacine	500 mg, 2 fois/jour	
Enfants	Doxycycline	2,2 mg/kg, 2 fois/jour	Orale
	ou Ciprofloxacine	15 mg/kg, 2 fois/jour	

B

Epidémie modérée	Antibiotique	Dose (10 à 21 jours)	Voie d'administration
Adultes	Streptomycine	1 g, 2 fois/jour	Intramusculaire
	ou Gentamicine	5 mg/kg, 1 fois/jour	Intraveineuse
Enfants	Streptomycine	15 mg/kg, 2 fois/jour	Intramusculaire
	ou Gentamicine	2,5 mg/kg, 3 fois/jour	Intraveineuse

Tableau 1-I-3 : Traitements recommandés pour la tularémie

Traitements recommandés dans le cas d'une épidémie de grande ampleur ne permettant pas l'hospitalisation de toutes les victimes (A) ou d'ampleur plus modérée (B).

D'après Dennis *et al.*, 2001 [26]

2) L'antibiothérapie contre la tularémie

a) Les antibiotiques recommandés

D'après le rapport de l'OMS publié en 2007, 3 familles d'antibiotiques sont recommandées pour traiter la tularémie : les aminoglycosides, les fluoroquinolones et les tétracyclines.

Dans les cas peu sévères, la ciprofloxacine (fluoroquinolone) ou la doxycycline (tétracycline) sont administrées par voie orale pendant 2 à 3 semaines. Ces traitements seraient aussi adaptés, en première intention, à des épidémies de masse qui incluraient un grand nombre de victimes, comme dans le cas d'une dissémination intentionnelle. Ces antibiotiques sont également utilisés en tant que traitement prophylactique dans le cas d'une exposition avérée à *F. tularensis* [35, 36, 56].

Pour les cas les plus graves nécessitant une hospitalisation, la streptomycine ou la gentamicine par voie parentérale sont conseillées. La gentamicine est associée à des rechutes plus fréquentes mais est aussi plus largement disponible, la streptomycine ayant été retirée du marché dans plusieurs pays à cause de lourds effets secondaires. La durée de traitement par l'un de ces deux aminoglycosides est de 10 jours [35, 56]. Le tableau 1-1-3 rassemble les traitements recommandés dans le cas d'épidémies de tularémie.

b) Les limites de l'antibiothérapie

Ces antibiotiques sont efficaces contre les infections par *F. tularensis* lorsqu'ils sont administrés dans des conditions optimales ; c'est-à-dire dans un court délai après l'infection, et lorsque la durée du traitement est suffisante. La plupart des rechutes suite à ces traitements ont été observées après une administration tardive. Malheureusement, la difficulté à poser le bon diagnostic participe activement au retard de traitement. En effet, les symptômes de la tularémie pulmonaire ne sont pas spécifiques de cette pathologie, qui est souvent mal identifiée, notamment dans les régions où les cas naturels de tularémie sont rares. Le traitement généralement donné à des personnes présentant une fièvre inexplicquée est basé sur des antibiotiques de la famille des β -lactamines, telle que la pénicilline. Cependant, *F. tularensis* étant naturellement résistante à cette famille d'antibiotique, un tel traitement n'a aucun effet [56, 57].

Par ailleurs, l'efficacité de ces traitements repose sur l'hypothèse d'une infection par une souche sensible à ces antibiotiques. Bien qu'aucune souche de *F. tularensis* n'ait acquis naturellement de résistance aux antibiotiques, en cas d'épidémie d'origine intentionnelle, l'utilisation d'une souche résistante est à envisager.

Pour faire face à cette éventualité, de nouveaux traitements anti-infectieux sont actuellement en cours d'étude. De nouveaux antibiotiques ont montré des effets prometteurs sur plusieurs souches de *F. tularensis*, ainsi que de nouvelles formulations d'antibiotiques existants afin d'améliorer leur pénétration dans les tissus et les cellules. En parallèle, d'autres approches thérapeutiques sont en cours d'investigation, notamment l'immunomodulation mais ce sujet sera discuté dans le paragraphe III-B [57].

Depuis le début des années 2000, un intérêt grandissant pour *F. tularensis*, notamment dans le cadre de programmes de défense contre les armes biologiques, a contribué à une meilleure connaissance de cette bactérie et des relations hôtes-pathogènes qui s'établissent lors d'une infection. Ces avancées devraient permettre, à terme, de développer des moyens de lutte efficace contre la tularémie pulmonaire, forme la plus étudiée à l'heure actuelle car la plus susceptible d'être provoquée par une attaque biologique.

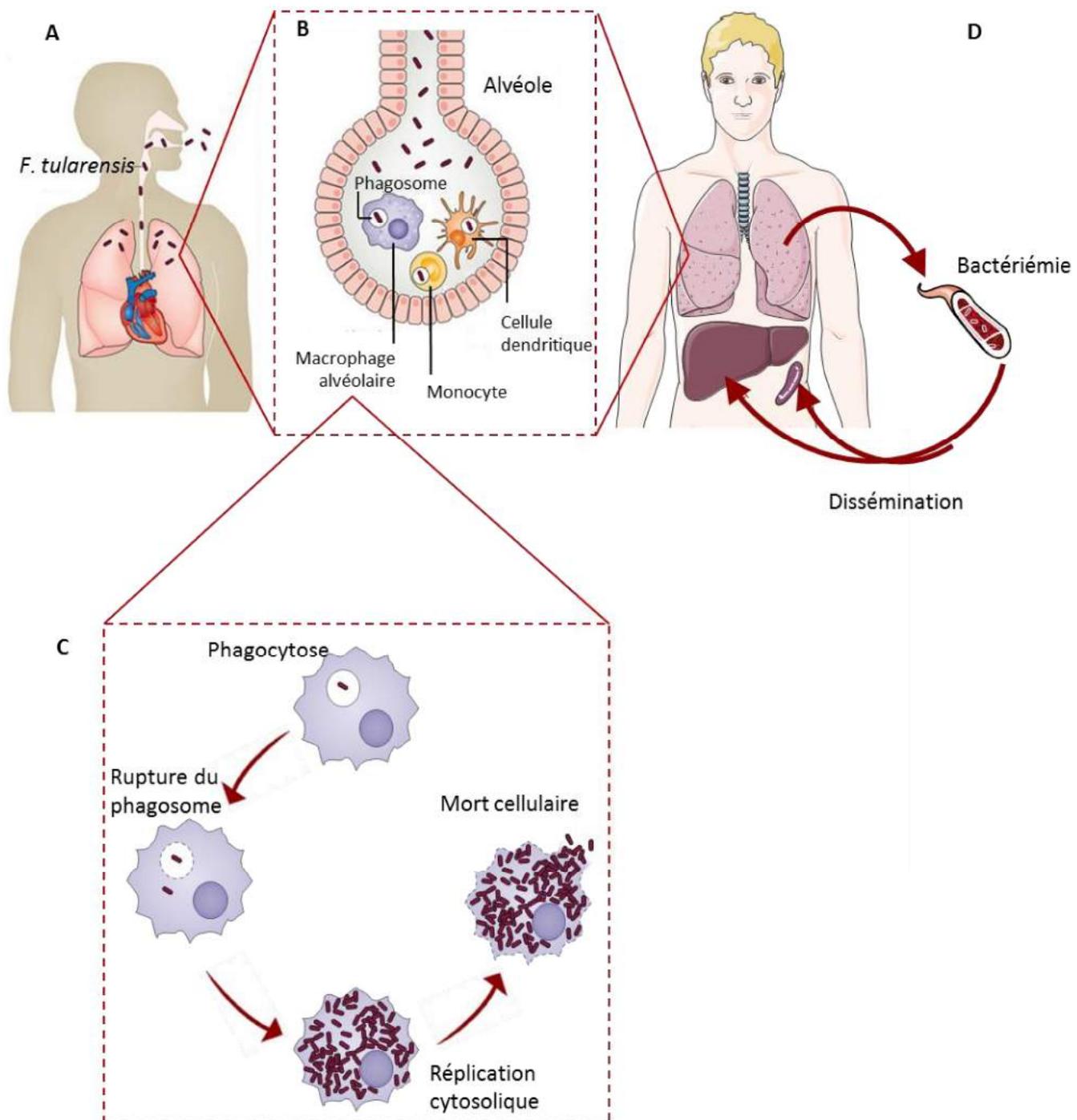


Figure 1-l-9: Cycle infectieux de *F. tularensis*

Suite à l'inhalation de *F. tularensis* (A), les bactéries infectent en premier lieu les cellules phagocytaires présentes dans les poumons (B), en particulier les macrophages, dans lesquels elles sont internalisées. *F. tularensis* est localisée dans un phagosome puis s'en échappe afin de se multiplier dans le cytosol jusqu'à provoquer la mort cellulaire (C). Quelques jours après l'infection pulmonaire, une bactériémie se développe et les bactéries disséminent *via* la circulation sanguine dans les organes, en particulier les poumons, le foie et la rate (D).

Adapté de Pai, *et al.*, 2016 [49] et Chong *et al.*, 2010 [53]

II- Tularémie pulmonaire : cycle infectieux et réponse immunitaire

Les cas de tularémie pulmonaire humaine sont rares et généralement diagnostiqués tardivement. De ce fait, les connaissances sur la pathogénie de *F. tularensis* chez l'homme sont limitées à l'analyse des symptômes cliniques et de prélèvements. Ceux-ci donnent donc des informations sur la pathologie uniquement à un stade très avancé, et sur les conséquences macroscopiques de l'infection (lésions tissulaires, cellules formant ces lésions, etc...). En revanche, les connaissances sur les premières étapes et le développement de l'infection, et sur la réponse immunitaire associée ont été apportées par des modèles *in vivo*, chez la souris pour la plupart, parfois sur des modèles de primates non-humains. Le développement de modèles *in vitro* d'infection de cellules murines ou humaines, a permis une meilleure compréhension des interactions cellule hôte-pathogène.

Ce paragraphe a pour objectif de donner dans un premier temps une vision globale du cycle infectieux de *F. tularensis* lors d'une infection pulmonaire, dont chaque étape sera détaillée par la suite.

A) Cycle infectieux : des poumons à l'infection systémique

La tularémie pulmonaire peut être provoquée par l'inhalation d'une dizaine de bactéries seulement, pour les souches de Type A [35]. *F. tularensis* est un pathogène intracellulaire qui cible en particulier les cellules phagocytaires (Figure 1-I-9A, [58]). Dans les poumons, les macrophages alvéolaires constituent la première population cellulaire infectée. En effet, chez la souris, ils représentent 80% des cellules infectées une heure après l'exposition [22, 59].

Les macrophages sont des acteurs de l'immunité innée dont le rôle est tout d'abord de détecter les agents infectieux *via* un ensemble de récepteurs, appelés Pattern Recognition Receptors (PRR). Ces PRR reconnaissent des motifs moléculaires conservés chez les micro-organismes, dénommés Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs). Après la détection d'un agent infectieux, la coopération entre différents PRR permet, d'une part, le déclenchement de cascades de signalisation conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires et d'autre part, l'internalisation du micro-organisme dans un phagosome. Cependant, *Francisella* a développé des stratégies, qui seront détaillées au paragraphe II-B-2, lui permettant d'échapper ou de résister aux mécanismes microbicides du phagosome ou d'inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires. *In vivo*, cela se traduit par l'absence de réponse inflammatoire durant les 2 à 3 jours suivant l'infection, correspondant chez l'homme à la période d'incubation asymptomatique (voir revue [60]).

Bien qu'elle évite le déclenchement des défenses de l'hôte, *F. tularensis* exploite certains PRR afin d'entrer dans les cellules phagocytaires qui constituent sa niche de réplication. *In vitro*, il a été montré que l'internalisation de *F. tularensis* dans les macrophages peut se faire aussi bien par voie opsonique, que *via* la reconnaissance directe de la bactérie par certains PRR,

notamment le récepteur au mannose [61]. Une fois internalisée, *Francisella* est contenue dans un phagosome (FCP) qui interagit avec la voie endo-lysosomale. Cependant, *F. tularensis* induit la rupture de la membrane phagosomale et s'échappe dans le cytosol avant la fusion phagosome-lysosome. Bien que les étapes finales de maturation du FCP restent encore à définir précisément, des bactéries sont observées dans le cytosol entre 4 et 8 h après l'infection où elles commencent leur multiplication (Figure I-9C, [62]) [63].

La croissance intracellulaire de *F. tularensis* dans des macrophages atteint son maximum entre 12 h et 24 h post-infection (p.i.) et provoque ensuite la mort des macrophages (Figure I-9C) [64, 65]. L'une des conséquences de cette mort cellulaire est la présence d'un grand nombre de bactéries dans le milieu extracellulaire qui, durant les 2 à 3 premiers jours de l'infection, va infecter les phagocytes environnants mais aussi, probablement, d'autres types cellulaires. En effet, chez la souris, *F. tularensis* est capable d'infecter les cellules épithéliales pulmonaires [22]. Bien que les mécanismes liés à la dissémination de *F. tularensis* ne soient pas clairement définis dans la littérature, l'infection de cellules épithéliales pourrait permettre aux bactéries de se propager de cellule en cellule des poumons jusqu'à la circulation sanguine. On retrouve, en effet, des bactéries dans le sang à partir de 48h p.i.. Une fois dans le sang, *F. tularensis* colonise très rapidement les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques et rate), ainsi que le foie (Figure 1-I-9D). Ainsi, des souris infectées par 300 CFU de la souche Schu S4 présentent une charge d'environ 10^8 bactéries dans les poumons, le foie et la rate à 72 h p.i. [66].

Après un délai d'environ 72 h dans l'initiation de la réponse inflammatoire, ces soudaines dissémination et prolifération massive des bactéries dans l'organisme provoquent une augmentation brutale de la production de cytokines, appelée tempête cytokinique. Celle-ci est due à la fois à la présence des PAMP de *F. tularensis* mais également aux alarmines libérées par les cellules mourantes. En effet, le nombre grandissant de cellules infectées et mourantes provoque la libération d'alarmines, ou Damage Associated Molecular Pattern (DAMP), qui, au même titre que les PAMP, sont reconnus par les PRR. Ces DAMP et PAMP présents dans tous les organes infectés, déclenchent alors cette production massive de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires [67, 68]. Cette hypercytokinémie est à l'origine du recrutement au niveau des sites infectieux d'une autre population de phagocytes professionnels : les neutrophiles [67]. Cependant, comme dans le cas des macrophages, *F. tularensis* est capable de s'échapper du phagosome et de se répliquer dans le cytosol des neutrophiles. De plus, *F. tularensis*, en prolongeant la durée de vie de ces cellules empêche la régulation de l'inflammation, normalement favorisée par la phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les macrophages (voir revue [69]). L'accumulation de neutrophiles conduit à des lésions nécrotiques dans les tissus et à l'endommagement des organes [68].

La bactériémie, la tempête cytokinique, et les lésions associées à un recrutement massif de cellules immunitaires dans les organes infectés, sont les caractéristiques d'un sepsis, pouvant

s'aggraver en choc septique [24, 68]. Les modèles animaux ont permis de comprendre le rôle clé et néfaste de la réponse inflammatoire, qui est déclenchée trop tard, et est trop intense pour être bénéfique [70]. En effet, l'évolution de l'infection en sepsis est probablement responsable de la mort des souris survenant 4 à 5 jours après l'infection. Bien que chez la souris l'infection pulmonaire par *F. tularensis* soit très rapidement létale, la tularémie pulmonaire humaine est toutefois moins foudroyante. De plus, les traitements antibiotiques ralentissent la progression de l'infection et, de ce fait, permettent le développement de l'immunité adaptative qui, contrairement à l'immunité innée, est plus longue à se mettre en place, de quelques jours à quelques semaines.

Chez l'homme, des anticorps spécifiques de *Francisella* sont détectés dans le sérum des individus infectés environ 6 à 10 jours après l'apparition des symptômes, soit deux semaines après l'infection. Le dosage des IgM, IgG et IgA spécifiques de *Francisella* est par ailleurs un moyen de diagnostic très utilisé. Ces anticorps persistent dans le temps, puisqu'ils sont toujours détectables une dizaine d'année après l'infection. La grande majorité des études *in vivo* sur la réponse adaptative aux infections pulmonaires à *F. tularensis* concerne les réponses « mémoire » ; son rôle dans la défense contre les primo-infections reste à élucider. En effet, l'étude des primo-infections pulmonaires à *F. tularensis* chez la souris est délicate puisque les animaux succombent à l'infection avant qu'une réponse adaptative ait pu être mise en place. Pour cette raison, la plupart des recherches s'est focalisée sur des expériences de vaccination apportant des informations sur les acteurs de la réponse mémoire. Le rôle des anticorps dans la défense contre les infections par *F. tularensis* semble limité. En effet, plusieurs études ont montré que des souris déficientes pour la production d'anticorps, infectées une première fois avec une dose non-létale de la souche LVS, survivent à une seconde infection intrapéritonéale létale. En revanche, l'immunité adaptative cellulaire, elle, semble jouer un rôle majeur dans la protection contre les infections pulmonaires secondaires à *F. tularensis*. Les lymphocytes B, en plus de la production d'anticorps, semblent jouer un rôle notamment *via* la production de cytokines telles que l'interferon- γ (IFN- γ) ou l'IL-1 β . Les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ sont nécessaires à l'immunité contre *F. tularensis* puisqu'il a été montré que des souris ne possédant pas ces deux types cellulaires résistent beaucoup moins que les souris sauvages à une infection pulmonaire avec la souche Schu S4 après vaccination avec la souche LVS. Leur fonction exacte dans la réponse immunitaire à *Francisella* est encore à définir plus précisément. Néanmoins, plusieurs études ont montré un rôle clé de l'IFN γ sécrété par les cellules T effectrices dans l'activation des macrophages, augmentant leur capacité à éliminer les bactéries [71] (voir revues [72-74]).

L'immunité adaptative joue donc un rôle dans la protection contre les infections à *F. tularensis* et la compréhension de ces mécanismes de défense est nécessaire, notamment à l'élaboration d'un vaccin efficace. L'immunité innée, elle, s'avère inopérante et semble, au contraire, jouer un rôle clé dans le développement de la pathologie.

Récepteur	Principaux Ligands	Origine des ligands
TLR1	Lipopeptides triacylés	Bactéries à Gram négatif et mycobactéries
TLR2	Lipoprotéines/Lipopeptides Peptidoglycanes Acide lipoteichoïque Lipoarabinomannane Zyosan	Bactéries Mycobactéries Levure
TLR3	ARN double brin	Virus
TLR4	LPS	Bactéries à Gram négatif
TLR5	Flagelline	Bactéries
TLR6	Lipopeptides diacylés Acide lipoteichoïque Zyosan	<i>Mycoplasma</i> /Bactéries à Gram positif Bactérie à Gram positif Levure
TLR7/TLR8	ARN simple brin	Virus
TLR9	Dinucléotides CpG	Virus et bactéries

Tableau 1-I-4 : Les TLR et leur principaux ligands
D'après Akira & Takeda, 2004 [66]

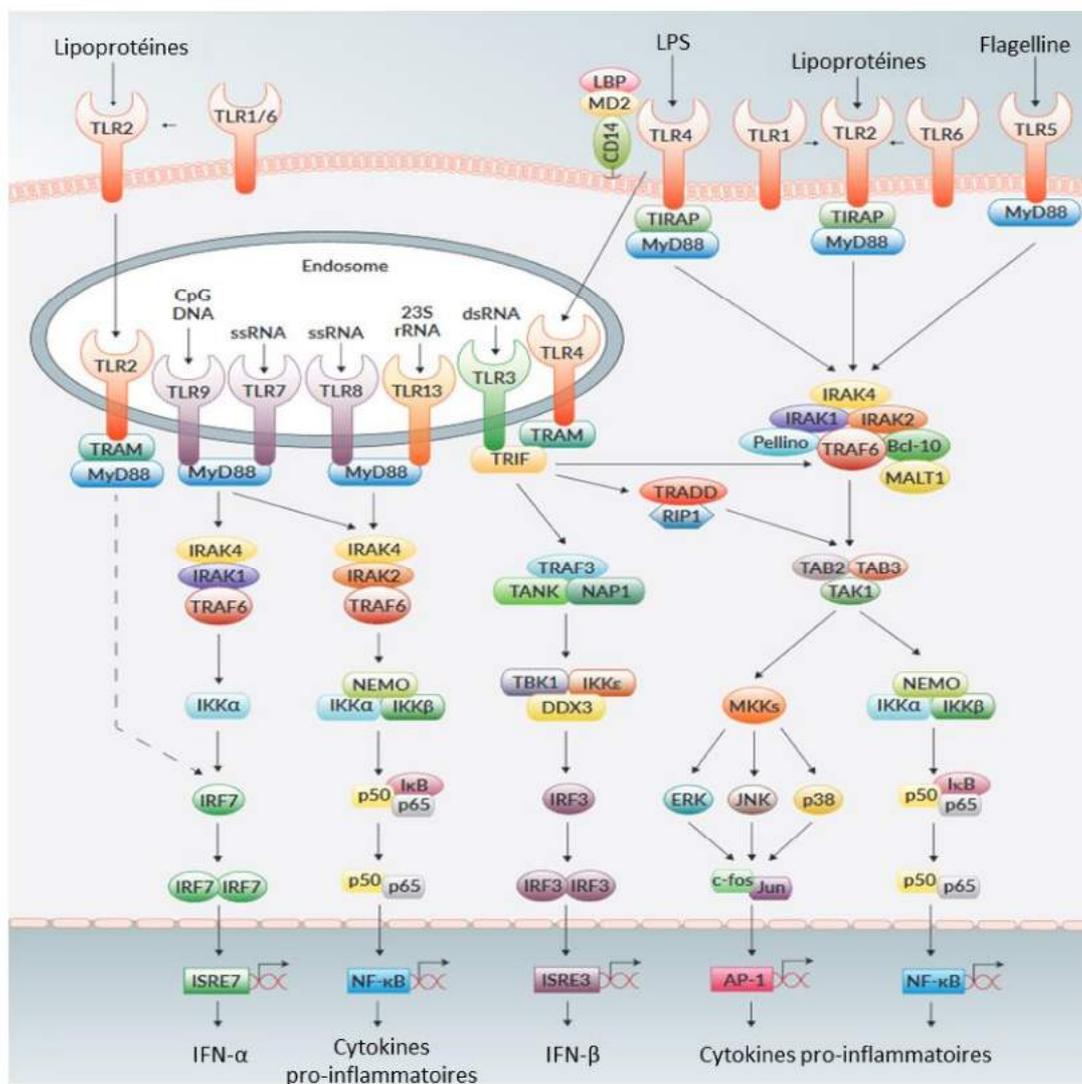


Figure 1-I-10 : Les voies de signalisation des TLR

L'activation d'un TLR par un PAMP induit le recrutement d'une molécule adaptatrice (MyD88, TRIF ou TIRAP...) et déclenche la cascade de signalisation correspondante. Ces voies aboutissent à l'activation d'un facteur de transcription (NF-κB, AP-1,...) et à la production de cytokines pro-inflammatoires.
D'après : InvivoGen http://www.invivogen.com/docs/2016-Poster_TLR-NLR-invivogen.pdf

B) Réponse immunitaire innée à *Francisella*

Le paragraphe suivant détaille les principaux éléments du cycle intracellulaire de *F. tularensis* et de la réponse immunitaire innée associée aux différentes étapes de ce cycle. Tout d'abord, l'interaction avec les récepteurs Toll-like (TLR), sera abordée ainsi que les mécanismes permettant à *Francisella* d'éviter la reconnaissance ou d'inhiber la signalisation induite par ces récepteurs. Ensuite, seront détaillées les différentes voies d'entrée possibles dans le macrophage et les conséquences qu'elles peuvent avoir sur le cycle intracellulaire des bactéries ainsi que les stratégies d'échappement de *Francisella* lui permettant de survivre dans l'environnement intramacrophagique. Enfin, la mise en place de la réponse inflammatoire et son rôle sur la pathologie seront décrites.

1) Interaction de *Francisella* avec les TLR

Les TLR sont l'une des principales familles de PRR impliqués dans la signalisation pro-inflammatoire déclenchée par la détection d'un agent infectieux. Ils sont exprimés à la surface, ou dans les endosomes, de la plupart des cellules immunitaires, telles que les macrophages ou les cellules dendritiques, mais également dans des cellules épithéliales ou des fibroblastes. Les 10 TLR humains reconnaissent chacun un ou plusieurs ligands spécifiques conservés chez la plupart des micro-organismes, permettant ainsi la détection d'une large diversité de microbes (Tableau 1-I-4). La reconnaissance des bactéries est plus particulièrement associée aux TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 et TLR9 ; les TLR3, 7 et 8 étant majoritairement impliqués dans la reconnaissance des virus [75]. La détection d'un agent infectieux par un TLR entraîne son homo- ou hétéro-dimérisation. Ce phénomène déclenche le recrutement d'une molécule adaptatrice, telle que MyD88 ou TRIF, qui va déterminer l'activation d'une voie de signalisation conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires, *via* l'activation du facteur de transcription NF- κ B, ou d'interféron de type I (Figure 1-I-10) [75].

De nombreux PRR sont donc susceptibles de détecter la présence de *Francisella*. Cependant comme de nombreux agents pathogènes, cette bactérie a développé des mécanismes lui permettant d'éviter la reconnaissance par la plupart des TLR impliqués dans la détection des bactéries (TLR4, TLR5, TLR9) ou même de moduler directement les voies de signalisation qu'ils induisent. En effet, seul TLR2, associé à TLR1 et TLR6 intervient dans la réponse de l'hôte à *Francisella*.

En effet, TLR5 reconnaît la flagelline, principale protéine constituant les flagelles des bactéries motiles. *Francisella* est une bactérie non-motile n'exprimant pas cette protéine et n'est donc par reconnue par TLR5 [76].

Le rôle de TLR9, reconnaissant l'ADN bactérien *via* les dinucléotides CpG non-méthylés [75], n'a pas été clairement défini dans le cadre de la détection et de la réponse à *Francisella*.

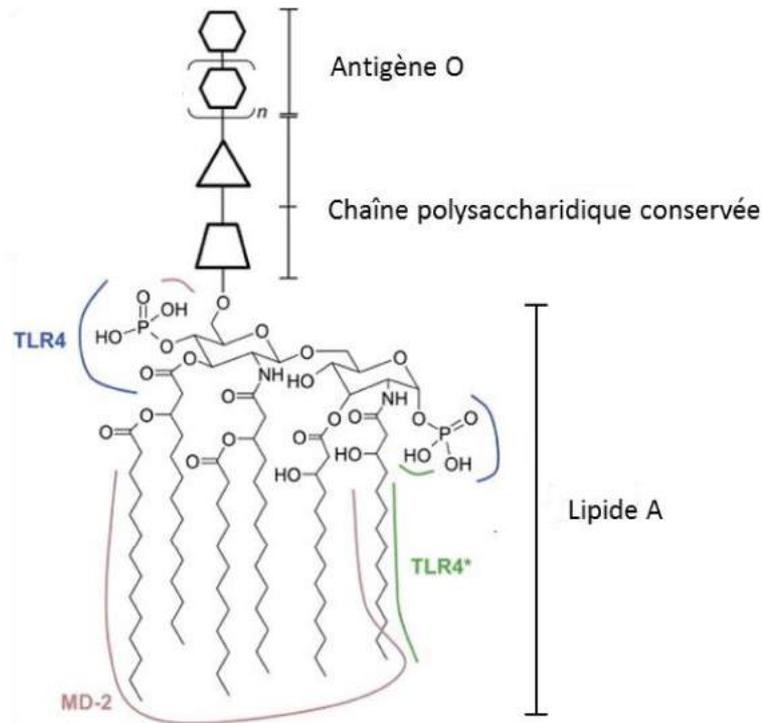


Figure 1-I-11 : Structure du LPS d'*E.coli* et motifs reconnus par TLR4

Le LPS est composé d'une ancre lipidique, le lipide A, portant une chaîne polysaccharidique composée d'un domaine conservé et d'une partie variable, l'antigène O. Le lipide A est reconnu par un dimère du complexe TLR4-MD2. Chaque élément du complexe reconnaît un motif structural particulier entouré en couleur. TLR4* représente la seconde unité du dimère.
D'après Ray *et al.*, 2013 [68]

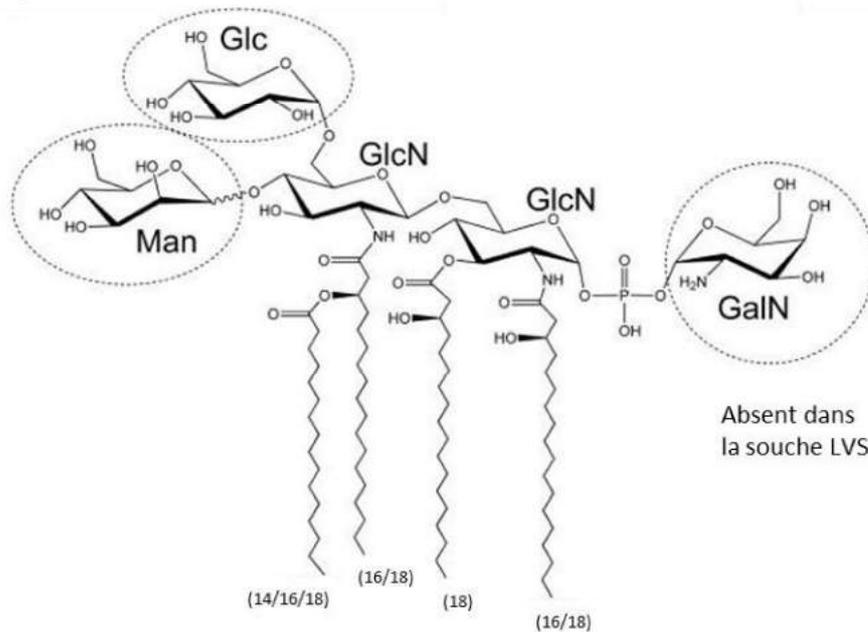


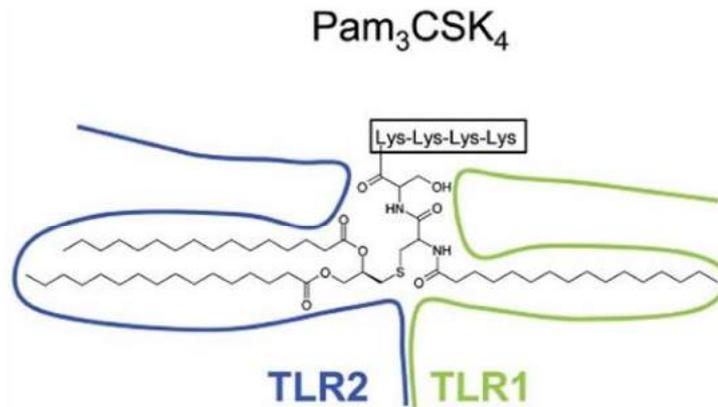
Figure 1-I-12 : Structure du lipide A des souches de *Francisella*

Le lipide A de toutes les sous-espèces de *F. tularensis* est tétra-acylé avec des acides gras de 14 à 18 carbones, selon les conditions de croissance, et ne possède qu'un groupement phosphate substitué par une galactosamine, sauf pour la souche LVS (A). La présence de glucose et de mannose dans le lipide A de *F. tularensis* dépend également des conditions de croissance.
D'après Okan *et al.*, 2013 [71]

Jusqu'à présent, une seule étude a montré que des souris déficientes pour ce récepteur ne sont pas plus sensibles à une infection intradermique par la souche LVS que des souris sauvages, suggérant que TLR9 n'a pas de rôle important dans la défense de l'hôte. De même, la croissance intracellulaire de la souche LVS dans des macrophages murins issus de ces souris n'est pas altérée [77]. Cependant, la capacité de *Francisella* à induire une production de cytokines en l'absence de TLR9 n'a pas été étudiée. Le rôle mineur de TLR9 dans la réponse de l'hôte à *Francisella* pourrait provenir de la résistance à de nombreux mécanismes anti-microbiens. En effet, ces mécanismes provoquent la lyse des bactéries et par conséquent, la libération d'ADN bactérien dans le cytosol. En limitant la lyse bactérienne, *Francisella* limite la reconnaissance d'ADN par TLR9 (cf paragraphe II-B-2-c et d).

TLR4 est impliqué dans la détection des bactéries à Gram négatif par la reconnaissance du lipopolysaccharide (LPS), un composant majoritaire de la paroi de ces bactéries. TLR4 se lie au lipide A, l'ancre lipidique du LPS, portant généralement une chaîne polysaccharidique [78]. L'association de TLR4 et MD-2 ainsi que la dimérisation de ce complexe lors de la liaison avec le lipide A, induit une cascade de signalisation provoquant la production de cytokines pro-inflammatoires [79]. La structure du lipide A peut varier selon les espèces bactériennes mais les formes induisant les plus fortes réponses inflammatoires, typiquement celui d'*E. coli*, sont constitués d'une diglucosamine hexaacylée présentant deux groupements phosphate en position 1 et 4'. Les 6 acides gras sont d'une longueur comprise entre 12 et 14 carbones (Figure I-11). Le nombre et la longueur des chaînes acylées jouent un rôle clé dans la reconnaissance par TLR4 comme l'a montré la structure cristallographique du complexe TLR4-MD-2-LPS [80]. En effet, alors que 5 des acides gras sont liés avec MD-2, le 6^{ème} forme une interaction hydrophobe avec TLR4 permettant la dimérisation des deux complexes. De plus, les groupements phosphate sont nécessaires à la liaison des différents éléments des hétérodimères (Figure I-11) [80]. *Francisella*, comme d'autres bactéries pathogènes produit un lipide A différent de cette structure classique et évite ainsi l'activation de TLR4. En effet, toutes les espèces de *Francisella* possèdent un lipide A tétra-acylé avec des acides gras plus longs, de 16 à 18 carbones, et ne présentent pas de groupement phosphate en position 4 de la diglucosamine (Figure I-12). De plus, pour toutes les souches, excepté LVS, le groupement phosphate situé en position 1 est lié à une galactosamine. Pour la souche LVS, au contraire, dans la forme majoritaire du lipide A, ce groupement phosphate est libre et pourrait jouer un rôle dans l'atténuation de cette souche. Ainsi, tous les éléments intervenant dans la reconnaissance par TLR4 sont modifiés ou inexistant [81, 82]. De ce fait, le LPS de *F. tularensis* n'induit aucune production de cytokines dans des macrophages murins ou humains et ne déclenche aucune réponse inflammatoire *in vivo*, contrairement au LPS d'*E. coli* qui provoque une production de cytokine et un recrutement de neutrophiles massifs dans les poumons des souris 4 h après inhalation [83].

A



B

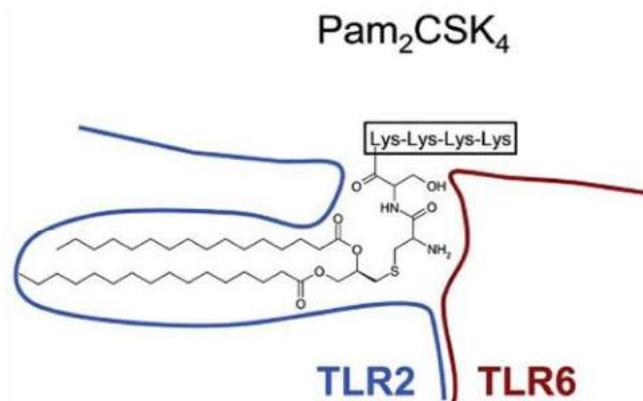


Figure 1-I-13 : Structure des lipopeptides et motifs reconnus par TLR2

Motifs structuraux des lipopeptides synthétiques triacylés (Pam₃CSK₄) et diacylés (Pam₂CSK₄) reconnus respectivement par les hétérodimères TLR1/TLR2 (A) et TLR2/TLR6 (B)

D'après Ray *et al.*, 2013 [68]

De même, des souris déficientes pour le récepteur TLR4 succombent à une infection par *F. tularensis* LVS de la même façon que les souris sauvages. Dans l'ensemble, ces données indiquent que TLR4 n'intervient pas dans la réponse de l'hôte à l'infection par *Francisella*.

Le seul TLR détectant et induisant un signal pro-inflammatoire lors de l'infection par *F. tularensis* est TLR2. Ce récepteur fonctionne sous forme d'un hétérodimère avec TLR1 ou TLR6 pour reconnaître, en autres les lipoprotéines à différents états d'acylation. En effet, le dimère TLR1/TLR2 se lie préférentiellement avec les lipoprotéines tri-acylées, principale forme trouvée dans les bactéries à Gram négatif, tandis que le dimère TLR2/TLR6 se lie aux lipoprotéines di-acylées (voir revue [75, 79]). Cette affinité provient du mécanisme de liaison entre ces dimères et leur ligand. En effet, TLR2 se lie par interactions hydrophobes avec deux acides gras, TLR1 se lie avec la troisième chaîne, les lipopeptides tri-acylées forment donc un pont entre les deux récepteurs permettant la dimérisation (Figure 1-I-13A) [84]. Le site de liaison des lipides est inaccessible sur le récepteur TLR6, empêchant la liaison des lipoprotéines tri-acylées, l'absence de pont formé par le ligand est en revanche compensée par une interaction plus forte entre TLR2 et TLR6 (Figure 1-I-13B) [85]. La dimérisation de TLR2 avec TLR1 ou TLR6 entraîne le recrutement de MyD88 et déclenche une cascade de signalisation aboutissant à la translocation dans le noyau du facteur de transcription NF- κ B. *In fine*, l'activation de NF- κ B induit la production de cytokines pro-inflammatoires [75]. La production de cytokines pro-inflammatoires, notamment le TNF- α ou l'IL-6, induites par *F. tularensis* est très majoritairement dépendante de TLR2 et de MyD88 dans les cellules dendritiques ou macrophages murins [86, 87]. TLR2 est indispensable à la défense de l'hôte contre l'infection puisque des souris déficientes pour le récepteur TLR2 succombent plus rapidement à une infection pulmonaire par la souche LVS que les souris sauvages. La production de cytokines pro-inflammatoires est également réduite dans les poumons de ces souris [88] [86].

Jusqu'à présent, deux ligands de TLR2 ont été identifiés pour la souche *F. tularensis* LVS. Il s'agit des lipoprotéines TUL4, également appelée LpnA, et FTT1103 [89]. Les fonctions physiologiques de ces protéines n'ont pas été décrites, la première intervient dans la stimulation des lymphocytes T [90]. Ces deux lipoprotéines sont agonistes du dimère TLR1/TLR2 comme démontré par l'utilisation de cellules HeLa exprimant chacun de ces récepteurs [89]. En revanche, le dimère TLR2/TLR6 n'est pas activé dans ces conditions, suggérant la nature tri-acylée de ces deux lipopeptides, comme cela a été montré pour TUL4 [91], et correspondant à la majorité des lipopeptides trouvés dans les bactéries à Gram négatif. Or, Katz *et al.* [87], ont précédemment montré que la production de TNF- α induite par la souche LVS était drastiquement réduite dans des cellules dendritiques déficientes pour le récepteur TLR6 mais inchangée dans des cellules dendritiques n'exprimant pas TLR1, suggérant un rôle important de TLR6 et non de TLR1 dans la réponse inflammatoire induite par *F. tularensis*. *In vivo*, les souris déficientes pour l'un ou l'autre de ces récepteurs ne sont

pas plus sensibles à une infection pulmonaire par la souche LVS que les souris sauvages, suggérant que ceux-ci ne sont pas impliqués dans la réponse de l'hôte à l'infection par *Francisella* [86]. Encore aujourd'hui, bien que l'implication de TLR2 ait été démontrée, le rôle de TLR1 et TLR6 dans la reconnaissance de *F. tularensis* n'est pas encore clairement défini. Bien que *Francisella* active le récepteur TLR2, elle possède aussi plusieurs mécanismes limitant la signalisation *via* ce récepteur. Notamment, Jones *et al.* [92] ont identifié un gène de *F. novicida*, le gène *FTN_0757*, permettant de réprimer l'expression de la lipoprotéine FTN1103, réduisant ainsi la signalisation par TLR2. *In vivo*, la souche déficiente pour le gène *FTN_0757* est nettement atténuée, démontrant l'importance pour *F. novicida* de limiter la signalisation induite par TLR2 [92].

De plus, *Francisella* peut également moduler activement la production de cytokines pro-inflammatoires. En effet, la souche de type A Schu S4 produit des lipides capables d'inhiber la production d'IL-12p40 dans des macrophages et des cellules dendritiques murins et humains, par au moins deux mécanismes différents dont l'un dépend de TLR2 et du récepteur PPAR- α [54, 93].

2) Phagocytose et cycle intracellulaire dans les macrophages

D'autres PRR sont présent à la surface des macrophages et sont impliqués dans l'internalisation de *F. tularensis*. L'implication de l'un ou l'autre de ces récepteurs a des conséquences différentes sur le cycle intracellulaire des bactéries.

a) Les récepteurs d'entrée

Plusieurs groupes ont participé à l'identification des récepteurs mis en jeu dans l'internalisation de *F. tularensis* par les macrophages. Bien qu'ayant utilisé des modèles cellulaires et des souches de *F. tularensis* différents, les données suggèrent que la phagocytose de *F. tularensis* est augmentée par une opsonisation préalable. La plupart des études se sont focalisées sur les opsonines sériques et, dans ce contexte, le facteur C3 du complément semble jouer un rôle primordial. En effet, lorsque les bactéries de la souche LVS ou d'une souche de type A sont opsonisées dans un sérum dépourvu du facteur C3, l'internalisation par des macrophages humains dérivés de monocytes (MDM) est fortement réduite. Cette internalisation, dépendante de C3, se fait par l'intermédiaire des récepteurs CR3 et CR4 [94]. Une autre famille de récepteur, les récepteurs Fc γ R, a aussi été montrée comme intermédiaire de l'internalisation des bactéries dans des MDM. En effet, le blocage simultané des trois classes de récepteurs Fc γ diminue de plus de 70 % l'association de *F. novicida* aux macrophages [95]. Enfin, d'autres récepteurs peuvent être impliqués dans la phagocytose opsonique de *F. tularensis*, tels que la nucléoline ou les récepteurs « scavenger » de classe A (SRA). L'internalisation de *F. tularensis* LVS dans des macrophages humains ou murins est en effet drastiquement réduite par des inhibiteurs des SR et augmentée par la présence de SRA,

mais uniquement en présence de sérum, indiquant un rôle des opsonines sériques dans ce mécanisme [96].

Finalement, une étude a montré que la nucléoline, une protéine intervenant dans la régulation de la prolifération cellulaire et l'internalisation de certains pathogènes viraux, exprimée en surface des cellules THP-1 agit comme un récepteur d'entrée des bactéries de la souche LVS *via* la liaison du facteur d'élongation Tu (EF-Tu) exposé à la surface de bactéries [97, 98]. L'opsonisation ne semble pas être indispensable pour l'internalisation de *F. tularensis* *via* la nucléoline [98].

Le rôle de tous ces récepteurs dans la phagocytose de *F. tularensis* a été déterminé *in vitro* en utilisant des bactéries opsonisées par du sérum humain. Dans le cas d'une infection pulmonaire, il est donc plus probable que ces récepteurs soient impliqués lors de la dissémination des bactéries dans le sang, puis dans les organes, plutôt que lors de la phase initiale de l'infection dans les poumons. En revanche, la collectine SP-A du surfactant pulmonaire pourrait quant à elle, jouer le rôle d'opsonine pour l'entrée de *F. tularensis* dans les macrophages alvéolaires. En effet, l'opsonisation préalable de *F. novicida* avec la SP-A augmente significativement son internalisation dans les MDM [95]. Le récepteur impliqué dans ce processus n'a pas été clairement identifié. Cependant, la SP-A pourrait faciliter la phagocytose de *F. novicida* *via* le récepteur au mannose (MR) ou les récepteurs scavengers comme décrit précédemment pour d'autres pathogènes intracellulaires [95]. Par ailleurs, cette même équipe a montré l'implication du MR dans la phagocytose non-opsonique de *F. novicida* par les MDM. Ce récepteur étant déjà connu pour être exploité par d'autres agents pathogènes, notamment *Mycobacterium tuberculosis*, comme une voie d'entrée silencieuse dans les macrophages, il est susceptible d'agir comme un récepteur permissif également dans le cas de *F. tularensis* [95].

b) Le devenir du phagosome conditionné par la voie d'entrée

La reconnaissance de *F. tularensis* par l'un ou plusieurs des récepteurs décrits ci-dessus entraîne son internalisation dans les macrophages *via* un procédé unique décrit par Clemens *et al.* [99], consistant en un réarrangement d'actine formant une large boucle autour de la bactérie. Le volume de cette boucle diminue ensuite lors du déplacement du FCP (*Francisella* containing phagosome) vers le centre de la cellule [99].

Dans les 5 premières minutes après l'infection de macrophages humains ou murins, le FCP contenant des bactéries de la souche Schu S4 ou LVS porte le marqueur EEA-1 des endosomes précoces [94, 100, 101].

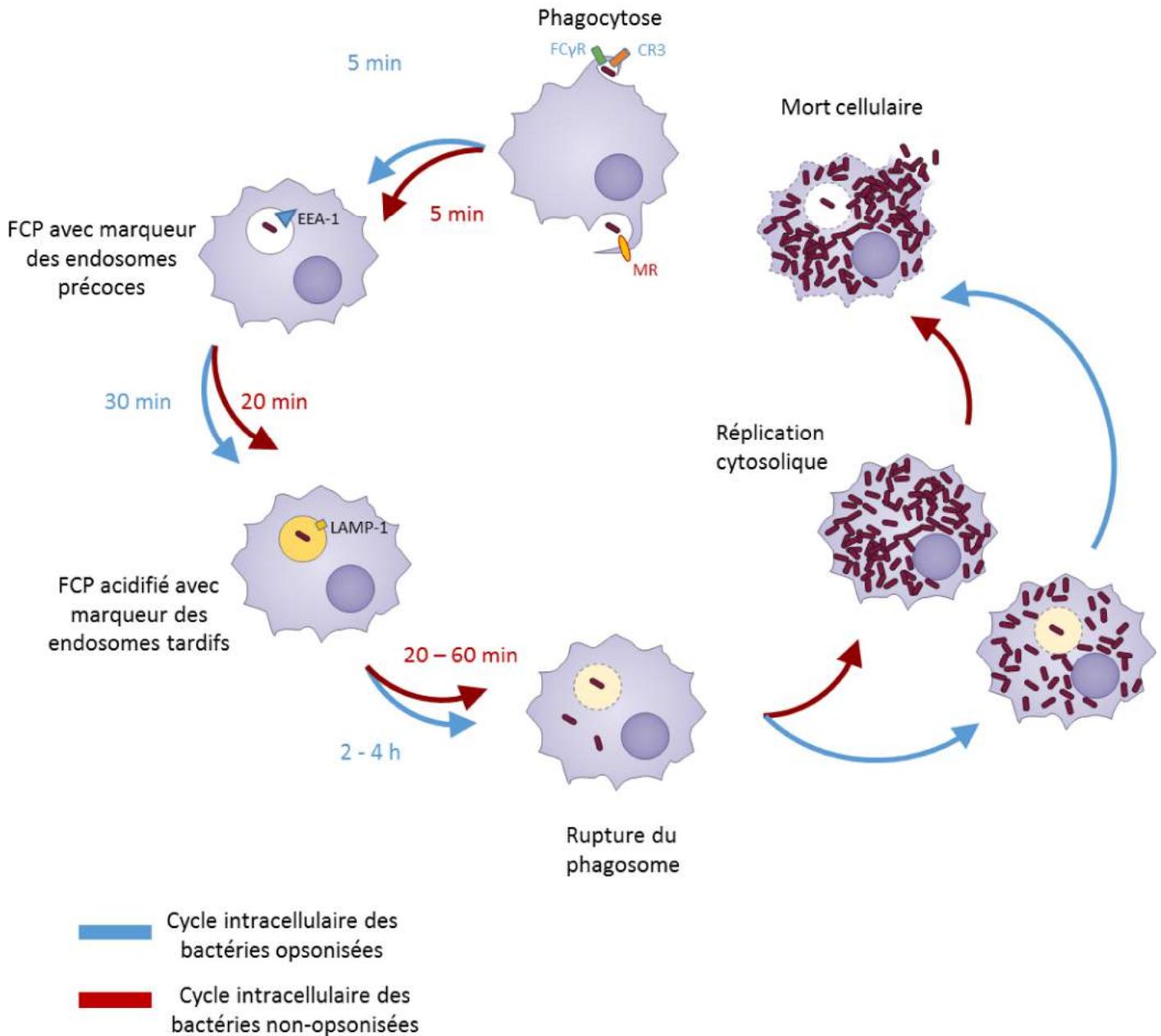


Figure 1-I-14 : Cycle intracellulaire de *F. tularensis* selon la voie d'entrée dans le macrophage

F. tularensis est internalisée via différents récepteurs selon les conditions (opsoniques ou non-opsoniques). Le phagosome contenant *Francisella* (FCP) acquiert rapidement le marqueur EEA-1 des endosomes précoces, puis LAMP-1, marqueur des endosomes tardifs, simultanément à l'acidification du compartiment. Suite à l'acidification du phagosome, les bactéries s'échappent dans le cytosol et s'y multiplient.

L'opsonisation altère le trafic intracellulaire de *F. tularensis* en ralentissant la maturation du phagosome et limite la croissance intracellulaire (en bleu) en comparaison aux bactéries non-opsonisées (en rouge).

Adapté de Chong *et al.*, 2010 [53].

En revanche, Geier & Celli [100] ont montré que le devenir du FCP et l'échappement du phagosome des bactéries de la souche virulente *F. tularensis* Schu S4, dépendaient de la voie d'entrée dans les macrophages murins. Dans cette étude, le FCP contenant les bactéries non-opsonisées acquiert en 20 minutes post-infection le marqueur LAMP-1 des endosomes tardifs. Ce marqueur disparaît à 60 minutes, ce qui est cohérent avec une rupture du phagosome. En effet, entre 20 et 90 min p.i., le pourcentage de bactéries cytosoliques passe de 20 à 90 %, traduisant un échappement du phagosome pendant ce laps de temps. En revanche, lorsque les bactéries sont opsonisées, la maturation du phagosome est retardée. En effet, l'acquisition du marqueur LAMP-1 n'a lieu qu'à partir de 30 min p.i.. L'échappement est aussi altéré dans ces conditions puisque le pourcentage de bactéries cytosoliques n'atteint que 50 % après 1 h d'infection.

L'acidification du compartiment est un élément clé dans la maturation du phagosome. Alors que Clemens *et al* [102] ont rapporté une absence d'acidification du FCP à 3 h p.i, plusieurs études s'accordent à dire que l'acidification a bien lieu mais de façon plus précoce, entre 15 et 60 min p.i. [100, 101, 103]. Ce désaccord pourrait donc provenir du moment où la mesure a été réalisée. En effet à 3 h p.i., la plupart des membranes phagosomales sont altérées et le pH dans le FCP s'équilibre avec celui du cytosol. De plus, l'acidification joue un rôle important dans l'échappement des bactéries du phagosome. En effet, lorsqu'elle est bloquée, les bactéries non-opsonisées ne sont détectées dans le cytosol qu'à partir d'une heure p.i., contre 20 minutes lorsque l'acidification a lieu [101]. Dans ces études, l'opsonisation des bactéries a été réalisée avec du sérum, favorisant ainsi une internalisation par le CR3 ou le FcγR. Ces récepteurs participent donc au contrôle de l'infection puisqu'ils retardent et limitent l'échappement du phagosome. De plus, le FcγR semble limiter la multiplication intracellulaire en induisant la production de ROS. A l'inverse, le MR favorise la croissance intracellulaire puisque dans des cellules déficientes pour ce récepteur, la prolifération intracellulaire des bactéries est divisée par deux [100]. La figure 1-14 résume le cycle intracellulaire de *Francisella* en fonction de la voie d'entrée des bactéries dans le macrophage.

La voie d'entrée détermine donc le devenir de *F. tularensis* dans le macrophage et les réponses de l'hôte associées. Cette bactérie semble, comme d'autres pathogènes intracellulaires, exploiter certains récepteurs, comme le MR, afin d'entrer dans la cellule et d'échapper très rapidement à l'environnement hostile du phagosome. Dans le cas où les bactéries sont préalablement opsonisées, leur internalisation est facilitée mais leur échappement du phagosome est aussi retardé, et *F. tularensis* doit donc faire face aux défenses anti-microbiennes mises en place au sein du FCP.

c) Résistance dans le phagosome

Afin de résister à ces mécanismes mais aussi de passer inaperçu lors de son internalisation dans le macrophage, *F. tularensis* a développé diverses stratégies d'échappement aux défenses de l'hôte. Le phagosome en particulier, ayant pour fonction physiologique de détruire les agents infectieux, devient, lors de sa maturation un environnement hostile pour les bactéries. En plus de l'acidification du milieu, d'autres mécanismes microbicides prennent place dans ce compartiment, tels que la production de ROS et RNS ainsi que de peptides antimicrobiens. Pour chacun de ces éléments de défense de l'hôte, *Francisella* a développé des stratégies d'échappement ou de résistance. Sa principale stratégie est de quitter rapidement le phagosome (1 h après l'infection) afin de limiter l'exposition aux éléments de défense de l'hôte.

La structure atypique du lipide A de *Francisella*, lui permet non seulement d'éviter la reconnaissance par TLR4 mais également de résister à d'autres mécanismes microbicides dont les peptides antimicrobiens. En particulier, les peptides antimicrobiens cationiques ciblent le LPS chargé négativement des bactéries à Gram négatif, par interactions électrostatiques afin de déstabiliser la structure de la bicouche lipidique constituant la membrane bactérienne (voir revues [104, 105]). L'absence du groupement phosphate en position 4' de la diglucosamine ainsi que l'addition d'une galactosamine sur le phosphate de la position 1 du lipide A de *Francisella* réduit la charge négative globale de la membrane bactérienne et limite les interactions électrostatiques entre celui-ci et les peptides antimicrobiens cationiques. En effet, une souche mutante de *F. novicida* déficiente pour le gène de la 4'-phosphatase *lpxF*, produisant un lipide A penta-acylé présentant un groupement phosphate en 4', est sensible à la polymyxine B et à la colistine, deux peptides antimicrobiens cationiques [106]. De plus, *in vivo*, cette souche est totalement avirulente chez les souris infectées par voies sous-cutanée ou pulmonaire démontrant une élimination efficace des bactéries. Des souris déficientes pour le récepteur TLR4 n'étant pas plus sensibles à l'infection, la perte de virulence n'est pas due à une meilleure reconnaissance de la souche $\Delta lpxF$, mais probablement à une plus grande efficacité des peptides antimicrobiens [106, 107]. La résistance de *Francisella* aux peptides antimicrobiens pourrait également être due à l'expression d'une pompe à efflux, lui permettant par ailleurs de résister aussi aux antibiotiques de la famille des β -lactames [108, 109].

Francisella est également capable de résister à l'acidification du FCP. Bien que les mécanismes exacts de cette résistance soient encore inconnus, des modifications structurales du lipide A observées en conditions de stress (basse température) sont également observées lors d'une diminution du pH, suggérant une adaptation des bactéries à cet environnement. En particulier, une forme plus polaire du lipide A possédant un hexose supplémentaire, apparaît en condition acide (cf Article – Chapitre 4). Cette modification observée dans le cas d'une culture en milieu acidifié, pourrait correspondre à celle observée dans le cas de bactéries

intracellulaires, indiquant qu'elle pourrait jouer un rôle dans la résistance au milieu intraphagosomal [110].

Francisella a également développé diverses stratégies d'échappement ou de résistance aux ROS produits dans le phagosome. Cette production est déclenchée par l'internalisation d'un agent infectieux dans le macrophage provoquant l'assemblage du complexe enzymatique de la NADPH oxydase au niveau de la membrane phagosomale. Ce complexe est responsable de la conversion des molécules d'oxygène en anion superoxyde (O_2^-) toxique *via* la production de produits intermédiaires nocifs pour les bactéries, tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Comme de nombreux pathogènes intracellulaires, *Francisella* a développé des mécanismes variés pour résister à la production de ROS. Elle peut, dans un premier temps, bloquer l'assemblage de la NADPH oxydase, puis inhiber la production de ROS ou enfin détoxifier ces espèces chimiques. En effet, grâce à 4 phosphatases acides, *F. novicida* et *F. tularensis* LVS sont capables de bloquer la formation du complexe de la NADPH oxydase. En particulier, la phosphatase acide AcpA, par la déphosphorylation des composants p47^{phox} et p40^{phox}, empêche leur translocation au niveau de la membrane phagosomale et inhibe ainsi l'assemblage complet du complexe enzymatique [111]. *F. tularensis* LVS est également capable d'empêcher la production de ROS induite par d'autres stimuli que la bactérie elle-même, par un mécanisme n'impliquant pas la déphosphorylation de p47^{phox}. Bien que le mécanisme exact ne soit pas encore décrit, ces données montrent l'existence d'une stratégie supplémentaire pour empêcher la production de ROS [112].

Enfin, bien que la majeure partie de cette production soit inhibée, *F. tularensis* possède des mécanismes lui permettant de résister à la faible quantité de ROS produite dans les phagosomes. Elle possède notamment des enzymes capables de détoxifier les espèces toxiques présentes. Ainsi, la catalase KatG exprimée par toutes les sous-espèces de *F. tularensis* leur confère une résistance au peroxyde d'hydrogène. En effet, *in vitro*, des souches déficientes pour cette enzyme sont sensibles à une exposition à H_2O_2 . En revanche, ces souches ne montrent pas de défaut de croissance dans les macrophages et ne sont que légèrement atténuées chez la souris [113]. Au contraire, la délétion de deux gènes codant pour les superoxyde dismutases *sodB* et *sodC*, rend la souche LVS quasiment avirulente chez la souris infectée par voie pulmonaire (20 % de mortalité contre 100 % pour la souche sauvage)[114]. Ces enzymes convertissent les anions superoxydes en O_2 , évitant ainsi l'accumulation d'espèces très toxiques.

L'ensemble de ces données montre que *F. tularensis* utilise diverses stratégies lui permettant d'éviter son élimination dans le phagosome pendant le court laps de temps où elle y réside avant de s'en échapper. Bien qu'elle puisse résister à cet environnement, l'échappement du phagosome est une condition nécessaire à la réplication intracellulaire pour toutes les espèces de *Francisella*.

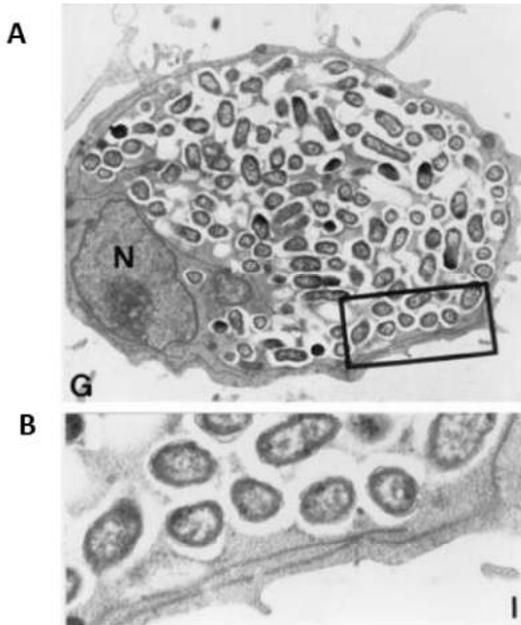


Figure 1-I-15 : Croissance cytosolique de *F. tularensis* LVS

Image de microscopie électronique à transmission d'un macrophage murin (J774) après 18 h d'infection par *F. tularensis* LVS (x 6000) (A). Bactéries intracellulaires (x 24000) (B).
Issue de Golovliov *et al.*, 2003 [104].

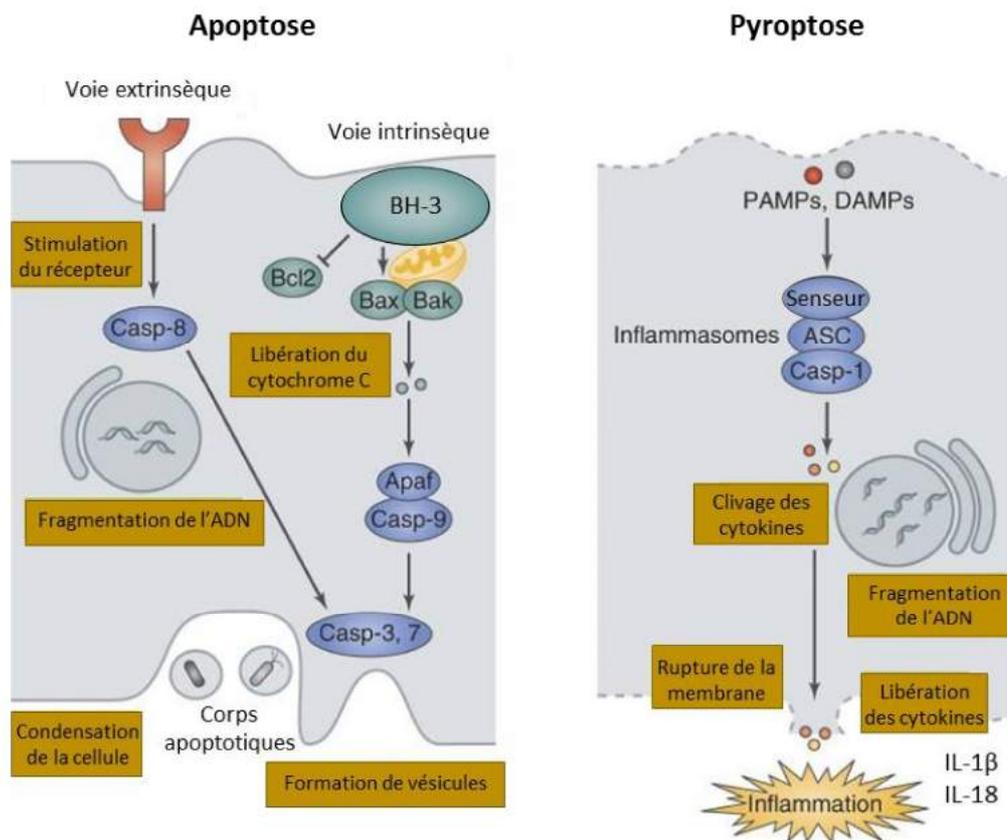


Figure 1-I-16 : Voies de signalisation conduisant à l'apoptose ou à la pyroptose

L'apoptose dépend de la caspase-3 et conduit à la formation de corps apoptotiques limitant la réponse inflammatoire. La pyroptose dépend de la caspase-1 et provoque la rupture de la membrane cellulaire et la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 β et l'IL-18.

Adapté de Ashida *et al.*, 2011 [110].

d) Croissance cytosolique et mort cellulaire

Bien que certaines bactéries se trouvent dans le cytosol à partir de 20 min post-infection, la multiplication n'est observée qu'à partir d'environ 4 h post-infection dans différents modèles cellulaires de macrophages murins ou humains, et avec les souches *F. tularensis* Schu S4, LVS ou *F. novicida*. La croissance intracellulaire varie selon les souches et la multiplicité d'infection (MOI) mais plusieurs études ont rapporté une augmentation du nombre de bactéries intracellulaires d'environ 2 log à 24 h p.i. [64, 115, 116]. La figure I-15 illustre la multiplication bactérienne intracellulaire dans des macrophages murins infectés par la souche LVS à 18 h p.i.. Dès 6 à 9 h en fonction des souches ou des MOI utilisées, une mortalité cellulaire due à l'infection est observée [117, 118].

Deux mécanismes de mort cellulaire peuvent survenir lors de l'infection par *F. tularensis* : l'apoptose et la pyroptose, dont les voies de signalisation sont représentées sur la figure 1-I-16 [119]. En effet, Lai *et al* [118] ont montré que la mort des macrophages murins de la lignée J774 infectés par la souche *F. tularensis* LVS était corrélée à l'activation de la caspase-9 puis de la caspase-3, toutes deux caractéristiques de l'apoptose, et survenait entre 9 et 12 h p.i.. De plus, *in vivo*, des souris infectées par voie intrapéritonéale avec une souche de type A montrent principalement des lésions associées à une mort cellulaire dépendante de la caspase-3 [120]. Les mécanismes déclencheurs de l'apoptose associée à l'infection par *F. tularensis* n'ont pas été clairement définis. Cette apoptose, contrairement à la pyroptose, déclenche une faible réponse inflammatoire et favoriserait donc la dissémination des bactéries.

Ainsi, les souches virulentes de *F. tularensis* induisent majoritairement une mort cellulaire par apoptose, contrairement à *F. novicida* et à la souche LVS qui induisent une mort cellulaire dépendante de la caspase-1 et de la molécule adaptatrice ASC caractéristiques de la pyroptose dans des macrophages murins péritonéaux [121]. Ce mécanisme de mort cellulaire constitue un important moyen de défense de l'hôte contre les bactéries intracellulaires puisqu'elle est associée à la production de cytokines pro-inflammatoires. La pyroptose résulte de l'activation d'un PRR multimoléculaire cytosolique : l'inflammasome. Dans les macrophages murins, *Francisella* active l'inflammasome AIM2 (Absent In Melanoma-2), du nom du senseur détectant l'ADN cytosolique [122]. Cette activation est la conséquence d'une coopération entre plusieurs PRR qui aboutit *in fine* au clivage de la pro-caspase-1, conduisant elle-même à la production des cytokines IL-1 β et IL-18 et à la mort cellulaire en quelques minutes seulement [117]. La réponse induite par l'inflammasome est notamment augmentée par l'IFN de type I et l'IFN- γ , produits suite à la détection d'ADN bactérien par le PRR cytosolique STING [122, 123, 124]. La signalisation induite par TLR2 joue également un rôle sur la cinétique d'activation de l'inflammasome. En effet, dans des BMDM déficients pour le récepteur TLR2, la mort cellulaire et la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 issues de l'activation de l'inflammasome sont retardées [125]. Dans les modèles murins, AIM2 a été

décrit comme le principal récepteur intervenant dans l'activation de l'inflammasome en réponse à l'infection par *Francisella*, bien qu'une étude récente ait montré un rôle pour le senseur NLRP3 dans ce processus également [126]. Dans les cellules de la lignée monocytique humaine THP-1, l'infection par *F. novicida* ou par la souche LVS induit une activation de ces deux inflammasomes, AIM2 et NLRP3, tous deux responsables de la production d'IL-1 β [127]. L'inflammasome joue un rôle clé dans la réponse de l'hôte à *Francisella*, puisqu'il a été montré *in vivo* que des souris déficientes pour la caspase-1 et ASC sont plus sensibles à l'infection par *F. novicida* que des souris sauvages [121]. Cependant, alors que des bactéries sont présentes dans le cytosol à partir d'une heure p.i., l'activation de l'inflammasome n'a lieu qu'entre 10 et 12 h post-infection. En effet, comme pour la plupart des défenses de l'hôte, *Francisella* évite ou retarde l'activation de l'inflammasome par divers mécanismes. Jusqu'à présent aucune étude n'a suggéré de mécanisme actif d'inhibition de la voie de l'inflammasome. Il semblerait que la principale stratégie exploitée par *Francisella* soit de limiter la libération de produits bactériens, notamment l'ADN, afin d'éviter leur détection par différents PRR (AIM2, STING). De la même façon, moduler l'expression de ses lipoprotéines afin de limiter la signalisation induite par TLR2 (cf paragraphe II-B1) est aussi une façon de limiter l'activation de l'inflammasome (voir revue [128]).

3) Réponse inflammatoire et sepsis

a) L'infection systémique et le déclenchement de la réponse inflammatoire

Les divers mécanismes d'échappement et même d'inhibition de la réponse immunitaire innée développés par *F. tularensis* lui permettent de se multiplier en très grand nombre sans induire de réponse antimicrobienne efficace. Cela se traduit *in vivo*, comme l'ont montré Mares *et al.* [67] par une absence de cytokines pro-inflammatoires et de neutrophiles dans les poumons de souris infectées par *F. novicida* jusqu'à trois jours p.i.. Durant cette période, *Francisella* se multiplie tout d'abord dans les poumons, seul organe colonisé 24 h p.i.. Puis entre 24 et 48 h, des bactéries sont détectées dans le sang. Transportées par la circulation sanguine, les bactéries disséminent alors dans tout l'organisme et colonisent en particulier le foie et la rate. Des études réalisées chez des souris infectées par voie pulmonaire avec 300 CFU des souches *F. novicida* ou Schu S4 démontrent une cinétique similaire avec des charges bactériennes à 72 h p.i. atteignant 10⁸ bactéries dans les poumons, le foie et la rate et 10⁵ à 10⁶ dans le sang [68, 129]. Les études réalisées chez la souris indiquent qu'à ce stade, une réponse inflammatoire systémique est déclenchée, caractérisée par une production brutale et massive de cytokines qualifiée de tempête cytokinique. Cette inflammation est provoquée d'une part, par la présence d'un grand nombre de bactéries et par conséquent de PAMP, qui malgré les mécanismes d'échappement de *Francisella*, finissent par induire une réponse de l'hôte. D'autre part, des facteurs endogènes libérés par les cellules mourantes, les alarmines ou

DAMP, sont également à l'origine de cette inflammation soudaine et exacerbée. En effet, l'équipe de J. Sharma a montré l'implication de deux alarmines, les galectines 3 et 9 dans la pathologie inflammatoire associée à l'infection pulmonaire par *F. novicida*. Des souris déficientes pour ces deux facteurs présentent une production de cytokines ainsi qu'un recrutement cellulaire plus modérés dans les poumons 3 jours après l'infection. De ce fait, la pathologie inflammatoire est réduite dans ces souris augmentant ainsi leur survie en comparaison aux souris sauvages [130, 131].

La bactériémie, la tempête cytokinique, ainsi que la libération de DAMP sont les caractéristiques d'un sepsis [67, 68, 129]. Le sepsis est une réponse inflammatoire généralisée non-contrôlée provoquée par une infection, qui débute par une tempête cytokinique impliquant des chimiokines, responsables du recrutement massif de cellules immunitaires dans les tissus infectés, ainsi que des facteurs de coagulation. Sans régulation, les neutrophiles et monocytes recrutés en masse provoquent alors de graves lésions tissulaires, tandis que la dérégulation de la cascade de coagulation aboutit à une coagulation intravasculaire pouvant provoquer des défaillances d'organes [132]. Ces éléments sont également observés dans le cas de l'infection pulmonaire par *Francisella*. En effet, la tempête cytokinique observée 3 jours p.i. s'accompagne de l'augmentation drastique du nombre de neutrophiles dans les poumons, ainsi que d'une production importante de protéines impliquées dans la cascade de coagulation, appelées protéines de la phase aigüe [67, 129]. Au même moment, des lésions nécrotiques apparaissent dans les poumons, le foie et la rate, provoquées par une accumulation de cellules, principalement des neutrophiles, dans les tissus.

Ces études ont été réalisées chez la souris, mais cette évolution a également été décrite pour deux espèces de primate non-humain : le singe vert africain et le macaque cynomolgus. En effet, les singes exposés à des aérosols contenant 1000 CFU de la souche virulente Schu S4, présentent une bactériémie à partir de 4 jours p.i.. Entre 4 et 6 jours p.i., apparaît également une augmentation drastique de cytokines pro-inflammatoires dans le sérum [133]. Les lésions tissulaires décrites dans les modèles animaux correspondent aux lésions pulmonaires observées chez l'homme, suggérant une évolution similaire de la pathologie.

La réponse inflammatoire induite par l'infection pulmonaire par *Francisella* étant déclenchée une fois l'infection disséminée, est trop tardive pour parvenir à éliminer les bactéries, et, est trop importante, provoquant des dommages tissulaires graves.

Pour cette raison, l'inflammation est tenue pour principale responsable de la mortalité associée aux infections pulmonaires par *F. tularensis* [70].

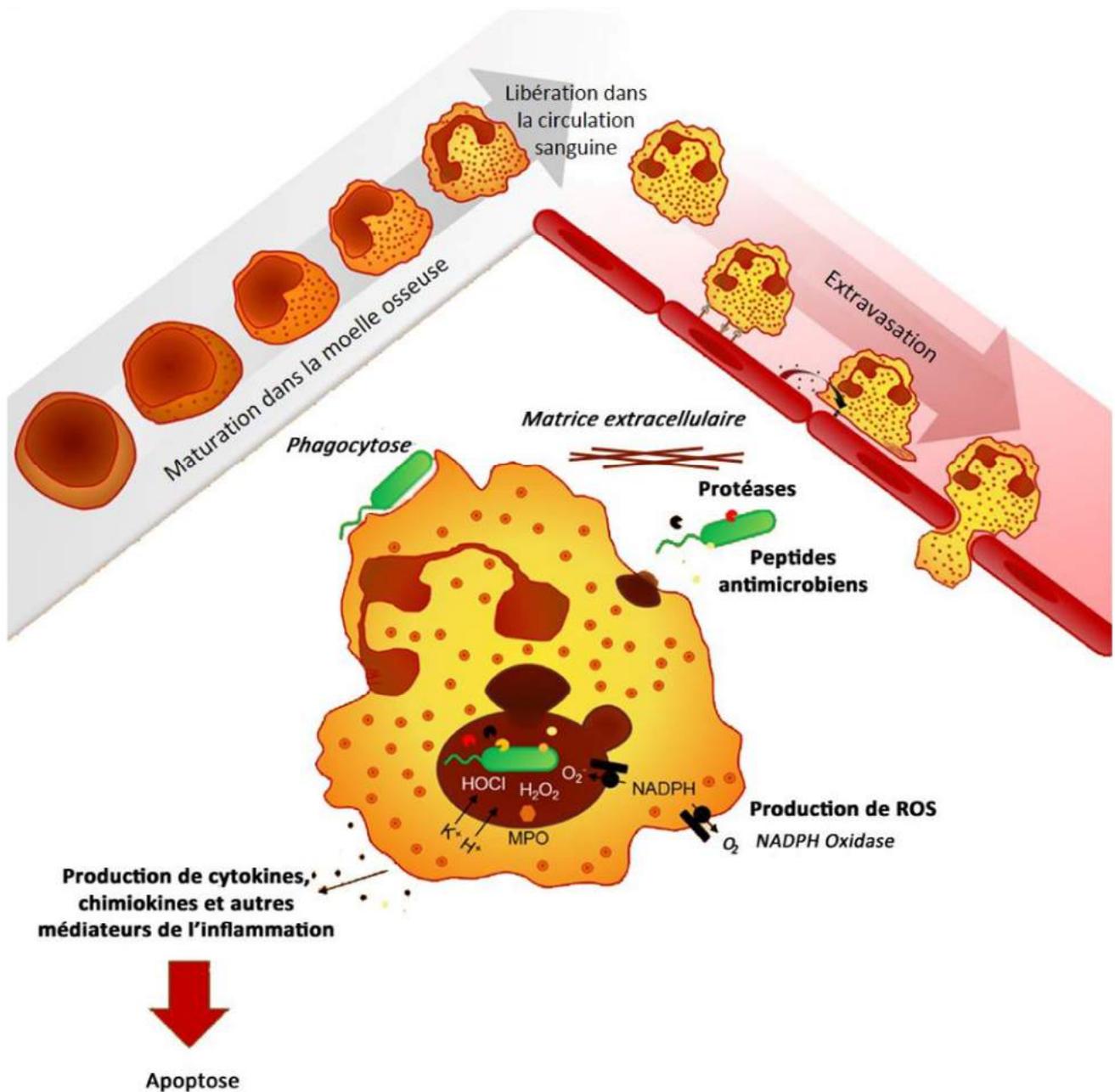


Figure 1-I-17 : Cycle de vie des neutrophiles

Les neutrophiles sont différenciés dans la moelle osseuse, puis libérés dans la circulation sanguine et recrutés au niveau des sites infectieux où ils phagocytent les microorganismes et libèrent plusieurs composants microbicides (peptides antimicrobiens, protéases), puis entrent en apoptose.

Adapté de Kruger *et al.*, 2015 [120].

b) Le rôle ambigu des neutrophiles dans la pathologie

Les neutrophiles sont différenciés dans la moelle osseuse à partir des cellules progénitrices myéloïdes. Une fois matures, ils circulent dans le sang et sont les premières cellules recrutées sur les sites infectieux. Leur migration est orientée par des gradients de chimiokines, elle-mêmes sécrétées par les cellules infectées. Leur rôle physiologique est d'internaliser, puis de détruire les microbes *via* la libération de divers facteurs anti-microbiens dans le phagosome (Figure 1-I-17). Ces cellules peuvent également libérer des composés nocifs pour les bactéries dans l'espace extracellulaire. L'une des caractéristiques de ces phagocytes est leur courte durée de vie. En effet, dans des conditions non-pathologiques, environ 24 h après leur libération dans la circulation, les neutrophiles entrent en apoptose. La phagocytose d'un agent infectieux accélère ce processus et entraîne l'élimination des neutrophiles apoptotiques par les macrophages. De cette façon, la libération du contenu cytotoxique et très inflammatoire des neutrophiles dans le milieu extracellulaire est évitée. La phagocytose des neutrophiles apoptotiques conduit les macrophages à adopter un phénotype de résolution de l'inflammation, indispensable pour la réparation des tissus (voir revues [69 , 134]).

Le rôle des neutrophiles dans le contrôle de l'infection par *Francisella* est ambigu. Alors que ceux-ci sont indispensables pour la défense contre des infections intradermiques par la souche LVS, leur rôle paraît plus limité pour contrôler les infections pulmonaires par cette même souche et constituent une niche de réplication pour *Francisella* [135 , 136]. En effet, des souris rendues neutropéniques par traitement avec un anticorps, et infectées par voie pulmonaire par la souche LVS, présentent une charge bactérienne identique dans les poumons et inférieure de 0,5 log dans la rate et le foie relativement aux souris non-traitées [135]. Au contraire, les souris non-traitées infectées par voie intradermique présentent 5 fois moins de bactéries dans les poumons par rapport aux souris neutropéniques. Ces données indiquent un rôle mineur des neutrophiles dans le contrôle de l'infection pulmonaire par *F. tularensis*. Ceci ne provient pas d'un défaut dans le recrutement de ces phagocytes puisque, malgré un délai initial, le nombre de neutrophiles dans les poumons augmente drastiquement au bout de 3 jours après l'infection [67]. Cependant, les cellules phagocytaires étant la cible privilégiée de *Francisella*, celle-ci est capable d'infecter les neutrophiles et de résister aux mécanismes microbicides dans ces cellules, de la même façon que dans les macrophages. En effet, une étude des populations cellulaires infectées par *Francisella* indique que les neutrophiles représentent 50 à 80 % des cellules infectées dans les poumons à 72 h p.i., selon la souche [22].

De plus, afin de maintenir cet environnement de réplication, *F. tularensis* SchuS4 et LVS inhibent les voies d'induction de l'apoptose des neutrophiles et prolongent ainsi leur durée de vie [137]. Les neutrophiles participent donc indirectement à la prolifération bactérienne. De plus, ces cellules sont très largement impliquées dans les lésions observées dans les organes. En effet, des études de la pathologie associée à *F. tularensis* Schu S4 ou *F. novicida*

montrent, par analyses histologiques, que les zones de nécrose dans les poumons, le foie et la rate sont majoritairement composées de neutrophiles, associés à de nombreux débris cellulaires [68, 129, 135]. Une autre étude appuie également le rôle délétère des neutrophiles. En effet, Malik *et al.* [138], ont montré que des souris déficientes pour la metalloprotéinase 9 (MMP-9), impliquée dans le recrutement des neutrophiles, étaient plus résistantes aux infections pulmonaires par les souches LVS et Schu S4. Ces souris dont les poumons contiennent moins de neutrophiles que les souris sauvages, présentent des lésions moins importantes dans les poumons, le foie et la rate [138]. L'ensemble de ces données indique que, non seulement les neutrophiles semblent avoir un rôle limité dans le contrôle des infections pulmonaires par *Francisella*, mais qu'ils sont majoritairement impliqués dans les lésions inflammatoires létales associées à la tularémie pulmonaire.

III – Thérapies ciblant l'hôte

Les maladies infectieuses sont l'une des causes majeures de mortalité dans le monde. En particulier, les infections respiratoires (hors tuberculose), responsables de 2,7 millions de morts en 2013, représentent la deuxième cause mondiale de mortalité. Même dans les pays développés, bénéficiant d'un accès facilité aux antibiotiques, les infections pulmonaires restent la 9^{ème} cause de mortalité [139].

Le traitement des pneumonies infectieuses, tout comme la tularémie pulmonaire, est basé sur l'antibiothérapie. Au-delà des limites évoquées au paragraphe I-F-2b dans le contexte du traitement de la tularémie, un problème plus global se pose quant à l'utilisation unique des antibiotiques : le phénomène de résistance. En effet, bien que les antibiotiques constituent probablement l'une des plus grandes avancées de l'histoire de la médecine, ayant permis d'éradiquer certaines des maladies infectieuses les plus mortelles [140], depuis le début du 21^{ème} siècle, l'apparition croissante de bactéries résistantes à un ou plusieurs antibiotiques soulève de nombreuses inquiétudes. Un rapport de l'OMS paru en 2014 suggère qu'une ère post-antibiotique est sur le point de commencer, dans laquelle n'importe quelle infection mineure pourra tuer. Ce rapport indique que pour toutes les bactéries provoquant les infections les plus courantes (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, etc...) des souches résistantes aux antibiotiques de première, voire de seconde, lignes sont présentes dans la plupart des pays. La tuberculose, l'une des maladies infectieuses les plus meurtrières au monde, mais aussi l'une des plus étudiées, en est un exemple. D'après le rapport de l'OMS, 3,6 % des nouveaux cas déclarés de tuberculose et 20,2 % des cas préalablement traités sont résistants à plusieurs antituberculeux [141].

La vaste majorité des antibiotiques utilisés à l'heure actuelle a été découverte pendant l'âge d'or des antibiotiques, entre 1950 et 1970, et alors que l'émergence de souches résistantes rend la recherche de nouveaux traitements antimicrobiens nécessaire, aucune nouvelle classe d'antibiotique n'a été découverte depuis plus de 20 ans. En effet, des modifications structurales ont été apportées aux antibiotiques existants, sans en faire varier la cible bactérienne, ne permettant pas de lutter contre des microorganismes résistants. Au-delà du défi scientifique que constitue l'identification de nouvelles cibles et de nouvelles molécules, d'autres facteurs rendent difficile le développement de nouveaux antibiotiques. Notamment, le manque d'investissement des industries pharmaceutiques, lié à une rentabilité insuffisante des antibiotiques, peut être mis en cause (voir revues [140, 142, 143]). Cependant, l'intérêt de développer de nouveaux antibiotiques reste relatif, puisque les bactéries seront *a priori* capables de s'adapter, et l'apparition de souches résistantes à ces nouveaux composés ne serait donc qu'une question de temps [140].

La problématique liée aux antibiotiques a contribué au développement de nouvelles stratégies anti-infectieuses ciblant, non pas l'agent pathogène, mais les réponses immunitaires de l'hôte.

En effet, le caractère pathogène d'un agent infectieux relève autant de sa capacité à persister et à se développer dans l'organisme que de l'incapacité de l'hôte à l'éliminer. De plus, dans de nombreux cas d'infections pulmonaires, et notamment dans le cas de la tularémie, les réponses déclenchées par l'hôte dans l'objectif d'éliminer l'infection sont délétères pour l'hôte, aggravant la pathologie (cf paragraphe II-B-3). Les thérapies ciblant l'hôte (« Host-Directed Therapies », HDT) regroupent l'utilisation de tous les composés destinés à améliorer les mécanismes de défenses de l'hôte, afin de faciliter l'élimination de l'agent pathogène, ou moduler les réponses inflammatoires excessives, et ainsi de réduire la pathologie [144].

Les HDT présentent plusieurs avantages. Tout d'abord, l'agent infectieux n'étant pas la cible du traitement, le développement de résistance devrait être évité. De plus, les stratégies visant notamment les réponses immunitaires innées, qui sont communes à de nombreux agents infectieux, peuvent être utilisées contre un large spectre de pathogènes. Enfin, même si une antibiothérapie peut être nécessaire pour éliminer l'infection, les HDT peuvent être administrées en complément, afin de potentialiser l'effet des antibiotiques et de limiter la durée des traitements ou de réduire les doses administrées.

A) Différentes stratégies thérapeutiques

Les HDT peuvent moduler la réponse immunitaires aussi bien innée qu'adaptative. Deux grandes stratégies de thérapies font actuellement l'objet de recherches plus ou moins avancées : i) l'immunostimulation, afin de favoriser l'élimination de l'infection en stimulant les mécanismes de défense de l'hôte, et ii) l'immunomodulation, afin de réduire la pathologie associée notamment à l'inflammation. La première s'applique principalement à des traitements prophylactiques ou intervenant de façon précoce dans la pathologie, contrairement à la seconde, qui, ciblant la réponse de l'hôte déclenchée par l'infection, peut être utilisée plus tardivement.

Ci-dessous, quelques exemples de HDT actuellement au stade clinique ou pré-clinique pour le traitement d'infections respiratoires, chronique (principalement la tuberculose) ou aiguës.

1) Immunostimulation

Cette stratégie a particulièrement été étudiée dans le cadre d'infections chroniques, notamment la tuberculose, pour lesquelles l'administration d'un tel traitement peut avoir lieu dans une large fenêtre de temps. Dans ce contexte, des thérapies adjuvantes par administration de cytokines, telles que l'IL-2, le GM-CSF, l'IFN- γ ou l'IL-12 permettent d'augmenter les signaux pro-inflammatoires et ainsi stimuler la prolifération, le recrutement et l'activation des macrophages, cellules dendritiques, monocytes et cellules T requis pour éliminer l'agent infectieux.

Des thérapies cellulaires sont également à l'étude, consistant à administrer des cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse du patient. Ces cellules ont la double

fonction de limiter l'inflammation et d'augmenter la réparation des tissus, mais également de restaurer une réponse immunitaire, notamment *via* l'activation des cellules T [144 , 145].

La mise en place de ce type de traitement est délicate et son efficacité dépend très étroitement du temps auquel il serait administré. En effet, les pneumonies aiguës sont caractérisées par une réponse inflammatoire intense pouvant provoquer, dans les cas les plus sévères, un sepsis ou un syndrome de détresse respiratoire aiguë [145]. Dans le cas de la tuberculose, les patients souffrent, eux, d'une inflammation chronique. En favorisant cette inflammation et en aggravant ainsi la pathologie inflammatoire, les traitements immunostimulants pourraient donc être plus délétères que bénéfiques dans un contexte d'infection pulmonaire.

2) Immunomodulation

L'immunomodulation est le terme généralement utilisé pour des stratégies consistant à réguler négativement la réponse immunitaire. Celle-ci est également étudiée dans le cadre du traitement des infections respiratoires chroniques ou aiguës. En effet, comme évoqué précédemment, l'inflammation joue un rôle clé dans ces pathologies, et une absence de régulation de la réponse inflammatoire peut conduire à des conséquences graves (sepsis, détresse respiratoire, endommagement d'organes, etc...), en grande partie responsables de la mortalité associée aux pneumonies [145]. De ce fait, des thérapies destinées à moduler cette réponse inflammatoire pourraient apporter un bénéfice en réduisant l'impact négatif de l'inflammation sur les tissus et les organes.

A l'inverse de la thérapie basée sur l'administration de cytokines citée dans le paragraphe précédent, des anticorps dirigés contre certaines cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- α ou l'IL-6, sont actuellement en phase d'essai pré-clinique. Ces anticorps permettent de bloquer l'action de ces cytokines et limitent ainsi l'inflammation réduisant également la destruction tissulaire associée [144].

De plus, divers composés anti-inflammatoires, tels que les corticostéroïdes ou les anti-inflammatoires non-stéroïdiens, peuvent également être utilisés dans le cadre du traitement des infections respiratoires. Enfin, les HDT ont également donné l'occasion de repositionner certaines molécules, tels que les statines ou les macrolides, indiquées pour le traitement de maladies métaboliques ou de cancers, possédant des propriétés immunomodulatrices. Ces deux familles sont également évaluées pour le traitement des pneumonies infectieuses (voir revues [144, 146]).

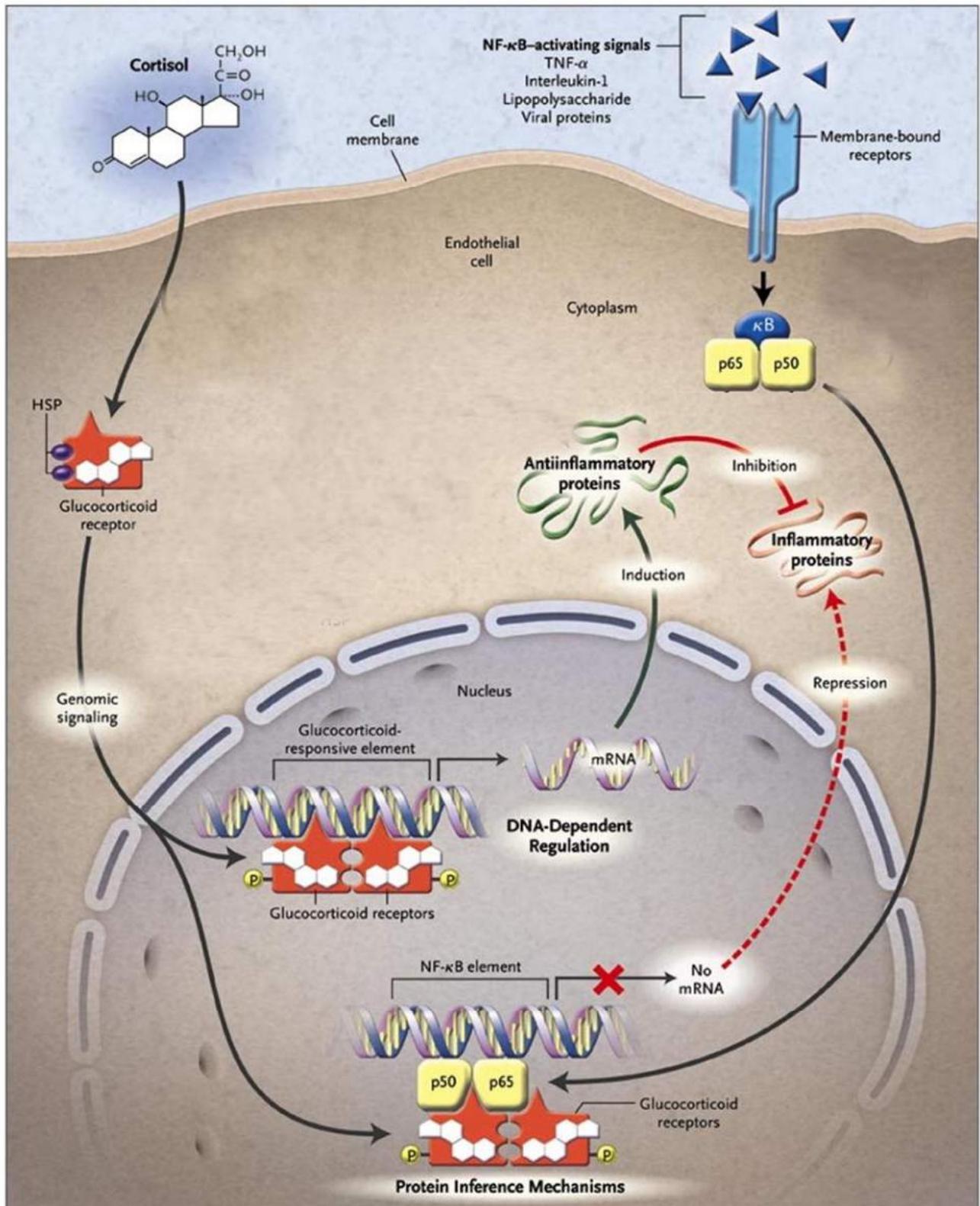


Figure 1-I-18 : Mécanismes anti-inflammatoires des corticostéroïdes

Le cortisol associé au récepteur des glucocorticoïdes forme un complexe (GR-cortisol) qui, en se liant à l'ADN, entraîne la transcription de gènes codant pour des protéines anti-inflammatoires. Ce même complexe peut interférer avec NF-κB et modifier son activité transcriptionnelle déclenchée par l'activation de PRR, bloquant ainsi la production de protéines inflammatoires.

Issu de Rhen *et al.*, 2005 [138].

a) Les glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes, sont les anti-inflammatoires les plus puissants existants à l'heure actuelle. Ces hormones interviennent à plusieurs niveaux de la régulation de l'inflammation. Au niveau transcriptionnel, la liaison du cortisol, l'hormone issue de la conversion enzymatique de la cortisone, au récepteur des glucocorticoïdes (GR) entraîne la translocation du complexe GR-cortisol vers le noyau. Ce complexe, en se liant à des séquences spécifiques de l'ADN, provoque une modification de la structure de la chromatine, inhibant ainsi la transcription de cytokines pro-inflammatoires et favorisant celle des cytokines anti-inflammatoires. Le complexe cortisol-GR peut également interagir directement avec NF- κ B et bloquer son activité transcriptionnelle, inhibant ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires. Enfin, ces hormones peuvent moduler la sécrétion de médiateurs de l'inflammation, tels que les prostaglandines, en faisant intervenir différentes voies de signalisation (Figure 1-I-18) (voir revues [146, 147]). Depuis une vingtaine d'années, plusieurs essais cliniques ont été réalisés pour déterminer les bénéfices d'une thérapie adjuvante par les glucocorticoïdes dans le traitement des pneumonies infectieuses. Alors qu'une étude réalisée sur 30 patients ne montre aucun effet de l'utilisation d'hydrocortisone [148], plusieurs autres études ont montré que le traitement par différents dérivés de la cortisone raccourcissait la durée d'hospitalisation des patients, de 7,5 à 6,5 jours [149], ou améliorait les paramètres cliniques de la pneumonie plus rapidement (oxygène dans le sang, score radiographique, etc...) par rapport au traitement par un placebo [150]. Bien que les conclusions de certaines de ces études soient divergentes, la plupart d'entre elles montre une amélioration de la pathologie, bien que légère, associée au traitement, en particulier pour les patients les plus gravement atteints, souffrant de pneumonie « hyperinflammatoire ». Cependant, certains effets secondaires lourds apparaissent lors de traitements prolongés. Pour cette raison, l'utilisation de corticostéroïdes pour le traitement des infections pulmonaires aiguës n'est pas recommandé systématiquement [145, 146, 147].

b) Les statines

Les statines sont des inhibiteurs de la réductase HMG-CoA (3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A), une enzyme intervenant dans la voie de synthèse du cholestérol. Pour cette raison, ces composés sont habituellement prescrits dans les cas d'hypercholestérolémie afin de diminuer le risque d'accidents cardiovasculaires [151, 152]. En inhibant la synthèse du cholestérol, les statines limitent également la production de plusieurs intermédiaires impliqués dans différentes fonctions cellulaires, notamment la réponse immunitaire innée et l'inflammation. Tout comme les corticostéroïdes, les statines agissent à différents niveaux de la réponse inflammatoire. Ils diminuent notamment l'activation de NF- κ B, conduisant à la réduction de la production de chimiokines, telles que MCP-1 ou l'IL-8, réduisant *in fine* le recrutement cellulaire au niveau des sites infectieux. Les statines sont également des inhibiteurs de la cyclo-oxygénase 2. Cette enzyme intervient dans la voie de synthèse de

médiateurs lipidiques de l'inflammation, comme les prostaglandines ou les leucotriènes qui jouent un rôle dans la perméabilité vasculaire ou la vasodilatation (voir revues [146 , 153 , 154]). Plusieurs observations cliniques ont montré que les patients préalablement traités avec des statines pour une hypercholestérolémie, et contractant une pneumonie, étaient moins nombreux à souffrir de complications. Notamment, moins de syndrome de détresse respiratoire aigues et de sepsis ont été observés chez ces patients en comparaison aux patients non-traités [155]. Toutes ces études suggèrent un effet bénéfique des statines sur les infections pulmonaires aigues. Cependant, ces données, basées uniquement sur des études rétrospectives, pourraient être biaisés. Des essais cliniques sur des sujets choisis aléatoirement apporteraient plus de certitude quant à l'efficacité de ce traitement. De plus, les patients observés étaient déjà sous traitement au moment de l'infection, et aucune étude n'a été réalisée sur l'effet de l'administration de statines après l'apparition de la pneumonie. Pour ces différentes raisons, des études supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer le potentiel thérapeutique des statines dans le traitement des infections respiratoires aigües [144, 146].

c) Les macrolides : antibiotiques anti-inflammatoires

Les macrolides sont une famille d'antibiotiques inhibant la synthèse protéique et qui possèdent également des propriétés anti-inflammatoires indépendantes de leur activité microbicide. Aussi bien *in vitro*, qu'*in vivo* chez des patients atteints de pneumonies infectieuses, les macrolides réduisent la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6 et favorisent la production d'IFN- γ et de cytokines anti-inflammatoires, telles que l'IL-10. Cette inhibition est la conséquence d'un mécanisme complexe interférant avec de multiples voies de signalisation aboutissant à un effet inhibiteur des facteurs de transcription NF- κ B ou AP-1 [156]. Cet effet ayant également été observé chez des souris infectées par des bactéries résistantes aux macrolides, la réduction des cytokines pro-inflammatoires est bien due à un effet indépendant de l'effet antibiotique des macrolides [157]. Ces composés ont également un effet sur les fonctions des neutrophiles. En effet, ils réduisent la libération, par ces cellules, de monoxyde d'azote impliqué dans les dommages tissulaires liés à l'inflammation. Ils semblent également favoriser l'apoptose de ces cellules, évitant ainsi leur accumulation dans les poumons, et limitant la destruction des tissus [157]. Aucun essai clinique à proprement parlé n'a été mené sur l'effet des macrolides dans le traitement des infections pulmonaires. Toutefois plusieurs études rétrospectives ont été réalisées. Certaines n'ont montré aucun effet de ces molécules dans le traitement des pneumonies infectieuses. Cependant, une majorité d'entre elles indiquent un taux de mortalité réduit pour les patients traités avec des combinaisons d'antibiotiques contenant des macrolides, comparativement aux patients recevant la même combinaison sans macrolides. Bien que l'association des effets antibiotique et anti-inflammatoire semble optimale pour le traitement des infections pulmonaires, les lourds effets secondaires associés aux macrolides, ainsi que le risque d'apparition de résistance peuvent contrebalancer les effets thérapeutiques de ces composés. Pour ces raisons, des études plus complètes sont nécessaires afin de conclure sur leur utilisation pour le traitement des pneumonies aiguës [144, 146].

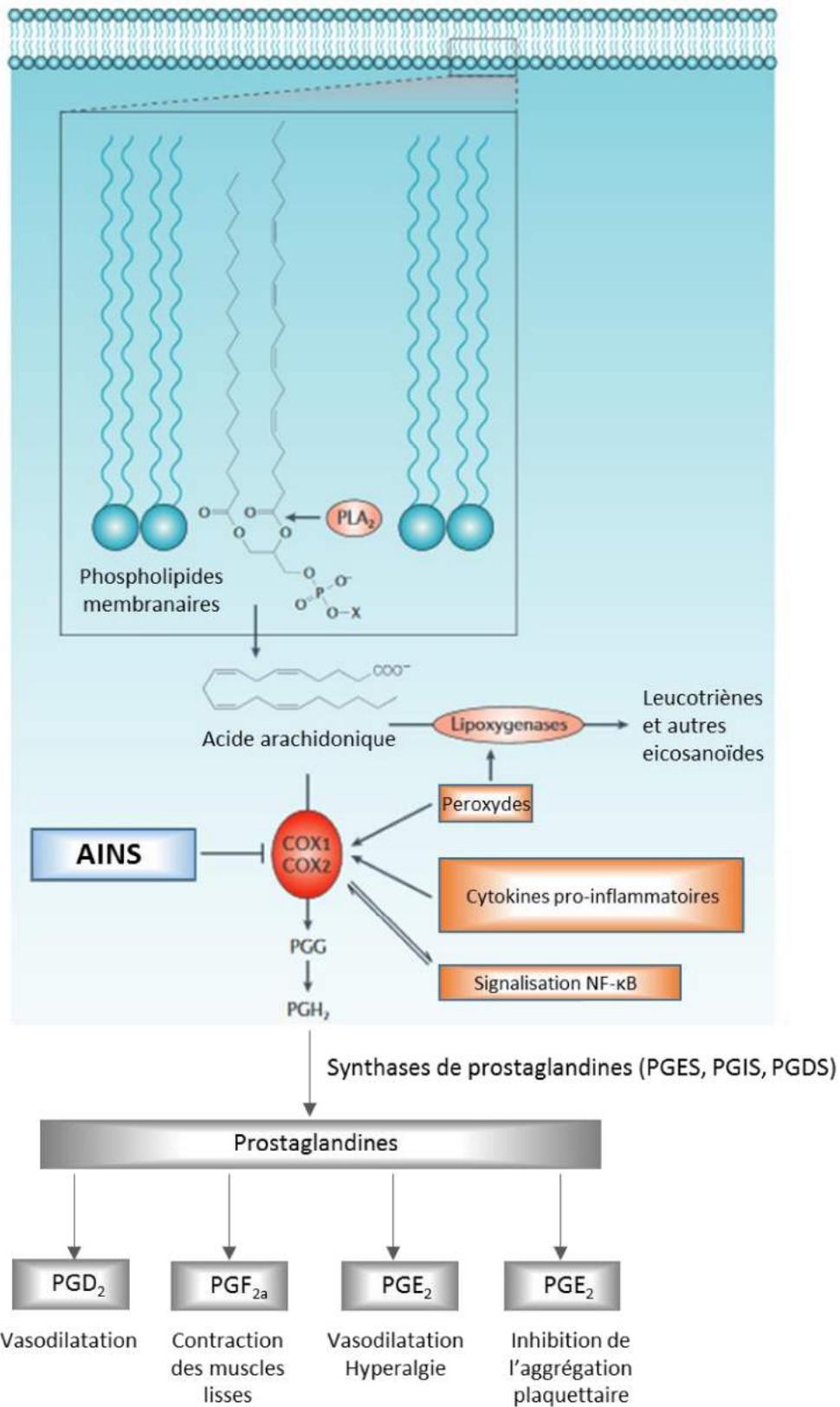


Figure 1-I-19 : Biosynthèse des médiateurs lipidiques de l'inflammation et action des AINS

L'acide arachidonique, issu des phospholipides membranaires peut être transformé par des lipoxygénases en leucotriènes ou en prostaglandines par les cyclo-oxygénases 1 et 2 (COX-1 et COX-2). Les prostaglandines jouent des rôles divers sur l'inflammation, comme décrit sur le schéma. Les AINS sont des inhibiteurs des COX, limitant ainsi la synthèse des prostaglandines et leur effets inflammatoires.

Adapté de Ulrich *et al.*, 2006 [146] et Kroesen *et al.*, 2017 [151]

d) Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) comprennent plusieurs composés, dont les plus couramment utilisés sont l'ibuprofène et l'aspirine. Les AINS peuvent avoir des structures très variées mais possèdent un mode d'action très similaire. Ces composés sont des inhibiteurs des cyclo-oxygénases (COX) COX-1 et COX-2. Ces enzymes catalysent la transformation de l'acide arachidonique, libéré à partir des phospholipides membranaires, en prostaglandines. Ces dernières sont des médiateurs lipidiques de l'inflammation qui jouent un rôle dans divers processus inflammatoires, notamment la perméabilité vasculaire et la vasodilatation, ainsi que dans l'induction de la douleur et de la fièvre (Figure 1-I-19) [158 , 159 , 160]. Dans plusieurs études cliniques sur des patients atteints de pneumonie, les AINS n'ont pas montré d'effet bénéfique majeur sur l'évolution de la pathologie, excepté une amélioration de quelques paramètres, tels que la fièvre ou la tachycardie, sans ralentir ou réduire la durée de la maladie, ni l'aggravation en syndrome de détresse respiratoire aigu [161 , 162 , 163]. En revanche, les AINS ont montré des effets plus prometteurs dans le cadre du traitement d'infections respiratoires chroniques, telles que la tuberculose où, associés à des antibiotiques, ils permettent de réduire la charge bactérienne et d'améliorer la pathologie chez la souris [164]. Ces résultats proviennent d'études sur des modèles animaux ou d'essais pré-cliniques, et des recherches plus approfondies sont nécessaires afin de déterminer de façon plus générale, le bénéfice des AINS dans le traitement des infections pulmonaires aiguës ou chroniques (voir revue [165]).

L'ensemble des études sur les modèles animaux ou des analyses rétrospectives a montré des effets bénéfiques de ces composés anti-inflammatoires sur la pathologie associée aux infections pulmonaires. Cependant, seuls des essais cliniques, en cours pour certains composés, pourront confirmer le bénéfice thérapeutique apporté par les anti-inflammatoires dans le traitement des infections pulmonaires humaines.

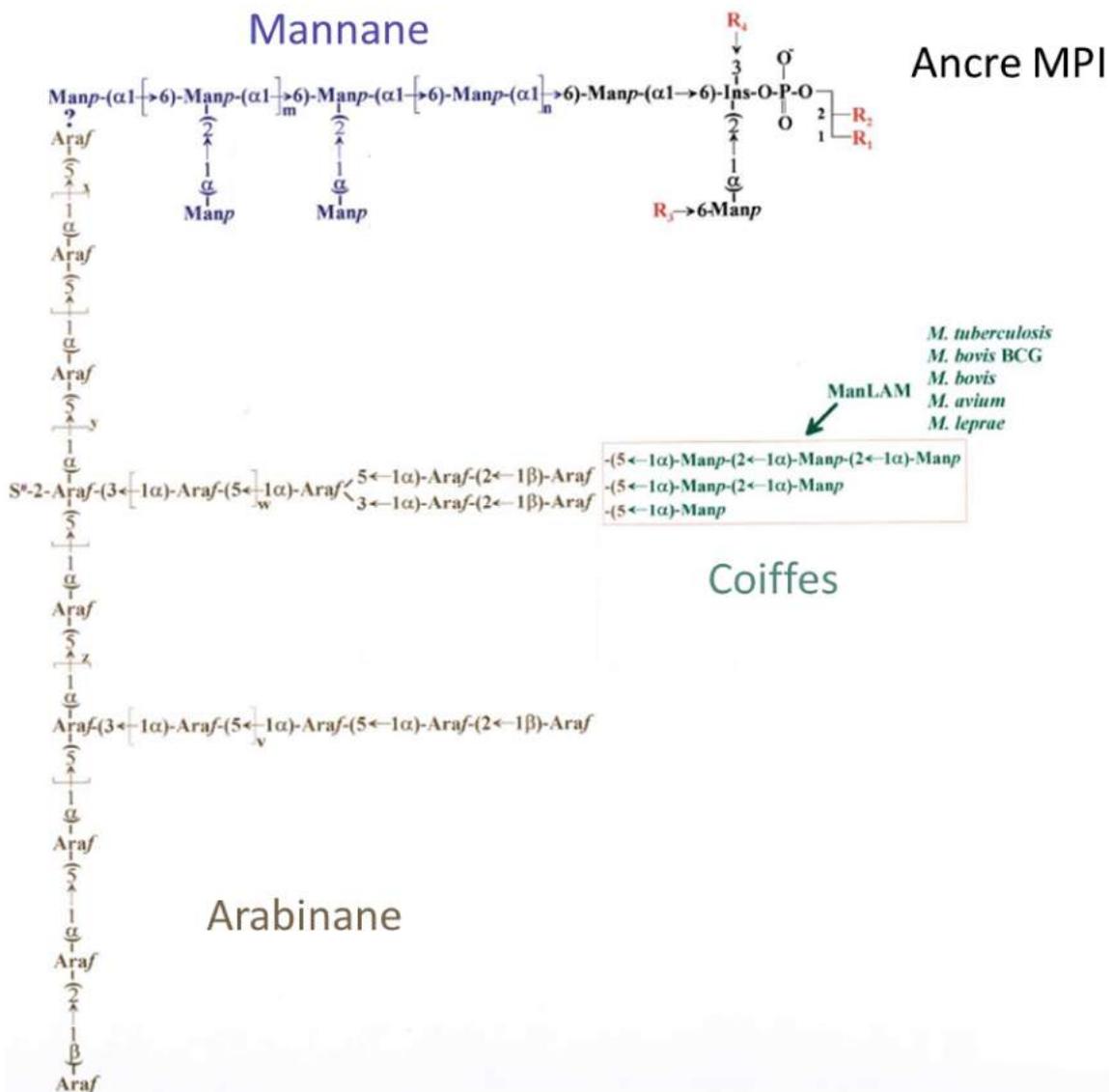


Figure 1-I-20 : Structure du lipoarabinomannane mannosylé

Le ManLAM est constitué de 3 domaines : i) une ancre mannosyl-phosphatidyl-*myo*-inositol (MPI) (en noir), ii) un domaine polysaccharidique composé d'environ 60 unités arabinose (Araf) (en marron), et 50 unités mannosyles (Manp) (en bleu), et iii) des coiffes mannosyles (mono-, di- ou tri-mannosyles)

Manp : mannopyranose, Araf : arabinofuranose, Ins : *myo*-inositol, R_n : acide palmitique, stéarique ou tuberculostéarique.

Adapté de Nigou *et al.*, 2003 [156]

e) Une nouvelle classe de composés anti-inflammatoires : les mannodendrimères

La plupart des composés anti-inflammatoires, comme tout médicament, présente des effets secondaires relativement lourds et sont de ce fait, plus ou moins adaptés en fonction des patients. De plus, certaines personnes peuvent présenter des intolérances à un ou plusieurs de ces composés. Ces intolérances et effets secondaires sont inhérents au mode d'action des médicaments. Pour ces raisons, le développement de nouvelles molécules avec de nouveaux modes d'action doit être envisagé.

Les stratégies et mécanismes développés par les agents pathogènes afin d'éviter, ou de résister, aux réponses de défense de l'hôte, dont l'inflammation, constituent une source potentielle de nouvelles cibles ou de nouveaux composés immunomodulateurs. En particulier, *M. tuberculosis* est capable d'infecter des cellules dendritiques (DC) tout en inhibant la production de cytokines pro-inflammatoires. Dans l'équipe, des lipoglycanes, les lipoarabinomannanes mannosylés (ManLAM) exposés à la surface de *M. bovis* BCG et *M. tuberculosis*, ont été identifiés comme responsables de l'inhibition de l'inflammation par ces mycobactéries *via* leur liaison au récepteur DC-SIGN [166, 167, 168]. Par la suite, l'équipe a cherché à synthétiser des molécules mimant la structure du ManLAM afin de reproduire cet effet anti-inflammatoire et ainsi développer de nouveaux composés immunomodulateurs : les mannodendrimères [169].

i) Le ManLAM : structure et propriétés anti-inflammatoires

Les ManLAM sont des macromolécules exposées à la surface des mycobactéries à croissance lente, *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. bovis* ou *M. bovis* BCG. Ces molécules sont constituées de 3 domaines : une ancre mannosyl-phosphatidyl-*myo*-inositol (MPI), un domaine polysaccharidique composé d'un mannane et d'un arabinane, et des coiffes mannosyles constituées de mono, di ou tri-mannosyles liés en $\alpha(1\rightarrow2)$ sur l'arabinane (Figure 1-1-20) [170]. En solution aqueuse, les molécules de ManLAM adoptent une organisation supramoléculaire sphérique avec les ancres lipidiques hydrophobes situées au cœur, et les coiffes mannosyles exposées en surface [171]. Cette structure est nécessaire à la liaison multivalente de haute avidité du ManLAM à DC-SIGN, requise pour l'activation de la voie de signalisation de ce récepteur et conduisant à l'inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires induite par certains TLR (Figure 1-21).

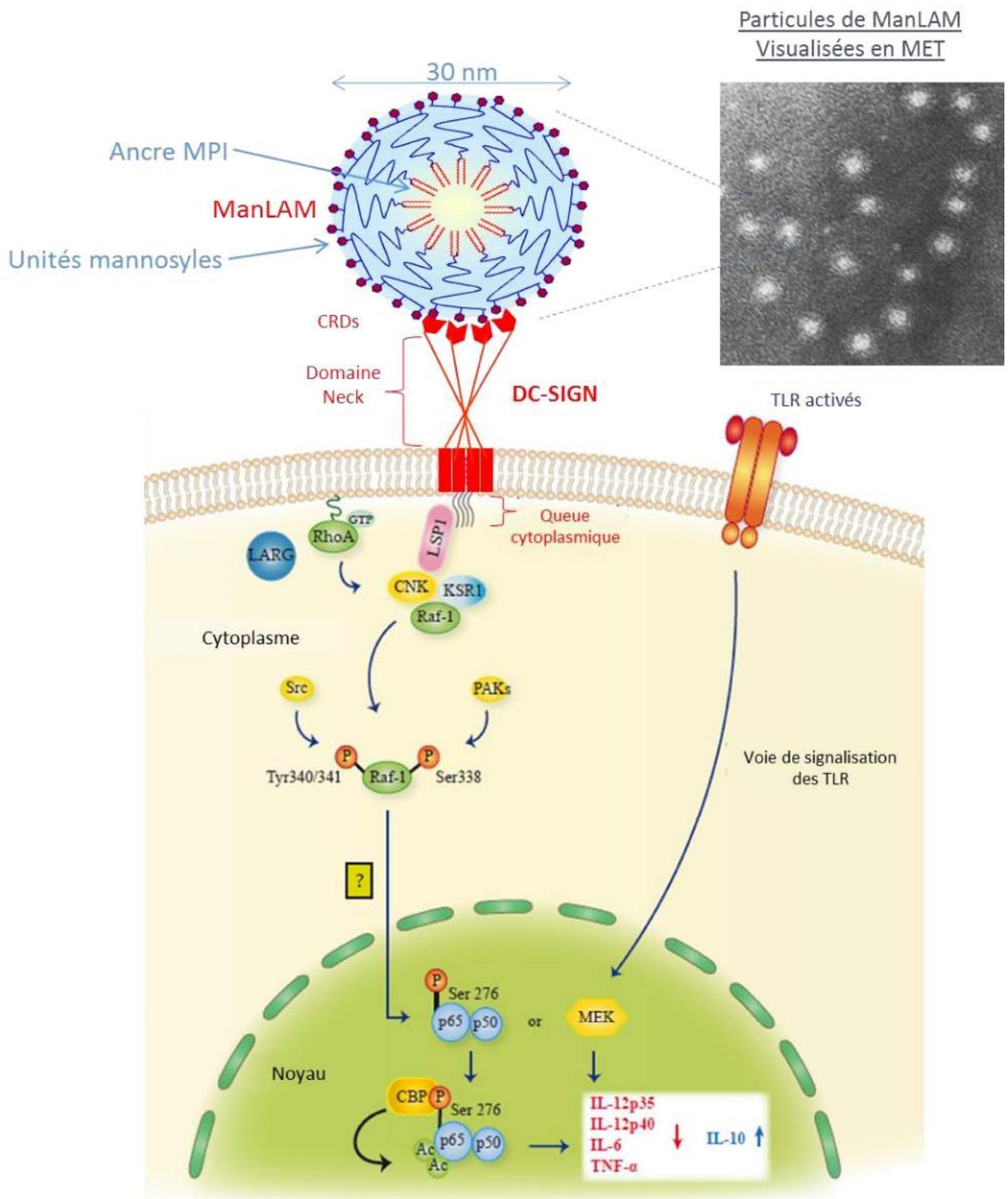


Figure 1-I-21 : Organisation supramoléculaire du ManLAM et activation de la voie de signalisation de DC-SIGN

En solution, le ManLAM s'organise sous une forme multimérique sphérique exposant les coiffes mannosyles en surface. Cette structure permet une liaison multivalente de haute avidité avec un tétramère de DC-SIGN, induisant la phosphorylation de Raf-1, conduisant *in fine* à l'acétylation de NF- κ B. Cette modification, en changeant l'activité transcriptionnelle de NF- κ B, réduit la production de cytokines pro-inflammatoires au profit des cytokines anti-inflammatoires, telles que l'IL-10.

Adapté de Blattes *et al.*, 2015 [161].

ii) DC-SIGN et ses homologues murins

Le récepteur DC-SIGN, DC-Specific ICAM-3 Grabbing Non-Integrin, est une lectine de type C, principalement exprimée au niveau de la membrane des cellules dendritiques (DC). DC-SIGN est constitué d'un domaine de reconnaissance des sucres (CRD) liant le mannose et le fucose de façon dépendante du calcium, d'un domaine Neck permettant la formation de tétramères, d'un domaine transmembranaire et d'une queue cytoplasmique contenant notamment des motifs d'internalisation et de transduction du signal (Figure I-21) (voir revue [172]). DC-SIGN a la particularité de se lier préférentiellement aux oligosaccharides, plutôt qu'aux monosaccharides [173]. De plus, la liaison entre le CRD et l'une des unités mannose étant de faible affinité, DC-SIGN forme un tétramère permettant une liaison de haute avidité avec des ligands multivalents, tels que le ManLAM [174].

DC-SIGN joue un rôle clé dans la fonction des DC puisqu'il est impliqué à la fois dans la reconnaissance des agents infectieux en tant que PRR, mais aussi dans la migration des DC et leur adhésion aux cellules T. Afin d'assurer ces fonctions, ce récepteur est exprimé dans les DC présentes dans la peau et les muqueuses (poumons, intestins, col de l'utérus) (voir revues [172, 175]). De plus, DC-SIGN est également exprimé sur les macrophages alvéolaires des poumons [176]. L'expression de ce récepteur est principalement induite par l'IL-4 [172, 176]. Le rôle de DC-SIGN dans l'interaction hôte-pathogène a tout d'abord été identifié par la liaison entre ce récepteur et la glycoprotéine gp120 de l'enveloppe du HIV-1 [177]. Cette liaison du virus aux DC a été montrée comme favorisant l'infection des lymphocytes T [177], indiquant un rôle de DC-SIGN dans l'échappement aux réponses immunitaires. DC-SIGN est également impliqué dans la reconnaissance d'autres virus, tels que le virus Ebola, le virus de l'hépatite C, le cytomégalovirus ou le virus de la Dengue pour lesquels il agit également comme un récepteur permissif (voir revue [178]). De plus, DC-SIGN reconnaît une large variété de micro-organismes, *via* la présence de composés mannosylés ou fucosylés à leur surface, notamment des bactéries (*Klebsiella pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *M. tuberculosis*), des parasites (*Leishmania*) ou des levures (*Candida albicans*) (voir revues [172, 175]). En particulier, DC-SIGN est l'un des principaux récepteurs impliqués dans l'internalisation de *M. tuberculosis* [179]. Comme dans le cas du HIV, l'interaction avec DC-SIGN semble profiter à *M. tuberculosis*. En effet, la liaison du ManLAM à DC-SIGN déclenche une cascade de signalisation conduisant à l'inhibition de la réponse pro-inflammatoire induite par certains TLR, notamment TLR3, TLR4 et TLR5. Cette liaison provoque l'activation de la kinase Raf-1 conduisant *in fine* à l'acétylation de la sous-unité p65 de NF- κ B dans le noyau, elle-même modifiant l'activité transcriptionnelle de NF- κ B pour favoriser la production de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 (Figure 1-I-21) [180].

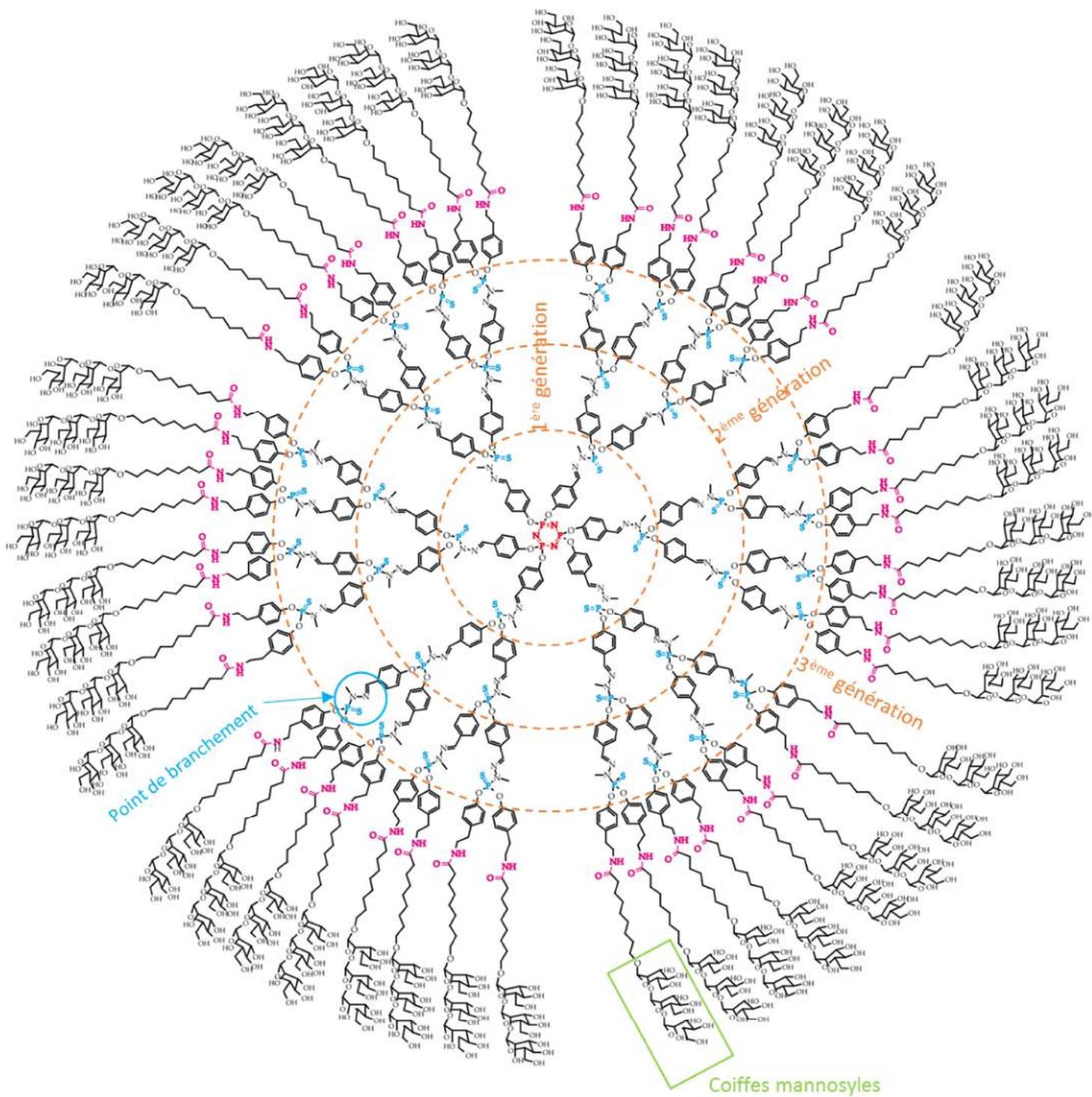


Figure I-22 : Structure du mannodendrimer 3T

Le mannodendrimer 3T a été synthétisé à partir d'un cœur tridimensionnel (en rouge), dont les points de branchement de chaque nouvelle génération (en orange) sont des phosphorydrazones (entouré en bleu). Sur un dendrimer de 3 générations ont été greffées des coiffes tri-mannosides (48 coiffes) (en vert).

L'étude du rôle de DC-SIGN *in vivo* s'est avérée complexe. En effet, chez la souris, le locus DC-SIGN code pour 7 récepteurs homologues : SIGNR1 à 5 et SIGNR7 et 8 [181, 182]. Ces 7 lectines de type C possèdent des structures différentes et une affinité spécifique pour différents oligosaccharides [182]. Parmi ces protéines, SIGNR1 et SIGNR3 semblent être les plus proches homologues du DC-SIGN humain en terme de structure et d'affinité pour les ligands mannosylés et fucosylés. Ces deux récepteurs sont exprimés dans divers types cellulaires, notamment les DC et macrophages de la rate et des nœuds lymphatiques. SIGNR3 est également exprimé par les monocytes du sang et de la moelle osseuse, et SIGNR1 par les macrophages péritonéaux [175, 183]. SIGNR1 et SIGNR3 ont tous deux été montrés comme impliqués dans la reconnaissance d'agents pathogènes, notamment *M. tuberculosis*, mais pourraient avoir un rôle différent. En effet, SIGNR3 semble être nécessaire à la défense de l'hôte contre *M. tuberculosis* [183] alors que la liaison du ManLAM à SIGNR1 inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires induite par TLR4 ou TLR2 [169, 184].

iii) Les mannodendrimères : analogues fonctionnels du ManLAM

Dans l'objectif de développer un composé anti-inflammatoire avec un mode d'action original, Blattes *et al.* [169] ont conçu et développé des composés synthétiques destinés à mimer la structure supramoléculaire active du ManLAM. Cette structure nécessitant un châssis sphérique, l'équipe a utilisé des dendrimères, composés macromoléculaires hyperbranchés dont la synthèse peut être extrêmement contrôlée, permettant d'obtenir des molécules monodisperses. Sur un cœur constitué de dendrimères poly(phosphorhydrazone) de 1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème} ou 4^{ème} génération, des coiffes mono-, di- ou tri-mannosyles ont été greffées afin d'obtenir une structure sphérique multivalente exposant de 12 à 96 coiffes selon la génération [169].

Ces composés ont ensuite été testés pour leurs propriétés anti-inflammatoires sur des DC humaines stimulées par du LPS. Parmi les composés testés, le plus actif, le mannodendrimère 3T (M3T) de 3^{ème} génération et portant 48 coiffes tri-mannosyles (Figure I-22), inhibe la production de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-8 et augmente la production d'IL-10, de façon plus marquée que le ManLAM. Cet effet est dépendant de DC-SIGN et de Raf-1, suggérant que le M3T agit sur la même voie de signalisation que le ManLAM. *In vivo*, les propriétés du M3T ont été évaluées dans un modèle d'inflammation pulmonaire aigüe induite par le LPS. Les souris, traitées par voie orale quotidiennement pendant 14 jours par 1 mg/kg de M3T, ont ensuite été exposées à des aérosols de LPS. Le M3T permet de réduire la production de TNF- α ainsi que le nombre de neutrophiles recrutés dans les poumons. Chez la souris, l'effet du M3T sur la réponse inflammatoire a été montré comme dépendant du récepteur SIGNR1 [169].

Les mannodendrimères, en particulier le M3T, constituent donc une nouvelle classe de composés anti-inflammatoires avec un mode d'action différents des molécules actuellement utilisées. Leur potentiel thérapeutique reste à évaluer dans un contexte pathologique, tel que la tularémie pulmonaire. Ceci constitue l'objet de mes travaux de thèse.

B) Cibler l'hôte pour traiter la tularémie pulmonaire

Les antibiotiques utilisés actuellement pour le traitement de la tularémie pulmonaire ont une efficacité limitée qui dépend notamment du moment auquel le traitement est initié (cf paragraphe I-F-2). De plus, dans un contexte d'utilisation malveillante de *Francisella*, l'utilisation de souches résistantes à certains antibiotiques est à craindre. De nouvelles stratégies thérapeutiques sont donc nécessaires pour traiter la tularémie pulmonaire. Comme mentionné dans le paragraphe II-B, la réponse immunitaire, en particulier la réponse innée, à *Francisella* joue un rôle clé dans la pathologie.

Les HDT, en tant que thérapies complémentaires aux antibiotiques, sont donc une solution à considérer. Comme évoqué au début de ce paragraphe III, deux grandes stratégies peuvent être envisagées. En effet, la multiplication intracellulaire, ainsi que la dissémination de *Francisella* dans l'organisme sont facilitées par l'absence de réponse microbicide efficace, et notamment par une production très limitée de cytokines pro-inflammatoires dans les premiers jours après l'infection.

La première stratégie à considérer est donc l'immunostimulation, qui est aussi la stratégie la plus étudiée dans la littérature consacrée à *Francisella*. Ces études se sont principalement focalisées sur la stimulation de différents TLR ou l'administration de cytokines pro-inflammatoires et ont, pour la plupart, montré des effets positifs sur la pathologie [57]. Ainsi, Pammit *et al*, [185], ont montré que l'administration intranasale d'IL-12 ou d'IFN- γ , en combinaison avec une dose sous-optimale de gentamicine, réduit la charge bactérienne dans les poumons, le foie et la rate et améliore la survie de souris infectées par voie pulmonaire par *F. novicida*. Cependant, plus l'administration de ces cytokines est tardive, plus l'effet est réduit. Lorsque le traitement est donné à 8 et 24 h p.i., il permet 70 % de survie contre 15 % pour les souris traitées par la gentamicine seule. En revanche, administré 48 et 60 h p.i., la survie des animaux est légèrement inférieure à 40 %. L'effet de l'administration d'IL-12 semble être dû à son impact sur la production d'IFN- γ , lui-même permettant d'activer les macrophages et ainsi, de limiter la prolifération intracellulaire [185].

Plusieurs études ont été menées sur des agonistes de PRR, en particulier les TLR, permettant d'induire une réponse de l'hôte. L'analogue synthétique de l'ARN double brin, la polyinosine-polycytosine, (Poly (I:C)), est un ligand de TLR3. Administré par voie intranasale 1 h avant une infection pulmonaire par la souche LVS, il prolonge la survie des souris d'environ 8 jours, mais seulement de 3 jours lorsqu'il est administré 1 h p.i.. Le traitement par cet agoniste de TLR3 induit la production de nombreuses cytokines 24 h p.i., notamment l'IL-6 ou le TNF- α , et provoque ainsi un recrutement de neutrophiles dans les poumons plus précoce, permettant de réduire la charge bactérienne [186]. De la même façon, un aminoalkyl glucosaminide phosphate (AGP), un lipide A synthétique agoniste de TLR4, administré par voie intranasale 48 h avant une infection pulmonaire par *F. novicida* augmente la production de cytokines telles

que le TNF- α ou l'IFN- γ dès 4 h et jusqu'à 24 h p.i.. Lorsqu'il est administré 48 h pré-infection, puis 24 h post-infection, ce composé réduit la charge bactérienne dans les poumons, le foie et la rate et permet la survie d'environ 40 % des souris alors que les souris non-traitées succombent à l'infection 4 jours post-infection. Cette protection est également dépendante de l'IFN- γ [187]. Des mélanges plus complexes, alliant plusieurs agonistes de différents récepteurs, ont également été étudiés. Un mélange de complexe liposome-ADN et d'une fraction protéique membranaire de *F. tularensis* LVS injecté par voie intraveineuse 3 jours pré-infection intranasale par la souche Schu S4 permet la survie de 50 % des souris. Ce mélange contenant de l'ADN bactérien, peut activer à la fois le récepteur TLR9 et le récepteur cytosolique DAI (DNA-dependent activator of IRF), et l'effet protecteur sur l'infection pulmonaire par *Francisella* provient d'une augmentation de la production de ROS par les macrophages [188]. Une étude a également été menée par Skyberg *et al.* [189] sur les propriétés immunostimulantes de polysaccharides issus de baies d'Açaï (palmiers d'Amérique du Sud, *Euterpe oleracea*) et leur effet sur la tularémie pulmonaire murine. Administré par voie intranasale 24 h post-infection pulmonaire par la souche SchuS4, l'extrait polysaccharidique permet la survie de 60 % des souris, alors que les souris non-traitées succombent à l'infection en 6 jours. Les mécanismes exacts de cet effet protecteur sont inconnus mais dépendent d'une augmentation de la production d'IFN- γ [189]. Les auteurs suggèrent que les polysaccharides de baies d'Açaï pourraient activer plusieurs PRR, notamment TLR4 et certaines lectines, et que cette activation d'une combinaison de PRR permettrait cet effet protecteur [189].

Ces différentes études ont montré l'intérêt de stimuler les réponses de l'hôte pour éliminer l'infection. Cependant, ce type de stratégie nécessite une administration très précoce des composés immunostimulants. Comme le montre certaines de ces études au-delà de 24 h à 48 h p.i., ces traitements ne protègent plus contre l'infection pulmonaire à *Francisella* [187, 189]. Or, une administration aussi rapide n'est pas compatible avec un diagnostic tardif. De plus, s'ils sont administrés trop tard, ces composés présentent un risque d'aggravation de la réponse inflammatoire, pouvant conduire à une augmentation des dommages tissulaires. L'administration de tels traitements doit donc être très précise et précéder le déclenchement de l'inflammation dû à l'infection. Le laps de temps très court pendant lequel ce type de traitement peut être administré rend les stratégies d'immunostimulation difficiles à mettre en œuvre pour le traitement de la tularémie pulmonaire [57].

L'autre stratégie thérapeutique à considérer dans le cas d'infections pulmonaires à *Francisella* est la modulation de la réponse inflammatoire. En effet, ce type de traitement visant à réduire les dommages liés à l'inflammation peut être administré dans une plus grande fenêtre de temps. Les symptômes de la tularémie pulmonaire étant dus à l'inflammation, ceux-ci n'apparaissent que lorsque l'infection a déjà atteint un stade systémique et que la réponse

inflammatoire a été déclenchée. Un traitement immunomodulateur serait probablement une solution plus adaptée en complément de l'antibiothérapie. Peu d'études ont été réalisées dans ce sens mais deux d'entre elles, utilisant deux cibles différentes, ont montré le potentiel thérapeutique d'une telle stratégie. D'Elia *et al.* [190], ont montré une augmentation significative de la survie des souris infectées par la souche LVS en injection i.p., lorsqu'elles sont traitées par un anticorps anti-HMGB-1, un DAMP libéré par les cellules infectées par *Francisella*. Cet anticorps est administré 2 et 3 jours p.i. en combinaison avec un antibiotique en dose sous-optimale. Les auteurs ont également observé une diminution de la charge bactérienne dans le foie et la rate. De façon surprenante le traitement avec l'anti-HMGB1 provoque également une augmentation de la production d'IFN- γ , participant à la réduction de la charge bactérienne. Dans un modèle murin d'infection par la souche LVS par voie i.p., Zhang *et al.* [191] ont montré que l'inhibition de la kinase GSK3 β , impliqué dans de nombreuses voies de régulation et dans l'activation de NF- κ B, augmente la survie de souris traitées avec l'inhibiteur 1 h p.i. d'environ 50 %. L'inhibition de GSK3 β réduit la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-12p40 et TNF- α) et augmente la production d'IL-10 à 6 et 24 h. Ces études soulignent l'intérêt thérapeutique d'une stratégie anti-inflammatoire, en association avec les antibiotiques dans le traitement des infections pulmonaires par *F. tularensis*.

IV - Présentation des travaux

L'objectif de mon travail de thèse était d'évaluer le potentiel anti-inflammatoire du mannodendrimère 3T (M3T) et son bénéfice thérapeutique dans un modèle murin d'infection pulmonaire par *F. tularensis*. Comme mentionné dans l'introduction, le traitement actuel de cette maladie par des antibiotiques présente des limites, majoritairement liées à un diagnostic difficile, et pourrait éventuellement être amélioré par une thérapie complémentaire ciblant l'hôte. La réponse immunitaire innée, et en particulier l'inflammation, joue un rôle délétère dans la pathologie de la tularémie pulmonaire et moduler cette réponse inflammatoire *via* une thérapie accessoire pourrait donc être bénéfique. Mon projet de thèse a consisté à évaluer cette approche thérapeutique dans un modèle d'infection pulmonaire par *F. novicida* chez la souris.

La souche *F. novicida* U112 est couramment utilisée en tant que substitut de *F. tularensis* pour l'étude de la tularémie. Nous avons choisi ce modèle car, bien qu'elle soit non-pathogène pour l'homme, elle provoque, en cas d'infection pulmonaire chez la souris, une pathologie très similaire à celle des souches virulentes. Des études menées sur l'infection pulmonaire de souris avec les souches U112 et Schu S4, ont en effet, montré une évolution en sepsis dans les deux cas, présentant les mêmes cinétiques de dissémination, et de réponse cytokinique et cellulaire [68, 129]. De plus, les souches pathogènes de Type A et B, ainsi que la souche LVS, figurent sur la liste des Micro-Organismes et Toxines (MOT) soumis à réglementation. Leur détention et manipulation, même à des fins de recherches, nécessitent des autorisations et installations particulières dont ne dispose pas le laboratoire. La souche *F. novicida* constituant un modèle adapté dans notre cas, nous n'avons pas entrepris les démarches requises pour manipuler ces souches.

Les propriétés anti-inflammatoires du M3T, comme évoqué en introduction, ont été montrées dans un modèle d'inflammation induite par le LPS. Nous avons donc dans un premier temps, chercher à évaluer ces propriétés dans un contexte infectieux. Mes travaux ont donc premièrement consisté à évaluer le M3T *in vitro* dans un modèle d'infection de macrophages par *F. novicida*. Les macrophages sont la principale cible cellulaire de *F. tularensis*, mais également des acteurs majeurs de la réponse inflammatoire associée à l'infection par cette bactérie. Nous avons choisi d'utiliser une lignée de monocyte-macrophage THP-1 (THP1-Dual™ commercialisée par InvivoGen), comme principal modèle cellulaire. En effet, ces cellules expriment le récepteur du M3T, DC-SIGN, ainsi que les PRR intervenant dans la réponse à Francisella, notamment TLR2. De plus, cette lignée possède un système rapporteur de l'activation de NF- κ B, un facteur de transcription clé de la réponse inflammatoire. Outre l'activation de NF- κ B, nous avons choisi d'évaluer le potentiel anti-inflammatoire du M3T sur la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-8 et l'expression de la molécule de co-stimulation CD40, qui sont des marqueurs l'activation des macrophages. Ce modèle a permis

de montrer la capacité du M3T à inhiber ces trois éléments induits par l'infection avec *F. novicida*. Mes travaux suggèrent également que ces facteurs clés de l'activation des macrophages, induits *via* TLR2, sont inhibés par le M3T de façon dépendante de DC-SIGN. De plus, la capacité du M3T à inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires a été confirmée sur des cellules dendritiques humaines dérivées de monocytes, constituant un modèle cellulaire plus physiologique. Cette première partie des travaux a donc permis de montrer le potentiel anti-inflammatoire du M3T dans des macrophages ou des cellules dendritiques infectés par *F. tularensis* et a fondé la base des travaux *in vivo*.

Dans une seconde partie, mon travail a consisté à évaluer le bénéfice thérapeutique du M3T dans le cadre d'une infection pulmonaire à *F. novicida* chez la souris (Chapitre 2- II). L'objectif était d'évaluer ce composé dans des conditions de faible dose infectieuse, mimant les infections survenant chez l'homme. De plus, le M3T a été administré en combinaison ou non avec un traitement antibiotique sous-optimal afin de pouvoir observer un effet additif potentiel de celui-ci. Finalement, ce traitement combinatoire a été évalué sur la survie des animaux, la charge bactérienne dans les poumons, le foie et la rate et la pathologie inflammatoire dans ces organes. Pour cela, j'ai tout d'abord mis au point le modèle d'infection pulmonaire par administration intranasale d'une dose inférieure à 100 CFU de *F. novicida*. Ensuite, le traitement sous-optimal d'antibiotique (dose, fréquence et voie d'administration) permettant de prolonger la vie des animaux sans être curatif, a été déterminé (dose, voie d'administration). Le M3T a ensuite été évalué dans ce modèle. Les résultats ont montré une nette amélioration de la survie des animaux traités avec la combinaison de M3T et d'antibiotique, en comparaison avec les animaux traités uniquement avec l'antibiotique. En revanche, aucun effet du M3T n'a été observé sur la charge bactérienne dans les poumons, le foie ou la rate. La réponse inflammatoire a été évaluée par le dosage de cytokines dans les poumons et par la caractérisation et le dénombrement des populations cellulaires recrutées dans cet organe par cytométrie en flux et enfin, la pathologie a été évaluée par des analyses histologiques sur les poumons, le foie et la rate. Le M3T n'a montré aucun effet sur la production de cytokines dans les poumons, ni sur les populations cellulaires présentes dans les poumons à différents temps post-infection. En revanche, même si cela reste à confirmer, il semblerait que le traitement au M3T diminue les lésions observables sur les coupes histologiques des poumons, du foie et de la rate.

L'ensemble des résultats obtenus montre que le M3T apporte un bénéfice thérapeutique par rapport à une antibiothérapie seule, en augmentant la survie de souris infectées par *F. novicida*. Malgré l'absence d'effet sur la charge bactérienne, il semble jouer un rôle dans le contrôle de la pathologie inflammatoire en réduisant les lésions tissulaires.

En parallèle de ce sujet principal, j'ai travaillé sur un autre projet visant à identifier les éventuelles modifications structurales du lipide A résultant de l'adaptation de *F. novicida* à des conditions de stress mimant l'environnement du phagosome. En effet, comme décrit dans

l'introduction, lors de leur internalisation dans le phagosome, les bactéries doivent faire face à différents mécanismes microbicides mis en place par le macrophage, tels que la production de ROS ou de peptides anti-microbiens, ou encore l'acidification du milieu. Pour résister à cet environnement hostile, *Francisella* possède diverses stratégies dont la production d'un lipide A atypique, empêchant la liaison des peptides anti-microbiens par exemple. Une modification de ce lipide A observée sur des bactéries intracellulaires a déjà été décrite dans la littérature. En effet, grâce à un radio-marquage, Barker *et al.* [110], ont pu montrer que le lipide A des bactéries internalisées dans les macrophages présentaient une polarité supérieure à celle cultivés en milieu synthétique [110]. Nous avons donc cherché à caractériser cette modification pouvant intervenir dans la résistance à l'environnement intraphagosomal de *F. novicida*. Nous avons analysé la structure du lipide A directement sur bactéries entières, cultivées dans des conditions mimant l'acidification du phagosome, par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Cette analyse nous a permis de montrer qu'une forme possédant un hexose supplémentaire apparaît lorsque le milieu est acidifié. Cette modification pourrait jouer sur la capacité de la bactérie à résister à cet environnement hostile ou à s'échapper dans le cytosol. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le journal Biochimie (cf Annexe)

Chapitre 2 – Résultats et discussion

I – Evaluation du M3T *in vitro* dans deux modèles cellulaires : les macrophages et les cellules dendritiques infectés par *F. novicida*

A) Mise au point d'un modèle d'infection des cellules THP-1 par *F. novicida*

Dans un premier temps, l'objectif de mon travail a été d'évaluer, *in vitro*, le potentiel anti-inflammatoire du M3T dans des macrophages infectés par *F. novicida*. Nous avons tout d'abord choisi d'utiliser la lignée de monocytes-macrophages THP-1 (THP-1 Dual™, commercialisée par InvivoGen) comme modèle cellulaire. Ces cellules offraient, en effet, plusieurs avantages pour une première évaluation du M3T *in vitro*. Premièrement, il s'agit de monocytes-macrophages, qui constituent une cible privilégiée de *F. tularensis* et jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire innée, et en particulier l'inflammation. Ensuite, une lignée cellulaire, en comparaison à des cellules primaires, permet d'obtenir un grand nombre de cellules rapidement et ainsi de multiplier les expériences facilement. Elle évite aussi les variations de résultats inhérentes aux différents donneurs, et offre une meilleure reproductibilité. De plus, bien qu'étant moins physiologiques que des cellules primaires, les cellules de la lignée THP-1 sont couramment utilisées dans la littérature comme modèle pour l'étude de l'infection de macrophages par *F. tularensis* [115, 192]. Enfin, la lignée THP-1-Dual en particulier, exprime le récepteur du M3T, DC-SIGN, ainsi qu'un système rapporteur de l'activation de NF-κB, facteur de transcription central de la réponse inflammatoire. Ce système rapporteur permet de mesurer facilement l'activation de NF-κB, se traduisant par l'expression de la phosphatase alcaline, par un test colorimétrique.

1) Croissance intracellulaire

F. novicida n'ayant jamais été manipulée dans le laboratoire avant mon arrivée, j'ai été accueillie pendant une semaine au début de ma thèse par l'équipe du Dr Alain Charbit (INSERM, Paris) afin d'apprendre à cultiver cette bactérie, et de réaliser une expérience-type d'infection de macrophages murins de la lignée J774 (Figure 2-I-1A). J'ai ensuite adapté ces connaissances pour mettre au point un modèle d'infection des cellules THP-1 par *F. novicida*. Avant de déterminer les conditions d'infection nous permettant d'évaluer le M3T, nous avons tout d'abord cherché à vérifier la validité de notre modèle en le confrontant aux données de la littérature. La réponse inflammatoire induite par *F. novicida* était notre principal paramètre d'intérêt, cependant peu de données sont disponibles concernant cette réponse dans les cellules THP-1 [193]. Pour cette raison, nous avons choisi la croissance intracellulaire de *F. novicida* comme critère de contrôle, celle-ci ayant été décrite dans ce modèle lors de différentes études [115, 192].

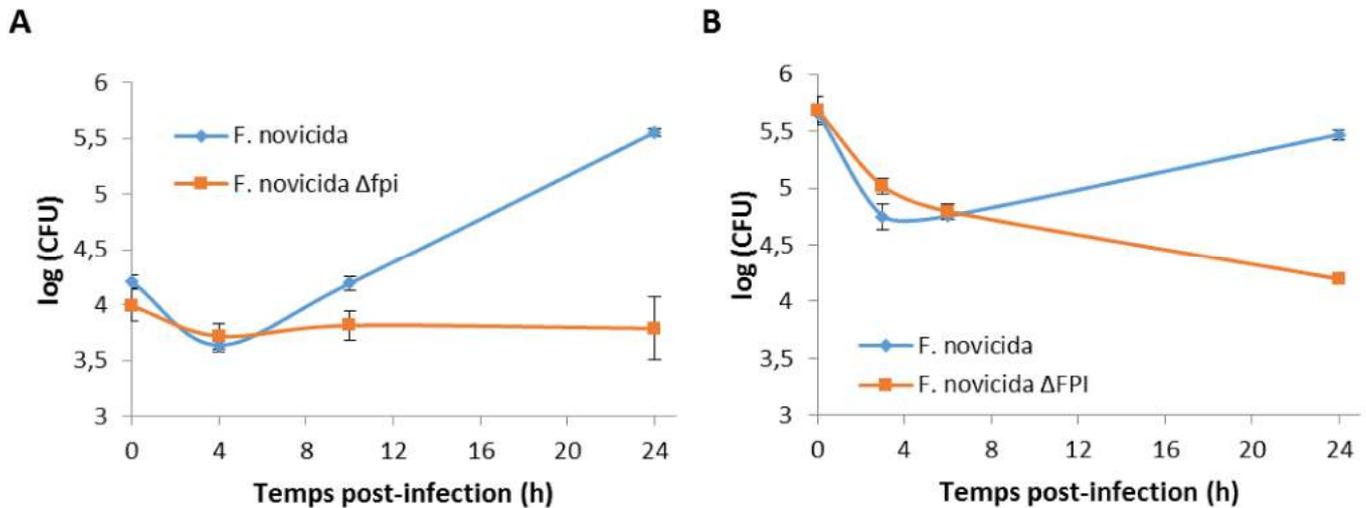


Figure 2-I-1 : Croissance intracellulaire de *F. novicida*

A) Croissance de *F. novicida* dans les cellules J774

Les cellules J774 sont infectées à MOI 100 avec la souche *F. novicida* et *F. novicida* Δ*Fpi*

B) Croissance de *F. novicida* dans les cellules THP-1

Les cellules sont infectées avec une MOI de 10 pour la souche *F. novicida* et de 5 pour la souche *F. novicida* Δ*Fpi*

Aux temps indiqués, les cellules ont été lavées et lysées puis étalées sur milieu gélosé. Les CFU ont été dénombrés après 24 h.

La souche *F. novicida*, contrairement à la souche *F. novicida* Δ*Fpi* se multiplie dans les cellules THP-1 et J774.

D'après ces données, elle se caractérise par deux phases : tout d'abord une baisse du nombre de bactéries entre 0 et 4 h après l'infection, suivie d'une forte multiplication des bactéries entre 4 et 24 h. Après 24 h, une importante mort cellulaire est observée [64, 192]. En revanche, la souche *F. novicida* Δ Fpi, en raison d'une délétion des gènes de l'îlot de pathogénicité, est incapable de se multiplier dans les macrophages. La courbe de croissance de cette souche présente, dans un premier temps, le même profil que pour les bactéries sauvages, mais après les 4 premières heures de l'infection, le nombre de bactéries intracellulaires reste constant [192].

Nous avons suivi la croissance intracellulaire de ces deux souches, la souche sauvage et la souche mutante Δ Fpi, dans les cellules THP-1 afin de la comparer à ces données. L'infection a été réalisée en suivant le protocole utilisé pour les cellules J774. Les cellules THP-1 sont des cellules en suspension. Pour des questions pratiques, notamment pour faciliter les lavages, elles ont été différenciées en macrophages adhérents préalablement à l'infection par ajout de PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate). Après une infection d'1 h, les cellules sont incubées dans un milieu contenant de la gentamicine afin d'éliminer les bactéries extracellulaires. A 3, 6 et 24 h, les cellules ont été lysées afin de dénombrer les bactéries intracellulaires.

Les résultats obtenus correspondent au profil décrit dans la littérature, avec une diminution du nombre de bactéries intracellulaires observée entre les deux mesures à 0 et 3 h post-infection (p.i.), suivie d'une augmentation jusqu'à 24 h (Figure 2-I-1B). Cette cinétique reflète le cycle intracellulaire de *F. tularensis*. En effet, comme décrit dans l'introduction (cf paragraphe II-B-2), les bactéries, pour se répliquer, doivent s'échapper du phagosome et atteindre le cytosol. Cette étape, selon les études, a lieu entre 30 min et 4 h p.i. [63]. Le temps de génération observé à partir de 4 h p.i. dans nos expériences dans les cellules THP-1 (1,25 h) est sensiblement plus important que dans les cellules J774 (1 h), en accord avec l'étude de Ramond *et al.*, [192]. Les bactéries de la souche Δ Fpi, ayant une croissance identique à la souche sauvage lorsqu'elles sont cultivées dans le même milieu de culture, montrent bien un défaut de croissance dans les macrophages humains (Figure 2-I-1B), comme dans les macrophages murins, (Figure 2-I-1A). L'ensemble ces données valide le modèle d'infection de cellules THP-1 par *F. novicida* mis en place.

2) Caractérisation de la réponse inflammatoire

Afin d'évaluer l'effet inhibiteur du M3T sur la réponse inflammatoire induite par *F. novicida* nous avons cherché à identifier des conditions permettant d'obtenir une intensité appréciable de cette réponse, en déterminant son évolution en fonction du temps et de la multiplicité d'infection (MOI) utilisée.

La réponse inflammatoire induite par *F. novicida* dans les macrophages est initiée par sa reconnaissance par les PRR, en particulier TLR2 [87, 89] (cf Introduction II-B-1). Cette dernière provoque l'activation d'une cascade de signalisation, conduisant notamment à la translocation nucléaire de NF- κ B. Ce facteur de transcription induit la production de cytokines pro-inflammatoires, ainsi que l'expression de molécules de co-stimulation intervenant dans l'interaction entre les cellules présentatrices d'antigènes et les lymphocytes et l'activation de ces derniers. Nous avons donc choisi de mesurer 3 paramètres clés de l'activation des macrophages : l'activation de NF- κ B (grâce au système rapporteur présent dans les cellules THP-1), la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-8, également nommée CXCL-8, (la plus abondamment produite par les cellules THP-1, et dont le rôle principal est d'assurer le recrutement des neutrophiles), ainsi que l'expression de la molécule de co-stimulation CD40.

a) Cinétique de la réponse et choix des paramètres d'infection (temps, MOI)

i) Cinétique de réponse et choix de la durée d'infection

In vivo, la réponse inflammatoire induite suite à une infection par *F. novicida* a été largement décrite chez la souris. Elle se caractérise notamment par un délai initial d'environ 2 jours dans la production de cytokines dans les poumons (cf Introduction II-B-3) [67]. En revanche, peu de données sont disponibles dans la littérature concernant la cinétique de la réponse inflammatoire induite par *F. novicida in vitro*, dans les macrophages. Toutefois, une étude a rapporté une production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- α) par des macrophages humains dérivés de monocytes infectés par *F. novicida* à 16 h p.i., seul temps auquel la mesure a été réalisée [193]. Cette production de cytokines varie en fonction des souches de *Francisella* utilisées. En effet, la souche virulente Schu S4 n'induit qu'une faible production d'IL-6 et de TNF- α dans des monocytes humains à 24 h p.i. comparativement aux monocytes infectés par la souche *F. novicida* [194, 195].

L'évaluation de la cinétique de la réponse inflammatoire a été réalisée par la mesure de l'activation de NF- κ B. Pour l'ensemble des expériences décrites par la suite, les cellules THP-1 ont été utilisées sans différenciation préalable. En effet, l'ajout de PMA entraîne une activation importante des cellules, ce qui constitue un biais dans la mesure de l'activation de NF- κ B. Bien que lorsqu'elles ne sont pas différenciées, les cellules THP-1 soient plus assimilées à des monocytes qu'à des macrophages, nous avons choisi de les utiliser comme telles pour l'évaluation du M3T. Par ailleurs, dans la littérature, les études sur l'infection de cellules THP-1 par *Francisella* ont également été réalisées avec des cellules non-différenciées [127].

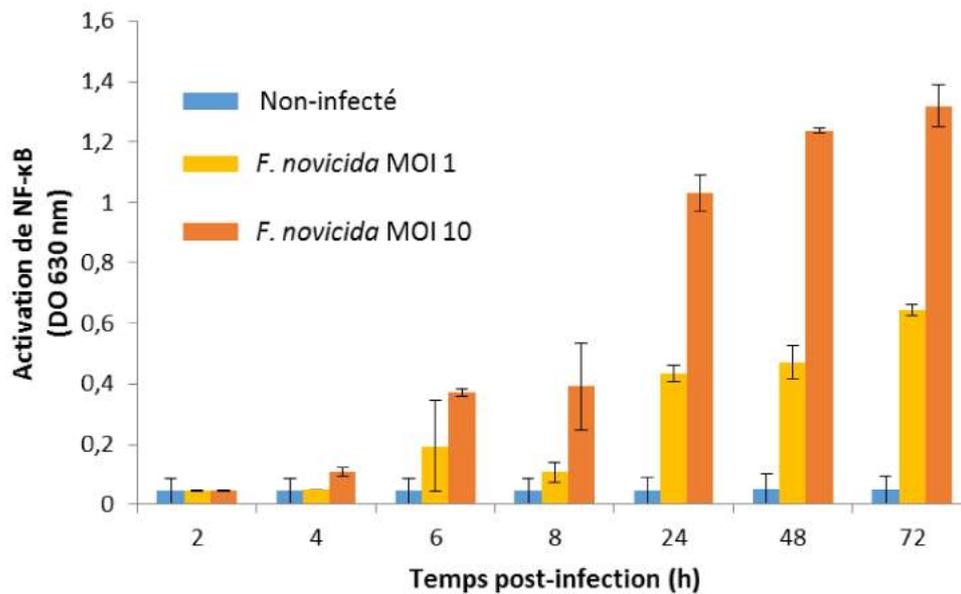


Figure 2-I-2 : Cinétique de l'activation de NF-κB par *F. novicida* dans les cellules THP-1

Les cellules sont infectées avec les MOI indiquées de *F. novicida*, aux temps indiqués le surnageant est prélevé afin de mesurer l'activation de NF-κB par mesure de la DO à 630 nm.

L'activation de NF-κB est détectée à partir de 6 h et augmente jusqu'à 24 h où elle atteint une valeur maximum.

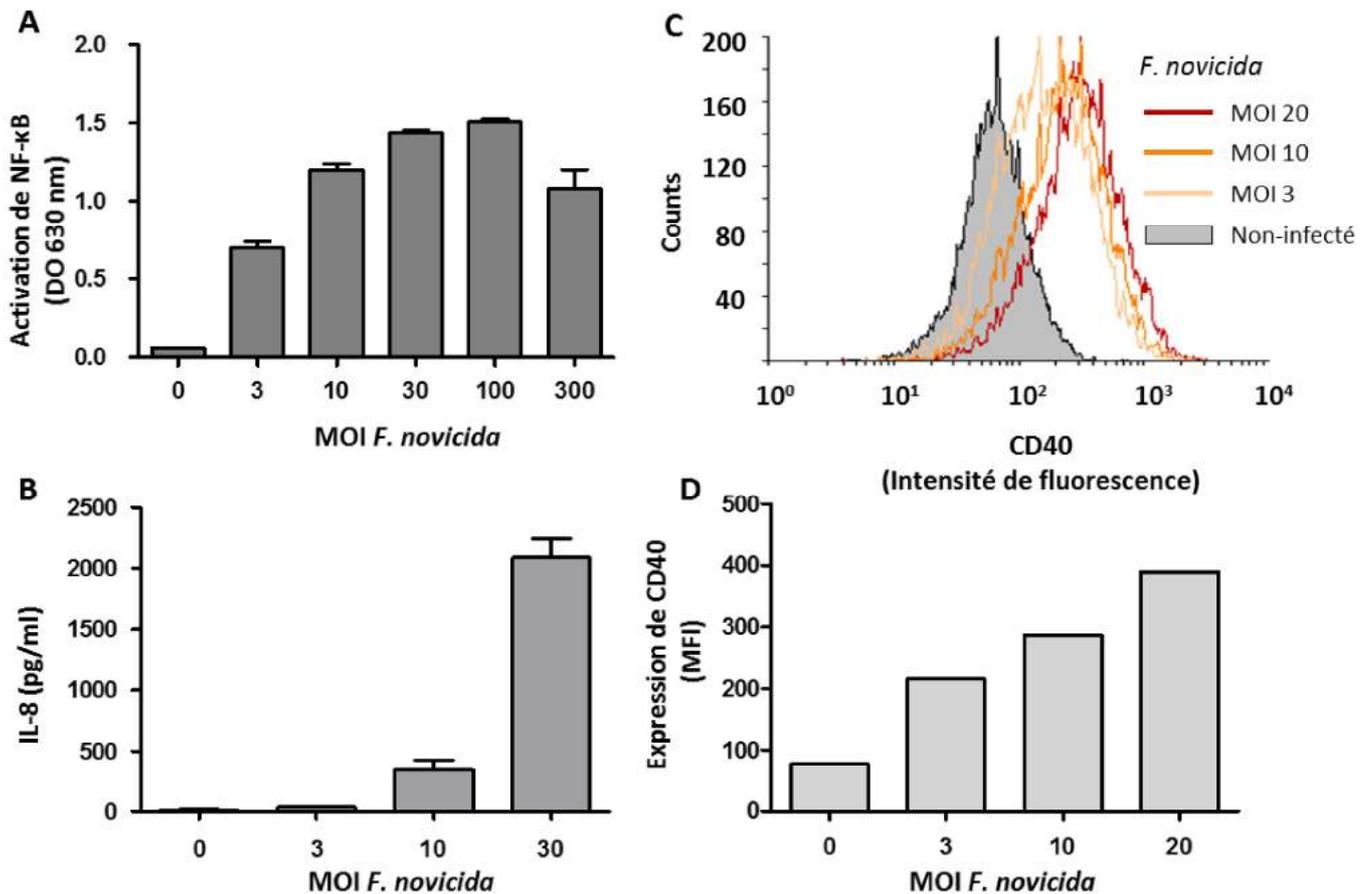


Figure 2-I-3 : Activation des cellules THP-1 par *F. novicida*

Les cellules sont infectées par *F. novicida* aux MOI indiquées pendant 18h puis le surnageant est prélevé pour mesurer l'activation de NF-κB (A) par mesure de la DO à 630 nm et dosage de l'IL-8 (B), par la méthode ELISA.

Les cellules sont ensuite marquées avec un anticorps anti-CD40 couplé au fluorochrome APC puis analysées par cytométrie en flux pour mesurer l'expression de CD40 (C) et (D).

L'activation de NF-κB, la production d'IL-8 et l'expression de CD40 augmente de façon dose-dépendante en fonction de la MOI jusqu'à 100.

Dans les expériences présentées sur la Figure 2-I-2, les cellules THP-1 ont été infectées par *F. novicida* à des MOI de 1 et 10. Ces MOI ont été choisies arbitrairement dans un premier temps, l'effet de la MOI ayant été étudié par la suite. A différents temps, de 2 h à 24 h, le surnageant de culture a été prélevé pour mesurer l'activation de NF- κ B. Celle-ci est observable dès 6 à 8 h p.i. à une MOI de 10 avec une nette augmentation au temps 24 h p.i.. Au-delà de 24 h, l'activation de NF- κ B atteint un plateau maximum (Figure 2-I-2). Pour des raisons pratiques, et en privilégiant une activation inférieure au maximum pour favoriser l'observation d'une inhibition potentielle par le M3T, nous avons choisi un temps d'infection de 18h (overnight) pour la suite des expériences. Le délai observé *in vivo* dans la réponse inflammatoire n'est donc pas observé *in vitro* dans les macrophages.

ii) Choix de la MOI

Le temps d'infection étant fixé nous avons ensuite cherché à déterminer l'effet de la MOI. Pour ce critère, nous avons mesuré l'évolution des trois paramètres de la réponse inflammatoire choisis précédemment : l'activation de NF- κ B, la production d'IL-8 et l'expression de CD40. Les cellules THP-1 ont été infectées pendant 18 h à différentes MOI allant de 3 à 300. L'activation de NF- κ B augmente de façon dose-dépendante des MOI 3 à 30, puis atteint un plateau (Figure 2-I-3A). La valeur mesurée diminue à MOI 300, probablement en raison de la toxicité de cette forte charge bactérienne. A partir de la MOI 30, l'activation de NF- κ B est à son maximum, nous avons donc ensuite dosé la concentration en IL-8 dans le surnageant et mesuré l'expression de CD40 à la surface des cellules infectées aux MOI 3, 10 et 30. La production d'IL-8 est détectable à MOI 10 avec une concentration d'environ 350 pg/ml, puis augmente drastiquement à 2 ng/ml à MOI 30 (Figure 2-I-3B). Enfin, l'expression de CD40 a été mesurée par cytométrie en flux par marquage fluorescent avec un anticorps anti-CD40. L'activation des cellules est détectable à partir de la MOI 3, puis augmente de façon dose-dépendante jusqu'à la plus forte MOI testée (MOI 20) (Figure 2-I-3C et D). En résumé, afin d'obtenir une réponse appréciable pour l'ensemble de ces paramètres, différentes MOI, comprises entre 1 et 30, doivent être utilisées. De plus, il existe une variabilité conséquente entre la MOI visée au moment de l'infection et la MOI réelle. En effet, la concentration de la suspension bactérienne est estimée à partir de la mesure de sa DO (densité optique) à 600 nm. La suspension est ensuite diluée afin d'obtenir un inoculum correspondant à la MOI choisie. Celle-ci est ensuite vérifiée par étalement de l'inoculum sur milieu gélosé. Un écart d'environ 5 à 10 % est souvent observé entre la MOI calculée et la MOI réelle. Pour compenser cette variabilité, pour chaque expérience réalisée par la suite, les cellules ont été infectées pendant 18 h avec 2 ou 3 MOI différentes dans une gamme de 1 à 30 bactéries par cellule.

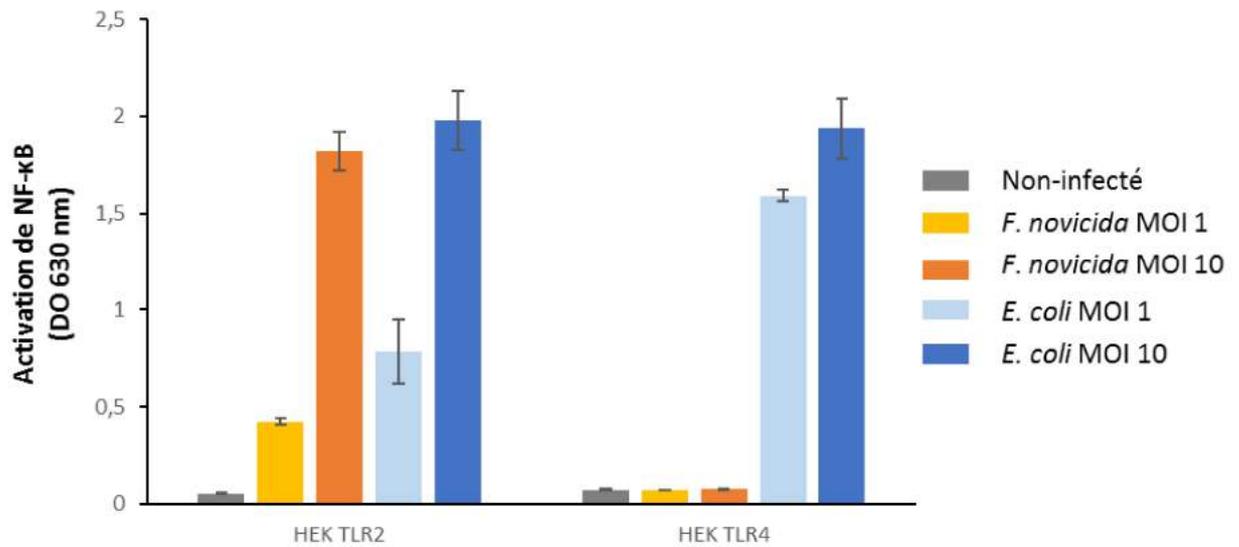


Figure 2-I-4 : Activation des lignées HEK-TLR2 et HEK-TLR4 par *F. novicida* et *E. coli*

Les cellules rapportrices HEK-TLR2 et HEK-TLR4 sont incubées avec les bactéries aux MOI indiquées pendant 18h. Le surnageant est ensuite prélevé pour mesurer l'activation de NF-κB par mesure de la DO à 630 nm. *F. novicida* active uniquement la lignée HEK-TLR2.

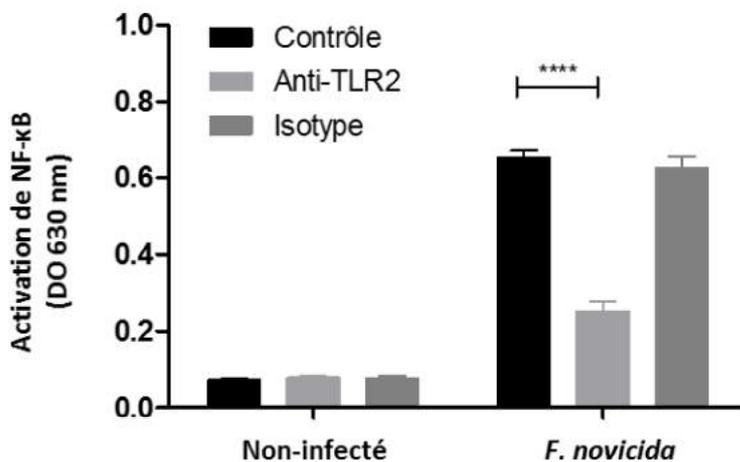


Figure 2-I-5 : Rôle de TLR2 dans l'activation de NF-κB induite par *F. novicida* dans les cellules THP-1

Les cellules THP-1 sont incubées pendant 1h avec un anticorps bloquant anti-TLR2 avant l'infection par *F. novicida* à MOI 10 pendant 18h. Le surnageant est prélevé afin de mesurer l'activation de NF-κB par mesure de la DO à 630 nm.

L'activation de NF-κB induite par *F. novicida* est dépendante de TLR2.

b) PRR impliqués dans l'activation des cellules THP-1 par *F. novicida*

Dans les macrophages, TLR2 est le principal PRR impliqué dans l'activation de NF- κ B induite par *F. tularensis*, et la production de cytokines pro-inflammatoires qui en découle. L'implication de ce récepteur a été démontrée, à la fois *in vitro* dans divers modèles cellulaires, tels que des DC humaines ou murines, ou des cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC), et *in vivo* chez la souris [86, 87, 196]. Au contraire, *F. tularensis* ne déclenche pas, ou peu, de signalisation *via* le récepteur TLR4 en raison de la structure atypique de son LPS [83] (cf Introduction II-B-1). Nous avons, dans un premier temps, cherché à vérifier que la souche *F. novicida*, dans nos conditions de culture, induisait bien une activation de NF- κ B dépendante de TLR2. Des cellules rapportrices de l'activation de TLR2 (HEK-TLR2) ou de TLR4 (HEK-TLR4) ont été infectées avec *F. novicida* à des MOI de 1 et 10. *Escherichia coli* a été utilisée comme bactérie contrôle aux mêmes MOI. Les deux bactéries induisent une activation dose-dépendante de la lignée HEK-TLR2, mais seule *E. coli* induit une activation de la lignée TLR4, en accord avec les données de la littérature sur l'activation de TLR2 et non TLR4 par *F. tularensis* (Figure 2-I-4) [83, 87, Hajjar, 2006 #144].

Nous avons ensuite cherché à évaluer l'implication de TLR2 dans la réponse induite par *F. novicida* dans les cellules THP-1. Les cellules, préalablement incubées avec un anticorps bloquant anti-TLR2, ou un isotype contrôle, ont été infectées pendant 18 h par *F. novicida* à une MOI de 10 (Figure 2-I-5). L'activation de NF- κ B observée lors de l'infection est drastiquement réduite lorsque le récepteur TLR2 est bloqué (Figure 2-I-5). L'isotype n'induit, quant à lui, aucune modification, indiquant que cette inhibition est due spécifiquement au blocage de TLR2 (Figure 2-I-5). Conformément à ce qui a été décrit dans d'autres modèles cellulaires, l'activation de NF- κ B induite par *F. novicida* dans les cellules THP-1 est majoritairement dépendante de TLR2. Une légère activation est toutefois toujours observable en présence de l'anticorps anti-TLR2 (Figure 2-I-5). Celle-ci peut provenir de l'incapacité de l'anticorps à bloquer l'intégralité de la signalisation par TLR2 ou de l'activation d'un autre PRR par *F. novicida*. En effet, les cellules THP-1 sont pourvues de récepteurs cytosoliques susceptibles de jouer un rôle dans l'activation de NF- κ B, tels que NOD2 ou STING. Bien que NOD2 n'intervienne pas *a priori* dans la réponse à *F. novicida*, STING, quant à lui, est impliqué dans l'activation de l'inflammasome induite par cette bactérie. (voir revue [124]).

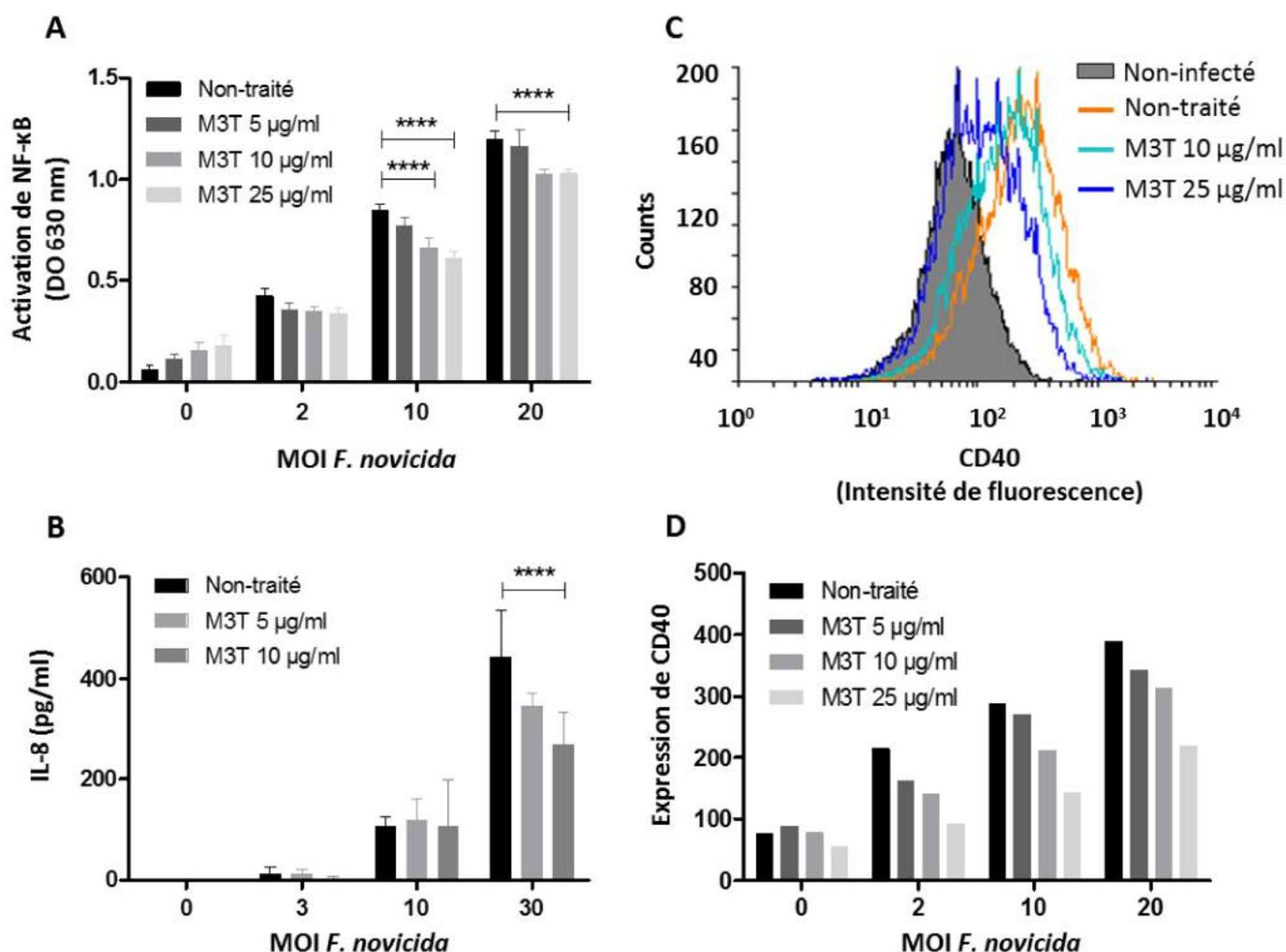


Figure 2-I-6 : Effet du M3T sur l'activation de NF- κ B, la production d'IL-8 et l'expression de CD40 induites par *F. novicida* dans les cellules THP-1

Les cellules THP-1 sont incubées pendant 1 h avec les concentrations indiquées de M3T puis infectées par *F. novicida* pendant 18 h aux MOI indiquées. Le surnageant est ensuite prélevé afin de mesurer l'activation de NF- κ B (A) par mesure de la DO à 630 nm, et de doser l'IL-8 (B) par ELISA. Les cellules infectées à MOI 6 sont marquées avec un anticorps anti-CD40-APC puis analysées par cytométrie en flux pour évaluer l'expression de CD40 (C) et (D).

Le M3T réduit l'activation de NF- κ B, l'expression de CD40 et la production d'IL-8 de façon dose-dépendante.

B) Evaluation de l'effet du mannodendrimère 3T sur la réponse inflammatoire induite par *F. novicida* dans les cellules THP-1

Le M3T a été évalué dans les cellules THP-1 infectées par *F. novicida* sur les trois indicateurs de la réponse inflammatoire choisis : l'activation de NF- κ B, la production d'IL-8, et l'expression de CD40.

1) Effet du M3T sur la réponse induite par *F. novicida*

Le M3T a précédemment été décrit comme un inhibiteur de la réponse inflammatoire induite par du LPS dans des cellules dendritiques humaines dérivées de monocytes (MDC) [169]. Dans cette étude les cellules ont été pré-incubées pendant 1 h avec 15 à 30 μ g/ml de M3T, soit 0,3 à 0,6 μ M, avant stimulation par du LPS. Nous avons choisi d'appliquer les mêmes conditions de traitement pour évaluer l'effet du M3T sur la réponse induite par *F. novicida* dans les cellules THP-1. Ces dernières ont donc été incubées avec des concentrations de M3T comprises entre 5 et 25 μ g/ml pendant 1 h avant l'infection par *F. novicida* dans les conditions décrites précédemment (paragraphe 2-I-A-2a). Aux MOI 10 et 20, le M3T inhibe de façon dose-dépendante l'activation de NF- κ B induite par *F. novicida* également de façon dose-dépendante (Figure 2-I-6A). La production d'IL-8, à MOI 10, étant inférieure à 100 pg/ml (seuil de détection), aucun effet du M3T n'est visible. En revanche, à MOI 30, le M3T inhibe la production d'IL-8 de façon dose-dépendante. Cette inhibition atteint 40 % lorsque le M3T est utilisé à 10 μ g/ml (Figure 2-I-6B). Enfin, l'expression de CD40 est inhibée de façon dose-dépendante avec des concentrations de M3T comprises entre 5 et 25 μ g/ml et pour toutes les MOI testées (2, 10 et 20) (Figures 2-I-6C et D).

Ces résultats démontrent que le M3T est capable d'inhiber la réponse inflammatoire induite par *F. novicida* dans des macrophages, constituant un premier pas vers l'évaluation du potentiel anti-inflammatoire du M3T *in vivo*.

Nous avons ensuite cherché à déterminer par quels mécanismes le M3T inhibait cette réponse.

2) Etude mécanistique de l'effet du M3T

Le M3T a été conçu pour se lier à DC-SIGN et ainsi inhiber la réponse induite par du LPS *via* TLR4 (cf Introduction III-A-2e), [169]). Dans le cas de l'infection par *F. novicida*, la réponse induite dans les cellules THP-1 est très majoritairement dépendante de TLR2. Notre hypothèse privilégiée était donc que le M3T, en se liant à DC-SIGN, pouvait inhiber la réponse induite par *F. novicida* *via* TLR2. Cependant, d'autres mécanismes auraient pu être à l'origine de cet effet anti-inflammatoire du M3T, ne pouvant pas être exclus.

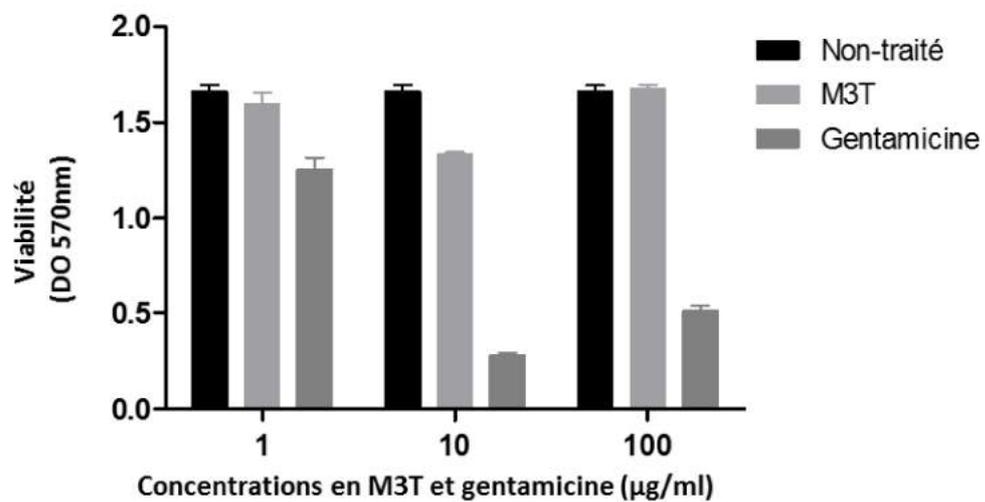


Figure 2-I-7 : Viabilité de *F. novicida* lors du traitement au M3T

6.10⁹ CFU de *F. novicida* sont incubées pendant 4h avec la gentamicine ou le M3T aux concentrations indiquées puis pendant 1h avec du MTT à 500 µg/ml. Après dissolution des cristaux de formazan, la DO est mesurée à 570 nm.

Le M3T n'a pas d'effet sur la viabilité de *F. novicida*.

En effet, le M3T aurait pu avoir un effet microbicide sur *F. novicida* et ainsi réduire la réponse induite par les bactéries en diminuant la charge bactérienne. De la même façon, le M3T aurait pu être un inhibiteur compétitif pour l'entrée des bactéries dans les macrophages réduisant ainsi le nombre de bactéries intracellulaires. Enfin, le M3T aurait pu être un antagoniste de TLR2, ou un inhibiteur direct de la voie de signalisation associée à ce récepteur. Afin de mieux comprendre le mécanisme d'inhibition du M3T sur la réponse induite par *F. novicida*, nous avons donc testé chacune de ces hypothèses.

a) Effet du M3T sur la viabilité de *F. novicida*

Nous avons choisi de vérifier la viabilité de *F. novicida* en présence de M3T par la mesure de la capacité des bactéries à métaboliser le MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide). Ce composé de couleur jaune est réduit en formazan violet par les cellules vivantes. Une mesure d'absorbance permet alors d'évaluer la mortalité des bactéries traitées relativement aux non-traitées. Celles-ci ont été incubées avec des concentrations en M3T et en gentamicine allant de 1 à 100 µg/ml. La gentamicine est un antibiotique efficace contre *F. novicida*, utilisé ici comme contrôle positif. Environ 10⁹ bactéries ont été incubées pendant 4 h avec le M3T ou la gentamicine, puis 1 h avec le MTT. Comme attendu, la gentamicine induit une mortalité des bactéries dès 1 µg/ml. Le M3T en revanche n'induit aucune mortalité à 1 et 100 µg/ml. On observe une légère diminution de la DO avec une dose de 10 µg/ml de M3T, probablement due à une variabilité technique puisqu'à une concentration supérieure le M3T n'a pas d'effet sur la viabilité.

Dans l'ensemble, le M3T ne semble pas altérer la viabilité des bactéries, indiquant qu'il n'agit pas simplement comme agent microbicide (Figure 2-I-7).

b) M3T : inhibiteur compétitif pour l'internalisation de *F. novicida* ?

Si le M3T bloquait l'internalisation de *F. novicida* dans les macrophages, le traitement des cellules par ce composé réduirait le nombre de bactéries intracellulaires et par conséquent la quantité de PAMPs induisant la réponse inflammatoire. Le M3T est un ligand de DC-SIGN, récepteur qui reconnaît les composés mannosylés [169, 173]. Or, le récepteur au mannose (MR), une autre lectine de type C reconnaissant également les motifs mannosylés, est impliqué dans la phagocytose de *Francisella* par les macrophages (Introduction II-B-2a) [61, 197]. L'hypothèse que DC-SIGN puisse être un récepteur d'internalisation de *F. novicida* a donc été testée. Par la suite, nous avons cherché à évaluer la capacité du M3T à interférer avec l'internalisation de *F. novicida* d'une façon plus globale.

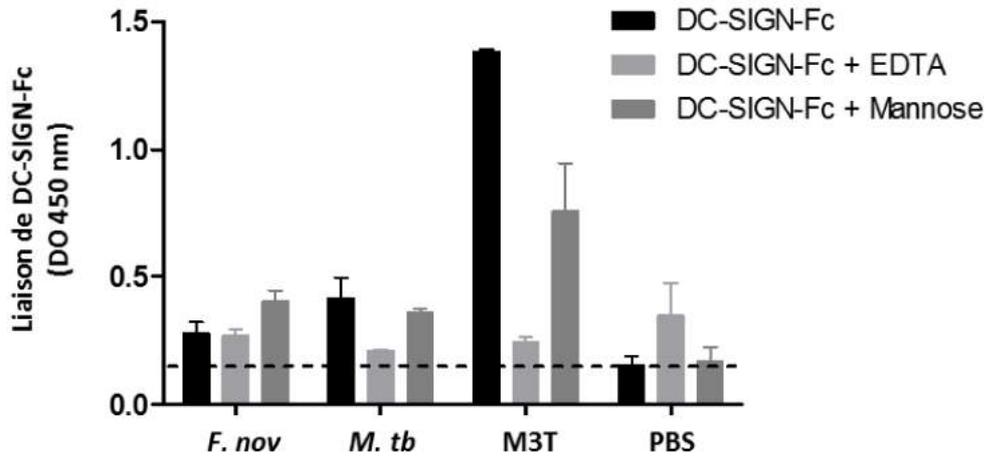


Figure 2-I-8 : Liaison de *F. novicida* à DC-SIGN

1.10^6 bactéries, *F. novicida* (*F. nov*) ou *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) ainsi que le M3T ($1\mu\text{g}$) ou du PBS sont adsorbés au fond des puits. DC-SIGN-Fc ($1\mu\text{g/ml}$) est pré-incubé avec du PBS, de l'EDTA (20 mM), ou du mannose (40 mM) puis placé dans les puits. La liaison est mesurée par la méthode ELISA.

F. novicida se lie faiblement et de façon non-spécifique à DC-SIGN.

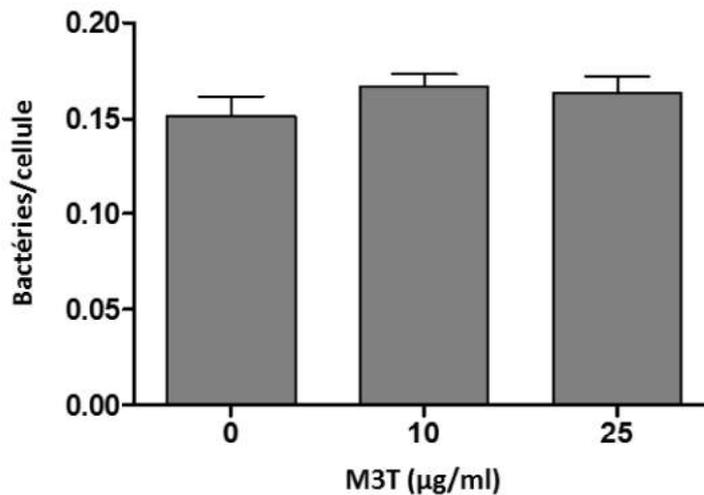


Figure 2-I-9 : Rôle du M3T dans l'internalisation de *F. novicida* par les cellules THP-1

Les cellules THP-1 différenciées sont incubées pendant 1h avec les concentrations indiquées de M3T, puis pendant 2h avec *F. novicida* à MOI 10. Les cellules sont ensuite lysées et étalées sur milieu gélosé pour dénombrer les bactéries intracellulaires.

Le M3T n'interfère pas avec l'internalisation de *F. novicida* dans les cellules THP-1.

ij) DC-SIGN : un récepteur de *F. novicida*?

Nous avons évalué la liaison de *F. novicida* au récepteur DC-SIGN au moyen d'une forme soluble du récepteur composée de sa partie extracellulaire couplée au fragment Fc (DC-SIGN-Fc) (Figure 2-I-8). La protéine DC-SIGN-Fc contient notamment le CRD nécessaire à la reconnaissance du ligand. La liaison au récepteur a été mesurée par un test de type ELISA dans lequel les bactéries ou les ligands purifiés ont été adsorbés au fond des puits d'une microplaque. Dans ces expériences, le M3T, ligand synthétique de DC-SIGN, a été utilisé comme contrôle positif au même titre que *M. tuberculosis*, qui, grâce au ManLAM, peut se lier à DC-SIGN mais possède également l'aspect particulaire des bactéries contrairement au M3T [168, 179, Geijtenbeek, 2003 #608]. Afin de s'assurer de la spécificité de la liaison observée, le récepteur a préalablement été incubé avec un chélateur de calcium, l'EDTA, empêchant ainsi la formation de la liaison, dépendante du Ca^{2+} , entre le CRD et le ligand, ou avec du mannose, un compétiteur pour la liaison.

Ainsi la liaison du M3T à DC-SIGN-Fc est totalement inhibée par l'EDTA et partiellement par le mannose (Figure 2-I-8). La liaison observée de *M. tuberculosis* au récepteur est très faible en comparaison au M3T, indiquant que ce test n'est pas parfaitement adapté à la mesure de la liaison avec des bactéries. En effet, dans cette expérience, les bactéries sont adsorbées au fond des puits de la plaque, et les multiples lavages réalisés au cours du protocole pourraient réduire le nombre de bactéries et engendrer une sous-estimation de la liaison réelle. Toutefois, bien qu'étant faible, la liaison observée entre DC-SIGN-Fc et *M. tuberculosis* est nettement inhibée par l'EDTA et légèrement par le mannose, démontrant une liaison spécifique. Au contraire, la liaison mesurée de *F. novicida* à DC-SIGN est faible mais non-spécifique puisqu'elle n'est inhibée, ni par l'EDTA, ni par le mannose (Figure 2-I-8). Ces résultats semblent indiquer que *F. novicida* ne se lie pas au récepteur DC-SIGN, qui de ce fait ne constituerait pas un récepteur de phagocytose pour ces bactéries.

ii) Effet du M3T sur l'internalisation de *F. novicida*

Nous avons ensuite évalué directement la capacité du M3T à inhiber l'internalisation de *F. novicida* dans les cellules THP-1. Pour cela, les cellules rendues adhérentes par l'ajout de PMA, ont été incubées pendant 1 h avec le M3T à 10 ou 25 $\mu\text{g/ml}$, puis infectées à MOI 10 pendant 2h seulement pour permettre la phagocytose des bactéries tout en évitant leur multiplication intracellulaire. Les cellules ont ensuite été lysées pour dénombrer les bactéries internalisées. Ce nombre ne varie pas en fonction de la présence de M3T (Figure 2-I-9), indiquant que celui-ci n'interfère pas avec l'internalisation de *F. novicida* dans les cellules THP-1.

L'ensemble de ces résultats nous a permis d'exclure la possibilité que le M3T soit un inhibiteur compétitif pour l'entrée de *F. novicida* (via DC-SIGN ou un autre PRR) dans les macrophages.

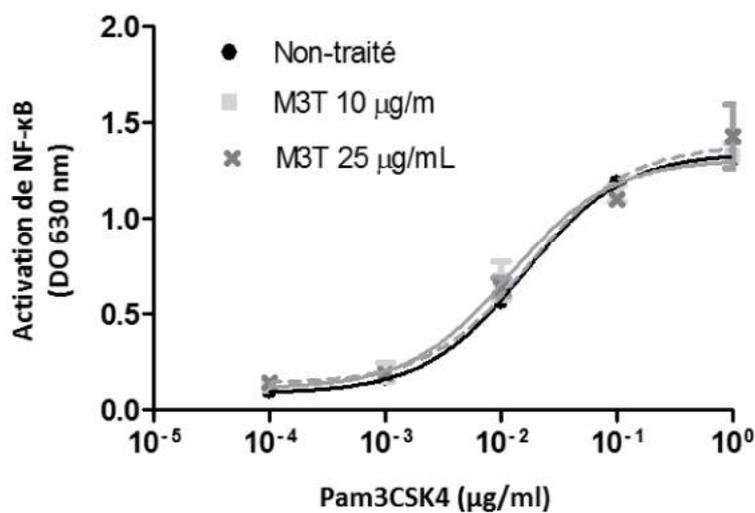


Figure 2-I-10 : Effet antagoniste du M3T sur la signalisation induite par TLR2

Les cellules HEK-TLR2 sont incubées pendant 1h avec les différentes concentrations de M3T indiquées puis pendant 18h avec du Pam₃CSK₄ aux concentrations indiquées. Le surnageant est prélevé pour mesurer l'activation de NF-κB par mesure de la DO à 630 nm.

Le M3T n'est pas un antagoniste de TLR2.

c) M3T : antagoniste de TLR2 ?

Bien que la structure du M3T ne soit pas *a priori* compatible avec une liaison à TLR2, l'éventualité que celui-ci soit un antagoniste de TLR2, ou un inhibiteur direct de sa voie de signalisation, était à vérifier. Ce récepteur reconnaît des ligands de nature lipidique ou protéique (lipoprotéines, lipoarabinomannane, acide lipoteichoïque) (cf Introduction II-B-1) qui diffèrent de la structure du M3T. Toutefois, nous avons cherché à nous assurer que celui-ci n'interagissait pas directement avec TLR2, ou la voie de signalisation associée. Les cellules HEK-TLR2 rapportrices de l'activation de ce récepteur et n'exprimant pas DC-SIGN, ont été utilisées pour vérifier l'absence d'effet inhibiteur direct du M3T sur la voie de signalisation de TLR2. Ces cellules, préalablement incubées avec 10 ou 25 µg/ml de M3T, ont été stimulées avec des doses croissantes de Pam₃CSK₄ (lipopeptides synthétique triacylé) de 0,1 ng/ml à 1 µg/ml. L'activation des cellules HEK-TLR2 est inchangée par la présence de M3T (Figure 2-I-10). Aux doses utilisées habituellement sur les cellules THP-1, le M3T n'a donc aucun effet inhibiteur direct sur la réponse induite par TLR2 dans ces cellules.

d) Inhibition de la voie de signalisation induite par TLR2

Comme décrit par Blattes *et al.* [169], dans le cas d'une stimulation par du LPS *via* TLR4, le M3T inhibe la réponse inflammatoire en induisant une voie de signalisation dépendante de DC-SIGN. Cette voie, partiellement élucidée par Gringhuis *et al.* [180] interfère avec la voie de signalisation des TLR. En effet, lorsque TLR4 est activé par du LPS, la liaison du M3T à DC-SIGN provoque la phosphorylation de la kinase Raf-1 [169]. Celle-ci, comme montré par Gringhuis *et al.* [180], conduit à la phosphorylation puis à l'acétylation de la sous-unité p65 de NF-κB. Cette modification de NF-κB favorise la transcription de cytokines anti-inflammatoires, telles que l'IL-10 aux dépens des cytokines pro-inflammatoires [169, 180].

Ayant réfuté les hypothèses concernant un effet du M3T sur la charge bactérienne ou un effet direct sur la voie de signalisation dépendante de TLR2, la dernière hypothèse est celle d'un mécanisme similaire à l'inhibition de la signalisation induite par TLR4 qui pourrait prendre place dans le cas d'une réponse induite par *F. novicida*. La liaison du M3T entraînant l'activation de la voie de signalisation de DC-SIGN, pourrait inhiber la réponse induite par les bactéries non pas *via* TLR4 mais *via* TLR2. Cependant, bien que l'activation de DC-SIGN permette l'inhibition des voies de signalisation induite par TLR3, TLR4 et TLR5, son rôle sur la voie induite par TLR2 n'a jamais été démontré [180]. Cependant, Salp15, une protéine des glandes salivaires de tiques, caractérisée comme ligand de DC-SIGN, inhibe la production de cytokines induite par de l'acide lipoteichoïque, ligand de TLR2, dans des cellules dendritiques humaines [198]. Bien que l'implication de DC-SIGN n'ait pas été montrée directement, ces données suggèrent un lien entre modulation de la signalisation par TLR2 et le récepteur DC-SIGN [198].

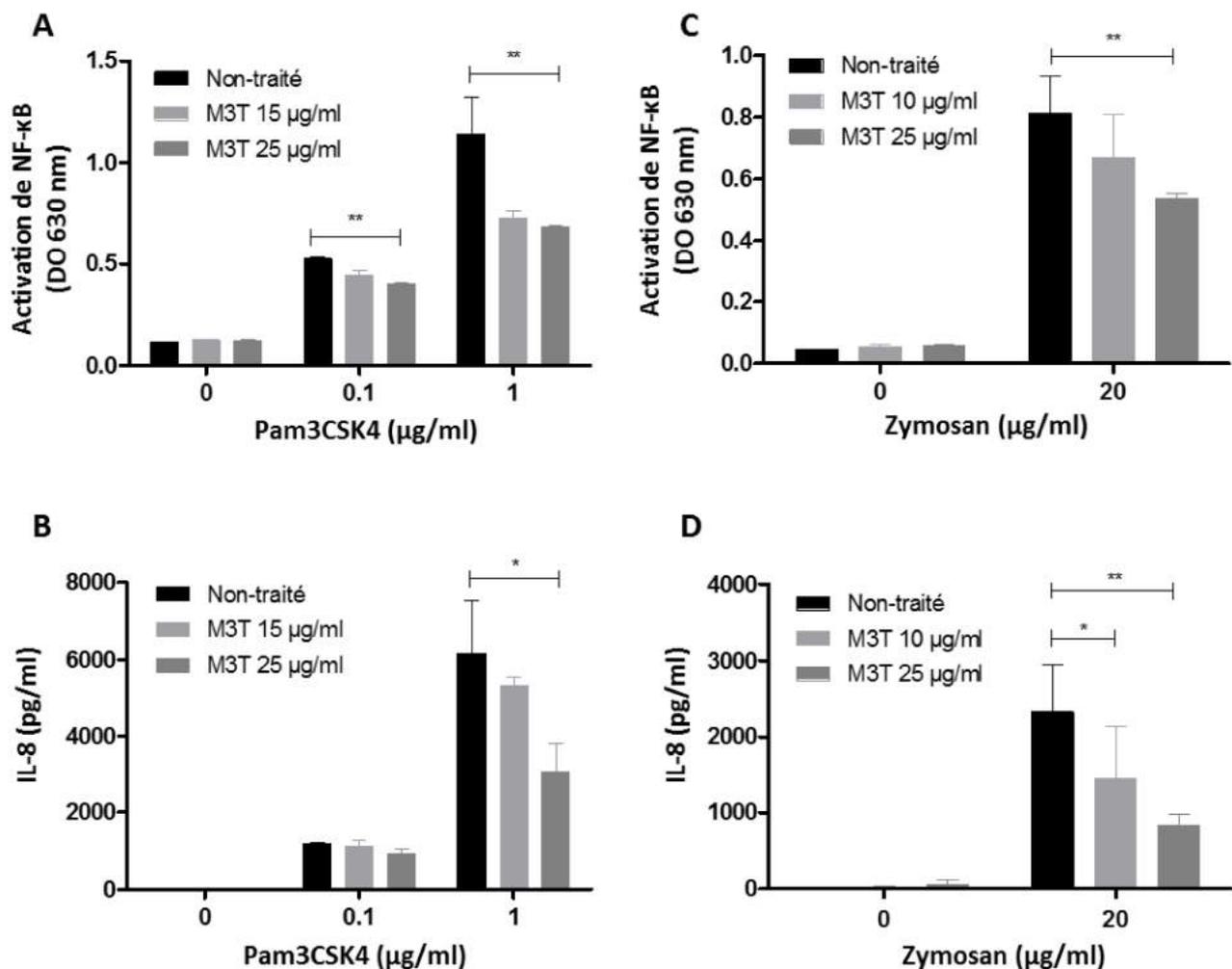


Figure 2-I-11 : Effet du M3T sur l'activation de NF-κB et la production d'IL-8 induite par des ligands de TLR2 dans les cellules THP-1

Effet du M3T sur l'activation de NF-κB (A) et de la production d'IL-8 (B) induite par le lipopeptide Pam₃CSK₄

Les cellules THP-1 sont incubées pendant 1h avec les concentrations indiquées de M3T puis pendant 18h avec les concentrations indiquées de Pam₃CSK₄. Le surnageant est ensuite prélevé pour mesurer l'activation de NF-κB par mesure de la DO à 630 nm et doser l'IL-8 par ELISA.

Effet du M3T de l'activation de NF-κB (C) et de la production d'IL-8 (D) induite par le zymosan

Les cellules THP-1 sont incubées pendant 1h avec les concentrations indiquées de M3T puis pendant 18h avec le zymosan. Le surnageant est ensuite prélevé pour mesurer l'activation de NF-κB par mesure de la DO à 630 nm et doser l'IL-8 par ELISA.

Le M3T réduit l'activation de NF-κB et d'IL-8 induites par le Pam₃CSK₄ et le zymosan, deux ligands de TLR2.

De plus, cette hypothèse est appuyée par des études décrivant un lien entre SIGNR1, homologue murin de DC-SIGN, et la signalisation par TLR2. En effet, il a été montré que l'activation de NF- κ B et la production de cytokines pro-inflammatoires induites *via* TLR2 peuvent être inhibées par la liaison de ManLAM au récepteur SIGNR1, dans des cellules dendritiques murines. Dans ces études, des ligands synthétiques de TLR2 tels que FSL-1 ou Pam₃CSK₄ (lipopeptide di- et tri-acylés respectivement) ont été utilisés [184, 199]. La voie de signalisation induite par SIGNR1 est légèrement différente de celle décrite par Gringhuis *et al.* pour l'inhibition par DC-SIGN de la signalisation induite *via* TLR4 [180]. La phosphorylation des kinases Raf-1 et Syk suite à l'activation SIGNR1 conduirait à une augmentation de l'expression de la protéine régulatrice SOCS1 (Suppressor of Cytokine Signaling 1). Cette dernière pourrait alors se lier à la sous-unité p65 de NF- κ B et provoquer sa dégradation, ou interagir avec la protéine adaptatrice TIRAP et empêcher l'activation de NF- κ B [199]. Le M3T est également un ligand du récepteur murin SIGNR1, appuyant l'hypothèse d'un mécanisme d'inhibition de la voie induite par TLR2 [169]. Nous avons donc cherché à savoir si le M3T pouvait inhiber une signalisation induite par TLR2 ainsi qu'à déterminer le rôle de DC-SIGN dans l'effet inhibiteur de la réponse induite par *F. novicida*.

i) Inhibition de la signalisation induite par des ligands de TLR2

L'évaluation de l'effet du M3T sur une signalisation induite par TLR2 a été réalisée en utilisant deux ligands de nature différentes de ce récepteur : le lipopeptide synthétique tri-acylé Pam₃CSK₄, activant l'hétérodimère TLR1/TLR2, et le zymosan, activant l'hétérodimère TLR2/TLR6. Ce dernier est un mélange complexe isolé de la paroi de la levure *Saccharomyces cerevisiae* et mimant la nature particulière des bactéries [200].

Les cellules THP-1, préalablement incubées avec des concentrations de M3T comprises entre 10 et 15 μ g/ml, ont été stimulées par le Pam₃CSK₄ ou le zymosan. Ces deux ligands induisent une activation de NF- κ B et une production d'IL-8, réduites de façon dose-dépendante par le M3T (Figure 2-I-11). Cet effet inhibiteur du M3T est plus prononcé pour la plus forte concentration de Pam₃CSK₄ avec une réduction d'environ 40 % de l'activation de NF- κ B (Figure 2-I-11A). De même, la production d'IL-8 induite par cette concentration de Pam₃CSK₄ est inhibée à plus de 50 % par le M3T (Figure 2-I-11B). La production d'IL-8 induite par le zymosan est réduite à 70 % par le M3T (Figure 2-I-11D). Ces résultats indiquent que le M3T est capable d'inhiber la voie de signalisation dépendante de TLR2. Cependant, en raison d'un problème lié à l'anticorps anti-DC-SIGN expliqué ultérieurement dans le paragraphe suivant, nous n'avons pas pu établir le rôle de la liaison du M3T à DC-SIGN dans cet effet inhibiteur.

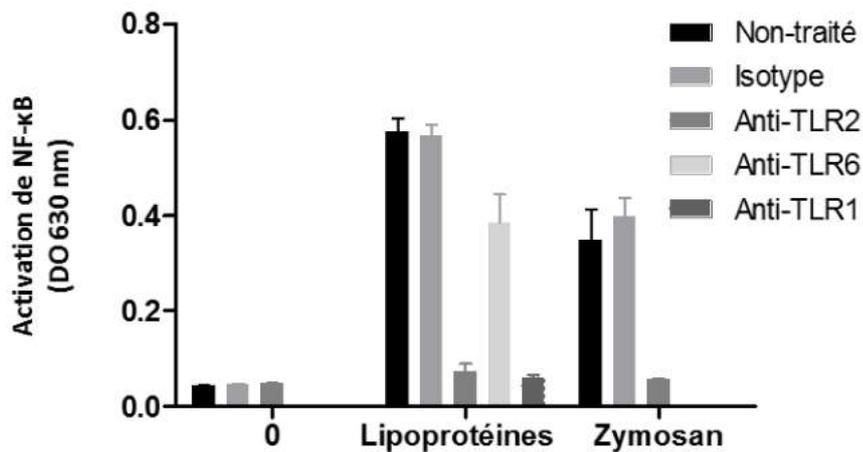


Figure 2-I-12 : Rôle de TLR1, TLR2 et TLR6 dans l'activation de NF-κB par les lipoprotéines de *F. novicida*

Les cellules THP-1 sont incubées pendant 30 min avec 5 µg/ml d'anticorps anti-TLR2, anti-TLR1, anti-TLR6 ou d'isotype puis pendant 18h avec 100 ng/ml de lipoprotéines extraites de *F. novicida*. Le surnageant est ensuite prélevé pour mesurer l'activation de NF-κB par mesure de la DO à 630 nm.

L'activation de NF-κB induite par les lipoprotéines extraites de *F. novicida* est dépendante de TLR1 et TLR2.

Cette démonstration de l'effet du M3T ayant été réalisée avec des ligands indépendants de *F. novicida*, nous nous sommes également intéressés à l'effet du M3T sur la réponse induite par le principal ligand de TLR2 de ces bactéries : les lipoprotéines [89]. En effet, bien que *Francisella* réprime l'expression de ces lipoprotéines afin de limiter l'activation de TLR2, au moins deux d'entre elles sont des ligands conduisant à l'activation de ce récepteur dans des BMDC (cf Introduction II-B-1) [89, 92]. Nous avons donc cherché à déterminer si le M3T inhibait la réponse induite par les lipoprotéines de *F. novicida*.

Les lipoprotéines de *Francisella* activent TLR2, en revanche l'implication des co-récepteurs TLR1 et TLR6 est toujours controversée (cf Introduction II-B-1). Thakran *et al* [89], ont montré une activation de l'hétérodimère TLR1/TLR2 par deux lipoprotéines de la souche LVS, alors que Katz *et al.* [87] ont montré une activation de cellules dendritiques par cette souche dépendante de TLR2/TLR6. Nous avons donc cherché, dans un premier temps, à déterminer l'implication de TLR1, 2 et 6 dans la réponse induite par les lipoprotéines de *F. novicida* dans les cellules THP-1.

Tout d'abord, les lipoprotéines ont été isolées à partir d'une culture de *F. novicida* par une extraction au phénol (cf Matériel et Méthodes). Ensuite, les cellules, préalablement incubées avec des anticorps bloquant anti-TLR1, TLR2 ou TLR6, ont été stimulées pendant 18h avec les lipoprotéines extraites de *F. novicida*. Les lipoprotéines à une dose de 100 ng/ml induisent bien une activation de NF- κ B (Figure 2-I-12). Le blocage de TLR2 ou de TLR1 entraîne une inhibition d'environ 90 % de l'activation de NF- κ B induite par les lipoprotéines. En revanche, l'anticorps anti-TLR6 n'inhibe que 30 % de cette activation (Figure 2-I-12). Par ailleurs, l'isotype contrôle n'a pas d'effet sur l'activation de NF- κ B indiquant que l'inhibition observée est bien spécifique du blocage de TLR2 et TLR1. Nous avons également vérifié que le zymosan induit une activation de NF- κ B dépendante de TLR2 (Figure 2-I-12). Dans notre modèle, les lipoprotéines extraites de *F. novicida* sont donc à l'origine d'une activation de NF- κ B très majoritairement dépendante de TLR1/TLR2. TLR6 semble jouer, quant à lui, un rôle mineur dans la réponse induite par les lipoprotéines de *F. novicida*. Malgré les données contradictoires de la littérature, ces résultats sont cohérents car, de façon générale, les bactéries à Gram négatif, telles que *F. novicida*, produisent des lipoprotéines tri-acylées reconnues par l'hétérodimère TLR1/TLR2 [78].

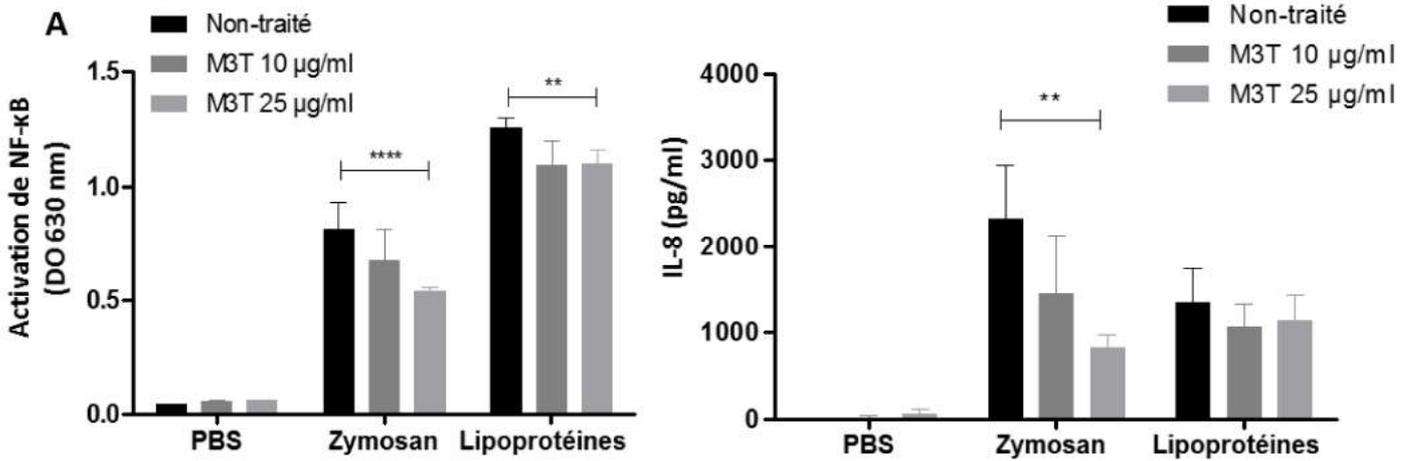


Figure 2-I-13 : Effet du M3T sur l'activation de NF-κB et la production d'IL-8 induite par les lipoprotéines de *F. novicida*

Les cellules THP-1 sont incubées pendant 1 h avec les concentrations indiquées de M3T puis pendant 18 h avec 100 ng/ml de lipoprotéines extraites de *F. novicida* et 20 µg/ml de zymosan (contrôle positif). Le surnageant est ensuite prélevé pour mesurer l'activation de NF-κB (A) par mesure de la DO 630 nm et la production d'IL-8 (B) par ELISA.

Le M3T n'a pas d'effet sur l'activation de NF-κB ou la production d'IL-8 induite par les lipoprotéines de *F. novicida* dans ces conditions.

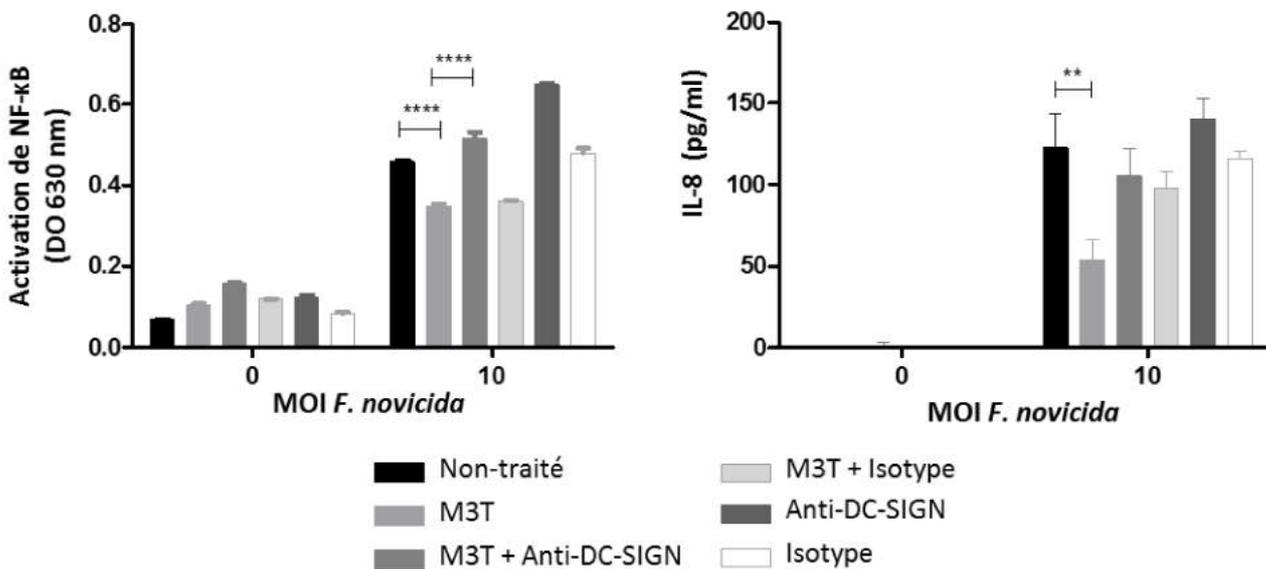


Figure 2-I-14 : Rôle de DC-SIGN dans l'inhibition de l'activation de NF-κB et de la production d'IL-8 par le M3T

Les cellules THP-1 sont incubées pendant 30 min avec les concentrations indiquées d'anticorps anti-DC-SIGN (20 µg/ml) ou d'istotype (20 µg/ml), puis pendant 1 h avec les concentrations indiquées de M3T et finalement, infectées par *F. novicida* pendant 18 h aux MOI indiquées. Le surnageant est ensuite prélevé afin de mesurer l'activation de NF-κB (A) par mesure de la DO à 630 nm et doser l'IL-8 (B) par ELISA.

L'inhibition de l'activation de NF-κB et de la production d'IL-8 par le M3T semble dépendante de DC-SIGN mais l'activation inhérente à l'anticorps ne permet pas de l'affirmer.

Nous avons ensuite cherché à savoir si le M3T pouvait inhiber la réponse induite par les lipoprotéines de *F. novicida*. Les cellules THP-1, préalablement incubées avec le M3T, ont donc été stimulées par les lipoprotéines de *F. novicida*. L'effet inhibiteur du M3T sur la réponse induite par le zymosan ayant été établie, nous avons choisi ce dernier comme contrôle positif. Lorsqu'elle est induite par le zymosan, l'activation de NF- κ B est bien inhibée de façon dose-dépendante par le M3T. En revanche, l'inhibition est plus faible lorsque l'activation est induite par les lipoprotéines et n'est pas toujours dose-dépendante (Figure 2-I-13A). La production d'IL-8 induite par le zymosan est en effet inhibée par le M3T. En revanche, celle-ci ne varie pas lorsque les cellules stimulées avec les lipoprotéines sont traitées avec le M3T (Figure 2-I-13B). Cette expérience a été reproduite trois fois avec des résultats similaires. Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que l'effet du M3T sur la réponse induite par les lipoprotéines de *F. novicida* est très limité. Des expériences supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer les conditions optimales d'activation par les lipoprotéines permettant d'observer un éventuel effet du M3T.

ii) Rôle de DC-SIGN

L'implication du récepteur DC-SIGN dans l'inhibition par le M3T de la réponse induite par *F. novicida*, a été évaluée en utilisant un anticorps bloquant anti-DC-SIGN (Aznd1 [201]). Les cellules THP-1, préalablement incubées avec cet anticorps, ont été traitées avec le M3T puis infectées par *F. novicida* à une MOI de 10. Le blocage de DC-SIGN par l'anticorps annule l'inhibition de l'activation de NF- κ B par le M3T, semblant indiquer que l'effet du M3T dépend de ce récepteur. De plus, l'isotype contrôle, utilisé dans les mêmes conditions que l'anticorps anti-DC-SIGN ne montre aucun effet sur l'activation de NF- κ B, ni sur son inhibition par le M3T, confirmant que l'inhibition de l'effet de M3T est bien due *a priori* au blocage de DC-SIGN (Figure 2-I-14A). En revanche, on observe une activation inexplicée de NF- κ B lorsque les bactéries et l'anticorps sont présents. La production d'IL-8 a ensuite été mesurée exactement dans les mêmes conditions et une inhibition par le M3T allant jusqu'à 50 % a été observée. Cette inhibition est bloquée par la présence de l'anticorps anti-DC-SIGN (Figure 2-I-14B). Cependant, comme dans le cas de l'activation de NF- κ B, la production d'IL-8 est augmentée par la présence simultanée de l'anticorps et des bactéries. De plus, dans le cas de l'IL-8, l'isotype contrôle semble avoir quasiment le même effet que l'anticorps anti-DC-SIGN, ne permettant pas de conclure sur les conséquences du blocage de DC-SIGN.

Les expériences réalisées jusqu'ici dans ces conditions n'ont pas permis de déterminer le rôle de DC-SIGN dans la réduction de l'expression de CD40 par le M3T. En effet, les MOI choisies pour mesurer l'activation de NF- κ B sont probablement trop faibles pour obtenir une expression suffisante de CD40 permettant d'observer l'inhibition par le M3T. D'autres expériences doivent être réalisées avec des conditions adaptées, notamment en augmentant la MOI.

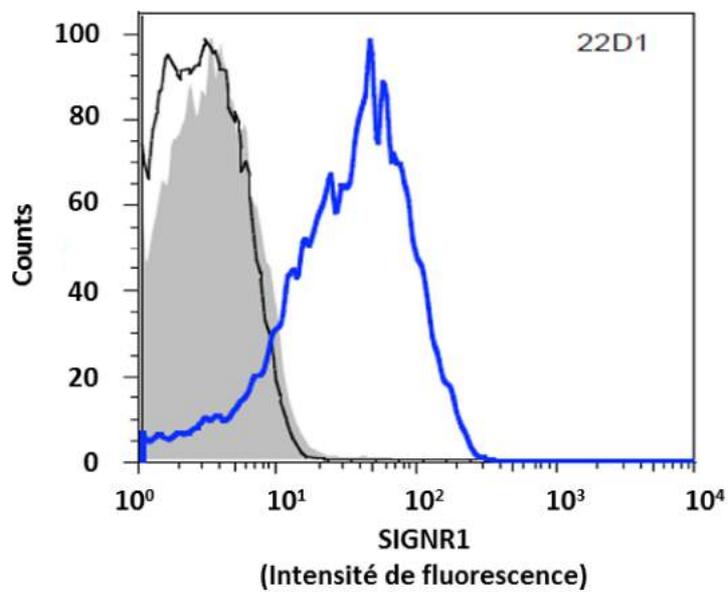


Figure 2-I-15 : Expression du récepteur SIGNR1 par les BMDC

Les BMDC générées à partir de souris C57Bl/6 ont été marquées par un anticorps anti-SIGNR1 (clone 22D1) puis par un anticorps secondaire fluorescent, et analysées par cytométrie en flux. Les BMDC expriment le récepteur SIGNR1.

Ces résultats semblent indiquer que l'inhibition par le M3T de l'activation de NF- κ B et de la production d'IL-8 induite par *F. novicida* est dépendante de DC-SIGN. Cependant, l'effet activateur de l'anticorps ne nous permet pas de conclure définitivement. Toutefois, le blocage de l'inhibition par le M3T de l'activation de NF- κ B et de la production d'IL-8 a été reproduit à plusieurs reprises avec une activation plus ou moins importante associée à l'anticorps anti-DC-SIGN seul. L'ensemble de ces données ainsi que le mécanisme d'action préalablement établi pour le M3T [169] suggèrent une implication du récepteur DC-SIGN dans l'effet inhibiteur du M3T sur la réponse associée à *F. novicida*.

3) Conclusion

Le M3T est capable de réduire l'activation de NF- κ B, la production d'IL-8 ainsi que l'expression de CD40 dans les cellules THP-1 infectées par *F. novicida*. De plus, il inhibe l'activation de NF- κ B et la production d'IL-8 induite par d'autres ligands de TLR2. Ces données suggèrent un mécanisme d'inhibition du M3T consistant à moduler la voie de signalisation de TLR2. Bien que le rôle exact de DC-SIGN reste à confirmer, celui-ci semble impliqué dans l'inhibition par le M3T de la réponse induite par *F. novicida* via TLR2 dans les cellules THP-1. Par la suite, nous avons cherché à évaluer le M3T dans des modèles cellulaires plus physiologiques tels que les cellules primaires humaines et murines.

C) Evaluation de l'effet anti-inflammatoire du mannodendrimère 3T *in vitro* dans des cellules primaires

Les cellules primaires humaines et murines ont été choisies selon plusieurs critères. Premièrement, ces cellules devaient exprimer les récepteurs humain ou murin du M3T, DC-SIGN ou SIGNR1. A l'instar des macrophages, les cellules dendritiques sont une cible privilégiée de *Francisella* et jouent un rôle clé dans la réponse inflammatoire. En effet, *in vivo*, les DC sont une niche de réplication de *F. tularensis* dans les poumons [59]. *In vitro*, une étude de la réponse induite par l'infection de DC humaines par *F. tularensis* indique que celles-ci jouent un rôle dans la production de cytokines pro-inflammatoires induite par les bactéries [202]. Bien qu'il soit possible de différencier des monocytes du sang périphérique humain en macrophages exprimant DC-SIGN [203], le M3T ayant déjà montré des propriétés anti-inflammatoires dans des cellules dendritiques humaines dérivées de monocytes (MDC) [169], nous avons donc choisi d'évaluer le M3T dans ces MDC et dans des cellules dendritiques murines dérivées de moelle osseuse de fémurs de souris C57Bl6 (BMDC). Ces dernières sont couramment utilisées comme modèle cellulaire *ex-vivo* et notamment dans le cadre d'étude sur les infections par *Francisella* [59]. Ces cellules expriment le récepteur SIGNR1 montré comme étant le récepteur murin du M3T [169] (Figure 2-I-15).

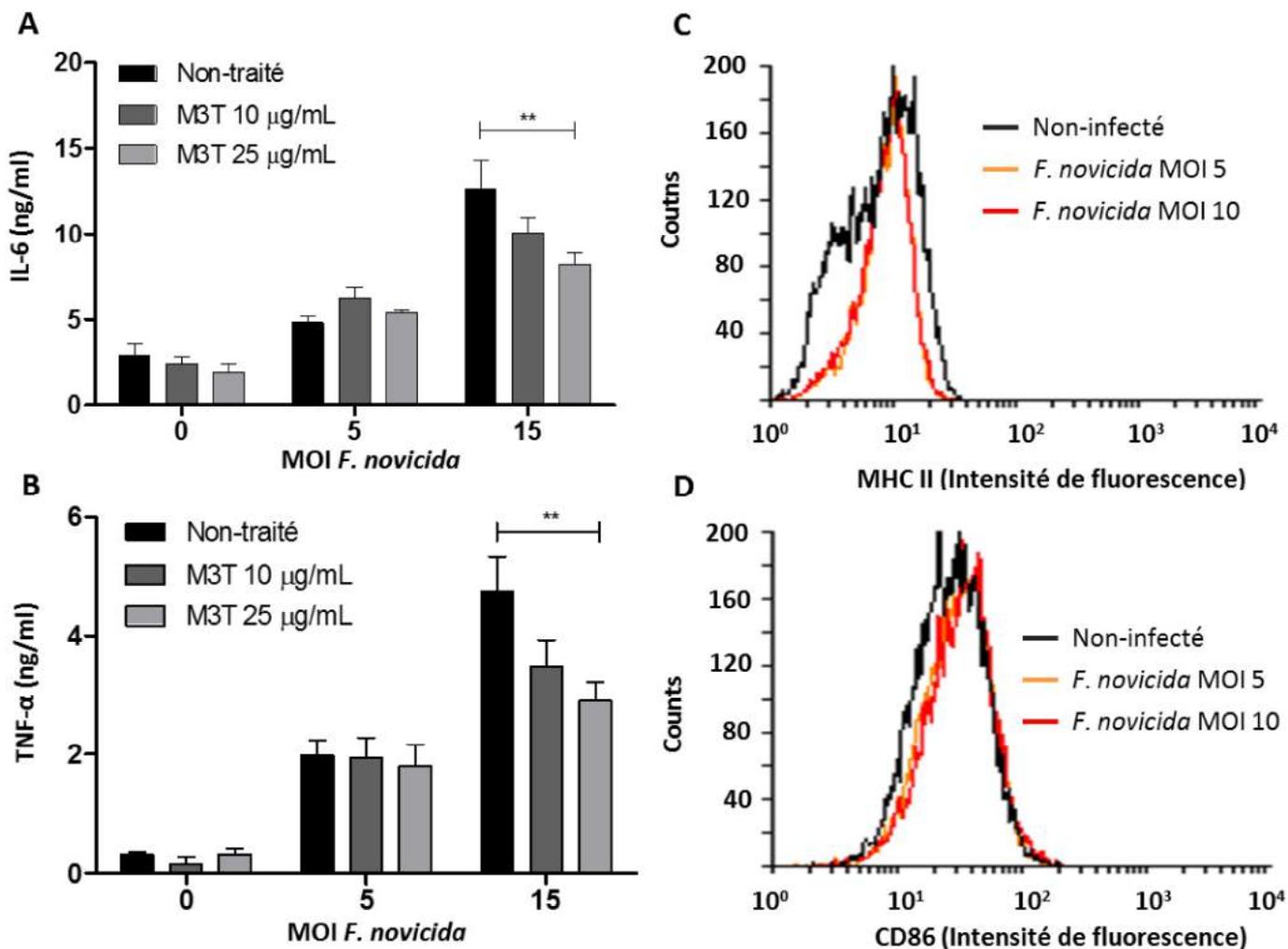


Figure 2-I-16 : Effet du M3T sur la production d'IL-6 et de TNF α induite par *F. novicida* dans les hMDC

Les hMDC sont incubées pendant 1h avec les concentrations indiquées de M3T puis infectées pendant 18h avec les MOI indiquées de *F. novicida*. Le surnageant est prélevé pour doser les cytokines IL-6 (A) et TNF- α (B) par ELISA. Le M3T inhibe la production d'IL-6 et de TNF- α induites par *F. novicida* dans les DC. L'infection, dans ces conditions, ne conduit pas à une augmentation de l'expression de CD86, ni de MHCII.

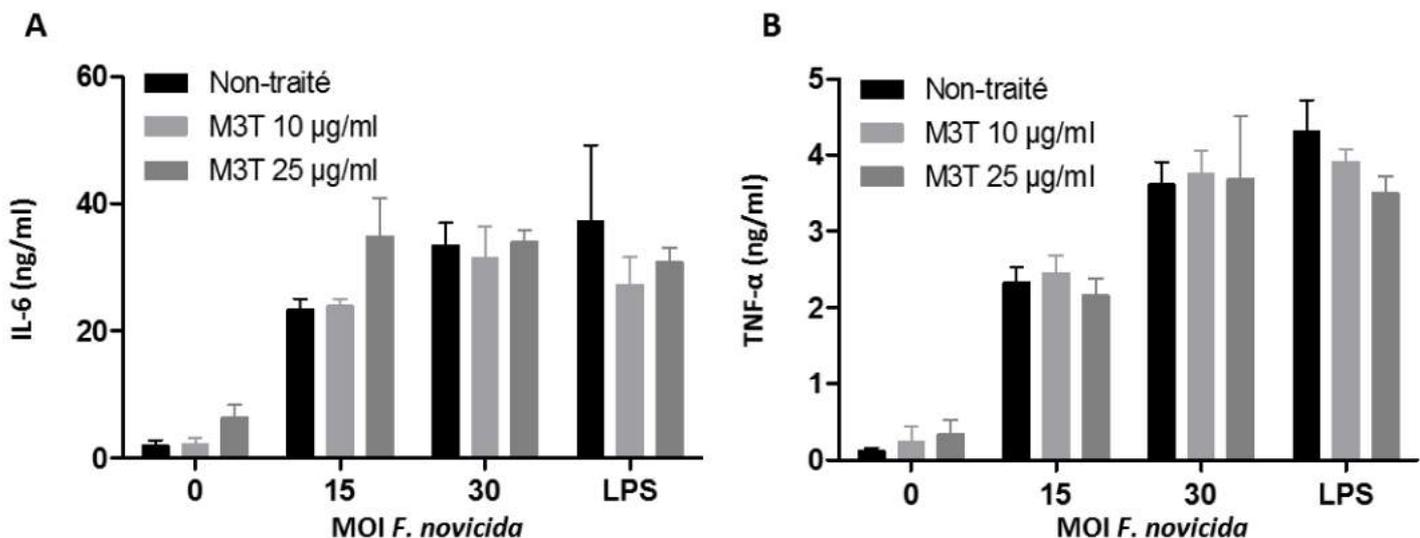


Figure 2-I-17 : Effet du M3T sur la production d'IL-6 et de TNF α induite par *F. novicida* dans les BMDC

Les BMDC sont incubées pendant 1h avec les concentrations indiquées de M3T puis infectées pendant 18h avec les MOI indiquées de *F. novicida*. Le surnageant est prélevé pour doser les cytokines IL-6 (A) et TNF- α (B) par ELISA. Aucun effet du M3T n'a été observé sur la production d'IL-6 ou de TNF- α induite par *F. novicida* dans les BMDC.

a) Les cellules dendritiques humaines dérivées de monocytes

Les conditions d'infection (MOI, durée) et de traitement par le M3T déterminées pour les cellules THP-1 ont été appliquées sur les hMDCs pour une première évaluation du M3T dans ces cellules. Les cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-6 sont produites par les cellules dendritiques humaines en réponse à *F. tularensis* LVS [202]. De plus, Bosio *et al*, [59] ont montré sur des cellules dendritiques murines que l'infection par *F. tularensis* LVS induisait une maturation des cellules caractérisée par l'expression des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (MHC II) et de la molécule de co-stimulation CD86 [59]. Nous avons donc choisi ces 4 paramètres comme marqueurs de la réponse inflammatoire dans les hMDC.

Les hMDC, obtenues après différenciation des monocytes, ont été incubées pendant 1 h avec le M3T, à des concentrations identiques à celles utilisées dans les cellules THP-1. Les cellules ont ensuite été infectées pendant 18 h par *F. novicida* à des MOI de 5 et 15.

Le dosage de l'IL-6 et du TNF- α dans le surnageant montre qu'à la plus forte MOI, le M3T inhibe la production de ces cytokines pro-inflammatoires de façon dose-dépendante, et jusqu'à 40 % pour le TNF- α (Figure 2-I-16A et B). En revanche, malgré plusieurs tentatives, l'expression de CD86 et MHCII induite par l'infection par *F. novicida* n'a pas pu être détectée (Figure 2-I-16C et D). Ceci pourrait être dû à des doses infectieuses trop faibles, de ce fait, les expériences sont à renouveler avec des MOI plus importantes.

b) Les cellules dendritiques murines dérivées de moelle osseuse

L'objectif étant, à terme, d'évaluer les propriétés du M3T *in vivo* chez la souris nous avons cherché à évaluer le potentiel anti-inflammatoire du M3T sur des cellules dendritiques murines. Dans ces cellules, la réponse inflammatoire a été observée *via* des paramètres identiques à ceux des hMDC (cytokines et expression de molécules de co-stimulation). L'évaluation du M3T sur ces cellules n'a pu être réalisée qu'une fois. Dans cette expérience, les conditions d'infection (MOI, durée) utilisées étaient similaires à celles des THP-1 et des hMDC. Les BMDC, préalablement incubées avec le M3T, ont donc été infectées par *F. novicida* à MOI 15 ou 30, ou stimulées par du LPS à 20 ng/ml, utilisé comme contrôle positif d'activation des cellules. Ces conditions ont entraîné une production très importante d'IL-6, jusqu'à 35 ng/ml. Cependant les cellules non-traitées et non-infectées ont montré également une production non négligeable d'IL-6 d'environ 2 ng/ml (Figure 2-I-17A). Le même constat a été fait pour la production de TNF- α . La production importante de cytokines, indépendamment de l'infection, traduit une activation anormale des cellules provenant probablement du protocole de différenciation. Cette expérience n'a donc peut-être pas été réalisée dans des conditions adaptées à l'évaluation du M3T, qui n'a, par ailleurs, pas montré d'effet inhibiteur dans ce cas (Figure 2-I-17B). La différenciation des cellules préalable à l'infection mérite des mises au point supplémentaires avant de pouvoir à nouveau évaluer le M3T. Lors de cette

expérience, l'expression des deux marqueurs d'activation CD86 et MHCII n'a pas pu être mesurée en raison d'un nombre trop faible de cellules.

Nos résultats, ainsi que les données publiées montrant un effet très limité du M3T sur la réponse induite par du LPS dans des BMDC [169], nous ont conduit à remettre en question la pertinence de ces cellules pour l'observation de l'effet anti-inflammatoire du M3T.

En effet, chez la souris, cet effet dépend du récepteur SIGNR1 puisque les souris déficientes pour ce récepteur, contrairement aux souris sauvages, ne présentent aucune différence dans recrutement des neutrophiles dans les poumons en présence ou en absence de traitement par le M3T [169]. Cependant, d'après la littérature, ce récepteur est principalement exprimé dans les macrophages de la zone marginale de la rate, dans lesquels il intervient dans l'internalisation d'antigènes de nature polysaccharidique [204]. Aucune donnée n'a été publiée sur l'expression de SIGNR1 dans les BMDC. Il n'est donc pas exclu que, bien que nous ayons vérifié la présence de SIGNR1 dans ces cellules (Figure 2-I-15), le récepteur, ou sa voie de signalisation, ne soit pas fonctionnel dans ces cellules.

II- Evaluation du potentiel thérapeutique du M3T *in vivo*

La suite de mon travail a consisté à évaluer le bénéfice thérapeutique potentiel apporté par le M3T dans un modèle murin d'infection pulmonaire par *F. novicida*. Cette évaluation a été réalisée sur la souche de souris C57Bl/6JRj, choisie pour deux raisons principales. Premièrement, elle est couramment utilisée comme modèle d'étude des infections pulmonaires par *F. tularensis*. En particulier, la réponse inflammatoire a été caractérisée principalement dans ce modèle, notamment son évolution en sepsis [67, 129]. La seconde raison est liée à notre volonté de démontrer l'implication de SIGNR1 dans l'effet du M3T, celui-ci étant le récepteur murin du M3T [169]. Pour ce faire, nous disposons de souris déficientes pour le récepteur SIGNR1 générées dans le fond génétique C57Bl/6 [183]. Afin de pouvoir évaluer l'effet du récepteur, il était nécessaire de réaliser la même expérience avec les souris sauvages (WT) de la même souche. Toutes les expériences ont donc été menées sur des souris C57Bl/6JRj femelles âgées de 6 à 10 semaines.

Le laboratoire n'est pas équipé d'une animalerie permettant la manipulation de souches bactériennes de niveau 2 spécifiquement. Toutes les expériences d'infection par *F. novicida* ont donc été réalisées dans l'animalerie de sécurité biologique de niveau 3 (ASB3).

A) Mise au point du modèle d'infection pulmonaire

Notre objectif était de développer un modèle d'infection pulmonaire avec une faible dose infectieuse, dans le but de mimer des conditions « réalistes » d'infection. De plus, d'après les données de la littérature, un faible nombre bactéries *F. novicida* (environ 50 CFU) administré par voie pulmonaire suffit à induire une pathologie létale [130].

D'autre part, nous souhaitons évaluer le bénéfice thérapeutique du M3T seul ou en tant que traitement complémentaire aux antibiotiques. En effet, la charge bactérienne, en l'absence de traitement, atteint 10^8 CFU dans différents organes tels que le foie ou la rate, 2 à 3 jours post-infection [130]. Dans un objectif thérapeutique, celle-ci doit donc nécessairement être contrôlée par un antibiotique. Nous avons donc cherché à développer un traitement antibiotique sous-optimal, non-curatif. L'objectif de ce modèle était de pouvoir évaluer un bénéfice thérapeutique potentiel du M3T, associé ou non, à l'antibiotique, sur trois principaux paramètres clés de la pathologie induite par l'infection pulmonaire par *F. novicida* : la survie des animaux, la charge bactérienne ainsi que l'inflammation. Nous avons étudié différents aspects de la réponse inflammatoire dans les poumons, premier organe touché par l'infection, notamment la production de cytokines et le recrutement cellulaire. De plus, les lésions inflammatoires dans les poumons, le foie et la rate, étant décrites comme en grande partie responsables de la mortalité associée aux infections pulmonaires par *F. novicida*, nous avons étudié l'effet du M3T sur ces lésions [68, 129]. Ceci a été réalisé par l'analyse de coupes histologiques de ces trois organes.

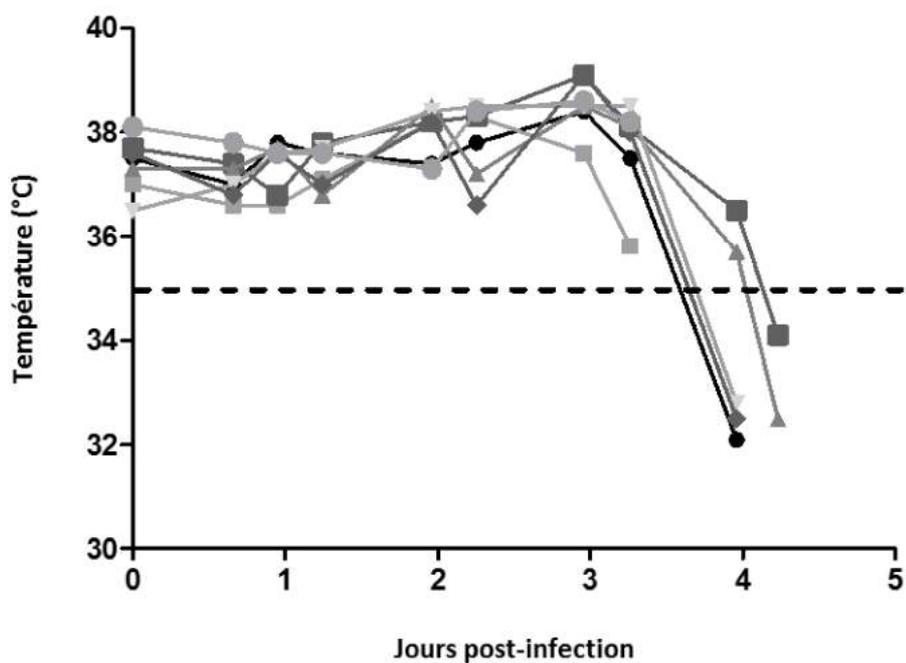


Figure 2-II-1 : Evolution de la température des souris infectées par *F. novicida*

Les souris sont infectées par voie intranasale avec 60 CFU de *F. novicida*. La température des animaux a ensuite été mesurée deux fois par jours jusqu'à la mort.

Après une augmentation 24 à 48 h post-infection, la température des animaux baisse drastiquement entre 72 et 96 h indiquant une mort imminente. Pour la suite des expériences, les souris présentant une température inférieure à 35 °C sont euthanasiées.

Bien que le M3T n'ait pas montré d'effet bactéricide *in vitro*, il était envisageable que la modulation de l'inflammation puisse jouer un rôle dans le contrôle de la charge bactérienne. Nous avons donc également évalué l'effet du M3T sur la charge bactérienne dans les organes les plus touchés par l'infection : les poumons, le foie et la rate.

Avant de pouvoir commencer la mise au point du modèle *in vivo*, des expériences préliminaires, demandées par le comité d'éthique, ont été réalisées afin de limiter la souffrance animale pour l'ensemble de l'expérimentation.

1) Ethique : détermination d'un point limite

L'un des paramètres choisi pour évaluer le bénéfice thérapeutique potentiel du M3T est la survie des animaux. Or, la réglementation éthique s'oppose à considérer la mort des animaux comme « point limite ». En d'autres termes, laisser les souris succomber à l'infection serait leur imposer une trop grande souffrance. Le comité d'éthique nous a donc demandé de déterminer un critère objectif nous permettant d'évaluer l'état général des animaux et de fixer un point limite au-delà duquel les souris devraient être euthanasiées. Le poids et la température corporelle sont des critères couramment utilisés pour le suivi des animaux. Dans le cas d'une infection à *Francisella*, la pathologie se développe trop rapidement pour pouvoir mesurer une variation significative de poids. Nous avons donc choisi la température corporelle comme critère d'évaluation de l'état général des animaux. En conditions normales, la température des souris varie légèrement autour de 37°C et il est connu que dans le cas d'une infection bactérienne, à l'approche de la mort, les animaux entrent en hypothermie. Par conséquent, une baisse drastique de la température est un indicateur de la mort imminente des animaux [205].

La température limite à laquelle les souris infectées par *F. novicida* seraient euthanasiées pour la suite des expériences a donc été déterminée par une expérience pilote. Quinze souris ont été infectées par voie intranasale avec 60 CFU de *F. novicida*, une dose décrite comme létale [130]. Leur température a ensuite été mesurée deux fois par jour pendant 10 jours. Seuls 6 animaux ont succombé à l'infection dans cette expérience (les raisons de ce faible taux de mortalité seront données dans le paragraphe suivant II-A-2) et sont morts 3 à 4 jours après l'infection. Pendant cette période, l'évolution de la température s'est divisée en deux phases ; une première, de 0 à 3 jours, au cours de laquelle la température, bien que fluctuante, a augmenté jusqu'à 39 °C pour certains animaux, suivie d'une deuxième phase, à partir de 3 jours et jusqu'à la mort des animaux, pendant laquelle une chute brutale de la température a été observée (Figure 2-II-1). Cette expérience nous a permis de constater que toutes les souris présentant une température inférieure ou égale à 35°C succombent à l'infection dans les heures suivantes. Nous avons donc choisi cette valeur comme point limite. Pour la suite des expériences, la température a donc été mesurée quotidiennement et tous les animaux présentant une température inférieure ou égale à 35°C ont été euthanasiés.

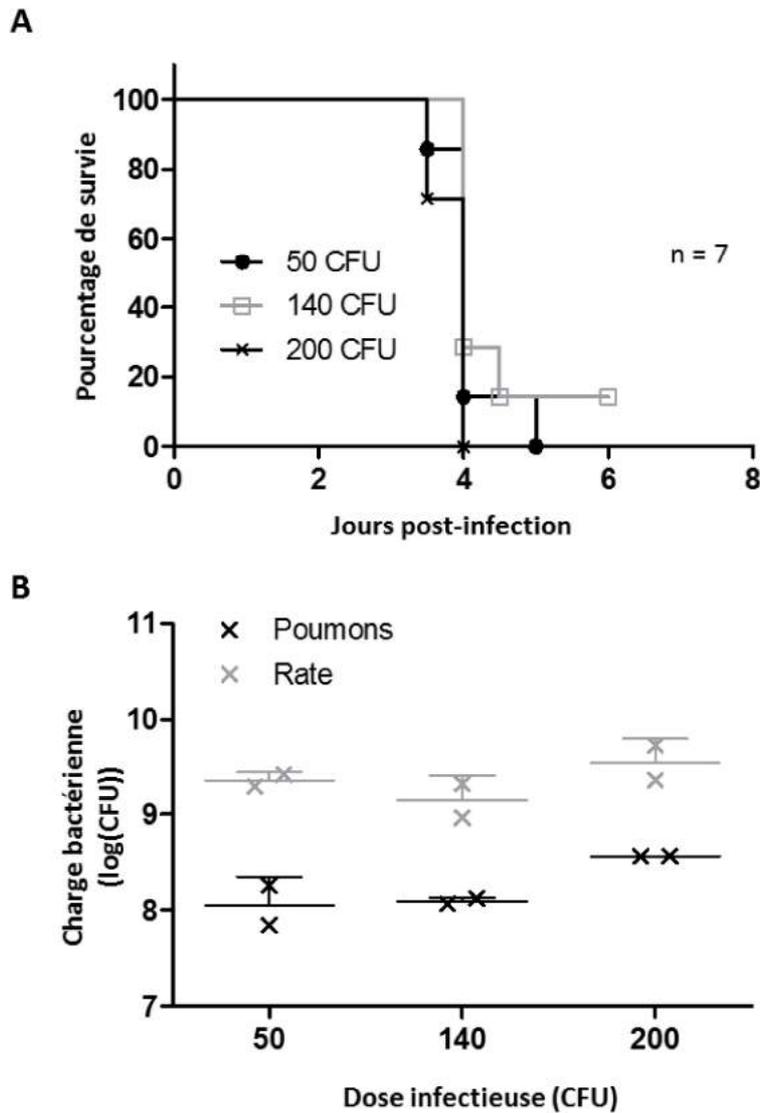


Figure 2-II-2 Effet de la dose infectieuse sur la mortalité et la charge bactérienne dans les poumons et la rate

Les souris sont infectées par voie intranasale avec les doses infectieuses indiquées. La **survie (A)** des souris a été suivie. Pour deux souris de chaque groupe, les poumons et la rate ont été prélevés *post-mortem* puis broyés et étalés pour évaluer la **charge bactérienne (B)**.

La dose d'infection a peu d'influence sur la survie des animaux, ni sur la charge bactérienne.

Cependant, il est important de noter que, malgré une surveillance fréquente des animaux, certains n'ont pas été euthanasiés à temps car leur température était supérieure à 35°C au moment de la mesure. Pour une minorité d'animaux la mort a donc été enregistrée au moment de la découverte du cadavre, et non au moment de l'euthanasie.

2) Détermination de la dose d'infection

Différentes méthodes d'infection peuvent être utilisées pour induire une infection pulmonaire : l'aérosolisation, ou l'injection par voies intratrachéale ou intranasale. La première nécessite un dispositif permettant de générer des aérosols dont le laboratoire n'est pas équipé. Nous avons choisi l'injection intranasale, moins invasive et plus facile à mettre en œuvre que l'injection intratrachéale. Cette technique consiste à déposer une goutte de 20 µL de suspension bactérienne sur les narines de l'animal préalablement anesthésié légèrement.

Par voie intranasale, la dose infectieuse minimale de *F. novicida* provoquant une pathologie létale décrite dans la littérature est de 50 CFU. A cette dose, entre 2 et 3 jours p.i., les charges bactériennes atteignent 10⁸ CFU dans les poumons, le foie ou la rate. Les animaux succombent à une telle infection en 3 à 5 jours [129, 130].

Dans des études réalisées avec une dose plus faible, le taux de mortalité n'atteint pas 100 % [206]. Ceci s'explique par une capacité des animaux à éliminer les bactéries présentes en faible nombre. Cependant, le nombre de bactéries arrivant effectivement dans les poumons peut aussi être mis en cause. En effet, une étude a montré qu'environ 20% seulement de l'inoculum atteignait dans les poumons 2 h p.i. [22]. Si celui-ci est trop faible, il est possible qu'aucune bactérie n'atteigne les poumons. Afin de pouvoir attribuer au M3T une amélioration potentielle de la survie, et d'attendre une force statistique suffisante avec un nombre d'animaux relativement faible, notre modèle d'infection devait être létal pour 100 % des souris. Nous avons donc cherché à déterminer dans nos conditions, la dose d'infection (inoculum) permettant d'obtenir une mortalité et une charge bactérienne similaire à ce qui a été décrit pour une dose infectieuse de 50 CFU.

Dans l'expérience pilote présentée précédemment, 60 CFU ont été administrés à 15 souris, résultant en un taux de mortalité de 40 %. Dans un premier temps nous avons donc conclu que dans nos conditions, 60 CFU n'était pas une dose suffisante pour infecter 100 % des souris. Afin de déterminer une dose d'infection adaptée, 3 groupes de 7 souris ont reçu 50, 140 ou 200 CFU de *F. novicida* par voie intranasale. La dose de 200 CFU a provoqué la mort de toutes les souris en 3 à 4 jours p.i.. La situation s'est avérée très similaire pour les souris infectées avec 50 CFU, toutes les souris succombant à l'infection entre 3 et 5 jours. En revanche, une souris infectée par 140 CFU a survécu au-delà d'une semaine, contrairement aux autres qui ont succombé à l'infection en 4 jours (Figure 2-II-2). La survie de cet animal n'est pas liée à une dose infectieuse insuffisante puisqu'une dose inférieure de 50 CFU s'est avérée létale pour 100 % des animaux.

Nous avons conclu de ce résultat, que le nombre de souris infectées n'était pas uniquement dû à la dose infectieuse mais également et vraisemblablement, à un défaut dans la réalisation de l'injection intranasale dans l'expérience pilote. En effet, les animaux étant sous anesthésie légère pendant la manipulation, le geste de l'expérimentateur doit être assez précis et rapide, faute de quoi les souris rejettent la suspension bactérienne. Après plusieurs expériences, j'ai pu mieux maîtriser cette technique et obtenir systématiquement un taux d'infection de 100 % avec une dose de 50 CFU.

Lors de cette expérience, la charge bactérienne dans les poumons et la rate a été mesurée au moment de la mort pour deux animaux de chaque groupe. Pour les souris infectées avec 50 et 140 CFU, la charge bactérienne dans les poumons d'une part, et dans la rate d'autre part, sont identiques et environ égales à 10^8 et 2.10^9 respectivement. Les souris infectées par 200 CFU présentent une charge bactérienne très légèrement supérieure, d'environ 3.10^8 et 3.10^9 CFU dans les poumons et la rate respectivement.

Les résultats de cette expérience ont montré que la durée de survie des animaux n'est pas, ou peu, dépendante de la dose d'infection dans la gamme testée. De plus, celle-ci n'influe pas non plus, ou très peu, sur la charge bactérienne finale. Ces données correspondent aux descriptions faites dans la littérature [129 , 130].

Le modèle d'infection choisi est donc le suivant : les animaux sont infectés par environ 50 CFU de *F. novicida* par voie intranasale sous anesthésie légère. Les souris succombent à cette infection en 3 à 5 jours et présentent 10^8 à 10^9 CFU par organe au moment de la mort. Il est à noter que certaines expériences présentées ci-après ont été réalisées avec une charge bactérienne plus élevée car elles ont été menées au début des expérimentations *in vivo* avant que je ne maîtrise totalement l'infection par voie intranasale.

3) Mise au point d'un traitement antibiotique sous-optimal

Le choix de l'antibiotique s'est premièrement orienté vers la ciprofloxacine, pour plusieurs raisons. Premièrement, cet antibiotique est utilisé en première intention pour le traitement de la tularémie chez l'homme (cf Introduction I-F-1a)). La seconde raison était liée à des contraintes techniques imposées par l'expérimentation dans l'ASB3. En effet, au moment où les expériences de mise au point du traitement antibiotique ont été réalisées, il était strictement interdit de manipuler les animaux dans l'ASB3 en dehors des jours d'ouverture de la structure (du lundi au vendredi). Sans traitement, les animaux succombent à l'infection en 3 à 5 jours permettant de réaliser la totalité des expériences durant la semaine. En revanche, le traitement antibiotique a pour objectif de contrôler l'infection et donc de prolonger la survie des animaux. De plus, la réplication rapide de *F. novicida* ainsi que la demi-vie des antibiotiques, impose un traitement quotidien. Le seul traitement compatible avec l'ensemble de ces contraintes était un antibiotique administré par voie orale dans l'eau de boisson. Ainsi, les animaux pouvaient être traités en continu sans être manipulés durant le week-end. La ciprofloxacine est administrable par voie orale et stable dans l'eau, nous avons donc tout d'abord déterminé une dose non-curative de cet antibiotique dans nos conditions expérimentales.

a) Ciprofloxacine

La délivrance de l'antibiotique dans l'eau de boisson nécessite de connaître le volume d'eau quotidiennement ingéré par les souris afin d'adapter la concentration en antibiotique. Nous avons donc mesuré ce volume sur 24 h pour 5 cages contenant 5 souris pesant entre 17 et 20 g. La différence de volume d'eau contenue dans les biberons a révélé une consommation de 5 ml par jour par souris, en accord avec les données publiées pour des souris de cette souche et de ce poids [207]. Les concentrations en ciprofloxacine ont donc été calculées à partir de ce volume et ajustées pour obtenir les doses voulues.

Une étude réalisée sur des souris BALB/c infectées par la souche Schu S4 par injection sous-cutanée, a montré un effet curatif de la ciprofloxacine administrée à 100 mg/kg quotidiennement par voie orale en débutant le traitement 6 h p.i. [208]. Le début du traitement est un point critique puisque le même traitement administré 6 h plus tard est moins protecteur. Afin de mettre au point un traitement sous-optimal, nous avons choisi d'administrer la ciprofloxacine à 6 h post-infection à des doses inférieures à 100 mg/kg. Quatre groupes de 6 souris ont donc été infectés avec 500 CFU de *F. novicida* par voie intranasale puis, 6 h plus tard, l'eau de boisson contenant la ciprofloxacine a mise à disposition des souris de façon à obtenir des doses de 12, 25 et 50 mg/kg. Un groupe n'a pas reçu de traitement. La survie des animaux a ensuite été évaluée jusqu'à 8 jours p.i..

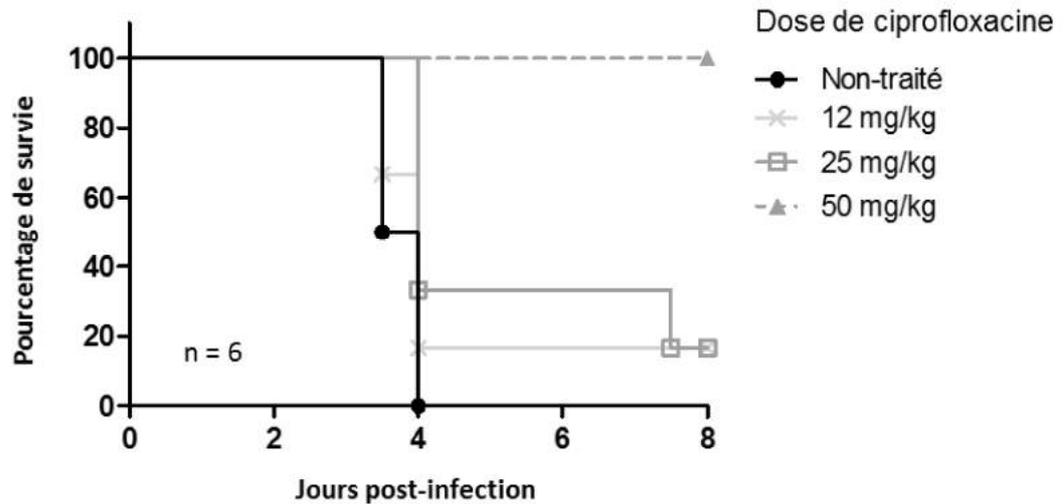


Figure 2-II-3 : Survie des souris traitées par la ciprofloxacine par voie orale

Les souris sont infectées par voie intranasale avec 500 CFU de *F. novicida*. 6h après infection, les doses indiquées de ciprofloxacine sont délivrées en continu dans l'eau de boisson. Les biberons contenant la ciprofloxacine sont changés 3 fois par semaine.

La dose de 50 mg/kg de ciprofloxacine est curative alors que les doses inférieures permettent la survie de 15 % seulement des animaux.

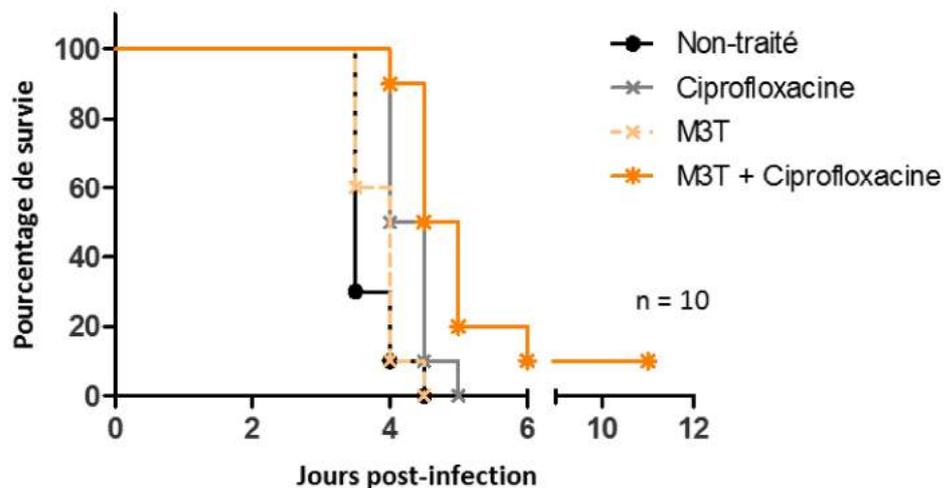


Figure 2-II-4 : Effet du M3T seul ou en combinaison avec la ciprofloxacine sur la survie des animaux

Les souris sont infectées par voie intranasale avec 280 CFU de *F. novicida*. 6h après infection, la ciprofloxacine à 25 mg/kg est délivrée dans l'eau de boisson. Au même temps, le M3T est administré à 1 mg/kg par injection intraveineuse. La ciprofloxacine est délivrée en continu pendant toute la durée de l'expérience, le M3T est administré toutes les 24h.

Le M3T seul n'a pas d'effet significatif mais en combinaison avec la ciprofloxacine il prolonge la survie des animaux d'un ou deux jours et permet la survie de 10 % des animaux.

Comme attendu, les souris n'ayant pas reçu de traitement ont succombé 4 jours après l'infection (Figure 2-II-3). En revanche, les souris traitées avec 50 mg/kg de ciprofloxacine ont toutes survécu jusqu'à 8 jours post infection (Figure 2-II-3). Les doses inférieures d'antibiotique ont permis la survie de 15 % des souris, mais la plupart des animaux traités avec 12 mg/kg est morte en même temps que les animaux du groupe contrôle. La dose de 25 mg/kg a permis de prolonger la survie de façon plus marquée. Nous avons donc choisi d'évaluer le M3T en combinaison avec une dose de 25 mg/kg de ciprofloxacine.

Dans un modèle d'inflammation pulmonaire aiguë induite par le LPS, le M3T a montré un effet anti-inflammatoire en étant administré aux souris en régime prophylactique à une dose quotidienne de 1 mg/kg par voie orale pendant 14 jours avant l'exposition [169]. Nous avons choisi d'évaluer le potentiel effet du M3T sur l'infection pulmonaire par *F. novicida* en régime curatif, c'est à dire administré après l'infection, en même temps que l'antibiotique, soit 6 h p.i. Dans le cas présent, la rapidité de développement de la pathologie ainsi que la courte fenêtre de traitement nous ont conduit à choisir un mode d'administration permettant une absorption plus rapide du M3T que la voie orale utilisée précédemment : l'injection intraveineuse.

Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour réaliser ce type d'injection, la plus facile à mettre en œuvre dans l'ASB3 étant l'injection au sinus rétro-orbital. Ces injections doivent se faire sous anesthésie légère et ne peuvent pas être réalisées plus de 2 fois par semaine pour chaque œil pour des raisons éthiques. Nous avons donc choisi un traitement d'une durée de 4 jours avec une injection par jour. La dose de 1 mg/kg de M3T a été choisie sur la base de l'étude réalisée dans le modèle d'inflammation induite par le LPS [169]. Ainsi, le M3T a été administré par injection intraveineuse à une dose de 1 mg/kg à 6 h p.i., puis toutes les 24 h jusqu'à 3 jours p.i..

Le M3T a été évalué seul ou en combinaison avec la ciprofloxacine administrée en continu dans l'eau de boisson à une dose de 25 mg/kg par jour pendant toute la durée de l'expérience. Quatre groupes de 10 souris ont été infectés par 280 CFU de *F. novicida* par voie intranasale puis traités avec le M3T seul, la ciprofloxacine seule ou la combinaison des deux. Un groupe contrôle a reçu uniquement des injections de sérum physiologique (NaCl 0,9 %). L'effet de ces traitements a été évalué sur la survie des animaux.

Les souris n'ayant pas reçu de traitement ont succombé à l'infection entre 3 et 4 jours p.i., de même que celles ayant reçu uniquement le M3T (Figure 2-II-4). Le M3T seul n'a donc aucun effet sur la survie. En revanche, le M3T en combinaison avec la ciprofloxacine a permis une légère amélioration de la survie en comparaison à l'antibiotique seul. En effet, le traitement combiné a retardé la mort d'environ 0,5 jour pour 80 % des souris puis de 1 à plusieurs jours pour les 20 % restant. Un animal traité avec le M3T combiné à l'antibiotique a survécu jusqu'à la fin de l'expérience, 11 jours p.i..

Cependant, lors de cette expérience, les volumes d'eau, et par conséquent de ciprofloxacine, ingérés par les souris ont été mesurés afin de contrôler la dose d'antibiotique administrée. Le volume d'eau bu par les souris contrôle était bien de 5,1 ml en moyenne. En revanche, les souris traitées par la ciprofloxacine seule n'ont bu en moyenne que 4 ml par jour, ce qui correspond à un traitement avec une dose de 20 mg/kg de ciprofloxacine, contrairement aux animaux traités par l'antibiotique en combinaison avec le M3T qui ont ingéré 5,6 ml, soit 28 mg/kg de ciprofloxacine. L'état général des animaux peut causer une telle différence. En effet, les animaux souffrant se déplacent moins et par conséquent réduisent leur alimentation et leur hydratation. L'amélioration de la survie pour les animaux ayant reçu la combinaison des deux traitements ne peut donc pas être attribuée seulement au M3T puisque la dose d'antibiotique administrée est supérieure à celle du groupe n'ayant reçu que l'antibiotique. Une telle différence dans la dose d'antibiotique administrée aux animaux introduit un biais considérable dans l'évaluation du traitement. Aussi, la délivrance de la ciprofloxacine *via* l'eau de boisson était incompatible avec notre objectif. Ces résultats nous ont conduit à faire une demande d'autorisation pour manipuler les animaux dans l'ASB3 durant le week-end. Celle-ci ayant été acceptée, nous avons choisi d'administrer le traitement antibiotique par injection. La gentamicine, délivrée par voie intraveineuse, est prescrite dans les cas les plus graves de tularémie chez l'homme [35] et est couramment administrée par injection i.p. chez la souris. De plus, un traitement sous-optimal de gentamicine a précédemment été mis au point par Sutherland *et al.* [209] dans le cadre d'une étude sur l'infection pulmonaire par *F tularensis* Schu S4. L'ensemble de ces raisons nous a conduit à changer de traitement antibiotique pour la gentamicine administrée par injection i.p.

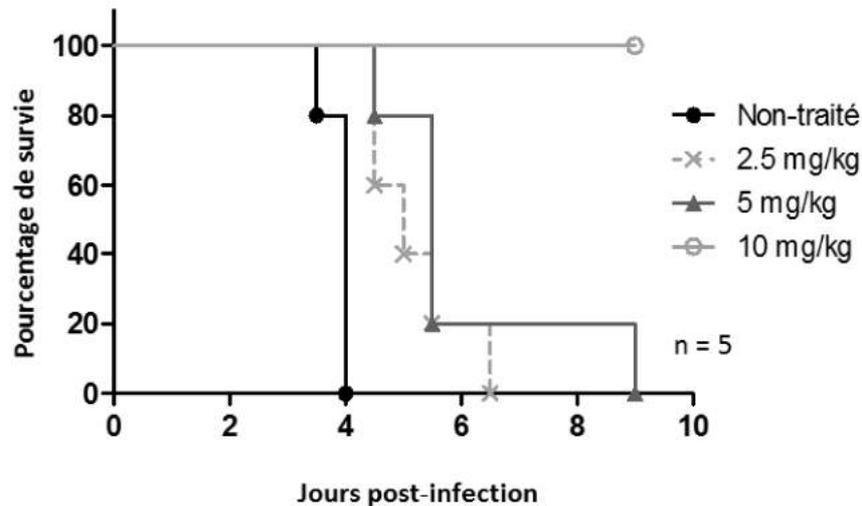


Figure 2-II-5 : Survie des souris traitées par la gentamicine par voie intrapéritonéale

Les souris sont infectées par voie intranasale avec 400 CFU de *F. novicida*. 6 h post-infection, la gentamicine est administrée quotidiennement aux doses indiquées pendant 10 jours. La température des souris est mesurée quotidiennement, toutes les souris présentant une température inférieure à 35°C sont euthanasiées.

La dose de 10 mg/kg de gentamicine est totalement curative mais les doses inférieures permettent seulement de prolonger la survie de 2 à 5 jours.

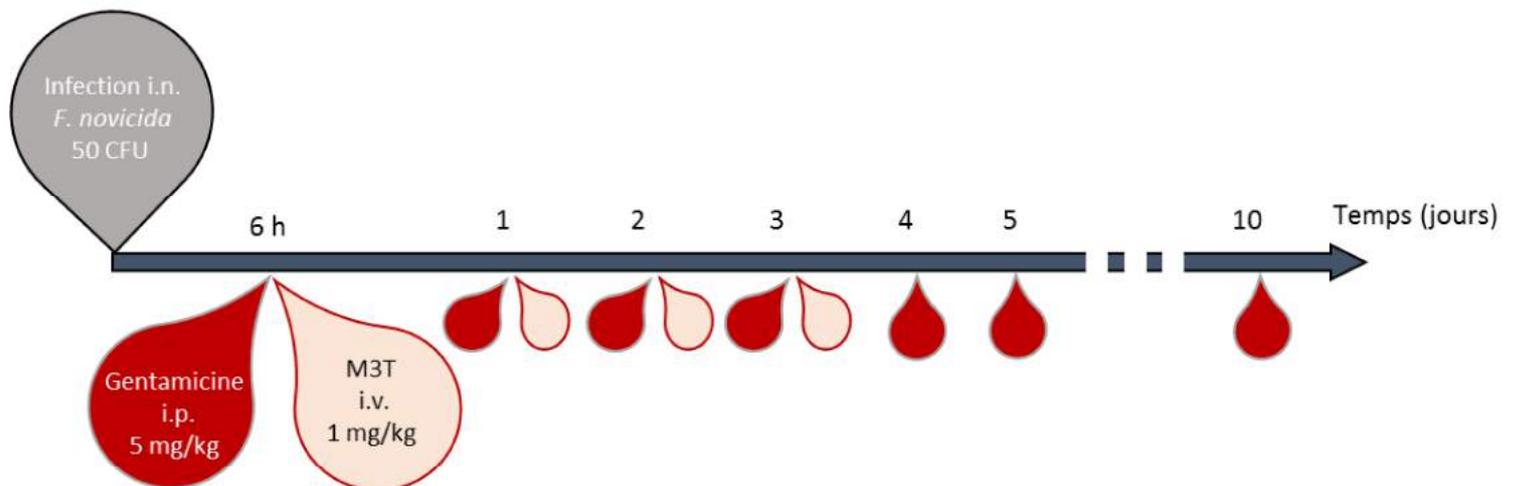


Figure 2-II-6 : Protocole d'infection et de traitement pour l'évaluation du M3T

Les souris sont infectées par voie intranasale (i.n) avec 100 CFU de *F. novicida*. La gentamicine est administrée par injection intrapéritonéale (i.p) 6 h p.i., puis quotidiennement, à 5 mg/kg pendant 10 jours. Le M3T est administré par injection intraveineuse 6 h p.i. puis quotidiennement pendant 4 jours.

b) Gentamicine

Dans l'étude de Sutherland *et al.* [209], la gentamicine délivrée par injection i.p à une dose de 10 mg/kg. quotidiennement à partir de 6 h p.i. prolonge la survie des animaux jusqu'à 6 à 8 jours p.i., alors que les souris non-traitées succombent à l'infection par la souche *F. tularensis* SchuS4 en 4 jours [209]. Afin de déterminer un traitement sous-optimal adapté à notre modèle d'infection par *F. novicida*, nous avons choisi de tester des doses de 2,5, 5 et 10 mg/kg de gentamicine administrée à partir de 6 h p.i. puis tous les jours jusqu'à la fin de l'expérience. Trois groupes de 5 souris ont donc été infectés par voie intranasale par 400 CFU de *F. novicida* puis traités avec l'une de ces doses de gentamicine. Un groupe n'a reçu que des injections de sérum physiologique (non-traité). La dose de 10 mg/kg s'est avérée totalement curative permettant la survie de 100 % des animaux (Figure 2-II-5). En revanche, les animaux ayant reçu 2,5 mg/kg de gentamicine ont tous succombé à l'infection entre 4 et 6 jours p.i., contre 3 à 4 jours pour les souris non traitées. Enfin, la dose de 5 mg/kg a permis de retarder la mort des animaux de 1 à 5 jours par rapport aux animaux non-traités (Figure 2-II-5).

Nous avons donc choisi d'évaluer le M3T dans le modèle suivant (Figure 2-II-6) : les souris sont infectées par voie intranasale avec une dose d'environ 50 CFU de *F. novicida*. 6 h p.i., la gentamicine est administrée à une dose 5 mg/kg par injection i.p., puis toutes les 24h jusqu'à la fin de l'expérience (10 jours maximum). Au même moment, le M3T est administré à 1 mg/kg en injection i.p. puis toutes les 24h jusqu'à 3 jours après l'infection.

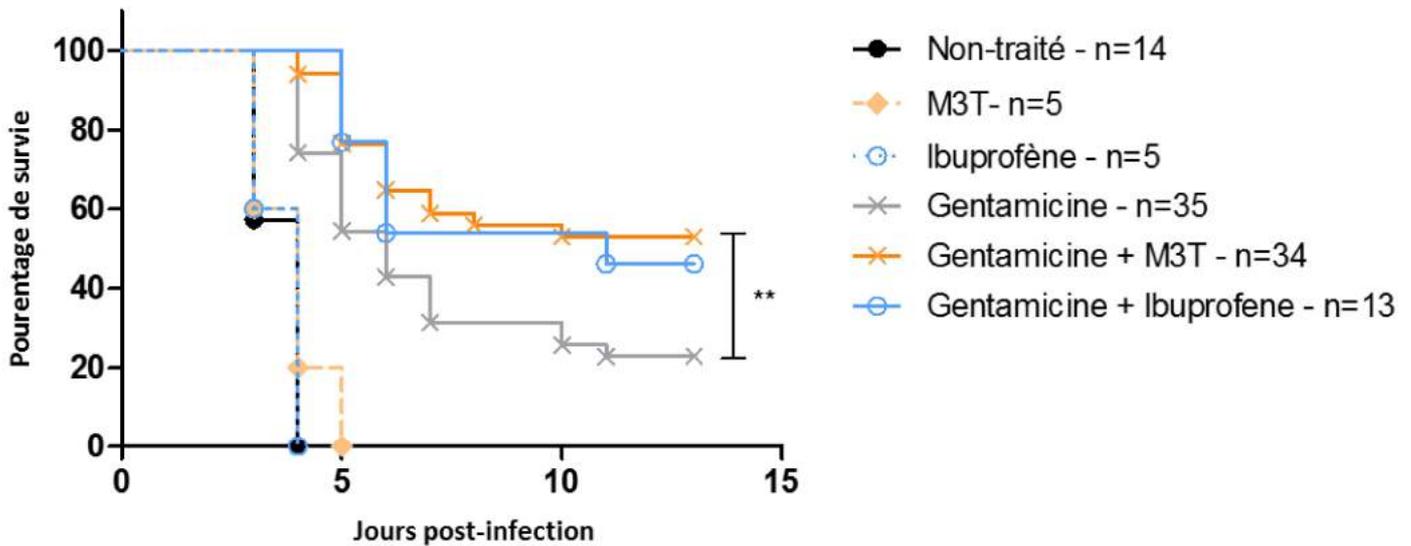


Figure 2-II-7 : Effet du M3T seul ou en combinaison avec la gentamicine sur la survie des animaux

Les souris sont infectées par voie intranasale avec en moyenne 60 CFU de *F. novicida*. La gentamicine à 5 mg/kg et le M3T à 1 mg/kg sont administrés 6 h post-infection. L'ibuprofène à 80 mg/kg est administré au même moment par injection i.p..

Les données de 4 expériences indépendantes ont été rassemblées pour les groupes non-traités et traités pas la gentamicine seule et en combinaison avec le M3T. Pour les autres conditions de traitement, une seule expérience a été réalisée. n : nombre d'animaux dans chaque groupe.

Le M3T seul n'a pas d'effet, mais en combinaison avec la gentamicine, il prolonge significativement la survie des animaux et permet la survie de 50% des animaux.

B) Evaluation du M3T

Le bénéfice thérapeutique potentiel du M3T a été évalué sur différents paramètres de la pathologie associée à l'infection pulmonaire par *F. novicida* : la survie des animaux, la charge bactérienne et l'inflammation.

1) Effet du M3T sur la survie et implication de *SIGNR1*

a) Effet sur la survie

Le traitement par le M3T a tout d'abord été évalué sur la survie des souris infectées et traitées dans les conditions décrites dans le paragraphe précédent (Figure 2-II-6).

La figure 2-II-7 regroupe les résultats obtenus lors de 3 expériences indépendantes pendant lesquelles la survie de 6 groupes de souris infectées par voie intranasale avec en moyenne 60 CFU de *F. novicida* a été mesurée. Ces 6 groupes ont reçu des traitements composés de gentamicine, d'ibuprofène ou de M3T seul, ou d'une combinaison de M3T et de gentamicine ou d'ibuprofène et de gentamicine. Enfin, un groupe dans chaque expérience n'a reçu que des injections de sérum physiologique (non-traité). Le traitement avec le M3T seul n'a été évalué qu'une fois. En effet, il n'a montré aucun effet sur la survie des animaux puisque les souris ayant reçu seulement ce composé ont succombé à l'infection en même temps que les animaux non-traités (Figure 2-II-7). En revanche, le traitement par le M3T combiné à la gentamicine apporte une nette amélioration de la survie en comparaison à la gentamicine seule. Bien qu'il ne retarde la mort que d'une journée pour 40 % des souris, 50 % des souris ont survécu à l'infection jusqu'à la fin de l'expérience contre 23 % pour les animaux traités avec la gentamicine seule. Le M3T, en combinaison avec un antibiotique apporte donc un bénéfice thérapeutique dans un modèle de tularémie pulmonaire murine.

Par ailleurs, nous avons cherché à évaluer, en même temps que le bénéfice thérapeutique potentiel du M3T, l'effet d'un traitement anti-inflammatoire, en utilisant une molécule contrôle avec mode d'action différent. L'ibuprofène a été choisi comme contrôle anti-inflammatoire car il a déjà montré un effet thérapeutique dans un contexte infectieux [164]. En effet, administré par voie orale à des souris à une dose de 80 mg/kg, l'ibuprofène réduit les lésions pulmonaires et la mortalité associée à une infection par *M. tuberculosis* [164]. Afin de ne pas multiplier les voies d'administration pour les différents traitements, nous avons choisi d'administrer l'ibuprofène à cette même dose (80 mg/kg) par injection i.p. avec la gentamicine. Ce traitement a été évalué dans les mêmes conditions que le M3T, soit pendant 4 jours en commençant 6 h p.i..

L'effet de l'ibuprofène est très similaire à celui du M3T. Seul il n'a aucun effet, en revanche, en combinaison avec l'antibiotique, il permet la survie de 50 % environ des animaux (Figure 2-II-7).

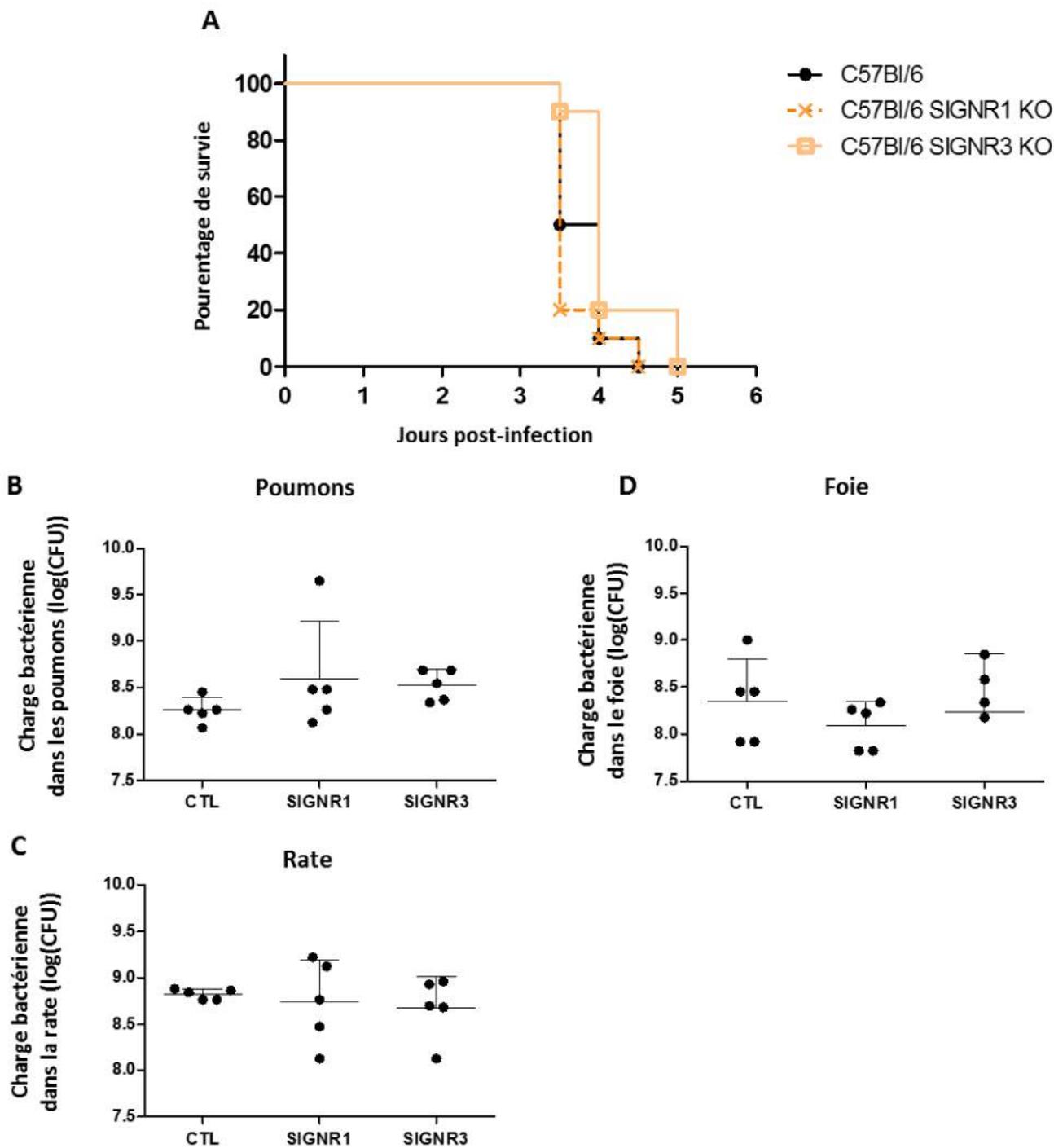


Figure 2-II-8 : Rôle des récepteurs SIGNR1 et SIGNR3 dans la pathologie

Les souris sont infectées par voie intranasale avec 500 CFU de *F. novicida*. La survie des souris sauvages, et déficientes pour les récepteurs SIGNR1 ou SIGNR3 a été observée (A). Au moment de la mort, les poumons (B), la rate (C) et le foie (D) sont prélevés et étaler pour dénombrer la charge bactérienne.

Aucune différence significative n'a été observée sur la survie ou la charge bactérienne entre les différentes souches de souris.

L'ensemble de ces résultats permettent de conclure à un effet thérapeutique à la fois du M3T mais aussi plus généralement, d'une stratégie accessoire anti-inflammatoire, pour le traitement des infections pulmonaires par *F. novicida* comme le montre le traitement par l'ibuprofène. Ces résultats montrent également la nécessité de contrôler l'infection par un antibiotique, aucun des traitements M3T ou ibuprofène seul, n'ayant pu prolonger la survie des animaux.

b) Rôle du récepteur SIGNR1

L'effet du M3T sur l'inflammation pulmonaire induite par le LPS chez la souris est dépendant du récepteur SIGNR1, homologue murin de DC-SIGN [169]. De plus, les résultats obtenus *in vitro* dans des macrophages infectés par *F. novicida* semblent indiquer un rôle de DC-SIGN dans l'effet anti-inflammatoire du M3T. Nous nous sommes donc intéressés au rôle de SIGNR1 dans l'augmentation de la survie des animaux infectés par *F. novicida* et traités avec la combinaison de M3T et de gentamicine. Avant de déterminer l'implication de SIGNR1 dans l'effet du M3T, nous avons tout d'abord cherché à savoir si ce récepteur pouvait jouer un rôle dans l'infection ou la pathologie. En effet, *F. novicida* est capable d'infecter les macrophages *via* le récepteur au mannose qui reconnaît des ligands de même nature que SIGNR1 [95 , 182]. Bien qu'*in vitro*, DC-SIGN ne soit pas impliqué dans l'internalisation de *F. novicida* dans les cellules THP-1, nous avons cherché à déterminer si son homologue murin pouvait jouer un rôle *in vivo*.

i) Rôle des récepteurs SIGNR1 et SIGNR3 dans la pathologie

Afin de déterminer l'implication du récepteur SIGNR1 dans la pathologie liée à l'infection par *F. novicida*, des souris déficientes pour ce récepteur ont été infectées par *F. novicida* par voie intranasale. Des souris déficientes pour le récepteur SIGNR3 ont aussi été infectées. En effet, le M3T ne se lie pas à SIGNR3 et n'est donc pas impliqué dans l'effet inhibiteur du M3T sur la réponse inflammatoire [169]. Les souris déficientes pour ce récepteur constituent donc un contrôle négatif pour déterminer l'implication de SIGNR1 dans l'effet du M3T. Dix souris de ces 2 souches, ainsi que de la souche sauvage, ont été infectées avec environ 500 CFU de *F. novicida* par voie intranasale. La survie des animaux a été observée et la charge bactérienne dans les poumons, le foie et la rate a été dénombrée pour 5 animaux dans chaque groupe au moment de la mort. Les souris sauvages, ainsi que les souris déficientes pour SIGNR1, ont succombé à l'infection entre 3,5 et 5 jours p.i. (Figure 2-II-8A). Vingt pourcent des souris déficientes pour le récepteur SIGNR3 ont survécu jusqu'à 5 jours p.i., les autres sont mortes entre 3,5 et 4 jours p.i. Les charges bactériennes dans les poumons sont comprises entre 8 et 8,5 log pour toutes les souches, excepté pour une souris déficiente pour le récepteur SIGNR1 présentant une charge plus élevée (Figure 2-II-8B).

De même, bien que les données soient plus dispersées, les moyennes des charges bactériennes dans le foie sont similaires pour les 3 souches, avec environ 8,2 log (Figure 2-II-8D). Dans la rate, les moyennes de charges bactériennes sont également toutes d'environ 8,7 log (Figure 2-II-8C).

L'ensemble de ces données ne montre aucune différence significative entre les différentes souches de souris concernant la survie ainsi que les charges bactériennes dans les poumons, le foie ou la rate. Les récepteurs SIGNR1 et SIGNR3 n'ont donc *a priori* pas d'influence majeure sur le développement de l'infection par *F. novicida* ou de la pathologie dans le modèle murin utilisé.

ii) Rôle du récepteur SIGNR1 dans l'inhibition de la réponse inflammatoire par le M3T

Nous avons cherché à évaluer l'implication éventuelle de SIGNR1 dans l'effet du traitement par le M3T en combinaison avec l'antibiotique sur la survie des animaux infectés. Deux groupes de 12 souris sauvages et 2 groupes de 12 souris déficientes pour SIGNR1 ont été infectés puis traités par la gentamicine seule ou en combinaison avec le M3T. Il est important de noter que cette expérience n'a été réalisée qu'une fois avec des animaux dont l'âge était très hétérogène, allant de 6 à 15 semaines. En effet, les souris sauvages utilisées dans toutes les expériences provenaient du fournisseur Janvier qui est en mesure de fournir un grand nombre d'animaux de tous âges. En revanche, les souris SIGNR1 KO, sont issues d'un élevage du laboratoire ne permettant pas d'obtenir un nombre suffisant de souris du même âge. Les souris SIGNR1 KO ont donc été réparties de façon à obtenir des groupes homogènes constitués de souris d'âge variable dans chacun des groupes. De la même façon, afin de pouvoir comparer les résultats obtenus pour les deux souches, nous avons commandé des souris sauvages âgées de 7 et 15 semaines de façon à constituer des groupes similaires à ceux établis pour les souris SIGNR1 KO.

Deux souris sauvages et deux souris déficientes pour le récepteur SIGNR1 ont été infectées et n'ont subi aucun traitement. Ce contrôle a été réalisé sur un faible nombre de souris puisque nos expériences précédentes ont montré une grande reproductibilité concernant la mortalité des animaux en l'absence de traitement. Comme attendu, celles-ci ont succombé à l'infection entre 3 et 4 jours p.i..

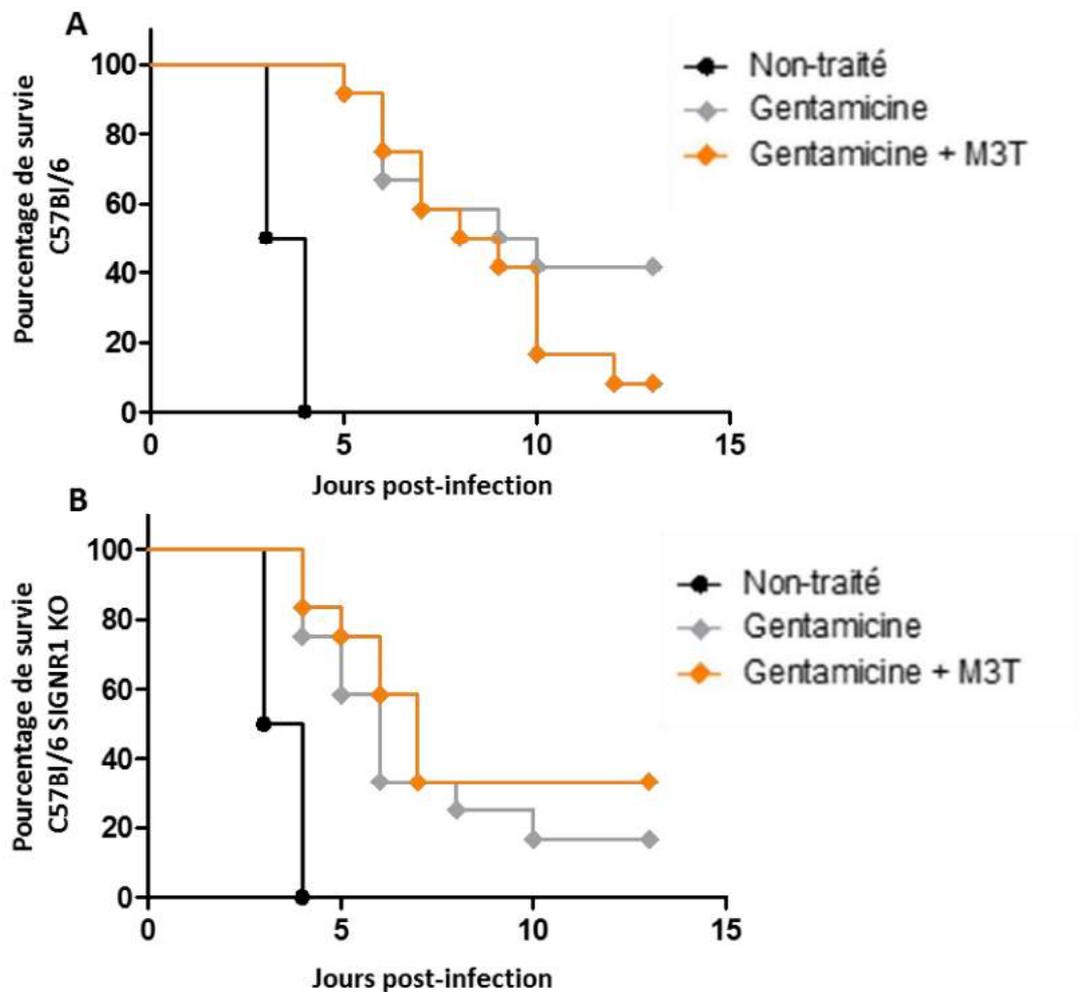


Figure 2-II-9 : Effet du M3T sur la survie des souris déficientes pour le récepteur SIGNR1

Les souris sauvages (A) ou déficientes pour le récepteur SIGNR1 (B) sont infectées par voie intranasale avec 100 CFU de *F. novicida* et traitées par la gentamicine seule ou associée au M3T.

Le M3T n'ayant pas d'effet sur la survie des souris sauvages dans cette expérience, aucune conclusion ne peut être faite sur le rôle de SIGNR1 dans l'effet du M3T.

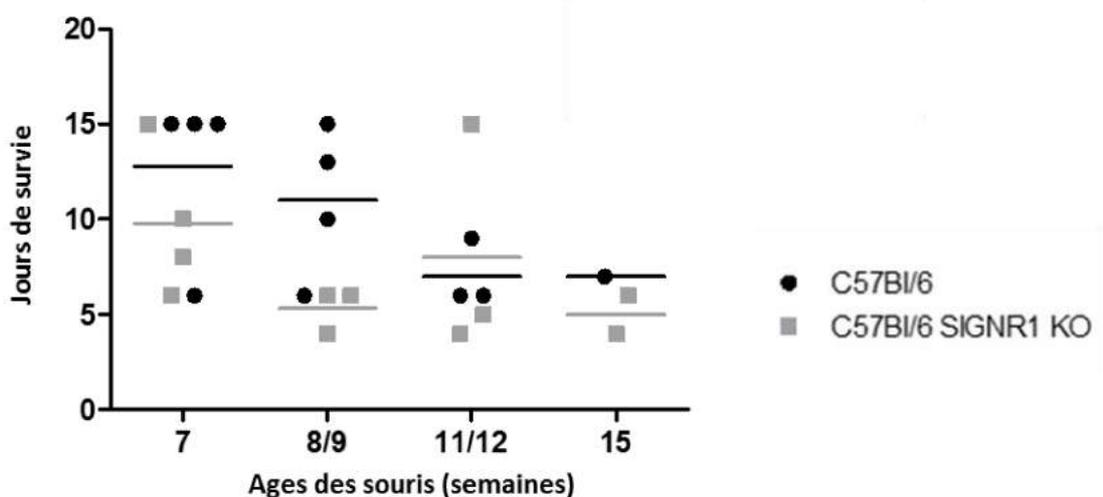


Figure 2-II-10 : Influence de l'âge des animaux sur leur survie à l'infection par *F. novicida*

Les données issues de l'expérience de survie réalisée sur les souris sauvages et déficientes pour SIGNR1 (Figure 2-II-14) ont été représentées ici en fonction de l'âge des souris pour les animaux non-traités.

Les animaux les plus âgés succombent plus rapidement à l'infection.

Les souris SIGNR1 KO traitées par la gentamicine seule ou en combinaison avec le M3T sont mortes entre 4 et 10 jours p.i.. Pour cette souche, 17 % des animaux traités par la gentamicine ont survécu à l'infection contre 33 % pour les souris traitées avec la combinaison d'antibiotique et de M3T (Figure 2-II-9A). En revanche, la tendance inverse a été observée pour le groupe contrôle constitué des souris sauvages. Ces dernières sont mortes entre 5 et 12 jours avec le traitement combiné, et 8 % des animaux ayant reçu ce traitement ont survécu. Les souris traitées par la gentamicine seule ont succombé à l'infection entre 6 et 10 jours p.i., mais plus de 40 % des animaux ont survécu (Figure 2-II-9B). Ces données ne sont pas cohérentes avec les résultats obtenus précédemment (Figure 2-II-7) et indiquent un défaut d'expérience.

L'âge hétérogène des animaux a introduit un biais considérable dans cette expérience. En effet, la Figure 2-II-10 représentant la survie des animaux (sauvages ou SIGNR1 KO) traités uniquement avec la gentamicine en fonction de leur âge montre que les souris âgées sont mortes plus rapidement. De plus, l'âge des animaux a déjà été montré comme un paramètre influençant l'évolution de la pathologie. En effet, Mares *et al.* [210] ont montré que les souris âgées survivent plus longtemps à une infection pulmonaire par *F. novicida* que des animaux plus jeunes. Cependant, la tendance est inversée dans nos conditions où les souris âgées ont moins résisté à l'infection que les plus jeunes. Cette différence pourrait provenir de l'utilisation d'un traitement antibiotique sous-optimal. En effet, la variation de poids entre les souris les plus jeunes et les plus âgées peut atteindre 5 à 6 g. Or, pour des raisons pratiques, la même injection de gentamicine a été réalisée pour tous les animaux, faisant ainsi varier la dose de 4,5 mg/kg pour les souris les plus âgées, à 6,2 mg/kg pour les plus jeunes. Lors de la mise au point du traitement par la gentamicine, nous avons constaté qu'une faible différence (2,5 mg/kg) dans la dose d'antibiotique administrée pouvait effectivement avoir un impact important sur la survie des animaux (Figure 2-II-5). Le traitement antibiotique pourrait donc être plus efficace pour les souris les plus jeunes.

Les résultats obtenus pour la survie des souris sauvages et SIGNR1 KO infectés par *F. novicida* et traités par le M3T, en combinaison ou non avec la gentamicine, ne permettent pas de conclure sur l'implication du récepteur SIGNR1 dans l'effet bénéfique du M3T sur la survie des animaux. Cette expérience est donc à renouveler en adaptant les injections de gentamicine pour obtenir la même dose de 5 mg/kg pour chaque animal.

Afin de caractériser l'effet du M3T sur la survie des animaux (Figure 2-II-7), nous avons étudié les conséquences du traitement sur : i) la charge bactérienne dans les poumons, la rate et le foie, ii) différents paramètres de la réponse inflammatoire : la production de cytokines et le recrutement cellulaire dans les poumons, et les lésions inflammatoires dans les poumons, le foie et la rate.

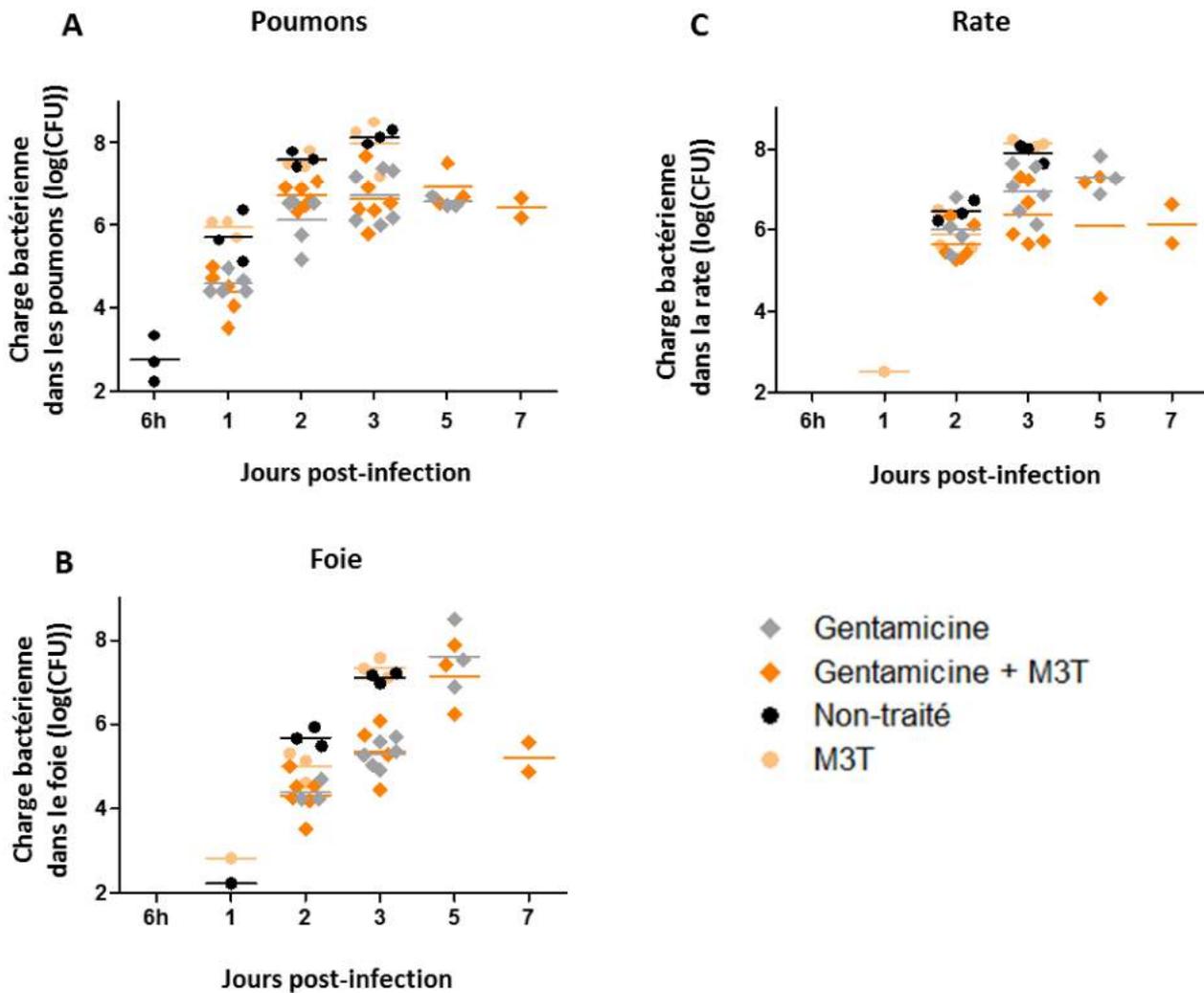


Figure 2-II-11 : Effet du M3T sur la charge bactérienne dans les poumons, le foie et la rate

Les souris sont infectées par voie intranasale avec en moyenne 100 CFU de *F. novicida*. La gentamicine à 5 mg/kg et le M3T à 1 mg/kg sont administrés 6 h post-infection. Aux temps indiqués, 2 ou 3 animaux (selon les expériences) sont sacrifiés et les poumons (A), le foie (B) et la rate (C) sont prélevés puis étalés pour déterminer la charge bactérienne. Les données représentées sont issues de 3 expériences indépendantes.

Aucun effet du M3T n'est observé sur la charge bactérienne.

2) Effet du M3T sur la charge bactérienne

Comme vu précédemment (Introduction II-A), les infections pulmonaires par *Francisella* chez la souris provoquent la dissémination des bactéries dans l'organisme *via* la circulation sanguine en 2 à 3 jours p.i.. Les organes les plus touchés sont les poumons, le foie et la rate. La charge bactérienne, pouvant atteindre 10^8 CFU par organe, est en partie responsable de la mort des animaux survenant 1 à 2 jours plus tard [66, 129]. Le M3T réduisant la mortalité associée à l'infection par *F. novicida*, nous nous sommes interrogés sur sa capacité à agir de façon synergique avec l'antibiotique pour réduire la charge bactérienne dans ces organes.

Des souris, réparties en 4 groupes, infectées par voie intranasale par en moyenne 100 CFU de *F. novicida* ont été traitées avec de la gentamicine et du M3T, seuls ou en combinaison, en suivant le protocole établi précédemment (Figure 2-II-6). A 6 h, et 1, 2, 3, 5 et 7 jours p.i., 3 souris ont été sacrifiées pour dénombrer la charge bactérienne dans les poumons, le foie et la rate. En raison de la mortalité observée à partir de 4 jours p.i., aucun animal non-traité ou traité uniquement par le M3T n'a pu être analysé après 3 jours. Pour les mêmes raisons, la charge bactérienne à 7 jours p.i. n'a pu être déterminée que pour deux animaux traités par le M3T avec la gentamicine. En accord avec les données de la littérature, à 6 h p.i., les bactéries ne sont présentes que dans les poumons. En absence d'antibiotique, la charge bactérienne dans cet organe augmente jusqu'à 3 jours p.i., et atteint alors 10^8 CFU (Figure 2-II-11). Des bactéries sont détectées dans le foie et la rate à partir de 24 ou 48 h et atteignent des charges similaires à celles observées dans les poumons à 72 h p.i. Le traitement antibiotique sous-optimal administré limite la charge bactérienne dans les poumons. Celle-ci ne dépasse pas 10^7 à 5 et 7 jours p.i., une valeur équivalente à la charge bactérienne dans les poumons des souris non-traitées 3 jours p.i.. De façon plus modérée, la gentamicine limite aussi la charge bactérienne dans la rate où l'on dénombre 10^7 bactéries à 5 et 7 jours p.i.. Dans le foie, le traitement antibiotique semble seulement ralentir la multiplication bactérienne puisque celle-ci ne cesse d'augmenter jusqu'à 5 jours où elle atteint 10^7 à 10^8 CFU puis diminue ensuite à 7 jours p.i. Le traitement par le M3T quant à lui, en combinaison ou non avec l'antibiotique, ne semble avoir aucun effet sur la charge bactérienne dans ces trois organes. En effet, les charges bactériennes pour les souris traitées avec le M3T seul sont similaires à celles des animaux non-traités, tout comme les charges bactériennes des souris traitées avec la combinaison de M3T et de gentamicine sont similaires à celles des souris traitées par l'antibiotique seul.

L'effet du M3T sur la survie des animaux n'est donc pas lié à une réduction de la charge bactérienne dans les organes. Ces résultats sont cohérents avec l'absence d'effet microbicide du M3T sur *F. novicida* observée *in vitro*.

Cependant un effet de la modulation de l'inflammation, en synergie avec le traitement antibiotique, rendant le système immunitaire plus apte à éliminer l'infection, n'était pas exclu, comme démontré dans le cas d'infections chroniques [164].

3) Effet du M3T sur la réponse inflammatoire

La mortalité des infections pulmonaires à *Francisella* est due à leur évolution en sepsis. Ce phénomène est caractérisé par une bactériémie provoquant la dissémination des bactéries dans l'organisme, ainsi que par une réponse inflammatoire brutale et excessive [129, 132]. Nous avons donc cherché à évaluer l'effet du M3T sur la réponse inflammatoire et la pathologie associée.

Plusieurs études ont montré que la réponse inflammatoire provoquée par l'infection pulmonaire par *F. novicida* était déclenchée tardivement et avec une très forte intensité [67, 129]. Cela se traduit par une absence de réponse cytokinique, dans les poumons ou dans le sérum, jusqu'à 72 h p.i., suivie d'une hypercytokinémie déclenchant notamment un recrutement massif de neutrophiles dans les tissus infectés. Or ceux-ci jouent un rôle clé et délétère dans le cas d'une infection pulmonaire par *Francisella* (Introduction II-B-3b) (voir revue [69]). En effet, une étude a montré que la survie de souris déficientes pour le recrutement des neutrophiles était supérieure à celle de souris sauvages après une infection pulmonaire par les souches *F. tularensis* Schu S4 ou LVS [138]. Le M3T réduit le recrutement des neutrophiles dans les poumons dans un modèle d'inflammation aigue induite par du LPS [169]. L'effet du M3T sur le recrutement cellulaire a donc été étudié, en mesurant la production de cytokines, ainsi qu'en analysant les populations cellulaires présentes dans les poumons. En effet, le poumon est le premier organe infecté et l'un des plus touché par les lésions inflammatoires. Le dosage des cytokines et l'analyse du recrutement cellulaire ont été réalisés lors des mêmes expériences. A différents temps post-infection, les fluides de lavages broncho-alvéolaires (BAL) ont été collectés pour doser les cytokines par ELISA et les cellules immunitaires présentes dans les BAL ainsi que les cellules du tissu pulmonaire, ont été analysées par cytométrie en flux.

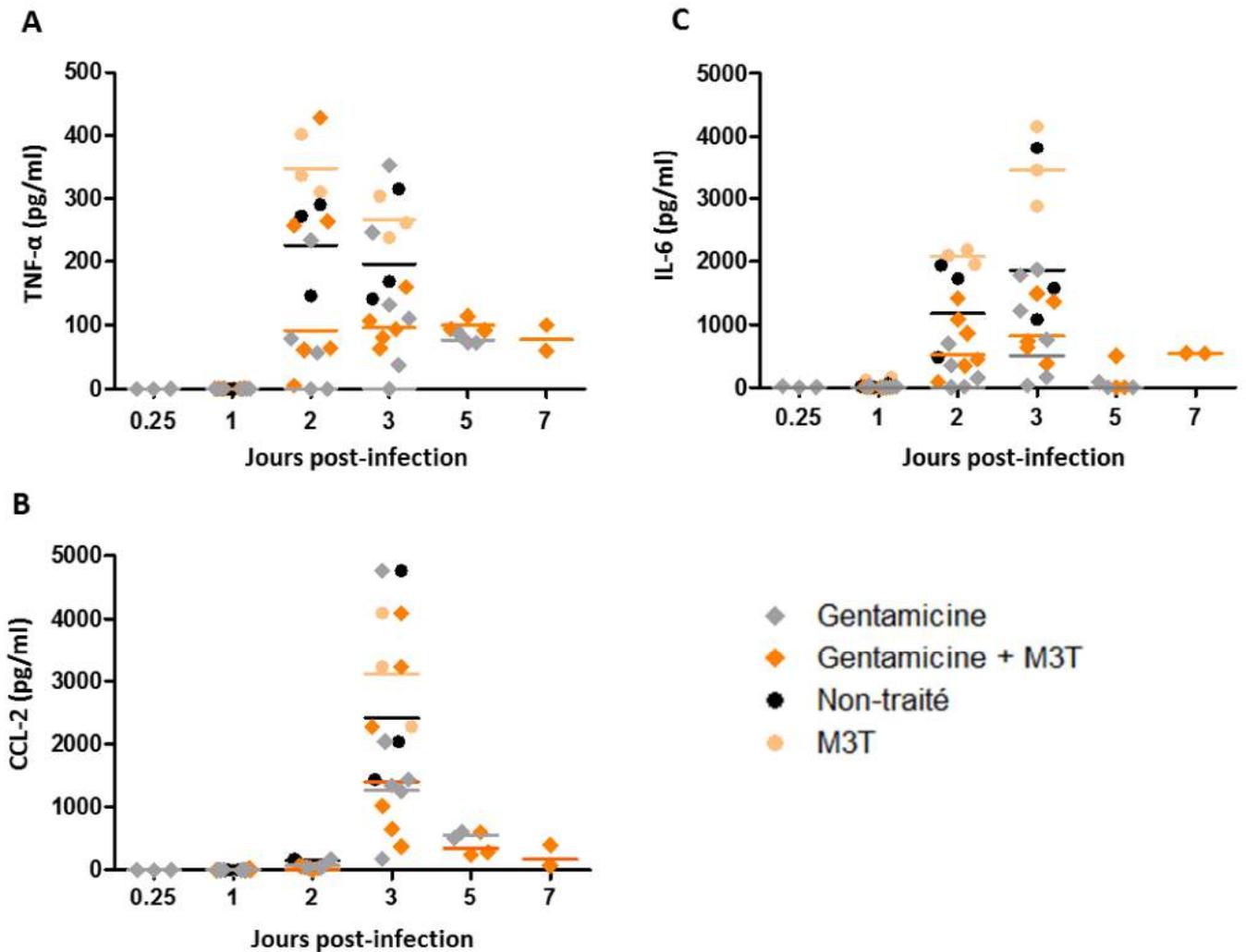


Figure 2-II-12 : Effet du M3T sur la production de cytokines pro-inflammatoires dans les poumons

Les souris sont infectées par voie intranasale avec en moyenne 100 CFU de *F. novicida*. La gentamicine à 5 mg/kg et le M3T à 1 mg/kg sont administrés 6 h post-infection. Aux temps indiqués, 2 ou 3 animaux (selon les expériences) sont sacrifiés et les BAL sont prélevés pour doser les cytokines. Les données représentées sont issues de 3 expériences indépendantes.

Aucun effet du M3T n'est observé sur la production de TNF- α , d'IL-6 ou de CCL-2 dans les poumons.

a) Production de cytokines dans les poumons

Parmi les nombreuses cytokines produites au cours de la réponse inflammatoire induite par *F. novicida*, nous nous sommes intéressés à deux cytokines pro-inflammatoires, le TNF- α , l'IL-6, et une chimiokine, CCL-2. L'IL-6 et CCL-2 sont notamment impliquées dans le recrutement des neutrophiles, le TNF- α quant à lui est l'une des principales cytokines impliquées dans le sepsis [67, 129]. De plus, nous avons montré que le M3T inhibe la production de TNF- α et d'IL-6 *in vitro* dans des cellules dendritiques humaines infectées par *F. novicida* (cf paragraphe 2-I-C, Figure 2-I-16). Les résultats, présentés dans la figure 2-II-12, regroupent les données de 3 expériences indépendantes pour lesquelles des souris, réparties en 4 groupes, ont été infectées par voie intranasale avec en moyenne 100 CFU de *F. novicida*, puis traitées avec la gentamicine ou le M3T, seuls ou en combinaison. Un groupe contrôle n'a reçu aucun traitement. A 6 h, 1, 2, 3, 5 et 7 jours p.i., 3 animaux par groupe ont été sacrifiés pour prélever les BAL. Le nombre d'animaux analysés à 5 et 7 jours a pu varier en fonction de la mortalité. Le TNF- α et l'IL-6 ne sont détectés qu'à 48 h et CCL-2 qu'à 72 h. Pour les animaux non-traités, les concentrations des trois cytokines augmentent brutalement d'une valeur inférieure au seuil de détection à 24 h jusqu'à 250 pg/ml pour le TNF- α à 48 h p.i.. Cette valeur atteint 1,5 ng/ml pour l'IL-6 et 2,5 ng/ml pour CCL-2 à 72 h (Figure 2-II-12). La quantité de TNF- α reste stable de 2 à 7 jours p.i. pour tous les groupes. La production d'IL-6 en revanche augmente d'un facteur 1,5 environ entre 48 et 72 h pour les groupes n'ayant pas reçu d'antibiotique. La quantité de CCL-2 atteint 2 à 3 ng/ml en fonction des groupes 72 h p.i., puis diminue ensuite à 5 et 7 jours p.i. La production de ces 3 cytokines est réduite par le traitement antibiotique, en particulier l'IL-6 dont la concentration est deux fois plus faible lorsque les souris sont traitées par la gentamicine. Ceci peut s'expliquer par une charge bactérienne plus faible dans ces groupes. En revanche, le M3T n'influe pas de façon significative sur la concentration des cytokines dosées dans les BAL, qu'il soit administré en combinaison ou non avec la gentamicine.

Dans l'ensemble ces résultats sont en accord avec les données de la littérature. On observe un retard dans la mise en place de la réponse inflammatoire, suivie d'une production importante de TNF- α , d'IL-6 et de CCL-2 entre 48 et 72 h après l'infection. Contrairement à ce qui était attendu, le M3T ne réduit pas la production de ces cytokines. L'effet bénéfique du M3T sur la survie des animaux ainsi que les précédentes données concernant le M3T laissent présager un effet sur les cytokines pro-inflammatoires dans les poumons. Cependant nous n'avons analysé à ce jour que 3 cytokines pro-inflammatoires. Il est possible que le M3T agisse sur d'autres cytokines. De plus, n'ayant mesuré que les cytokines sécrétées dans les BAL, il serait également intéressant de quantifier les cytokines dans les tissus ou dans le sang.

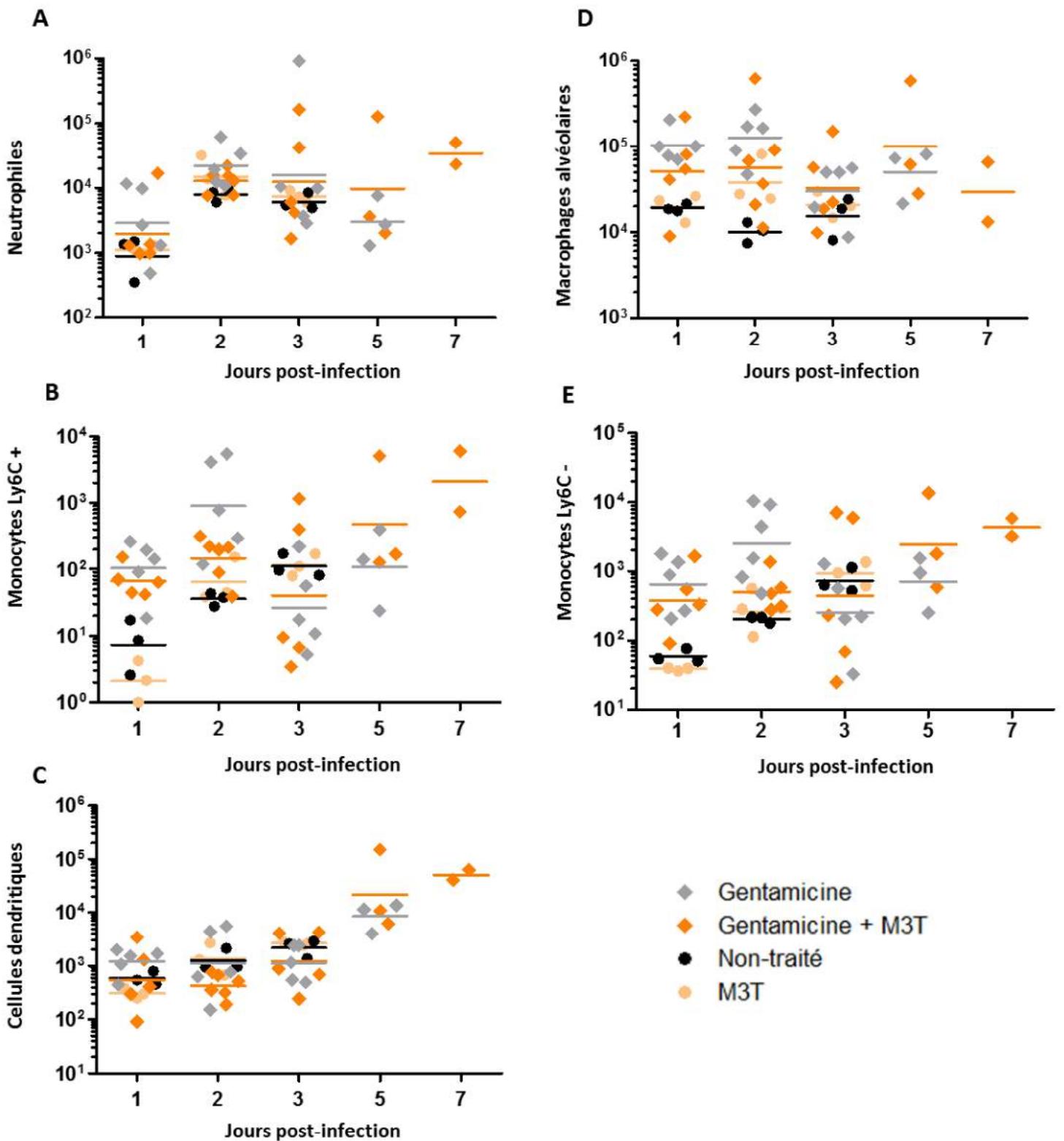


Figure 2-II-13 : Effet du M3T sur les populations cellulaires dans les BAL

Les souris sont infectées par voie intranasale avec en moyenne 100 CFU de *F. novicida*. La gentamicine à 5 mg/kg et le M3T à 1 mg/kg sont administrés 6 h post-infection. Aux temps indiqués, 2 ou 3 animaux (selon les expériences) sont sacrifiés et les BAL prélevés. Les cellules contenues dans les BAL sont marquées puis analysées en cytométrie en flux. Les données représentées sont issues de 3 expériences indépendantes.

Aucun effet du M3T n'est observé sur les différentes populations cellulaires observées dans les BAL.

b) Recrutement cellulaire dans les poumons

Dans un premier temps, l'analyse des populations cellulaires a été réalisée dans les BAL. En effet, ce type de prélèvement a précédemment été utilisée pour analyser le recrutement de cellules, notamment des neutrophiles, dans les poumons de souris infectées par *F. novicida* [67]. Cependant, lors de deux expériences, les cellules issues des poumons broyés et homogénéisés ont également été analysées afin de confirmer les résultats obtenus dans les BAL. Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec Antonio Peixoto, responsable de la plateforme de cytométrie de l'IPBS.

i) BAL

Les cellules ont été marquées par un cocktail d'anticorps permettant d'identifier, par cytométrie en flux, les populations cellulaires suivantes : neutrophiles (CD11b⁺/Ly6G⁺), cellules dendritiques (CD11b⁺/MHCII⁺), macrophages alvéolaires (CD11c⁺/F480⁺), monocytes (CD11b⁺/F480⁺). Deux types de monocytes ont été observés : les monocytes « inflammatoires » exprimant fortement le marqueur de surface Ly6C (Monocyte Ly6C⁺) et les monocytes « non-inflammatoires » (Monocytes Ly6C). Tous les résultats sont rassemblés dans la figure 2-II-13. Une augmentation du nombre de neutrophiles a été observée entre 24 et 48 h. Le nombre de monocytes et de cellules dendritiques lui, augmente entre 24 et 72 h p.i. pour les animaux n'ayant pas reçu d'antibiotique. Cette cinétique de recrutement cellulaire correspond aux données de la littérature [22, 67].

Aucun effet drastique du M3T, en combinaison ou non avec l'antibiotique, n'est observé (Figure 2-II 13). Cependant ces résultats présentent une grande dispersion ne permettant pas de comparaison précise des différentes conditions.

ii) Tissu pulmonaire

L'analyse des populations cellulaires a ensuite été réalisée dans les poumons lors de deux expériences indépendantes, en utilisant la même approche méthodologique par cytométrie en flux. Dans la première, deux groupes de souris ont été infectées par *F. novicida* par voie intranasale et traités ou non par le M3T. Trois souris de chaque groupe ont été sacrifiées à 1, 2 et 3 jours p.i. pour prélever les poumons. Dans la deuxième expérience, les souris ont été traitées avec la gentamicine seule, ou en combinaison avec le M3T. Les analyses ont été réalisées à 3, 5 et 7 jours après l'infection. L'analyse des populations cellulaires dans le tissu pulmonaire à 1, 2 et 3 jours après l'infection reste à faire.

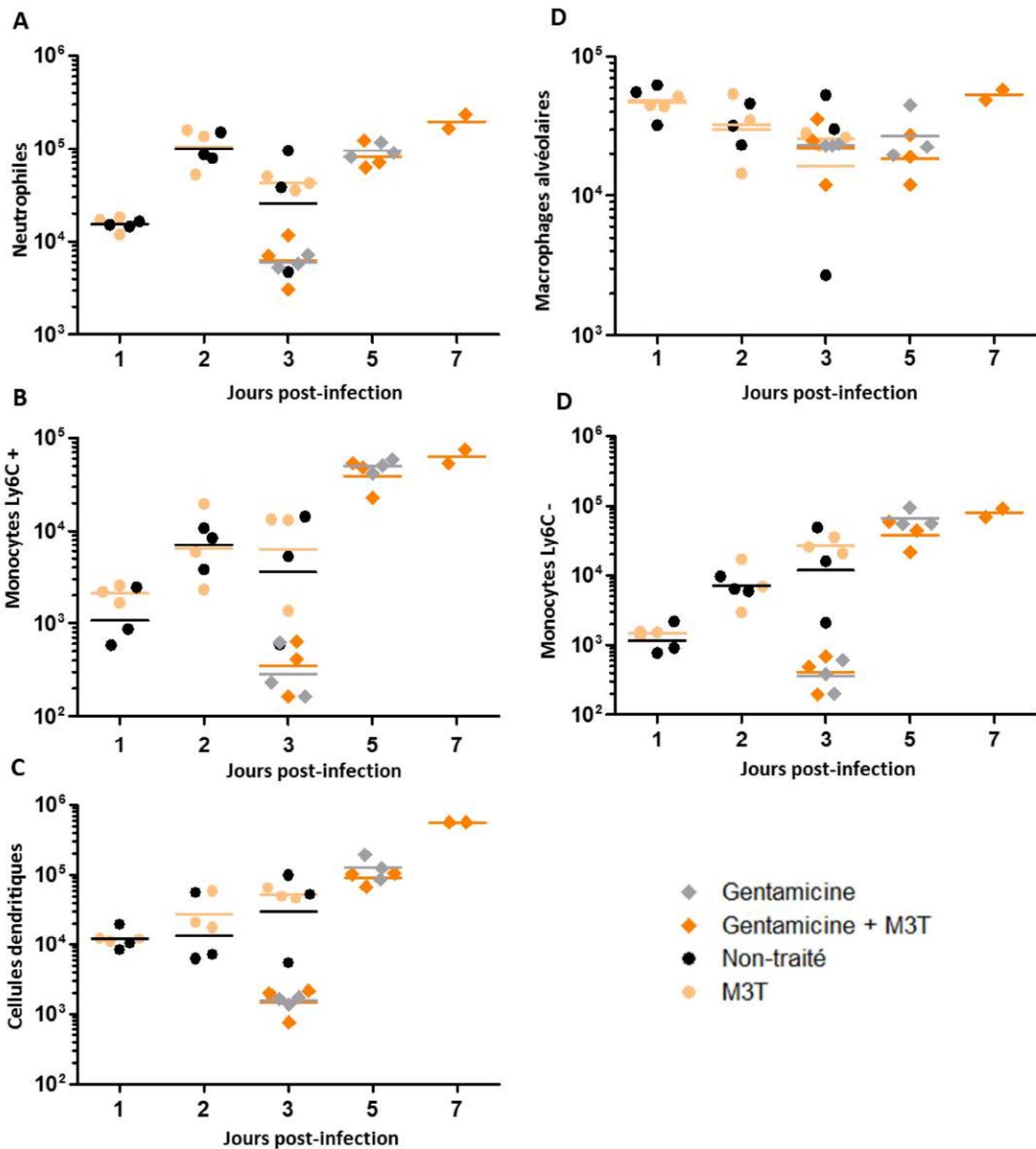


Figure 2-II-14 : Effet du M3T sur les populations cellulaires dans le tissu pulmonaire

Les souris sont infectées par voie intranasale avec en moyenne 100 CFU de *F. novicida*. La gentamicine à 5 mg/kg et le M3T à 1 mg/kg sont administrés 6 h post-infection. Aux temps indiqués, 2 ou 3 animaux (selon les expériences) sont sacrifiés et les poumons sont prélevés puis dissociés. Les cellules sont ensuite marquées puis analysées par cytométrie en flux. Les données représentées sont issues de 2 expériences indépendantes. Aucun effet du M3T n'est observé sur les populations cellulaires dans les poumons.

Les résultats de ces deux expériences sont représentés dans la figure 2-II-14. Mis à part les macrophages alvéolaires, toutes les populations cellulaires augmentent de façon identique jusqu'à 72 h p.i. pour les souris non-traitées et traitées avec le M3T seul (Figure 2-II-14). De la même façon, entre 3 et 7 jours p.i., les populations cellulaires analysées dans les conditions de traitement avec l'antibiotique augmentent rapidement. Un écart conséquent est observable à 3 jours p.i. entre les groupes ayant reçu l'antibiotique et ceux ayant reçu le M3T seul ou du sérum physiologique. En revanche, le M3T ne semble pas avoir d'impact sur l'abondance des différentes populations cellulaires. Le profil de recrutement cellulaire observé dans les poumons pour les souris non-traitées est cohérent avec les données de la littérature. De plus, la cinétique de recrutement corrèle avec celle de la production de cytokines pro-inflammatoires, impliquées dans le recrutement cellulaire, dosées dans les poumons (cf paragraphe 2-II-B-3a, Figure 2-II-9)

Le traitement par le M3T n'a donc pas d'influence sur le nombre de cellules observées dans les poumons, ni dans les BAL, toute population confondue.

c) Effet du M3T sur la pathologie

Au cours des diverses expériences, nous avons pu constater des différences d'aspect macroscopiques des organes de souris infectées en fonction du traitement. En particulier, le foie des souris infectées par *F. novicida* prend une teinte très claire à partir de 48 h à 72 h p.i., caractéristique d'un dysfonctionnement hépatique. Alors que les souris traitées avec une dose sous-optimale d'antibiotique présentent des morphologies similaires, les souris traitées avec le M3T en combinaison avec la gentamicine présentent un foie d'aspect plus normal (Figure 2-II-15).

Pour l'analyse histologique des lésions tissulaires, 4 groupes de 5 ou 10 souris ont été infectés avec environ 200 CFU de *F. novicida*, puis traités avec la gentamicine ou le M3T seuls ou en combinaison, ou non-traités (injections de sérum physiologique). 3, 4 et 5 jours p.i., 5 souris par groupe ont été sacrifiées pour prélever les poumons, le foie et la rate. Les organes fixés ont été inclus en paraffine puis donnés au service d'histopathologie expérimentale de l'unité INSERM de Toulouse-Purpan où des coupes de 5 µm ont été réalisées puis colorées à l'hématoxyline-éosine. Comme évoqué précédemment, en raison de la mortalité due à l'infection, les animaux non-traités et traités uniquement par le M3T n'ont pu être analysés qu'au temps 3 jours p.i. et les animaux traités par la gentamicine seule qu'à 3 et 4 jours p.i..



Figure 2-II-12 : Observation macroscopique de l'effet du M3T sur les lésions hépatiques

Les souris ont été infectées avec 100 CFU de *F. novicida* par voie intranasale puis traitées avec de la gentamicine seule (A) ou en combinaison avec le M3T (B). 3 jours post-infection, les animaux ont été sacrifiés puis disséqués afin d'observer les lésions macroscopiques.

Le foie des souris traitées par le M3T en combinaison avec la gentamicine est moins pale, suggérant un dysfonctionnement hépatique moins important.

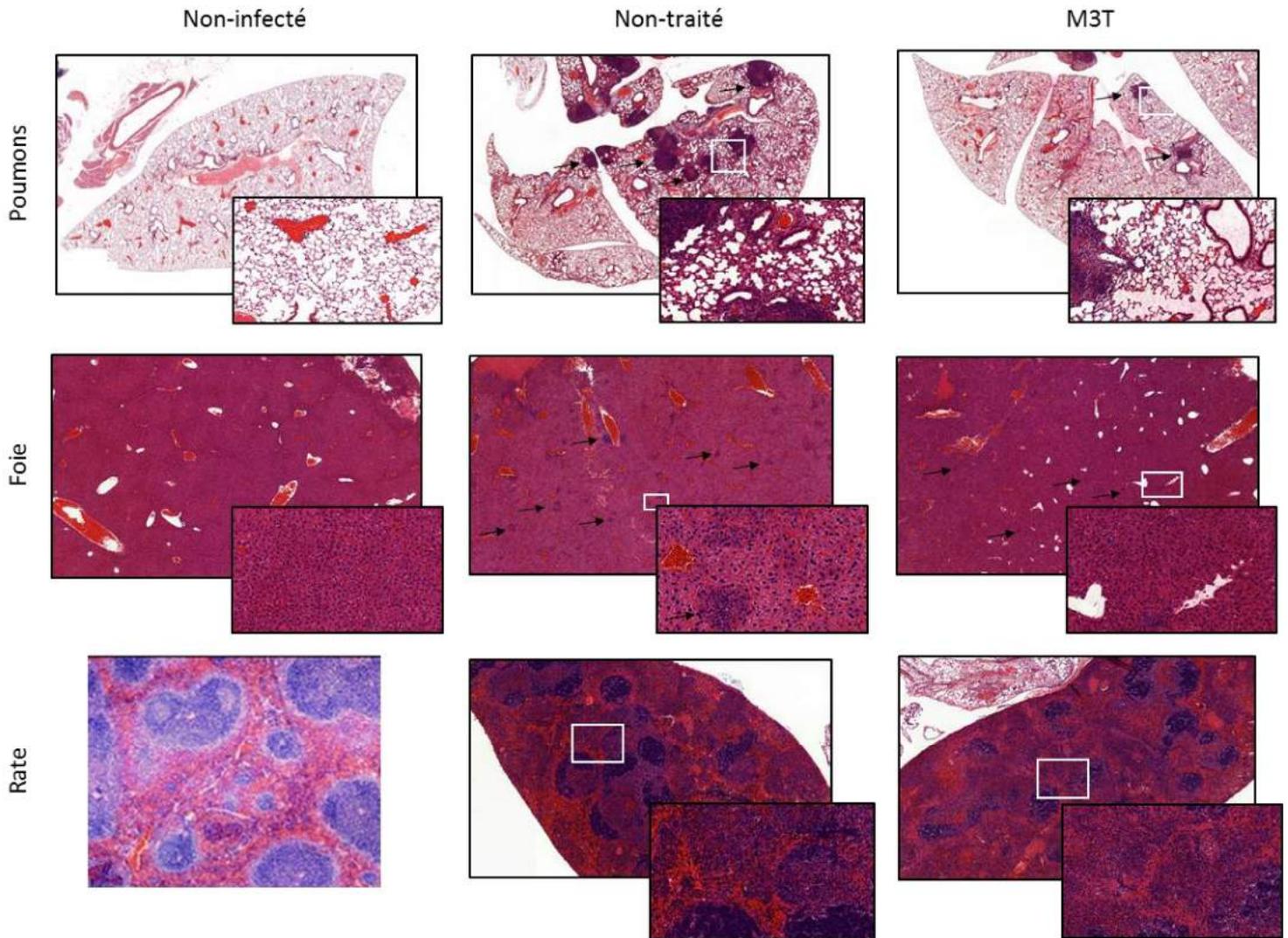


Figure 2-II-13 : Effet du M3T sur les lésions dans les poumons, le foie et la rate

Les souris ont été infectées avec 200 CFU de *F. novicida* par voie intranasale puis traitées avec du NaCl ou du M3T quotidiennement. 3 jours post-infection, les animaux ont été sacrifiés. Les poumons préalablement gonflés avec la solution de fixation, le foie et la rate ont été prélevés puis fixés au formol pendant 48 h. Les organes ont ensuite été inclus en paraffine puis des coupes de 5 μ m ont été réalisées. Celles-ci ont été colorées à l'Hématoxyline-Eosine. Les grossissements sont les suivants : poumons (A) x0,76 et x14, foie (B) x3 et x20 et rate (C) x5 et x15. La coupe histologique de la rate non-infectée est issue de l'article Malik *et al.*, 2006 [77] et a été réalisée sur une souris C57Bl6.

L'observation des lames suggère que les lésions dans les poumons et le foie des souris traitées par le M3T sont moins importantes que pour les souris non-traitées.

Les figures 2-II-16 et 2-II-17 montrent des lésions représentatives de celles observées sur les poumons, le foie et la rate des animaux non-traités ou traités par le M3T seul (Figure 2-II-16), ou traités par l'antibiotique seul ou en combinaison avec le M3T (Figure 2-II-17). L'analyse complète des coupes histologiques n'a pas encore été réalisée à ce jour mais le sera prochainement (elle sera présentée lors de la soutenance). Cette analyse permettra de donner un score histologique à chaque échantillon, afin de quantifier l'effet du M3T. Néanmoins, une simple observation des coupes a permis d'observer une tendance positive de l'effet du M3T sur les lésions, principalement dans les poumons et le foie. En effet, les poumons des animaux non-traités présentent de nombreuses et larges lésions péri-vasculaires et péri-bronchiales nécrotiques, ainsi qu'un épaissement global des parois alvéolaires caractéristique d'une pneumonie interstitielle (Figure 2-II-16A). Les lésions semblent composées d'une grande majorité de neutrophiles. Le foie des souris non-traitées présente de très nombreux foyers inflammatoires de densité modérée constitués de neutrophiles (Figure 2-II-16C). Pour tous les groupes, une hyperplasie de la pulpe blanche accompagnée d'une déstructuration des follicules lymphoïdes a été observée dans la rate. La pulpe rouge est marquée par une forte infiltration de polynucléaires neutrophiles. La rate est très touchée par l'inflammation et contient une très forte charge bactérienne, inobservable sur ces coupes, comme indiqué au paragraphe 2-II-B2. Nos observations correspondent aux lésions décrites dans la littérature chez des souris 3 jours après une infection pulmonaire par *F. novicida* [129] ou par une souche de *F. tularensis* de type A [211].

Mis à part dans la rate, où aucune différence évidente n'a été observée, les animaux traités par le M3T, seul et en combinaison avec l'antibiotique, semblent présenter des lésions de même nature, mais moins nombreuses et moins étendues. Les poumons des animaux traités par l'antibiotique seul présentent des lésions nécrotiques similaires mais moins nombreuses que les souris non-traitées. Ces lésions sont d'autant plus réduites dans le cas d'un traitement antibiotique conjugué avec le M3T. De plus, l'épaississement des parois alvéolaires est moins important dans ces échantillons (Figure 2-II-16A et B et 2-II-17A et B). Dans le foie, le même type de lésions est observé dans tous les groupes. Seuls le nombre et la densité varient en fonction du traitement. Le traitement par le M3T seul semble permettre la réduction du nombre de foyers inflammatoires ainsi que leur densité (Figure 2-II-16D). L'antibiotique en revanche, réduit le nombre de foyers mais leur densité semble identique aux souris non-traitées (Figure 2-II-17C). Enfin, les souris traitées avec la combinaison de gentamicine et de M3T semblent présenter des lésions moins nombreuses et de faible densité (Figure 2-II-17D).

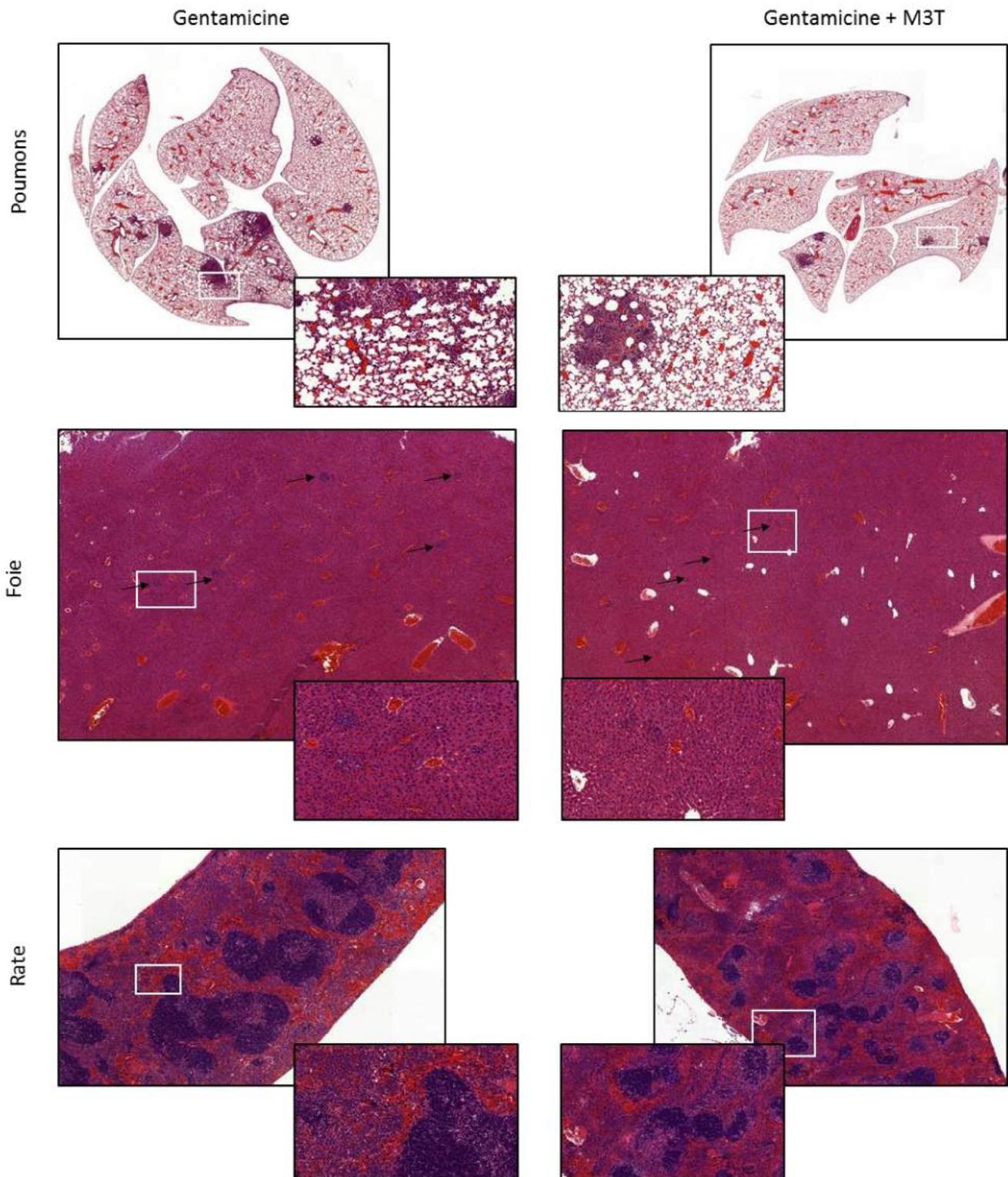


Figure 2-II-17 : Effet du M3T en combinaison avec la gentamicine sur les lésions dans les poumons et le foie

Les souris ont été infectées avec 200 CFU de *F. novicida* par voie intranasale puis traitées avec de la gentamicine seule ou en combinaison avec le M3T quotidiennement. 3 jours post-infection, les animaux ont été sacrifiés. Les poumons préalablement gonflés avec la solution de fixation, le foie et la rate ont été prélevés puis fixés au formol pendant 48 h. Les organes ont ensuite été inclus en paraffine puis des coupes de 5 µm ont été réalisées. Celles-ci ont été colorées à l'Hémaléoxylène-Eosine. Les grossissements sont les suivants : poumons (A) x0,76 et x14, foie (B) x3 et x20 et rate (C) x5 et x15.

Les lésions dans les poumons et le foie semblent moins importantes pour les souris traitées par le M3T en combinaison avec la gentamicine que pour celles traitées avec la gentamicine seule.

Une quantification des lésions est nécessaire afin de déterminer s'il existe une différence significative entre les différents groupes et ainsi de pouvoir conclure sur l'effet de chaque traitement. Toutefois, les premières observations des coupes histologiques à 3 jours p.i. pulmonaire par *F. novicida* semblent confirmer un effet positif du M3T, administré seul ou en combinaison avec la gentamicine, sur les lésions pulmonaires et hépatiques.

Enfin, *in vivo*, le traitement par le M3T, en combinaison avec la gentamicine, prolonge la survie des souris infectées par voie pulmonaire par *F. novicida* et semble réduire, même lorsqu'il est administré seul, les lésions inflammatoires dans les poumons et le foie. En revanche, aucun effet n'a été observé sur la charge bactérienne, ni sur les différents paramètres de la réponse inflammatoire observés : production de cytokines et recrutement cellulaire dans les poumons.

Chapitre 3 – Conclusions et perspectives

Au cours de mes travaux de thèse, j'ai évalué le potentiel anti-inflammatoire du mannodendrimère 3T *in vitro* dans des cellules phagocytaires infectées par *F. novicida*, ainsi que le bénéfice thérapeutique d'un traitement par le M3T dans un modèle murin de tularémie pulmonaire.

Nous avons évalué le potentiel anti-inflammatoire du M3T *in vitro*, dans différents types de cellules phagocytaires infectées par *F. novicida*. Dans les monocytes-macrophages humains de la lignée THP-1, le M3T réduit l'activation de NF- κ B, la production d'IL-8 et l'expression de la molécule de co-stimulation CD40, induites par *F. novicida* via TLR2. Nos résultats, ainsi que les données publiées sur l'effet anti-inflammatoire du M3T [169], suggèrent que cet effet soit dépendant de DC-SIGN. Cependant, l'utilisation d'un anticorps bloquant anti-DC-SIGN, n'a pas permis de conclure sur le rôle exact de ce récepteur dans l'inhibition de la réponse inflammatoire induite par *F. novicida*, son implication reste donc à démontrer formellement. Dans des cellules dendritiques dérivées de monocytes humains, le M3T inhibe également la production de cytokines pro-inflammatoires induite par *F. novicida*. En revanche, aucun effet du M3T n'a été observé sur la réponse induite par l'infection dans des cellules dendritiques murines dérivées de moelle osseuse. De même, le M3T n'inhibe pas ou peu, la réponse inflammatoire induite par du LPS dans ces cellules [169]. Bien que le protocole utilisé pour différencier les cellules puisse être à l'origine de ce résultat, il est aussi envisageable que les BMDC ne soient pas un modèle tout à fait adapté à notre étude. En effet, *in vivo*, l'effet du M3T est dépendant du récepteur SIGNR1, or il est possible que ce récepteur, ou la voie de signalisation associée, ne soient pas fonctionnels dans les BMDC. En revanche, Kawauchi *et al.* [212] ont démontré que SIGNR1 intervient dans l'inhibition, par des liposomes mannosylés, de la production d'IL-6 induite par le LPS dans les macrophages péritonéaux. Les macrophages étant les principales cellules cibles de *Francisella*, les macrophages péritonéaux pourraient être un modèle plus adapté à l'évaluation du M3T dans des cellules murines.

Le M3T étant capable d'inhiber la réponse inflammatoire induite par *F. novicida* *in vitro* dans des cellules phagocytaires, nous avons ensuite évalué le bénéfice thérapeutique potentiel de ce composé dans un modèle murin d'infection pulmonaire par *F. novicida*. Le traitement par le M3T, en combinaison avec un antibiotique, la gentamicine, administré à une dose sous-optimale, permet d'augmenter significativement la survie des animaux, en comparaison au traitement antibiotique seul. Ayant constaté que le traitement par le M3T n'influe pas sur la charge bactérienne dans les organes, nous avons étudié différents paramètres de la réponse inflammatoire sur lesquels le M3T aurait pu avoir un effet.

Dans le cas d'une inflammation induite par le LPS, le M3T inhibe la production de TNF- α et le recrutement des neutrophiles dans les poumons par un mécanisme dépendant du récepteur

SIGNR1 [169]. Nous nous sommes donc intéressés à l'implication de ce récepteur dans l'augmentation de la survie des animaux traités par le M3T, mais également à l'effet de ce traitement sur le recrutement des cellules immunitaires dans les poumons.

Nos résultats n'ont pas permis de mettre en évidence, dans un contexte d'infection par *F. novicida*, un mode d'action du M3T similaire à celui précédemment établi. D'une part, nous n'avons pas pu tirer de conclusion de l'unique expérience réalisée à ce jour sur les souris déficientes pour le récepteur SIGNR1. En effet, un biais expérimental, lié à une hétérogénéité dans l'âge des animaux, n'a pas permis d'obtenir les résultats attendus dans la condition contrôle. De nouvelles expériences sont prévues pour évaluer le rôle de ce récepteur dans l'augmentation de la survie apportée par le traitement par le M3T. D'autre part, aucun effet du traitement par le M3T sur le recrutement des cellules immunitaires dans les poumons n'a été observé. En effet, le M3T n'influe pas sur la production des cytokines pro-inflammatoires, nécessaires au recrutement cellulaire, que nous avons étudiées (TNF- α , IL-6, CCL-2) dans les BAL, ni sur le nombre de cellules immunitaires (monocytes, neutrophiles, cellules dendritiques, macrophages alvéolaires) dans les BAL et dans le tissu pulmonaire. En revanche, l'effet bénéfique du M3T sur la mortalité des souris infectées provient vraisemblablement de la réduction des dommages tissulaires liés à l'inflammation, comme suggéré par l'observation des coupes histologiques du foie et de la rate. En effet, même si la quantification de ces lésions reste à faire, une observation qualitative indique une réduction des lésions dans les organes des souris traitées par le M3T, témoignant de l'effet anti-inflammatoire du M3T.

La localisation première de l'infection pulmonaire par *F. novicida* ainsi que l'effet décrit du M3T sur l'inflammation pulmonaire induite par du LPS, nous ont conduit à focaliser notre analyse sur les poumons. Cependant, contrairement à l'inflammation dans cet organe, induite immédiatement après une exposition à des aérosols de LPS, la réponse inflammatoire à *F. novicida* est plus tardive et déclenchée de façon systémique, dans tous les organes infectés. Bien que les lésions pulmonaires soient réduites dans le cas d'un traitement avec le M3T, il est envisageable que l'effet de ce traitement sur les paramètres de la réponse inflammatoire que nous avons étudiés ne soit pas observable dans les poumons, mais le soit dans d'autres organes. Les observations macroscopiques du foie notamment, suggèrent un effet du M3T sur la pathologie de cet organe qu'il serait intéressant de caractériser *via* une analyse du recrutement cellulaire, similaire à celle que nous avons réalisée dans les poumons, ou *via* un dosage des enzymes du foie donnant des indications sur le fonctionnement hépatique. De façon générale, l'inflammation induite par *F. novicida* étant systémique, un suivi de la production de cytokines dans le sang serait également nécessaire afin d'observer un effet anti-inflammatoire potentiel plus global du M3T.

Les lésions observées dans les poumons et le foie semblent impliquer majoritairement des neutrophiles, bien qu'un marquage spécifique soit nécessaire pour le confirmer de façon

définitive. Ces neutrophiles participent activement à la nécrose des tissus, à la fois en libérant des composés microbicides toxiques (cf Introduction II-B-3), mais également par leur propre mort cellulaire provoquant la présence de nombreux débris cellulaires dans les tissus. Le recrutement massif de ces neutrophiles est donc à l'origine de dommages conséquents. La réduction de ces lésions par le traitement avec le M3T suggère un effet sur ces cellules en limitant soit leur recrutement, soit leur état d'activation, réduisant ainsi la quantité de composés toxiques dans les tissus, soit leur mortalité.

Notre première hypothèse était que le M3T pouvait interférer avec le recrutement des neutrophiles car ce mécanisme a précédemment été mis en évidence pour ce composé [169]. En effet, 18 h après exposition à du LPS, les souris traitées par le M3T présentent deux fois moins de neutrophiles dans les BAL que les souris non-traitées [169]. Cependant, d'après nos résultats, le M3T n'influe pas sur le recrutement des cellules immunitaires dans les poumons de souris infectées par *F. novicida* suggérant donc un rôle potentiel sur l'état d'activation ou la mortalité des neutrophiles.

L'hypothèse d'un effet direct du M3T sur la durée de vie des neutrophiles peut facilement être vérifiée *in vitro*. En effet, l'analyse de marqueurs spécifiques de la mort cellulaire (iodure de propidium, annexine V, TUNEL) sur des neutrophiles infectés par *F. novicida*, par cytométrie en flux ou microscopie, permettrait d'évaluer l'effet direct du M3T sur ce paramètre. Il existe également des moyens d'évaluer l'activité de la NADPH oxydase, donnant ainsi une information sur l'état d'activation des neutrophiles. Une interaction directe entre le M3T et les neutrophiles est possible mais il est aussi envisageable que l'effet du M3T provienne d'un mécanisme plus complexe. En effet, le M3T pourrait agir indirectement sur l'activation ou la mort des neutrophiles en modulant les médiateurs de l'inflammation produits par les cellules environnantes, telles que les cellules dendritiques ou les macrophages. Un tel mécanisme ne pourrait donc être étudié qu'*in vivo*. Les principaux facteurs de l'inflammation susceptibles de jouer ce rôle sont les cytokines pro-inflammatoires et les DAMP. En particulier, la mesure de la production d'IL-1 β et IL-18 libérées lors de l'activation de l'inflammasome, l'un des acteurs clés de la réponse de l'hôte à *Francisella*, serait intéressante [124]. Nous avons tenté de mesurer la production d'IL-1 β dans les BAL par ELISA, mais la sensibilité du kit de dosage ne nous a pas permis de détecter cette cytokine dans les échantillons. Par ailleurs, jusqu'à présent, toutes les cytokines étudiées ont été dosées dans les BAL, et il serait intéressant de mesurer leur expression par quantification de l'ARN dans les tissus par RT-qPCR. En effet, ces données permettraient d'évaluer de façon plus globale l'effet du M3T sur la production de cytokines par les cellules présentes dans ces tissus. Les DAMP, tels que HMGB-1, favorisent l'activation des neutrophiles et peuvent être observés par immunohistochimie. Le marquage de ces signaux de danger sur les coupes histologiques de foie et de poumons permettrait d'évaluer l'influence du M3T sur la libération de ces médiateurs de sepsis. Également, un

marquage des différentes caspases par la même méthode pourrait permettre d'évaluer l'impact du M3T sur les différents mécanismes de mort cellulaire mis en jeu.

De nombreuses voies restent à explorer afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans l'effet thérapeutique du M3T observé sur la pathologie provoquée par l'infection par *F. novicida*. Par ailleurs, des connaissances approfondies de ses propriétés d'absorption ou de métabolisation, doivent être acquises avant de pouvoir considérer le M3T en tant qu'agent thérapeutique potentiel. En effet, celui-ci ne remplit pas les critères définis par les règles de Lipinski concernant les propriétés physico-chimiques des drogues potentielles ou existantes. Son poids moléculaire de 48 000 Da par exemple, dépassant la valeur maximale (500 Da) décrite dans ces règles, pourrait être un problème pour le passage de certaines barrières de l'organisme. Cependant, dans notre étude, le M3T n'a pas montré de toxicité majeure chez la souris. De plus, depuis plusieurs années à présent, les nanoparticules, dont les dendrimères, suscitent un intérêt grandissant pour le développement de nouveaux médicaments ou de nouvelles formulations de drogues existantes. De nombreuses études sont disponibles dans la littérature sur l'utilisation de dendrimères de composition variées pour le traitement de diverses pathologies. Certains d'entre eux font actuellement l'objet d'essais cliniques, notamment en tant qu'agent antiviral pour la prévention des infections sexuellement transmissibles (HIV, HSV), ou en tant que transporteur d'un agent anti-cancéreux [213]. Ces exemples permettent d'envisager la possibilité d'une future utilisation thérapeutique du M3T. Au-delà du potentiel thérapeutique du M3T, mes travaux ont également montré qu'une stratégie anti-inflammatoire, complémentaire aux antibiotiques, présentait un intérêt non négligeable pour le traitement de l'infection pulmonaire par *F. novicida*. En effet, l'augmentation de la survie des animaux a été observée à la fois dans le cas d'un traitement par le M3T, mais également par l'ibuprofène. Ce dernier constitue, par ailleurs, un très bon exemple de composé immunomodulateur pouvant être utilisé pour le traitement d'infections pulmonaires, comme démontré dans le cas de la tuberculose [164]. L'immunomodulation est un domaine en pleine expansion depuis quelques années et constitue une stratégie prometteuse pour le traitement des maladies infectieuses, probablement en tant que thérapie complémentaire aux antibiotiques. Mes travaux de thèse s'inscrivent dans ce contexte et soulignent l'intérêt d'une telle stratégie pour le traitement des infections respiratoires aiguës, telles que la tularémie pulmonaire.

Chapitre 4 – Matériel et méthodes

I- Expériences *in vitro*

A) Microbiologie

1) Cultures de *F. novicida*

Les souches *F. novicida* U112 et *F. novicida* U112 Δ FPI (Dr Thomas Henry, INSERM, Lyon) sont cultivées sur milieu gélosé TSA (Conda) complétementé avec 0,1% de cystéine (Sigma), et 30 μ g/ml de kanamycine, pour la souche Δ FPI, à 37°C pendant 24 h à partir d'ampoules stock congelées à -80°C. Les cultures liquides sont réalisées dans du milieu TSB complétementé avec 0,1 % de cystéine pendant 18 ou 24 h à partir de colonies prélevées sur milieu gélosé. Les ampoules stock sont réalisées avec 600 μ L de culture ayant atteint une DO600nm (densité optique) de 1 avec 300 μ l de glycéról à 50 % puis congelées à -80°C. Pour les infections de cellules, les cultures sont centrifugées à 3000 g pendant 5 min, puis le culot est repris dans du PBS. Grâce à la relation reliant la DO600nm et la concentration en bactéries (DO600nm = 1 correspond à 109 bactéries/ml), la suspension est diluée afin d'obtenir la MOI (Multiplicité d'infection) voulue.

2) Extraction des lipoprotéines de *F. novicida*

500 ml de culture de *F. novicida* sont centrifugés à 3000 g pendant 10 min, le culot est ensuite lavé deux fois avec du PBS. Les bactéries sont inactivées par la chaleur (110 °C pendant 1 h) puis congelées et lyophilisées. Les lipides sont extraits par un mélange chloroforme/méthanol (1:1) pendant 6 h à 60 °C sous agitation. Après centrifugation à 1500 rpm pendant 10 min, le surnageant constituant l'extrait lipidique est prélevé et le culot de bactéries délipidées est repris dans un mélange éthanol/eau (1:1) puis agité à 60 °C pendant 12 h. Après centrifugation à 1500 rpm pendant 10 min, le surnageant est prélevé et placé dans un ballon et le culot de bactéries est repris dans l'eau puis soniqué avec une sonde à ultrason. Un volume équivalent d'éthanol est ajouté et une deuxième extraction est réalisée à 60 °C pendant 12 h. Après centrifugation à 1500 rpm pendant 10 min, les surnageants des deux extractions sont rassemblés et séchés à l'évaporateur rotatif. Les lipoprotéines sont ensuite purifiées par une extraction au phénol hydraté. L'extrait éthanol/eau sec est repris dans un mélange phénol/eau (1:1), chauffé à 60 °C pendant 1 h sous agitation puis centrifugé 5 min à 1500 rpm. La phase phénolique, contenant les lipoprotéines est ensuite dialysée contre de l'eau (seuil de coupure de la membrane de dialyse 6-8000 Da). Suite à la dialyse, les lipoprotéines précipitées sont congelées puis lyophilisées avant d'être dosées par la méthode de Bradford (Sigma).

3) Test de viabilité des bactéries

100 µL d'une suspension bactérienne à 6.10¹⁰ bactéries/ml sont distribués dans des puits d'une plaque 96 puits. Les bactéries sont incubées pendant 4 h avec le M3T ou la gentamicine à 1, 10 et 100 µg/ml (contrôle positif) ou du PBS (contrôle négatif), puis avec 50 µL de MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium) à 1 mg/ml pendant 1 h 30 (Sigma). Enfin, 50 µL de SDS à 20 % sont finalement ajoutés avant de lire l'absorbance à 570 nm.

4) Test de liaison de *F. novicida* à DC-SIGN-Fc

50 µL de PBS contenant 10⁶ bactéries sont distribués dans une plaque MaxiSorp (Nunc) 96 puits puis séchés sous un flux d'air chaud. Les puits sont bloqués 1 h avec 100 µL de PBS 5 % BSA (Bovin Serum Albumin). Les bactéries sont ensuite incubées 2 h avec 50 µL de DC-SIGN-Fc (InvivoGen) à 1 µg/ml dans du PBS 1 % BSA puis lavées 2 fois avec du PBS. Les récepteurs solubles sont détectés avec un anticorps anti-hFc-Biotine (dilution 1/1000, 1h) puis avidine-HRP (1/500, 30 min). Les plaques sont lavées 5 fois avec du PBS et incubées avec 50 µL de TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) jusqu'à l'apparition d'une coloration bleue puis 25 µL de H₂SO₄ à 1M sont ajoutés. L'absorbance à 450 nm est ensuite mesurée.

B) Biologie cellulaire

1) Lignées cellulaires

Les cellules THP-1 DualTM (InvivoGen) dérivent des cellules monocytaires humaines THP-1, elles sont transfectées de manière stable par deux plasmides intégratifs : l'un portant le gène codant pour une phosphatase alcaline sécrétée sous le contrôle d'un promoteur inducible par NF-κB et AP-1 et l'autre portant le gène codant pour une luciférase sécrétée sous le contrôle du promoteur inducible par ISG54 (régulation de la voie de l'interféron).

Les cellules HEK-BlueTM hTLR2 et hTLR4 dérivent des cellules épithéliales humaines HEK. Elles surexpriment les récepteurs humains TLR2 et TLR4 et sont transfectées de manière stable par le plasmide portant le gène codant pour une phosphatase alcaline sécrétée sous le contrôle d'un promoteur inducible par NF-κB et AP-1.

Les cellules THP-1 sont cultivées en milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI), L-glutamine (11875093, ThermoFisher Scientific) supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal (SVF, 10091148, ThermoFisher Scientific) et 50 µg/ml de Pénicilline Streptomycine (15070063, ThermoFisher Scientific) à 37°C sous atmosphère humide contenant 5 % de CO₂. Les cellules HEK-BlueTM hTLR2 et hTLR4 sont cultivées dans les mêmes conditions dans du milieu Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM), 4,5 g/L Glucose, L-glutamine (11965-092, ThermoFisher Scientific) supplémenté par 10 % de SVF et 1 % de pénicilline-streptomycine.

2) Cellules dendritiques murines dérivées de moelle osseuse (BMDC)

Les cellules de moelle osseuse sont extraites des tibias et fémurs de souris C57Bl/6 (Janvier) avec 5 mL de milieu Iscove Modified Dulbecco's Medium (IMDM), L-glutamine, HEPES (GE Healthcare, SH30228). La suspension cellulaire est centrifugée 10 min à 300g à 4°C et remise en suspension dans le même milieu avec 10 % de SVF, pénicilline-streptomycine (50 µg/ml) et cultivées pendant 4 h en boîtes de Pétri afin d'éliminer les cellules différenciées. Pour obtenir les BMDCs, les cellules non-adhérentes sont cultivées à une densité de cellules de 10⁶ cellules/ml dans du milieu IMDM, 10 % de SVF, 50 µg/ml de pénicilline-streptomycine, 50 µM de 2-β-mercaptoéthanol et 10 % de milieu conditionné de surnageant de culture de cellules J558 comme source de GM-CSF. Le troisième jour, du milieu frais contenant du GM-CSF est ajouté et le sixième jour, la moitié du milieu est renouvelée. Les BMDC sont collectées le huitième jour et utilisées sans pré-activation.

3) Cellules dendritiques dérivées de monocytes

Le sang issu de donneurs sains est obtenu auprès de l'établissement français du sang dans le cadre d'une convention. Les PBMC sont isolées sur gradient de Ficoll, l'ensemble des étapes conduisant à leur purification est réalisé à température ambiante. Le sang est dilué au demi puis déposé doucement sur un milieu de séparation des lymphocytes (MSL, Eurobio) pour éviter qu'ils ne se mélangent l'un à l'autre (MSL, Eurobio). Après 30 min de centrifugation à 600g, l'anneau lymphocytaire est récupéré. Les PBMC sont lavées trois fois avec du PBS, les centrifugations sont réalisées à 900g afin d'éliminer les plaquettes. Les cellules sont ensuite réparties dans une plaque 24 puits à 5.10⁶ cellules/ml/puits dans du milieu RPMI 1 % SVF, 50 µM de 2-β-mercaptoéthanol et 50 µg/ml de pénicilline-streptomycine. Les monocytes sont séparés par adhérence pendant 2 h. Les cellules non-adhérentes sont aspirées avec le surnageant. Les monocytes sont lavés délicatement avec du PBS Ca²⁺/Mg²⁺ (Gibco, ThermoFisher Scientific) à 37°C. 1 ml de milieu RPMI, 1 % SVF, 50 µM de 2-β-mercaptoéthanol et 50 µg/ml de pénicilline-streptomycine, IL-4 (1000 UI/ml) et GM-CSF (4000 UI/ml) est ajouté dans chaque puits. Les cellules sont cultivées dans ce milieu à 37°C sous atmosphère humide avec 5 % de CO₂. Le 3^{ème} jour 1 ml de milieu RPMI 1 % SVF, 50 µM de 2-β-mercaptoéthanol et 50 µg/ml de pénicilline-streptomycine, IL-4 (1000 UI/ml) et GM-CSF (4000 UI/ml) est ajouté. Après 3 jours, soit 6 jours de différenciation, les cellules dendritiques non-adhérentes sont collectées et utilisées sans pré-activation.

4) Evaluation de la réponse inflammatoire

a) Infection, stimulation et traitement

Les cellules THP-1 sont distribuées dans une plaque 96 puits à 100 000 cellules/puits dans du milieu RPMI, les cellules HEK sont diluées à 50 000 cellules/puits dans du milieu DMEM et les cellules dendritiques à 150 000 cellules/puits dans du DMEM également.

- Traitements

Le M3T est dilué dans du PBS puis ajouté dans les puits pour obtenir une concentration finale de 5, 10 ou 25 µg/ml dans chaque puits. La plaque est ensuite incubée pendant 1 h à 37 °C. Les cellules sont ensuite infectées ou stimulées avec un ligand purifié (LPS, Pam3CSK4, zymosan (InvivoGen), lipoprotéines de *F. novicida*).

Lorsque les cellules sont traitées avec un anticorps (anti-TLR1, TLR-2, TLR6 (InvivoGen), DC-SIGN (Beckman)), celui-ci est ajouté 30 min avant le M3T ou avant la stimulation aux concentrations indiquées sur les figures.

- Infection par *F. novicida*

10 µL de suspension bactérienne de *F. novicida*, diluée dans du PBS sont ajoutés dans chaque puits à la MOI choisie (concentration déduite de l'absorbance à 600 nm). La plaque est ensuite centrifugée à 400 g pendant 10 min puis placée à 37 °C pendant 18 h. Afin de déterminer la MOI réelle, l'inoculum est dilué (dilutions successives d'un facteur 10), et les différentes dilutions sont étalées sur milieu gélosé TSA 0,1 % de cystéine. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24 h et les colonies sont ensuite dénombrées afin de déterminer la concentration de l'inoculum.

- Stimulation

Les ligands sont dilués dans du PBS puis ajoutés dans les puits à la concentration choisie. Les cellules sont ensuite incubées pendant 18 h.

b) Mesure de l'activation de NF-κB et dosage de cytokines

Après l'infection ou la stimulation par un ligand purifié, le surnageant est collecté puis filtré avec un filtre 0,2 µm. L'activation de NF-κB et la concentration en l'IL-8 est mesurée dans le surnageant des cellules THP-1, et le TNF-α et l'IL-6 sont dosées dans le surnageant des cellules dendritiques. Les cytokines sont dosées par la méthode ELISA à l'aide des kits ELISA Ready-SET-Go!, eBioscience, selon le protocole du fournisseur. La mesure de l'activation de NF-κB se fait par l'ajout de 180 µL de Quantiblue (InvivoGen) sur 20 µL de surnageant de culture. L'absorbance à 630 nm est mesurée après 1 à 4 h d'incubation.

c) Mesure de l'expression des marqueurs d'activation par cytométrie en flux

Après prélèvement du surnageant, les cellules sont lavées avec une solution de PBS à 3 % de SVF, puis transférées dans une plaque 96 puits à fond rond. Les cellules sont ensuite incubées pendant 30 minutes à 4°C avec un anticorps anti-CD40, anti-MHCII ou anti-CD80 couplé avec un fluorochrome (APC, PE, FITC) (eBioscience) aux concentrations indiquées par le fabricant. Les cellules sont lavées puis fixées pendant 2 h avec du PBS contenant 4 % de PFA. L'intensité de fluorescence est ensuite analysée par cytométrie en flux (FACSCalibur, BD Biosciences)

5) Mesure de la croissance intracellulaire de *F. novicida*

La croissance intracellulaire a été évaluée dans les cellules THP-1. Les cellules sont rendues adhérentes par l'ajout de 20 ng/ml de PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma), dans le milieu de culture (RPMI, SVF, Pénicilline-Streptomycine) pendant 48 h. Les cellules sont lavées pour éliminer le PMA, puis infectées par *F. novicida* avec la méthode décrite dans le paragraphe 4-a) pendant 1 h seulement, puis lavées 3 fois avec du PBS. Le milieu de culture est alors remplacé par du RPMI contenant 10 µg/ml de gentamicine afin d'éliminer les bactéries extracellulaires. A différent temps post-infection, le surnageant est aspiré, les cellules sont lavées avec du PBS puis lysées avec du PBS contenant 1 % de saponine. Le lysat est ensuite dilué (dilutions successives d'un facteur 10), et les différentes dilutions sont étalées sur milieu gélose TSA 0,1 % de cystéine. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24 h et les colonies sont ensuite dénombrées.

II- Expérimentation animale

Les animaux sont hébergés dans des isocages sur portoirs ventilés dans l'ASB3. La nourriture et l'eau sont accessibles en continu.

A) Infection intranasale

L'inoculum est préparé à partir d'une ampoule stock de *F. novicida* de concentration connue congelée à -80 °C. Une nouvelle ampoule est décongelée à chaque expérience. La concentration en bactéries dans l'inoculum est vérifiée par étalement sur milieu gélosé TSA 0,1 % de cystéine.

Les souris sont anesthésiées par inhalation d'isoflurane. Pour cela, 5 animaux sont placés pendant 5 min dans une chambre d'induction et exposés à 4 % d'isoflurane avec un débit d'air de 1 L/min. L'infection est réalisée en déposant une goutte de 20 µL de suspension bactérienne sur les narines de l'animal.

B) Administration du M3T et de la gentamicine

Le M3T est administré par injection intraveineuse au sinus rétro-orbital. Les souris sont anesthésiées comme décrit ci-dessus avant l'injection de 100 µl de solution de M3T dilué à 1 mg/kg dans du sérum physiologique (NaCl 0,9 %). Les injections sont réalisées à 24 h d'intervalle en changeant d'œil chaque jour.

La gentamicine est administrée par injection intrapéritonéale sans anesthésie. La gentamicine est diluée dans du sérum physiologique et injectée à 5 mg/kg (100 µl), hormis pour les expériences de mise au point.

C) Evaluation de la charge bactérienne et de la réponse inflammatoire

A différents jours post-infection, 3 à 5 souris sont anesthésiées par injection intrapéritonéale de 100 µl d'un mélange de kétamine et xylazine (240µL et 160µL respectivement pour 2 ml).

1) Charge bactérienne

Les animaux sont disséqués afin de prélever les poumons, le foie et la rate. Chaque organe est placé dans 5 ml de PBS dans un tube GentleMACS M (Miltenyi Biotec). Les organes sont ensuite broyés à l'aide du GentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec). Les broyats sont dilués successivement d'un facteur 10. Chaque dilution est ensuite étalée sur milieu gélosé TSA 0,1 % cystéine. Les boîtes de Pétri sont placées à 37°C pendant 24 h puis les colonies sont dénombrées.

2) Immunomonitoring

Les dosages de cytokines et l'analyse des populations cellulaires sont faites à partir des fluides de lavages broncho-alvéolaires (BAL). Les BAL sont collectés en injectant 2 fois 1 ml de PBS dans les poumons via une aiguille placée dans la trachée. Les BAL sont centrifugés à 1200 rpm pendant 5 min et le surnageant est prélevé puis filtré avec un filtre de 0,2 µm.

Les cytokines sont dosées dans ce surnageant par la méthode ELISA en utilisant les kits ELISA Ready-SET-Go!, eBioscience, selon le protocole du fournisseur.

Le culot contenant les cellules est utilisé pour analyser les populations cellulaires en FACS.

Les poumons sont prélevés puis placés dans 5 ml de PBS dans un tube GentleMACS C puis broyés grossièrement à l'aide du GentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec). Les broyats sont ensuite traités pendant 25 min avec 2 mg/ml de collagénase D (Roche) et 40 U/ml de DNase I (Roche) à 37°C sous agitation. Les poumons sont de nouveau broyés et une suspension cellulaire est collectée après passage sur tamis cellulaire. Cette suspension est centrifugée à 1200 rpm pendant 5 min et les globules rouges contenus dans le culot cellulaire sont lysés par l'ajout de RBC Lysis Buffer (eBiosciences) pendant 5 min. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée pendant 5 min à 1200 rpm.

Les culots issus des BAL et du tissu pulmonaire sont repris dans 200 µl de Cell Staining Buffer (CSB) dans une plaque 96 puits à fond rond. Les cellules sont lavées avec du CSB puis incubées pendant 10 minutes avec un FcR-block (eBiosciences). Après un lavage avec du CSB, les cellules sont marquées par un mélange de plusieurs anticorps (anti-CD11c, anti-CD11b, anti-Ly6 C, anti-Ly6 G, anti-F480, anti-MHCII). Elles sont ensuite lavées puis fixées pendant 5 min avec une solution de fixation (Fixation Buffer, eBiosciences), lavées puis analysées par cytométrie en flux.

3) Histologie

A différents temps post-infection, les animaux sont euthanasiés par injection intrapéritonéale de 200 µl de pentobarbital. Les poumons sont gonflés avec 1 ml de formalin 10 % (Sigma) puis ligaturés et prélevés. Le foie et la rate sont également prélevés. Les organes sont plongés dans 25 ml de formalin 10 % à 4 °C pendant 48 h. Les organes fixés sont ensuite gardés dans l'éthanol à 70 °C à 4°C jusqu'à l'inclusion en paraffine. Les coupes et les colorations hématoxyline-éosine ont été réalisées par la plateforme d'histologie de Toulouse Purpan.

Annexe – Article : Identification par spectrométrie de masse sur bactéries entières d'une modification de la structure du lipide A de *Francisella novicida* en réponse à un stress acide

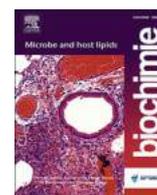
Le LPS, composé très abondant de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, est constitué d'une ancre lipidique (Lipide A) substituée par une chaîne polysaccharidique. Ce glycolipide joue un rôle clé dans la physiologie de ces bactéries, mais constitue également un PAMP induisant la production de cytokines pro-inflammatoires *via* sa reconnaissance par TLR4 [214, 215]. Il est également une cible pour les peptides antimicrobiens cationiques, effecteurs moléculaires du système immunitaire inné capables de détruire la membrane bactérienne chargée négativement. Cependant, *Francisella* produit un lipide A atypique, présent à 90 % sous forme non-substituée par un oligosaccharide [110, 216]. Ce lipide A est constitué d'une diglucosamine tétra-acylée contrairement à la plupart des bactéries à Gram négatif dont le lipide A est hexa-acylé. De plus, cette structure est substituée en position 1' par une phosphogalactosamine et aucun groupement phosphate n'est présent en position 4' [81, 217] (cf Introduction II-B-1, Figure 1-12). Ces différences par rapport à la structure habituelle des lipides A, permettant à *Francisella* d'éviter la reconnaissance à la fois par TLR4 et les peptides antimicrobiens, sont nécessaires à sa virulence *in vivo* chez la souris (cf Introduction II-B-2) [83, 106, 107, 109]. La modification de la structure du Lipide A est un mécanisme d'adaptation présent chez de nombreuses espèces bactériennes dont *Francisella* [218].

Divers milieux ou espèces animales, tels que l'eau, les arthropodes ou les mammifères, peuvent servir de niche pour la prolifération de *F. tularensis*. Celle-ci doit donc faire face à des variations d'environnement, notamment de la température. *In vitro*, la variation de la température induit une modification de la structure du lipide A de *F. novicida* [219, 220]. En effet, le lipide A de *F. novicida* cultivée 37°C, température des mammifères, présente des acides gras composés d'un plus grand nombre d'atomes de carbone que lorsque celle-ci est cultivée à 18 °C, correspondant à la température des hôtes tels que les arthropodes. Cette modification de structure a également été observée *in vivo* entre le lipide A des bactéries présentes dans la rate de souris infectées et celui des bactéries retrouvées dans des tiques [221]. Cette modification pourrait donc représenter une adaptation de *F. novicida* à son milieu [219].

Chez les mammifères, les macrophages sont la principale cible de *F. tularensis*. Lors de leur internalisation dans ces cellules, les bactéries doivent faire face à l'environnement hostile du phagosome. En particulier, la production de ROS, l'acidification du milieu, la déprivation en nutriments ou encore l'intoxication par de fortes concentrations en cations divalents (zinc, cuivre) sont autant de mécanismes microbicides pour lesquels les bactéries pathogènes ont développé de multiples stratégies de résistance [222, 223]. Dans une étude récente, Barker *et al* [110] ont montré, par marquage métabolique, qu'une forme plus polaire du lipide A de la souche LVS apparaissait lorsque les bactéries se répliquaient dans le milieu intracellulaire des cellules THP-1, en comparaison aux bactéries cultivées dans du milieu BHI. Ces données démontrent une modification de la structure du lipide A induite lors de l'infection. Cette modification pourrait être impliquée dans l'adaptation de *Francisella* à son environnement intracellulaire [110]. Cependant, la nature exacte de cette modification n'a pas été caractérisée lors de cette étude.

Dans le cadre de ce mon travail de thèse, nous avons cherché à caractériser les modifications du lipide A pouvant intervenir lors de la survie intramacrophagique de *F. novicida* en exposant ces bactéries à différents stress mimant les conditions intraphagosomales (pH acide, H₂O₂, forte concentration en Zn²⁺, carence en cations divalents). La structure du lipide A a été analysée par spectrométrie de masse MALDI-TOF directement sur bactéries entières, évitant ainsi les différentes étapes laborieuses de purification et permettant de multiplier les conditions testées. Ainsi, nous avons détecté une modification de la structure du lipide A dans les conditions de culture à pH acide. Cette modification consiste en une augmentation de l'abondance relative d'une forme du lipide A portant un hexose supplémentaire sur la diglucosamine. L'augmentation de la proportion de cette glycoforme a également été observée en conditions de culture à 18°C [219]. L'abondance plus importante de cette forme plus polaire du lipide A en conditions acides, mimant l'acidification du phagosome, correspond selon toute vraisemblance à l'observation de Barker *et al.* [110], sur le lipide A des bactéries intracellulaires. Cette espèce moléculaire, présente en très faible quantité dans les conditions de culture habituelles à 37°C, pourrait contribuer à l'adaptation de *Francisella* dans le milieu intracellulaire.

Cette étude a été réalisée en collaboration avec Gérald Larrouy-Maumus et Michael Thomson de l'Imperial College de Londres, qui ont réalisé les analyses en spectrométrie de masse, ainsi que Robert K. Ernst et Francesca Gardner de l'Université du Maryland qui nous ont fourni les souches *F. novicida* Δ *FlmF1* et Δ *FlmK*.



Short communication

Mass spectrometry analysis of intact *Francisella* bacteria identifies lipid A structure remodeling in response to acidic pH stress



Camille B. Robert ^a, Michael Thomson ^b, Alain Vercellone ^a, Francesca Gardner ^c,
Robert K. Ernst ^c, Gérald Larrouy-Maumus ^{b, **}, Jérôme Nigou ^{a, *}

^a Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Université de Toulouse, CNRS, Université Paul Sabatier, 31077, Toulouse, France

^b MRC Centre for Molecular Bacteriology and Infection, Department of Life Sciences, Faculty of Natural Sciences, Imperial College London, London, UK

^c Department of Microbial Pathogenesis, University of Maryland Baltimore, Baltimore, MD 21201, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 April 2017

Accepted 9 August 2017

Available online 12 August 2017

Keywords:

Lipopolysaccharide

Structure

MALDI

ABSTRACT

Structural modification of lipid A, the lipid anchor of LPS, is one of the strategies used by Gram-negative bacteria to evade host innate immunity. *Francisella tularensis* is a human pathogen that infects and replicates within phagocytic cells. It produces an atypical lipid A, whose structure precludes an efficient recognition by both innate immune players, TLR4 and cationic antimicrobial peptides. Interestingly, a recent report indicates that the lipid A of *Francisella* (LVS vaccinal strain) undergoes polar modifications when bacteria are grown in human macrophages as compared to in broth. To characterize the structural modifications of lipid A that may be induced intracellularly, *Francisella novicida*, a surrogate strain for the highly virulent *F. tularensis*, was submitted to different stress conditions mimicking the harsh environment encountered in the macrophages. To analyze lipid A directly from intact bacteria without any chemical treatment or purification steps, we used a rapid and sensitive MALDI-TOF mass spectrometry approach. Among the many conditions tested, only bacteria exposure to acidic pHs (from 6 to 5) induced a change in lipid A structure. These changes were characterized by an increase in the relative abundance of molecular species bearing an additional hexose unit on the diglucosamine backbone, similar to species present when bacteria are grown under reduced environmental temperature. This lipid A glyco-form, which is observed in trace amounts in normal *in vitro* growth conditions at 37 °C, may contribute to the intracellular parasitism of macrophages by *Francisella*.

© 2017 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

1. Introduction

Francisella tularensis is an intracellular human pathogen able to infect and replicate within phagocytic cells without triggering any immune response, in part *via* the production of an atypical lipopolysaccharide (LPS) [1]. LPS is composed of a lipid anchor (lipid A) substituted by a polysaccharide chain. It is a highly abundant glycolipid of the outer membrane of Gram-negative bacteria and plays a key role in their physiology. It is also a Pathogen-Associated Molecular Pattern (PAMP) recognized by the innate immune

system *via* TLR4. It is therefore a strong inducer of pro-inflammatory cytokine response [2–4]. In addition, it is the target of cationic antimicrobial peptides that are capable of disrupting the negatively charged bacterial membranes. However, *Francisella* produces an unusual lipid A, which exists mainly as a free non-substituted form (up to 90%) [5,6]. *Francisella* lipid A is tetra-acylated, lacks a phosphate group on the 4' position of the diglucosamine backbone, and is substituted on position 1 by a phosphogalactosamine [7,8]. These structural features, which hamper an efficient recognition by both TLR4 and cationic antimicrobial peptides, are required for *Francisella* full virulence [1,9–11].

F. tularensis is able to grow in many different environments and hosts (e.g. water, ticks and mammals), facing environmental changes including temperature. Previous studies have shown that the lipid A structure of *Francisella novicida*, a surrogate strain for the highly virulent *F. tularensis*, differs depending on growth temperature in *in vitro* cultures [12,13]. Indeed, *F. novicida* synthesizes a

* Corresponding author. Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, UMR 5089, CNRS, Université Paul Sabatier, 205 route de Narbonne, BP 64182, 31077, Toulouse Cedex 4, France.

** Corresponding author.

E-mail addresses: g.larrouy-maumus@imperial.ac.uk (G. Larrouy-Maumus), jerome.nigou@ipbs.fr (J. Nigou).

lipid A with longer fatty acids when grown at 37 °C, the temperature of warm-blooded hosts, as compared to 18 °C, a lower temperature encountered in arthropods or water environments. This lipid A structure remodeling is also observed *in vivo* in infected mice spleen vs infected ticks [14] and may represent a virulence-state adaptation [12]. Upon infection of a mammalian host, *F. tularensis* enters macrophages by internalization in a phagosome, from which it rapidly escapes (within 30 min to 4 h, depending on the receptors mediating the entry) to replicate inside the cytosol [1,15]. During the time spent in the phagosome, although brief, bacteria are exposed and must actively become resistant to many antimicrobial mechanisms, such as pH acidification, production of reactive oxygen species or antimicrobial peptides, access restriction to important micronutrients (such as the metal ions iron or magnesium), or poisoning by high concentrations of other divalent cations (zinc, copper). Accordingly, *Francisella* has evolved a multitude of strategies to subvert host defenses [1]. Interestingly, Barker et al. have recently shown by metabolic labelling that the lipid A of the vaccinal strain LVS undergoes polar modifications when bacteria are grown in THP-1 human macrophages, as compared to BHI broth, demonstrating infection-induced changes of lipid A structure that might be involved in *Francisella* adaptation to intracellular lifestyle [5]. However, the exact nature of these structural modifications are currently unknown.

Here, to characterize the structural modifications of lipid A that may be induced intracellularly, *F. novicida* was submitted to different stress conditions mimicking the harsh environment encountered in the macrophages, and lipid A was analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry directly on whole bacteria [16].

2. Materials and methods

2.1. Bacterial growth conditions

Under normal conditions, *F. novicida* U112 (kindly provided by Dr Thomas Henry, Lyon, France), or $\Delta FlmF1$ or $\Delta FlmK$ mutants, were grown overnight at 37 °C in TSB medium (Cat n°1224; Conda, Torrejón de Ardoz Madrid, Spain) supplemented with 0.1% cysteine (primary culture, Abs_{560nm}~1). For experiments of direct growth under stress conditions, the primary culture was diluted 100-fold in TSB medium adjusted at the indicated pH with HCl, or supplemented with ZnCl₂ or H₂O₂ at the indicated concentrations, and bacteria were allowed to grow for 24 h. For experiments of bacteria adaptation to stress conditions, the primary culture was diluted 2-fold in TSB medium modified as indicated above and incubated for the indicated period of time. For experiments of growth under iron, calcium and/or magnesium restriction, a primary bacterial culture was performed overnight using a Chemically Defined Medium (CDM) [17]. Bacteria were then washed three times with CDM devoid of FeSO₄, CaCl₂ and MgSO₄, and used to inoculate a 24 h culture (100-fold dilution as compared to the primary culture) in CDM devoid of FeSO₄ and/or CaCl₂, or containing 10 μM MgSO₄ only. Bacteria were heat-inactivated for an hour at 110 °C before MS analysis.

2.2. MALDI-MS analyses

Bacteria were washed three times and resuspended in double distilled water at a final concentration of 10⁴ to 10⁵ bacteria per μl. 0.4 μl of bacteria solution and 0.8 μl of the matrix solution (10 mg/ml of 2,5-dihydroxybenzoic acid in chloroform/methanol 90:10 v/v) were deposited on the target, mixed with a micropipette and dried under a gentle stream of air. MALDI-TOF MS analysis was performed on a 4800 Proteomics Analyzer MALDI TOF-TOF (Applied Biosystems) using the reflectron mode. Samples were

analyzed operating at 20 kV in the negative ion mode. Typically, spectra from 500 to 2000 laser shots were summed to obtain the final spectrum. All conditions were analyzed from at least three independent bacterial cultures.

2.3. Thin-layer chromatography (TLC) analyses

Lipid A analysis by TLC was performed as previously described [5,6]. Bacteria were washed with PBS and re-suspended in chloroform/methanol/water (1:2:0.8 v/v/v) to extract lipid A. Bacterial debris were removed by centrifugation at 1000 rpm and the supernatant was converted into two phases by adjusting to chloroform/methanol/water (2:2:1.8 v/v/v). The chloroform phase was dried, re-suspended in a minimum volume of chloroform. 50 μg of lipids were spotted onto a silica gel TLC plate, which was developed in the solvent of chloroform/pyridine/88% formic acid/water (50:50:16:5 v/v/v/v). Lipids were visualized by spraying the plate with 0.3% orcinol, 10% sulfuric acid in water followed by charring.

3. Results

To validate our approach involving direct mass spectrometry analysis of intact *F. novicida*, we first studied bacteria grown at 37 °C or 18 °C, a temperature difference that has been previously described to lead to changes in lipid A fatty acid composition [12,13]. Accordingly, the negative MALDI mass spectrum of *F. novicida* grown at 37 °C showed a major ion at *m/z* 1665.4 assigned to tetra-acyl lipid A bearing 3C18OH and 1C16 acyl groups (Fig. 1A and B). In contrast, the mass spectrum of bacteria grown at 18 °C was dominated by two ions at *m/z* 1609.2 and 1637.3 consistent with the modifications previously described at lower temperature and assigned to lipid A molecular species bearing 1C18OH, 2C16OH, 1C16 and 2C18OH, 1C16OH, 1C16 acyl groups respectively [12,13] (Fig. 1C). The lipid A from bacteria first grown at 37 °C and then incubated for 24 h at 18 °C exhibited an intermediate profile (Fig. 1D). These results are in total agreement with data published previously [12,13], demonstrating the potency of our approach to detect structural modifications of *F. novicida* lipid A under different stress conditions.

We next analyzed bacteria submitted to different stress conditions mimicking the hostile environment encountered in macrophages, i.e. acidic pH, oxidative stress, and high concentration of divalent cations, such as Zn²⁺ [1]. Bacteria were grown at 37 °C in TSB broth (pH 7.2), collected and then incubated for 24 h in the same broth, or the same broth adjusted to pH 6, supplemented with 1 mM ZnCl₂ or 0.4 mM H₂O₂. These conditions were found to have no impact on the overall bacterial culture viability but significantly restricted bacterial growth (Supplementary Fig. 1). The negative ion MALDI mass spectrum of bacteria submitted to acidic pH stress (Fig. 2B) showed, as that of the control bacteria (Fig. 2A), two ions at *m/z* 1637.3 and 1665.4. However, it exhibited an additional series of ions at *m/z* 1799.6 and 1827.7 (Fig. 2B), barely detectable in the control bacteria (Fig. 2A), corresponding to the same tetra-acyl lipid A molecular species but bearing an additional hexosyl residue (Fig. 1A), as previously described [6,18]. In contrast, the mass spectrum of bacteria incubated with high concentration of Zn²⁺ ions (Fig. 2C) or H₂O₂ (Fig. 2D) remained unchanged. We then investigated the kinetics of lipid A structure remodeling at pH 6. The relative increase of the molecular species bearing the additional hexosyl residue was barely detectable after 6 h incubation at acidic pH and reached a maximum (around 30% of the total lipid A species) after 24 h (Fig. 2E). However, their relative abundance did not further increase when the pH was decreased to 5 or when combining the stress conditions. Directly growing the bacteria at pH 6 resulted in a slightly more pronounced effect (Supplementary

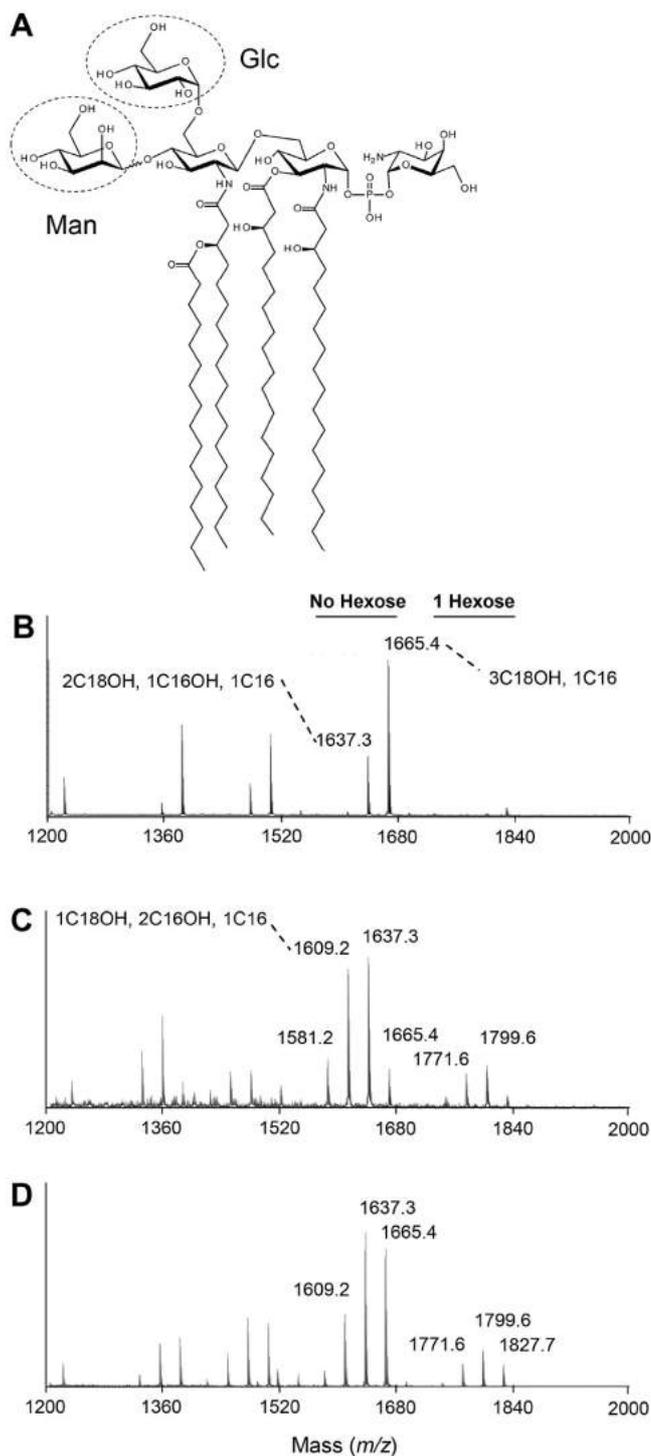


Fig. 1. Mass spectrometry analysis of lipid A from intact *F. novicida* grown at different temperatures. A) Structure of lipid A from *F. novicida* grown at 37 °C, as reported earlier [6,12]. The major acyl-form is drawn. Possible additional hexose units, glucose (Glc) or mannose (Man), linked to the diglucosamine backbone are shown in dashed circles. B–D) Negative ion mode MALDI-TOF MS spectra are shown for *F. novicida* grown at 37 °C (B), grown at 18 °C (C), first grown at 37 °C and then incubated overnight at 18 °C (D). The mass spectra in the low m/z values showed a series of peaks corresponding to lipid A molecular species having lost acyl or galactosaminyl groups and arising from in-source fragmentation processes as a result of the use of a high laser energy required to desorb molecules directly from bacterial cell envelope [16].

Fig. 2). The increase of the relative abundance of lipid A species bearing an additional hexosyl residue at pH 6 was confirmed by TLC

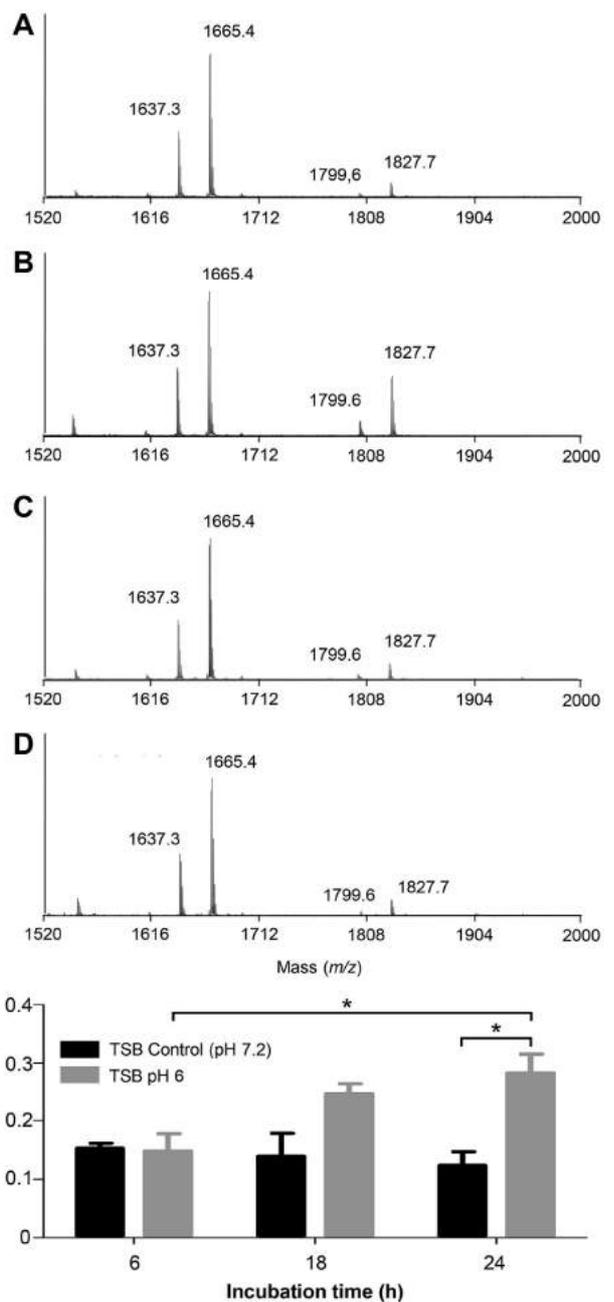


Fig. 2. Mass spectrometry analysis of lipid A from intact *F. novicida* submitted to different stresses mimicking the macrophage environment. A–D) Negative ion mode MALDI-TOF MS spectra are shown for *F. novicida* grown at 37 °C in TSB broth (pH 7.2) and then incubated at 37 °C for 24 h in the same broth (A), the same broth adjusted at pH 6 (B), supplemented with 1 mM Zn^{2+} (C), or 0.4 mM H_2O_2 (D). E) Ratio of lipid A molecular species containing a hexosyl unit (ions at m/z 1799 and m/z 1827) vs molecular species with no hexosyl unit (ions at m/z 1637 and m/z 1665), as determined by the intensity (Int.) of mass spectra ions ($(Int_{m/z1799} + Int_{m/z1827}) / (Int_{m/z1637} + Int_{m/z1665})$). Data are presented as mean \pm SEM calculated from 3 independent experiments. Similar data were obtained with the *F. novicida* Δ FPI (Francisella pathogenicity island) mutant (not shown). *, $P < 0.05$.

analysis (Supplementary Fig. 3).

Another strategy used by macrophages to control and eliminate intracellular pathogens is to restrict their access to important micronutrients, such as iron or magnesium, which are actively excluded from the phagosome. We thus analyzed *F. novicida* grown in a minimum medium devoid of Ca^{2+} , Fe^{2+} , or both Ca^{2+} and Fe^{2+} ,

or containing 10 μM only instead of 550 μM Mg^{2+} (Supplementary Fig. 1C) [17]. The mass spectrum was not altered from the control at all conditions tested (Supplementary Fig. 2).

Addition of the hexose unit on the lipid A has been previously demonstrated to involve the action of the glycosyltransferases FlmF1 and FlmK [18]. Accordingly, the negative MALDI mass spectra of *F. novicida* ΔFlmF1 or ΔFlmK grown at either pH 7.2 or pH 6 lacked the ions at m/z 1799.6 and 1827.7 (Supplementary Fig. 4). In agreement with previous data, ΔFlmK mutant also lacked the galactosamine substituent [18].

4. Discussion

Structural modifications of LPS, most notably lipid A, are one of the strategies used by Gram-negative bacteria to evade of host innate immunity [19]. Lipid A structural remodeling can be regulated at both transcriptional and post-translational levels. This allows the bacteria to adapt to their diverse and often hostile surroundings [20,21], such as the macrophage in the case of intracellular pathogens. We investigated the structural modifications of lipid A that may be induced in the phagosome by submitting *in vitro*-grown *F. novicida* to different stress conditions mimicking this harsh environment. However, purification and characterization of lipid A is tedious and time-consuming. We thus used a rapid and sensitive approach to analyze lipid A directly on intact bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry without any chemical treatment or purification [16]. This allowed us to easily screen altogether more than 60 different conditions. The validity of this approach was demonstrated by its ability to perfectly reproduce previous data obtained with purified lipid A, i.e. a variation of fatty acid length as a function of *F. novicida* growth temperature [12,13]. We did not detect any lipid A modification when growing *F. novicida* in a broth depleted of Mg^{2+} or Ca^{2+} , conditions that in other Gram-negative bacteria result in activation of two-component systems and lipid A structure remodeling [20,21]. However, *Francisella* are devoid of classical, tandemly arranged two-component system genes [22]. Actually, among all the conditions tested, only bacteria exposed to acidic pH (from 6 to 5) induced a change in lipid A structure, i.e. an increase in the relative abundance of molecular species bearing an additional hexose unit. This lipid A glyco-form, bearing either a glucosyl [6] or mannosyl [18] unit, is observed in trace amounts in normal *in vitro* growth conditions at 37 °C. Its relative intensity was increased up to 4-fold when incubating bacteria at pH 6 for 24 h, as previously observed by growing bacteria at low temperature (18–25 °C) [12,13] (see Fig. 1). Interestingly, acidic pH and low temperature showed a synergistic effect (Supplementary Fig. 5). As suggested by Barker et al., this glyco-form might well correspond to one of those observed by metabolic labeling of the LVS strain in human THP-1 macrophages [5]. It is tempting to propose that the acidic pH encountered in the phagosome may be one of the stimuli inducing the remodeling of LVS lipid A in THP-1 cells, although in the study by Barker et al., lipid A profiling by immunoblotting and autoradiography was performed 24 h post-infection [5], a time at which bacteria have already escaped and multiplied in the cytosol, and been submitted to other stresses [1]. Interestingly, acidification of the phagosome has been shown to ensure rapid escape and robust replication in the cytosol of unopsonized *Francisella* [23,24]. This suggests that a decrease in pH stimulates *Francisella* to produce unknown factors to disrupt the phagosomal membrane [15]. Acidic pH-induced modification of lipid A by addition of a hexose unit, a process that involves the action of the glycosyltransferases FlmF1 and FlmK required for the full virulence of *Francisella* [18], might participate in this process. The modification was hardly detectable after 6 h incubation of bacteria at acidic pH. However, inside

macrophages, different stress conditions may synergize to induce lipid A remodeling at an earlier time point. Improving detection and characterization of lipid A from or within infected host cells or tissues is now required to validate these data *in vivo* [14].

Acknowledgments

We gratefully acknowledge Dr Alain Charbit (Paris, France) for helpful advice concerning *Francisella* handling and culturing. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Université Paul Sabatier (Toulouse), the Department of Life Sciences from the Faculty of Natural Sciences Imperial College London, UK, and the Medical Research Council (MR/J006874/1). C.R. is the recipient of a PhD fellowship from the Direction Générale de l'Armement.

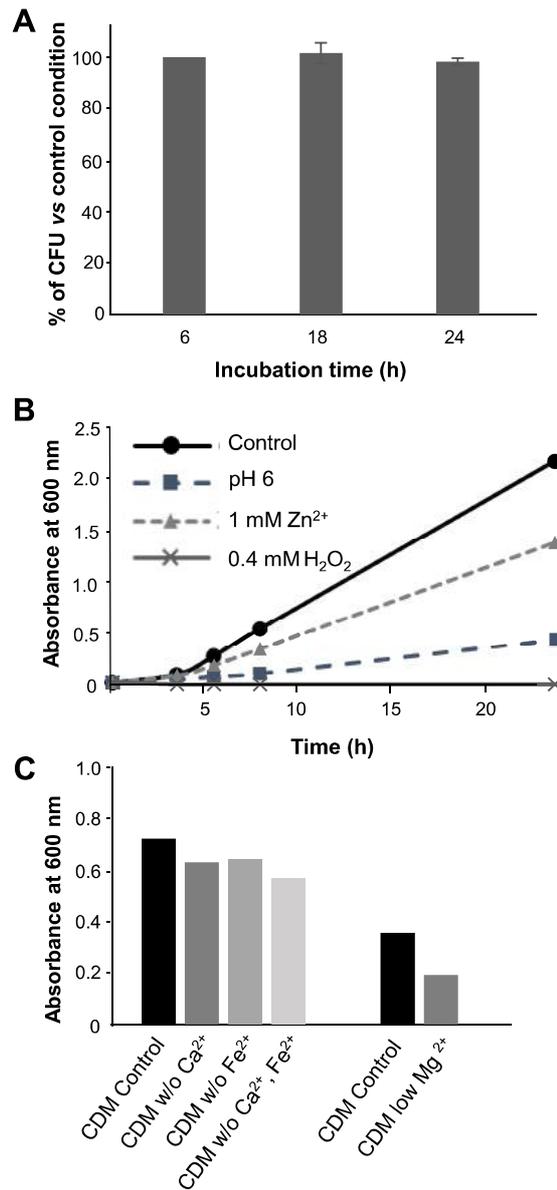
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2017.08.008>.

References

- [1] C.L. Jones, B.A. Napier, T.R. Sampson, A.C. Llewellyn, M.R. Schroeder, D.S. Weiss, Subversion of host recognition and defense systems by *Francisella* spp. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76 (2012) 383–404.
- [2] C.R. Raetz, C. Whitfield, Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 71 (2002) 635–700.
- [3] J.Y. Kang, J.O. Lee, Structural biology of the Toll-like receptor family. *Annu. Rev. Biochem.* 80 (2011) 917–941.
- [4] S. Silva-Gomes, A. Decout, J. Nigou, Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), in: M.J. Parnham (Ed.), *Compendium of Inflammatory Diseases* Springer, Basel, 2014, pp. 1–16.
- [5] J.H. Barker, J.W. Kaufman, D.S. Zhang, J.P. Weiss, Metabolic labeling to characterize the overall composition of *Francisella* lipid A and LPS grown in broth and in human phagocytes. *Innate Immun.* 20 (2014) 88–103.
- [6] X. Wang, A.A. Ribeiro, Z. Guan, S.C. McGrath, R.J. Cotter, C.R. Raetz, Structure and biosynthesis of free lipid A molecules that replace lipopolysaccharide in *Francisella tularensis* subsp. *novicida*. *Biochemistry* 45 (2006) 14427–14440.
- [7] N.J. Phillips, B. Schilling, M.K. McLendon, M.A. Apicella, B.W. Gibson, Novel modification of lipid A of *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.* 72 (2004) 5340–5348.
- [8] B. Schilling, M.K. McLendon, N.J. Phillips, M.A. Apicella, B.W. Gibson, Characterization of lipid A acylation patterns in *Francisella tularensis*, *Francisella novicida*, and *Francisella philomiragia* using multiple-stage mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization on an intermediate vacuum source linear ion trap. *Anal. Chem.* 79 (2007) 1034–1042.
- [9] D. Kanistanon, D.A. Powell, A.M. Hajjar, M.R. Pelletier, I.E. Cohen, S.S. Way, S.J. Skerrett, X. Wang, C.R. Raetz, R.K. Ernst, Role of *Francisella* lipid A phosphate modification in virulence and long-term protective immune responses. *Infect. Immun.* 80 (2012) 943–951.
- [10] X. Wang, A.A. Ribeiro, Z. Guan, S.N. Abraham, C.R. Raetz, Attenuated virulence of a *Francisella* mutant lacking the lipid A 4'-phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 4136–4141.
- [11] A.M. Hajjar, M.D. Harvey, S.A. Shaffer, D.R. Goodlett, A. Sjøstedt, H. Edebro, M. Forsman, M. Bystrom, M. Pelletier, C.B. Wilson, S.I. Miller, S.J. Skerrett, R.K. Ernst, Lack of *in vitro* and *in vivo* recognition of *Francisella tularensis* subspecies lipopolysaccharide by Toll-like receptors. *Infect. Immun.* 74 (2006) 6730–6738.
- [12] Y. Li, D.A. Powell, S.A. Shaffer, D.A. Rasko, M.R. Pelletier, J.D. Leszyk, A.J. Scott, A. Masoudi, D.R. Goodlett, X. Wang, C.R. Raetz, R.K. Ernst, LPS remodeling is an evolved survival strategy for bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 8716–8721.
- [13] S.A. Shaffer, M.D. Harvey, D.R. Goodlett, R.K. Ernst, Structural heterogeneity and environmentally regulated remodeling of *Francisella tularensis* subspecies *novicida* lipid A characterized by tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18 (2007) 1080–1092.
- [14] A.J. Scott, B. Flinders, J. Cappell, T. Liang, R.S. Pelc, B. Tran, D.P. Kilgour, R.M. Heeren, D.R. Goodlett, R.K. Ernst, Norharmane matrix enhances detection of endotoxin by MALDI-MS for simultaneous profiling of pathogen, host, and vector systems. *Pathog. Dis.* 74 (8) (1 November 2016) ftw097, <http://dx.doi.org/10.1093/femspd/ftw097>.
- [15] M. Ozanic, V. Marecic, Y. Abu Kwaik, M. Santic, The divergent intracellular lifestyle of *Francisella tularensis* in evolutionarily distinct host cells. *PLoS Pathog.* 11 (2015) e1005208.
- [16] G. Larrouy-Maumus, A. Clements, A. Filloux, R.R. McCarthy, S. Mostowy, Direct detection of lipid A on intact Gram-negative bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods* 120 (2016) 68–71.

- [17] X. Wu, G. Ren, W.T. Gunning 3rd, D.A. Weaver, A.L. Kalinoski, S.A. Khuder, J.F. Huntley, FmvB: a *Francisella tularensis* magnesium-responsive outer membrane protein that plays a role in virulence, *PLoS One* 11 (2016) e0160977.
- [18] D. Kanistanon, A.M. Hajjar, M.R. Pelletier, L.A. Gallagher, T. Kalhorn, S.A. Shaffer, D.R. Goodlett, L. Rohmer, M.J. Brittnacher, S.J. Skerrett, R.K. Ernst, A *Francisella* mutant in lipid A carbohydrate modification elicits protective immunity, *PLoS Pathog.* 4 (2008) e24.
- [19] M. Matsuura, Structural modifications of bacterial lipopolysaccharide that facilitate gram-negative bacteria evasion of host innate immunity, *Front. Immunol.* 4 (2013) 109.
- [20] B.D. Needham, M.S. Trent, Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis, *Nature reviews, Microbiology* 11 (2013) 467–481.
- [21] C.R. Raetz, C.M. Reynolds, M.S. Trent, R.E. Bishop, Lipid A modification systems in gram-negative bacteria, *Annu. Rev. Biochem.* 76 (2007) 295–329.
- [22] N.P. Mohapatra, S. Soni, B.L. Bell, R. Warren, R.K. Ernst, A. Muszynski, R.W. Carlson, J.S. Gunn, Identification of an orphan response regulator required for the virulence of *Francisella* spp. and transcription of pathogenicity island genes, *Infect. Immun.* 75 (2007) 3305–3314.
- [23] A. Chong, T.D. Wehrly, V. Nair, E.R. Fischer, J.R. Barker, K.E. Klose, J. Celli, The early phagosomal stage of *Francisella tularensis* determines optimal phagosomal escape and *Francisella* pathogenicity island protein expression, *Infect. Immun.* 76 (2008) 5488–5499.
- [24] M. Santic, R. Asare, I. Skrobonja, S. Jones, Y. Abu Kwaik, Acquisition of the vacuolar ATPase proton pump and phagosome acidification are essential for escape of *Francisella tularensis* into the macrophage cytosol, *Infect. Immun.* 76 (2008) 2671–2677.

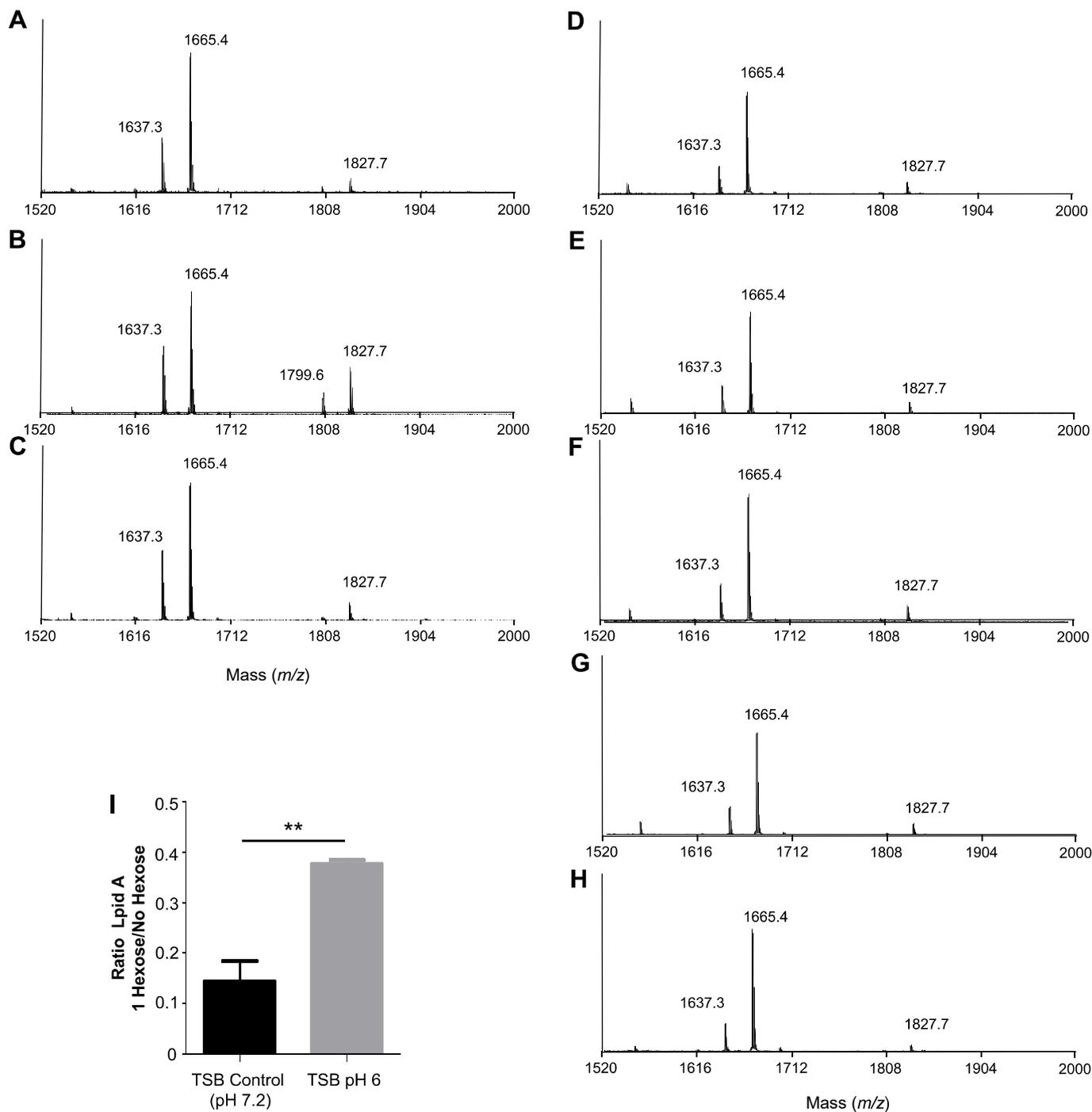


Supplementary Figure 1: Viability and growth of *F. novicida* cultures.

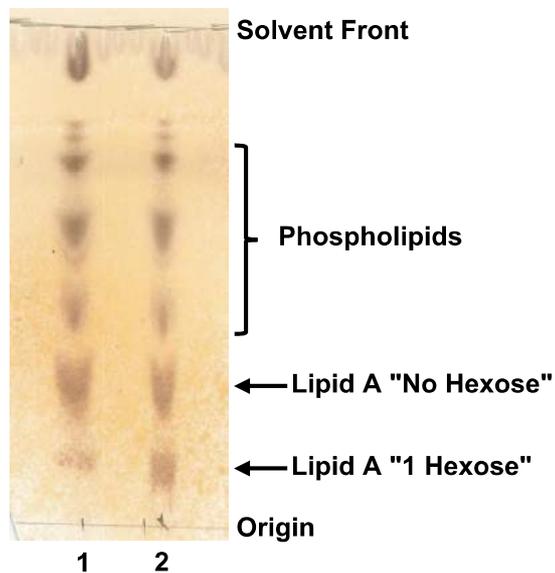
A) Time-course viability of *F. novicida* in TSB broth at pH 6. CFUs in the bacterial culture were determined after 6, 18 or 24 h incubation. Data are presented as the % of CFUs in the TSB broth at pH 6 vs CFUs in the control TSB broth (pH 7.2). The viability was not affected by acidic pH over 24 h.

B) Growth of *F. novicida* under various stress conditions in TSB broth. Absorbance at 600 nm was monitored at 4, 6, 8 or 24 h after inoculation of the control or modified medium. Cultures were also performed at a lower pH (5.5, 5, or 4). Although these conditions resulted in stronger growth defects, they did not lead to increased lipid A modifications as compared to pH 6. Culturing bacteria with higher concentrations of ZnCl₂ (up to 5 mM) did not significantly alter the growth and had no impact on lipid A structure.

C) Growth of *F. novicida* under iron, calcium or magnesium restriction in CDM medium. Absorbance at 600 nm was measured after 24 h growth.

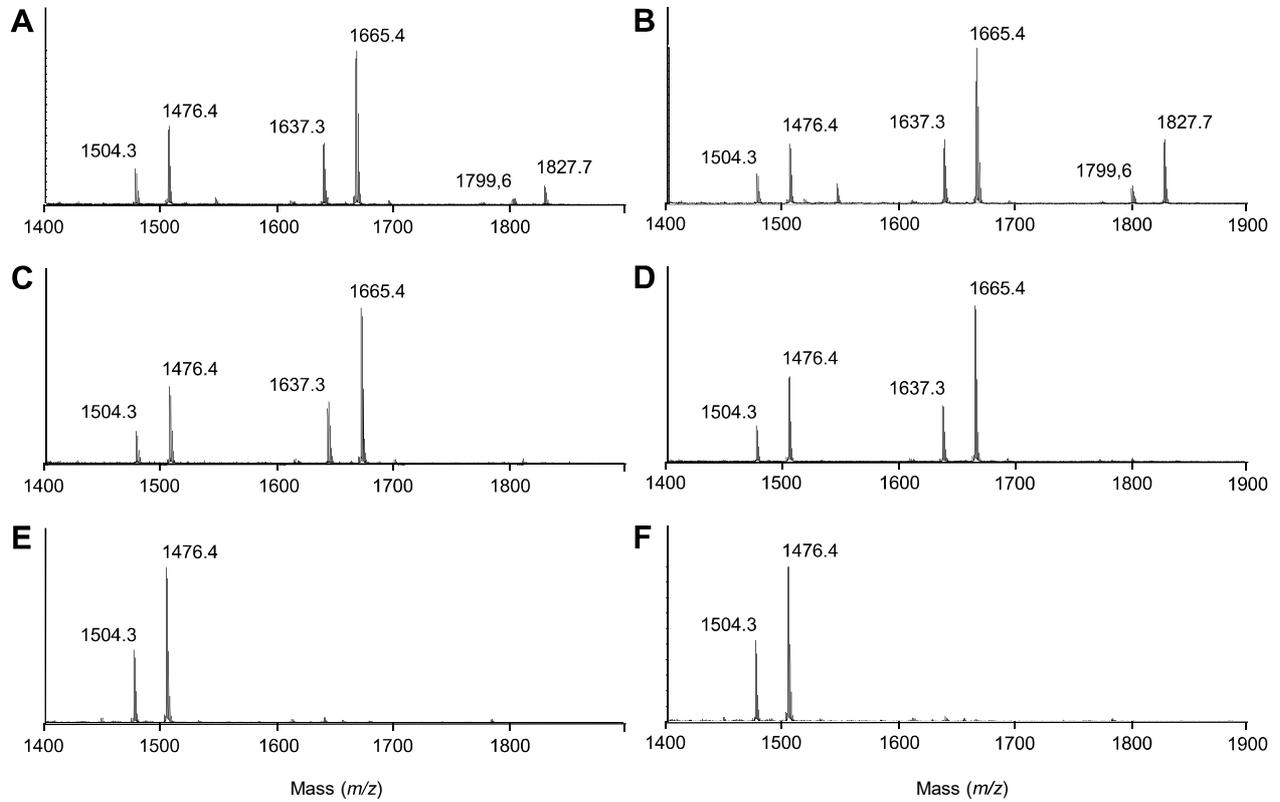


Supplementary Figure 2: Negative ion mode MALDI-TOF MS spectra for *F. novicida* grown at 37°C in TSB broth (pH 7.2) (A), TSB broth adjusted to pH 6 (B), TSB broth supplemented with 1 mM Zn²⁺ (C), or a minimum reconstituted control broth (D) or devoid of Ca²⁺ (E), Fe²⁺ (F), or both Ca²⁺ and Fe²⁺ (G), or containing 10 μM Mg²⁺ only (H). I) Ratio of lipid A molecular species for bacteria grown at 37°C in TSB broth (pH 7.2) vs in TSB broth adjusted to pH 6. The ratio of lipid A molecular species containing a hexosyl unit (ions at *m/z* 1799 and *m/z* 1827) vs molecular species with no hexosyl unit (ions at *m/z* 1637 and *m/z* 1665) is shown, as determined by the intensity (Int.) of mass spectra ions ((Int._{*m/z*1799} + Int._{*m/z*1827})/(Int._{*m/z*1637} + Int._{*m/z*1665})). Data are presented as mean ± SEM calculated from 3 independent experiments. **, *P* < 0.01.



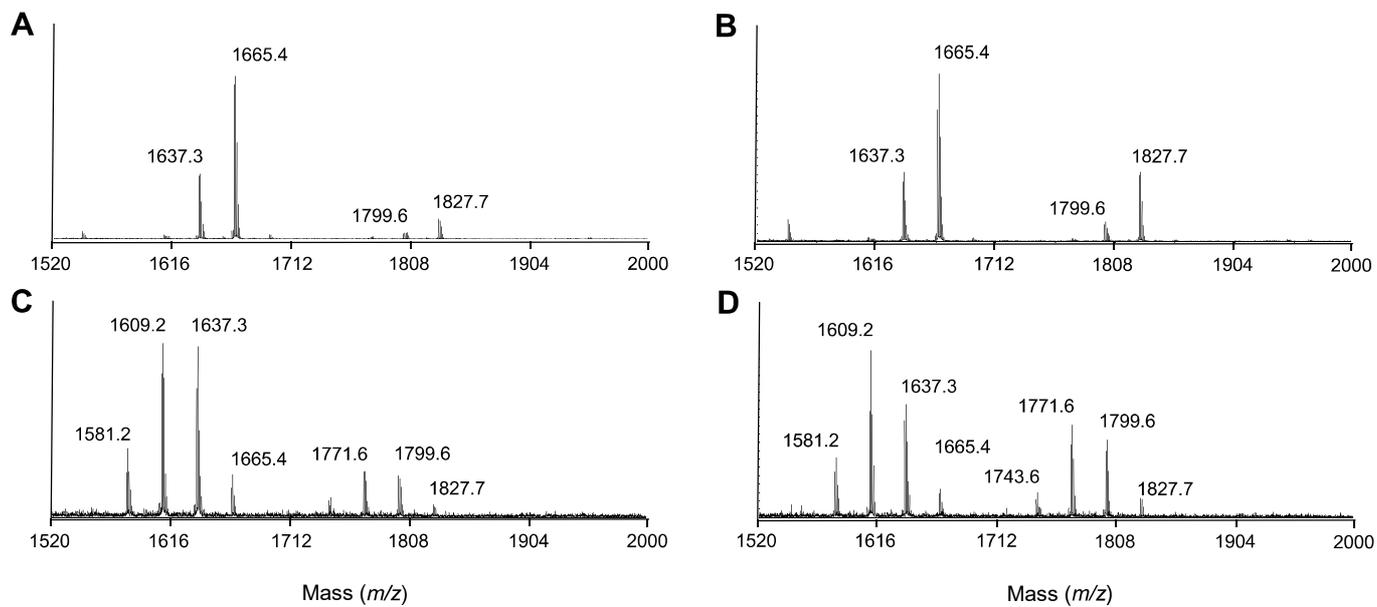
Supplementary Figure 3: Lipid A analysis by TLC.

Lipids were extracted from *F. novicida* grown in the control TSB broth (pH 7.2; lane 1) or in TSB broth adjusted to pH 6 (lane 2), separated by TLC plate using chloroform/pyridine/88% formic acid/water (50:50:16:5 v/v/v/v) [5, 6] and visualized by spraying the plate with 0.3% orcinol, 10% sulfuric acid in water followed by charring.



Supplementary Figure 4: Mass spectrometry analysis of lipid A from intact *F. novicida* wild-type or, Δ FlmF1 or Δ FlmK mutant, strains grown at neutral or acidic pH.

Negative ion mode MALDI-TOF MS spectra are shown for *F. novicida* wild-type (A, B), or Δ FlmF1 (C, D) or Δ FlmK (E, F) mutant, strains grown at 37°C in TSB broth (pH 7.2; A, C and E) or TSB broth adjusted at pH 6 (D, E and F).



Supplementary Figure 5: Negative ion mode MALDI-TOF MS spectra for *F. novicida* grown at 37°C (A, B) or 25°C (C, D) in control TSB broth (pH 7.2; A, C) or TSB broth adjusted to pH 6 (B, D).

Bibliographie

1. Georges W. McCoy, C.W.C., *Further Observations on a Plague-Like Disease of Rodents with a Preliminary Note on the Causative Agent, Bacterium tularensis*. The Journal of Infectious Diseases, 1912. **10**(1): p. 61-72.
2. Wherry, W.B. and B.H. Lamb, *Infection of man with Bacterium tularensis*. 1914. J Infect Dis, 2004. **189**(7): p. 1321-9.
3. Edward Francis, B.M.a.G.C.L., *Tulaeremia*. Public Health Reports (1896, 1921. **36**(30): p. 1731-1753.
4. Keim, P., A. Johansson, and D.M. Wagner, *Molecular epidemiology, evolution, and ecology of Francisella*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1105**: p. 30-66.
5. Evans, M.E., *Francisella tularensis*. Infect Control, 1985. **6**(9): p. 381-3.
6. Ellis, J., et al., *Tularemia*. Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(4): p. 631-46.
7. Olsufjev, N.G., *Taxonomy and characteristic of the genus Francisella Dorofeev, 1947*. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol, 1970. **14**(1): p. 67-74.
8. Forsman, M., G. Sandstrom, and A. Sjostedt, *Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of Francisella strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR*. Int J Syst Bacteriol, 1994. **44**(1): p. 38-46.
9. Ottem, K.F., et al., *Elevation of Francisella philomiragia subsp. noatunensis Mikalsen et al. (2007) to Francisella noatunensis comb. nov. [syn. Francisella piscicida Ottem et al. (2008) syn. nov.] and characterization of Francisella noatunensis subsp. orientalis subsp. nov., two important fish pathogens*. J Appl Microbiol, 2009. **106**(4): p. 1231-43.
10. Brevik, O.J., et al., *Francisella halioticida sp. nov., a pathogen of farmed giant abalone (Haliotis gigantea) in Japan*. J Appl Microbiol, 2011. **111**(5): p. 1044-56.
11. Larson, M.A., et al., *Reclassification of Wolbachia persica as Francisella persica comb. nov. and emended description of the family Francisellaceae*. Int J Syst Evol Microbiol, 2016. **66**(3): p. 1200-5.
12. Qu, P.H., et al., *Francisella guangzhouensis sp. nov., isolated from air-conditioning systems*. Int J Syst Evol Microbiol, 2013. **63**(Pt 10): p. 3628-35.
13. Huber, B., et al., *Description of Francisella hispaniensis sp. nov., isolated from human blood, reclassification of Francisella novicida (Larson et al. 1955) Olsufjev et al. 1959 as Francisella tularensis subsp. novicida comb. nov. and emended description of the genus Francisella*. Int J Syst Evol Microbiol, 2010. **60**(Pt 8): p. 1887-96.
14. Sjostedt, A., *Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1105**: p. 1-29.
15. McLendon, M.K., M.A. Apicella, and L.A. Allen, *Francisella tularensis: taxonomy, genetics, and Immunopathogenesis of a potential agent of biowarfare*. Annu Rev Microbiol, 2006. **60**: p. 167-85.
16. Olsufjev, N.G., O.S. Emelyanova, and T.N. Dunayeva, *Comparative study of strains of B. tularensis in the old and new world and their taxonomy*. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol, 1959. **3**: p. 138-49.

17. Molins, C.R., et al., *Virulence difference between the prototypic Schu S4 strain (A1a) and Francisella tularensis A1a, A1b, A2 and type B strains in a murine model of infection*. BMC Infect Dis, 2014. **14**: p. 67.
18. Larson, C.L., W. Wicht, and W.L. Jellison, *A new organism resembling P. tularensis isolated from water*. Public Health Rep, 1955. **70**(3): p. 253-8.
19. Hollis, D.G., et al., *Francisella philomiragia comb. nov. (formerly Yersinia philomiragia) and Francisella tularensis biogroup novicida (formerly Francisella novicida) associated with human disease*. J Clin Microbiol, 1989. **27**(7): p. 1601-8.
20. Kingry, L.C. and J.M. Petersen, *Comparative review of Francisella tularensis and Francisella novicida*. Front Cell Infect Microbiol, 2014. **4**: p. 35.
21. Larsson, P., et al., *Molecular evolutionary consequences of niche restriction in Francisella tularensis, a facultative intracellular pathogen*. PLoS Pathog, 2009. **5**(6): p. e1000472.
22. Hall, J.D., et al., *Infected-host-cell repertoire and cellular response in the lung following inhalation of Francisella tularensis Schu S4, LVS, or U112*. Infect Immun, 2008. **76**(12): p. 5843-52.
23. Staples, J.E., et al., *Epidemiologic and molecular analysis of human tularemia, United States, 1964-2004*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(7): p. 1113-8.
24. Tarnvik, A. and L. Berglund, *Tularaemia*. Eur Respir J, 2003. **21**(2): p. 361-73.
25. Adams DA, T.K., Jajosky R, et al., *Summary of Notifiable Infectious Diseases and Conditions — United States, 2014.*, in *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016, CDC: Atlanta.
26. Aktas, D., et al., *Oropharyngeal Tularemia Outbreak Associated with Drinking Contaminated Tap Water, Turkey, July-September 2013*. Emerg Infect Dis, 2015. **21**(12): p. 2194-6.
27. Kilic, S., et al., *Water as Source of Francisella tularensis Infection in Humans, Turkey*. Emerg Infect Dis, 2015. **21**(12): p. 2213-6.
28. Tarnvik, A., H.S. Priebe, and R. Grunow, *Tularaemia in Europe: an epidemiological overview*. Scand J Infect Dis, 2004. **36**(5): p. 350-5.
29. Reintjes, R., et al., *Tularemia outbreak investigation in Kosovo: case control and environmental studies*. Emerg Infect Dis, 2002. **8**(1): p. 69-73.
30. Grunow, R. and E.J. Finke, *A procedure for differentiating between the intentional release of biological warfare agents and natural outbreaks of disease: its use in analyzing the tularemia outbreak in Kosovo in 1999 and 2000*. Clin Microbiol Infect, 2002. **8**(8): p. 510-21.
31. Evans, M.E., et al., *Tularemia: a 30-year experience with 88 cases*. Medicine (Baltimore), 1985. **64**(4): p. 251-69.
32. Wang, Y.H., et al., *A case of Francisella tularensis subspecies holarctica in China*. Ticks Tick Borne Dis, 2015. **6**(6): p. 802-4.
33. Mailles, A, V.V., *Bilan de 10 années de surveillance de la tularémie chez l'Homme en France 2013*, Institut de veille sanitaire: Saint-Maurice. p. 16.
34. Aravena-Roman, M., A. Merritt, and T.J. Inglis, *First case of Francisella bacteriaemia in Western Australia*. New Microbes New Infect, 2015. **8**: p. 75-7.
35. Dennis, D.T., et al., *Tularemia as a biological weapon: medical and public health management*. JAMA, 2001. **285**(21): p. 2763-73.
36. Tarnvik, A., *WHO Guidelines on tularemia*, 2007, World Health Organization: Geneva. p. 125.

37. McCrumb, F.R., *Aerosol Infection of Man with Pasteurella Tularensis*. Bacteriol Rev, 1961. **25**(3): p. 262-7.
38. Gurcan, S., *Epidemiology of tularemia*. Balkan Med J, 2014. **31**(1): p. 3-10.
39. Barras, V. and G. Greub, *History of biological warfare and bioterrorism*. Clin Microbiol Infect, 2014. **20**(6): p. 497-502.
40. Roffey, R., A. Tegnell, and F. Elgh, *Biological warfare in a historical perspective*. Clin Microbiol Infect, 2002. **8**(8): p. 450-4.
41. Riedel, S., *Biological warfare and bioterrorism: a historical review*. Proc (Bayl Univ Med Cent), 2004. **17**(4): p. 400-6.
42. Consultants, W., *Health Aspects of Chemical and Biological Weapons*, 1970, World Health Organization: Geneva.
43. Frischknecht, F., *The history of biological warfare. Human experimentation, modern nightmares and lone madmen in the twentieth century*. EMBO Rep, 2003. **4 Spec No**: p. S47-52.
44. Buisson, Y., et al., *Les Risques NRBC, savoir pour agir*. Xavier Montauban SA ed2004, Montrouge.
45. Trevisanato, S.I., *The 'Hittite plague', an epidemic of tularemia and the first record of biological warfare*. Med Hypotheses, 2007. **69**(6): p. 1371-4.
46. Oyston, P.C., A. Sjostedt, and R.W. Titball, *Tularaemia: bioterrorism defence renews interest in Francisella tularensis*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(12): p. 967-78.
47. Kaufmann, A.F., M.I. Meltzer, and G.P. Schmid, *The economic impact of a bioterrorist attack: are prevention and postattack intervention programs justifiable?* Emerg Infect Dis, 1997. **3**(2): p. 83-94.
48. Tigertt, W.D., *Soviet viable Pasteurella tularensis vaccines. A review of selected articles*. Bacteriol Rev, 1962. **26**: p. 354-73.
49. Elkins, K.L., S.L. Kurtz, and R. De Pascalis, *Progress, challenges, and opportunities in Francisella vaccine development*. Expert Rev Vaccines, 2016. **15**(9): p. 1183-96.
50. Sandstrom, G., *The tularaemia vaccine*. J Chem Technol Biotechnol, 1994. **59**(4): p. 315-20.
51. Oyston, P.C. and J.E. Quarry, *Tularemia vaccine: past, present and future*. Antonie Van Leeuwenhoek, 2005. **87**(4): p. 277-81.
52. Pechous, R.D., T.R. McCarthy, and T.C. Zahrt, *Working toward the future: insights into Francisella tularensis pathogenesis and vaccine development*. Microbiol Mol Biol Rev, 2009. **73**(4): p. 684-711.
53. Mann, B.J. and N.M. Ark, *Rationally designed tularemia vaccines*. Expert Rev Vaccines, 2009. **8**(7): p. 877-85.
54. Ireland, R., et al., *Francisella tularensis SchuS4 and SchuS4 lipids inhibit IL-12p40 in primary human dendritic cells by inhibition of IRF1 and IRF8*. J Immunol, 2013. **191**(3): p. 1276-86.
55. Huntley, J.F., et al., *Native outer membrane proteins protect mice against pulmonary challenge with virulent type A Francisella tularensis*. Infect Immun, 2008. **76**(8): p. 3664-71.
56. Maurin, M. and M. Gyuranecz, *Tularaemia: clinical aspects in Europe*. Lancet Infect Dis, 2016. **16**(1): p. 113-24.
57. Boisset, S., et al., *New therapeutic approaches for treatment of tularaemia: a review*. Front Cell Infect Microbiol, 2014. **4**: p. 40.
58. Pai, M., et al., *Tuberculosis*. Nat Rev Dis Primers, 2016. **2**: p. 16076.

59. Bosio, C.M. and S.W. Dow, *Francisella tularensis* induces aberrant activation of pulmonary dendritic cells. *J Immunol*, 2005. **175**(10): p. 6792-801.
60. Steiner, D.J., Y. Furuya, and D.W. Metzger, *Host-pathogen interactions and immune evasion strategies in Francisella tularensis pathogenicity*. *Infect Drug Resist*, 2014. **7**: p. 239-51.
61. Schulert, G.S. and L.A. Allen, *Differential infection of mononuclear phagocytes by Francisella tularensis: role of the macrophage mannose receptor*. *J Leukoc Biol*, 2006. **80**(3): p. 563-71.
62. Chong, A. and J. Celli, *The francisella intracellular life cycle: toward molecular mechanisms of intracellular survival and proliferation*. *Frontiers in Microbiology*, 2010. **1**: p. 138.
63. Santic, M., et al., *Francisella tularensis* travels a novel, twisted road within macrophages. *Trends Microbiol*, 2006. **14**(1): p. 37-44.
64. Lai, X.H., I. Golovliov, and A. Sjostedt, *Francisella tularensis* induces cytopathogenicity and apoptosis in murine macrophages via a mechanism that requires intracellular bacterial multiplication. *Infect Immun*, 2001. **69**(7): p. 4691-4694.
65. Anthony, L.S.D., R.D. Burke, and F.E. Nano, *Growth of Francisella-Spp in Rodent Macrophages*. *Infect Immun*, 1991. **59**(9): p. 3291-3296.
66. Hall, C.A., et al., *A Bioluminescent Francisella tularensis SCHU S4 Strain Enables Noninvasive Tracking of Bacterial Dissemination and the Evaluation of Antibiotics in an Inhalational Mouse Model of Tularemia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016. **60**(12): p. 7206-7215.
67. Mares, C.A., et al., *Initial delay in the immune response to Francisella tularensis is followed by hypercytokinemia characteristic of severe sepsis and correlating with upregulation and release of damage-associated molecular patterns*. *Infect Immun*, 2008. **76**(7): p. 3001-10.
68. Sharma, J., et al., *Features of sepsis caused by pulmonary infection with Francisella tularensis Type A strain*. *Microb Pathog*, 2011. **51**(1-2): p. 39-47.
69. Kinkead, L.C. and L.A.H. Allen, *Multifaceted effects of Francisella tularensis on human neutrophil function and lifespan*. *Immunol Rev*, 2016. **273**(1): p. 266-281.
70. Cowley, S.C., *Editorial: Proinflammatory cytokines in pneumonic tularemia: too much too late?* *J Leukoc Biol*, 2009. **86**(3): p. 469-70.
71. Santic, M., M. Molmeret, and Y. Abu Kwaik, *Modulation of biogenesis of the Francisella tularensis subsp novicida-containing phagosome in quiescent human macrophages and its maturation into a phagolysosome upon activation by IFN-gamma*. *Cell Microbiol*, 2005. **7**(7): p. 957-967.
72. Elkins, K.L., S.C. Cowley, and C.M. Bosio, *Innate and adaptive immunity to Francisella*. *Ann N Y Acad Sci*, 2007. **1105**: p. 284-324.
73. Kirimanjeswara, G.S., et al., *Humoral and cell-mediated immunity to the intracellular pathogen Francisella tularensis*. *Immunol Rev*, 2008. **225**: p. 244-55.
74. Cowley, S.C. and K.L. Elkins, *Immunity to Francisella*. *Frontiers in Microbiology*, 2011. **2**: p. 26.
75. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. *Cell*, 2006. **124**(4): p. 783-801.
76. Hayashi, F., et al., *The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5*. *Nature*, 2001. **410**(6832): p. 1099-103.

77. Collazo, C.M., et al., *Myeloid differentiation factor-88 (MyD88) is essential for control of primary in vivo Francisella tularensis LVS infection, but not for control of intramacrophage bacterial replication*. *Microbes Infect*, 2006. **8**(3): p. 779-90.
78. Silva-Gomes, S., A. Decout, and J. Nigou, *Pathogen-Associated Molecular Pattern (PAMPs)*, in *Encyclopedia of Inflammatory Diseases*, M. Parnham, Editor 2015, Sringer: Basel. p. 1-16.
79. Ray, A., et al., *Bacterial cell wall macroamphiphiles: pathogen-/microbe-associated molecular patterns detected by mammalian innate immune system*. *Biochimie*, 2013. **95**(1): p. 33-42.
80. Park, B.S., et al., *The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex*. *Nature*, 2009. **458**(7242): p. 1191-5.
81. Schilling, B., et al., *Characterization of lipid A acylation patterns in Francisella tularensis, Francisella novicida, and Francisella philomiragia using multiple-stage mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization on an intermediate vacuum source linear ion trap*. *Anal Chem*, 2007. **79**(3): p. 1034-42.
82. Okan, N.A. and D.L. Kasper, *The atypical lipopolysaccharide of Francisella*. *Carbohydr Res*, 2013. **378**: p. 79-83.
83. Hajjar, A.M., et al., *Lack of in vitro and in vivo recognition of Francisella tularensis subspecies lipopolysaccharide by Toll-like receptors*. *Infect Immun*, 2006. **74**(12): p. 6730-8.
84. Jin, M.S., et al., *Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide*. *Cell*, 2007. **130**(6): p. 1071-82.
85. Kang, J.Y., et al., *Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer*. *Immunity*, 2009. **31**(6): p. 873-84.
86. Abplanalp, A.L., et al., *TLR-Dependent Control of Francisella tularensis Infection and Host Inflammatory Responses*. *PLoS One*, 2009. **4**(11).
87. Katz, J., et al., *Toll-like receptor 2 is required for inflammatory responses to Francisella tularensis LVS*. *Infect Immun*, 2006. **74**(5): p. 2809-2816.
88. Malik, M., et al., *Toll-like receptor 2 is required for control of pulmonary infection with Francisella tularensis*. *Infect Immun*, 2006. **74**(6): p. 3657-62.
89. Thakran, S., et al., *Identification of Francisella tularensis lipoproteins that stimulate the toll-like receptor (TLR) 2/TLR1 heterodimer*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(7): p. 3751-60.
90. Sjostedt, A., et al., *Molecular cloning and expression of a T-cell stimulating membrane protein of Francisella tularensis*. *Microb Pathog*, 1989. **6**(6): p. 403-14.
91. Sjostedt, A., A. Tarnvik, and G. Sandstrom, *The T-cell-stimulating 17-kilodalton protein of Francisella tularensis LVS is a lipoprotein*. *Infect Immun*, 1991. **59**(9): p. 3163-8.
92. Jones, C.L., et al., *Repression of bacterial lipoprotein production by Francisella novicida facilitates evasion of innate immune recognition*. *Cell Microbiol*, 2012. **14**(10): p. 1531-43.
93. Crane, D.D., et al., *Lipids derived from virulent Francisella tularensis broadly inhibit pulmonary inflammation via toll-like receptor 2 and peroxisome proliferator-activated receptor alpha*. *Clin Vaccine Immunol*, 2013. **20**(10): p. 1531-40.
94. Clemens, D.L. and M.A. Horwitz, *Uptake and intracellular fate of Francisella tularensis in human macrophages*. *Ann N Y Acad Sci*, 2007. **1105**: p. 160-86.
95. Balagopal, A., et al., *Characterization of the receptor-ligand pathways important for entry and survival of Francisella tularensis in human macrophages*. *Infect Immun*, 2006. **74**(9): p. 5114-25.

96. Pierini, L.M., *Uptake of serum-opsonized Francisella tularensis by macrophages can be mediated by class A scavenger receptors*. Cell Microbiol, 2006. **8**(8): p. 1361-70.
97. Jia, W., et al., *New perspectives of physiological and pathological functions of nucleolin (NCL)*. Life Sci, 2017.
98. Barel, M., et al., *A novel receptor - ligand pathway for entry of Francisella tularensis in monocyte-like THP-1 cells: interaction between surface nucleolin and bacterial elongation factor Tu*. BMC Microbiol, 2008. **8**: p. 145.
99. Clemens, D.L., B.Y. Lee, and M.A. Horwitz, *Francisella tularensis enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops*. Infect Immun, 2005. **73**(9): p. 5892-902.
100. Geier, H. and J. Celli, *Phagocytic receptors dictate phagosomal escape and intracellular proliferation of Francisella tularensis*. Infect Immun, 2011. **79**(6): p. 2204-14.
101. Chong, A., et al., *The early phagosomal stage of Francisella tularensis determines optimal phagosomal escape and Francisella pathogenicity island protein expression*. Infect Immun, 2008. **76**(12): p. 5488-99.
102. Clemens, D.L., B.Y. Lee, and M.A. Horwitz, *Virulent and avirulent strains of Francisella tularensis prevent acidification and maturation of their phagosomes and escape into the cytoplasm in human macrophages*. Infect Immun, 2004. **72**(6): p. 3204-17.
103. Santic, M., et al., *Acquisition of the vacuolar ATPase proton pump and phagosome acidification are essential for escape of Francisella tularensis into the macrophage cytosol*. Infect Immun, 2008. **76**(6): p. 2671-7.
104. Yeaman, M.R. and N.Y. Yount, *Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance*. Pharmacol Rev, 2003. **55**(1): p. 27-55.
105. Piotrowska, U., M. Sobczak, and E. Oledzka, *Current state of a dual behaviour of antimicrobial peptides-Therapeutic agents and promising delivery vectors*. Chem Biol Drug Des, 2017.
106. Kanistanon, D., et al., *Role of Francisella lipid A phosphate modification in virulence and long-term protective immune responses*. Infect Immun, 2012. **80**(3): p. 943-51.
107. Wang, X., et al., *Attenuated virulence of a Francisella mutant lacking the lipid A 4'-phosphatase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(10): p. 4136-41.
108. Bina, X.R., et al., *The AcrAB RND efflux system from the live vaccine strain of Francisella tularensis is a multiple drug efflux system that is required for virulence in mice*. FEMS Microbiol Lett, 2008. **279**(2): p. 226-33.
109. Jones, C.L., et al., *Subversion of host recognition and defense systems by Francisella spp*. Microbiol Mol Biol Rev, 2012. **76**(2): p. 383-404.
110. Barker, J.H., et al., *Metabolic labeling to characterize the overall composition of Francisella lipid A and LPS grown in broth and in human phagocytes*. Innate Immunity, 2014. **20**(1): p. 88-103.
111. Mohapatra, N.P., et al., *Francisella acid phosphatases inactivate the NADPH oxidase in human phagocytes*. J Immunol, 2010. **184**(9): p. 5141-50.
112. McCaffrey, R.L., et al., *Multiple mechanisms of NADPH oxidase inhibition by type A and type B Francisella tularensis*. J Leukoc Biol, 2010. **88**(4): p. 791-805.
113. Lindgren, H., et al., *Resistance of Francisella tularensis strains against reactive nitrogen and oxygen species with special reference to the role of KatG*. Infect Immun, 2007. **75**(3): p. 1303-9.
114. Melillo, A.A., et al., *Identification of Francisella tularensis live vaccine strain CuZn superoxide dismutase as critical for resistance to extracellularly generated reactive oxygen species*. J Bacteriol, 2009. **191**(20): p. 6447-56.

115. Golovliov, I., et al., *An attenuated strain of the facultative intracellular bacterium Francisella tularensis can escape the phagosome of monocytic cells*. Infect Immun, 2003. **71**(10): p. 5940-50.
116. Edwards, J.A., et al., *Restricted cytosolic growth of Francisella tularensis subsp. tularensis by IFN-gamma activation of macrophages*. Microbiology, 2010. **156**(Pt 2): p. 327-39.
117. Pierini, R., et al., *AIM2/ASC triggers caspase-8-dependent apoptosis in Francisella-infected caspase-1-deficient macrophages*. Cell Death Differ, 2012. **19**(10): p. 1709-21.
118. Lai, X.H., I. Golovliov, and A. Sjostedt, *Francisella tularensis induces cytopathogenicity and apoptosis in murine macrophages via a mechanism that requires intracellular bacterial multiplication*. Infect Immun, 2001. **69**(7): p. 4691-4.
119. Ashida, H., et al., *Cell death and infection: a double-edged sword for host and pathogen survival*. J Cell Biol, 2011. **195**(6): p. 931-42.
120. Parmely, M.J., J.L. Fischer, and D.M. Pinson, *Programmed cell death and the pathogenesis of tissue injury induced by type A Francisella tularensis*. FEMS Microbiol Lett, 2009. **301**(1): p. 1-11.
121. Mariathasan, S., et al., *Innate immunity against Francisella tularensis is dependent on the ASC/caspase-1 axis*. Journal of Experimental Medicine, 2005. **202**(8): p. 1043-9.
122. Jones, J.W., et al., *Absent in melanoma 2 is required for innate immune recognition of Francisella tularensis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(21): p. 9771-6.
123. Henry, T., et al., *Type I interferon signaling is required for activation of the inflammasome during Francisella infection*. Journal of Experimental Medicine, 2007. **204**(5): p. 987-94.
124. Wallet, P., B. Lagrange, and T. Henry, *Francisella Inflammasomes: Integrated Responses to a Cytosolic Stealth Bacterium*. Inflammasome Signaling and Bacterial Infections, 2016. **397**: p. 229-256.
125. Jones, C.L. and D.S. Weiss, *TLR2 signaling contributes to rapid inflammasome activation during F. novicida infection*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e20609.
126. Periasamy, S., et al., *Inflammasome-Independent NLRP3 Restriction of a Protective Early Neutrophil Response to Pulmonary Tularemia*. PLoS Pathog, 2016. **12**(12): p. e1006059.
127. Atianand, M.K., et al., *Francisella tularensis reveals a disparity between human and mouse NLRP3 inflammasome activation*. J Biol Chem, 2011. **286**(45): p. 39033-42.
128. Henry, T. and D.M. Monack, *Activation of the inflammasome upon Francisella tularensis infection: interplay of innate immune pathways and virulence factors*. Cell Microbiol, 2007. **9**(11): p. 2543-51.
129. Sharma, J., et al., *Lethal pulmonary infection with Francisella novicida is associated with severe sepsis*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(3): p. 491-504.
130. Mishra, B.B., et al., *Galectin-3 functions as an alarmin: pathogenic role for sepsis development in murine respiratory tularemia*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e59616.
131. Steichen, A.L., et al., *Alarmin function of galectin-9 in murine respiratory tularemia*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0123573.
132. Van Amersfoort, E.S., T.J. Van Berkel, and J. Kuiper, *Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock*. Clin Microbiol Rev, 2003. **16**(3): p. 379-414.
133. Glynn, A.R., et al., *Comparison of experimental respiratory tularemia in three nonhuman primate species*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2015. **39**: p. 13-24.

134. Kruger, P., et al., *Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury*. PLoS Pathog, 2015. **11**(3): p. e1004651.
135. Conlan, J.W., et al., *Different host defences are required to protect mice from primary systemic vs pulmonary infection with the facultative intracellular bacterial pathogen, Francisella tularensis LVS*. Microb Pathog, 2002. **32**(3): p. 127-34.
136. Sjostedt, A., J.W. Conlan, and R.J. North, *Neutrophils are critical for host defense against primary infection with the facultative intracellular bacterium Francisella tularensis in mice and participate in defense against reinfection*. Infect Immun, 1994. **62**(7): p. 2779-83.
137. Schwartz, J.T., et al., *Francisella tularensis inhibits the intrinsic and extrinsic pathways to delay constitutive apoptosis and prolong human neutrophil lifespan*. J Immunol, 2012. **188**(7): p. 3351-63.
138. Malik, M., et al., *Matrix metalloproteinase 9 activity enhances host susceptibility to pulmonary infection with type A and B strains of Francisella tularensis*. J Immunol, 2007. **178**(2): p. 1013-20.
139. *Global, regional, and national age–sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013*. The Lancet, 2015. **385**(9963): p. 117-171.
140. Aminov, R.I., *A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future*. Frontiers in Microbiology, 2010. **1**: p. 134.
141. WHO, *Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014*, 2014, World Health Organization: Geneva. p. 257.
142. Payne, D.J., et al., *Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(1): p. 29-40.
143. Tommasi, R., et al., *ESKAPEing the labyrinth of antibacterial discovery*. Nat Rev Drug Discov, 2015. **14**(8): p. 529-42.
144. Zumla, A., et al., *Host-directed therapies for infectious diseases: current status, recent progress, and future prospects*. Lancet Infect Dis, 2016. **16**(4): p. e47-63.
145. Muller-Redetzky, H., et al., *Therapeutic strategies in pneumonia: going beyond antibiotics*. Eur Respir Rev, 2015. **24**(137): p. 516-24.
146. Meijvis, S.C., et al., *Treatment with anti-inflammatory drugs in community-acquired pneumonia*. J Intern Med, 2012. **272**(1): p. 25-35.
147. Rhen, T. and J.A. Cidlowski, *Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs*. N Engl J Med, 2005. **353**(16): p. 1711-23.
148. Marik, P., et al., *Hydrocortisone and tumor necrosis factor in severe community-acquired pneumonia. A randomized controlled study*. Chest, 1993. **104**(2): p. 389-92.
149. Meijvis, S.C., et al., *Dexamethasone and length of hospital stay in patients with community-acquired pneumonia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. Lancet, 2011. **377**(9782): p. 2023-30.
150. Confalonieri, M., et al., *Hydrocortisone infusion for severe community-acquired pneumonia: a preliminary randomized study*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **171**(3): p. 242-8.
151. Istvan, E.S. and J. Deisenhofer, *Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase*. Science, 2001. **292**(5519): p. 1160-4.
152. Vaughan, C.J., M.B. Murphy, and B.M. Buckley, *Statins do more than just lower cholesterol*. Lancet, 1996. **348**(9034): p. 1079-82.

153. Blanco-Colio, L.M., et al., *Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of statins*. *Kidney Int*, 2003. **63**(1): p. 12-23.
154. Terblanche, M., et al., *Statins and sepsis: multiple modifications at multiple levels*. *Lancet Infect Dis*, 2007. **7**(5): p. 358-68.
155. Chalmers, J.D., et al., *Prior statin use is associated with improved outcomes in community-acquired pneumonia*. *Am J Med*, 2008. **121**(11): p. 1002-1007 e1.
156. Kanoh, S. and B.K. Rubin, *Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications*. *Clin Microbiol Rev*, 2010. **23**(3): p. 590-615.
157. Kovaleva, A., et al., *Immunomodulatory effects of macrolides during community-acquired pneumonia: a literature review*. *J Antimicrob Chemother*, 2012. **67**(3): p. 530-40.
158. Vane, J.R. and R.M. Botting, *Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. *Am J Med*, 1998. **104**(3A): p. 2S-8S; discussion 21S-22S.
159. Steinmeyer, J., *Pharmacological basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. *Arthritis Res*, 2000. **2**(5): p. 379-85.
160. Ulrich, C.M., J. Bigler, and J.D. Potter, *Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: promise, perils and pharmacogenetics*. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(2): p. 130-40.
161. Bernard, G.R., et al., *The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. The Ibuprofen in Sepsis Study Group*. *N Engl J Med*, 1997. **336**(13): p. 912-8.
162. Voiriot, G., et al., *Nonsteroidal antiinflammatory drugs may affect the presentation and course of community-acquired pneumonia*. *Chest*, 2011. **139**(2): p. 387-394.
163. Ferrer, M., et al., *Effect of acetylsalicylic acid on pulmonary gas exchange in patients with severe pneumonia: a pilot study*. *Chest*, 1997. **111**(4): p. 1094-100.
164. Vilaplana, C., et al., *Ibuprofen therapy resulted in significantly decreased tissue bacillary loads and increased survival in a new murine experimental model of active tuberculosis*. *J Infect Dis*, 2013. **208**(2): p. 199-202.
165. Kroesen, V.M., et al., *Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs As Host-Directed Therapy for Tuberculosis: A Systematic Review*. *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 772.
166. Nigou, J., et al., *Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor*. *J Immunol*, 2001. **166**(12): p. 7477-85.
167. Pitarque, S., et al., *The immunomodulatory lipoglycans, lipoarabinomannan and lipomannan, are exposed at the mycobacterial cell surface*. *Tuberculosis (Edinb)*, 2008. **88**(6): p. 560-5.
168. Geijtenbeek, T.B., et al., *Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function*. *Journal of Experimental Medicine*, 2003. **197**(1): p. 7-17.
169. Blattes, E., et al., *Mannodendrimers prevent acute lung inflammation by inhibiting neutrophil recruitment*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(22): p. 8795-800.
170. Nigou, J., M. Gilleron, and G. Puzo, *Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis*. *Biochimie*, 2003. **85**(1-2): p. 153-66.
171. Riviere, M., et al., *Highly ordered supra-molecular organization of the mycobacterial lipoarabinomannans in solution. Evidence of a relationship between supra-molecular organization and biological activity*. *J Mol Biol*, 2004. **344**(4): p. 907-18.
172. van Kooyk, Y. and T.B. Geijtenbeek, *DC-SIGN: escape mechanism for pathogens*. *Nature Reviews Immunology*, 2003. **3**(9): p. 697-709.

173. Feinberg, H., et al., *Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR*. Science, 2001. **294**(5549): p. 2163-6.
174. Feinberg, H., et al., *Extended neck regions stabilize tetramers of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR*. J Biol Chem, 2005. **280**(2): p. 1327-35.
175. Blattes, E., et al., *Molecular basis of Mycobacterium tuberculosis recognition by the C-type lectin DC-SIGN: from the modulation of innate immune response to the design of innovative anti-inflammatory drugs*, in *Carbohydrates in drug design and discovery*, J. Jiménez-Barbero, F.J. Cañada, and S. Martin-Santamaria, Editors. 2015, The Royal Society of Chemistry: Cambridge. p. 64-88.
176. Tailleux, L., et al., *DC-SIGN induction in alveolar macrophages defines privileged target host cells for mycobacteria in patients with tuberculosis*. PLoS Med, 2005. **2**(12): p. e381.
177. Geijtenbeek, T.B., et al., *DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells*. Cell, 2000. **100**(5): p. 587-97.
178. Van Breedam, W., et al., *Bitter-sweet symphony: glycan-lectin interactions in virus biology*. FEMS Microbiol Rev, 2014. **38**(4): p. 598-632.
179. Tailleux, L., et al., *DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells*. Journal of Experimental Medicine, 2003. **197**(1): p. 121-7.
180. Gringhuis, S.I., et al., *C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB*. Immunity, 2007. **26**(5): p. 605-16.
181. Park, C.G., et al., *Five mouse homologues of the human dendritic cell C-type lectin, DC-SIGN*. Int Immunol, 2001. **13**(10): p. 1283-90.
182. Powlesland, A.S., et al., *Widely divergent biochemical properties of the complete set of mouse DC-SIGN-related proteins*. J Biol Chem, 2006. **281**(29): p. 20440-9.
183. Tanne, A., et al., *A murine DC-SIGN homologue contributes to early host defense against Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Experimental Medicine, 2009. **206**(10): p. 2205-20.
184. Ohtani, M., et al., *Involvement of suppressor of cytokine signalling-1-mediated degradation of MyD88-adaptor-like protein in the suppression of Toll-like receptor 2-mediated signalling by the murine C-type lectin SIGNR1-mediated signalling*. Cell Microbiol, 2012. **14**(1): p. 40-57.
185. Pammit, M.A., et al., *Intranasal interleukin-12 treatment promotes antimicrobial clearance and survival in pulmonary Francisella tularensis subsp. novicida infection*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(12): p. 4513-9.
186. Pyles, R.B., G.E. Jezek, and T.D. Eaves-Pyles, *Toll-like receptor 3 agonist protection against experimental Francisella tularensis respiratory tract infection*. Infect Immun, 2010. **78**(4): p. 1700-10.
187. Lembo, A., et al., *Administration of a synthetic TLR4 agonist protects mice from pneumonic tularemia*. J Immunol, 2008. **180**(11): p. 7574-81.
188. Ireland, R., et al., *Effective, broad spectrum control of virulent bacterial infections using cationic DNA liposome complexes combined with bacterial antigens*. PLoS Pathog, 2010. **6**(5): p. e1000921.
189. Skyberg, J.A., et al., *Nasal Acai polysaccharides potentiate innate immunity to protect against pulmonary Francisella tularensis and Burkholderia pseudomallei infections*. PLoS Pathog, 2012. **8**(3): p. e1002587.

190. D'Elia, R.V., et al., *Targeting the "Rising DAMP" during a Francisella tularensis Infection*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(9): p. 4222-4228.
191. Zhang, P., J. Katz, and S.M. Michalek, *Glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) inhibition suppresses the inflammatory response to Francisella infection and protects against tularemia in mice*. Mol Immunol, 2009. **46**(4): p. 677-87.
192. Ramond, E., et al., *Glutamate Utilization Couples Oxidative Stress Defense and the Tricarboxylic Acid Cycle in Francisella Phagosomal Escape*. PLoS Pathog, 2014. **10**(1).
193. Dai, S., et al., *Fine tuning inflammation at the front door: macrophage complement receptor 3-mediates phagocytosis and immune suppression for Francisella tularensis*. PLoS Pathog, 2013. **9**(1): p. e1003114.
194. Butchar, J.P., et al., *Microarray analysis of human monocytes infected with Francisella tularensis identifies new targets of host response subversion*. PLoS One, 2008. **3**(8): p. e2924.
195. Cremer, T.J., et al., *MiR-155 induction by F. novicida but not the virulent F. tularensis results in SHIP down-regulation and enhanced pro-inflammatory cytokine response*. PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8508.
196. Li, H., et al., *Innate immune response to Francisella tularensis is mediated by TLR2 and caspase-1 activation*. J Leukoc Biol, 2006. **80**(4): p. 766-73.
197. Frison, N., et al., *Oligolysine-based oligosaccharide clusters: selective recognition and endocytosis by the mannose receptor and dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin*. J Biol Chem, 2003. **278**(26): p. 23922-9.
198. Hovius, J.W., et al., *Salp15 binding to DC-SIGN inhibits cytokine expression by impairing both nucleosome remodeling and mRNA stabilization*. PLoS Pathog, 2008. **4**(2): p. e31.
199. Srivastava, V., et al., *Toll-like receptor 2 and DC-SIGNR1 differentially regulate suppressors of cytokine signaling 1 in dendritic cells during Mycobacterium tuberculosis infection*. J Biol Chem, 2009. **284**(38): p. 25532-41.
200. Underhill, D.M., *Macrophage recognition of zymosan particles*. J Endotoxin Res, 2003. **9**(3): p. 176-80.
201. Geijtenbeek, T.B.H., et al., *Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses*. Cell, 2000. **100**(5): p. 575-585.
202. Ben Nasr, A., et al., *Critical role for serum opsonins and complement receptors CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) in phagocytosis of Francisella tularensis by human dendritic cells (DC): uptake of Francisella leads to activation of immature DC and intracellular survival of the bacteria*. J Leukoc Biol, 2006. **80**(4): p. 774-86.
203. Soilleux, E.J., et al., *Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro*. J Leukoc Biol, 2002. **71**(3): p. 445-57.
204. Geijtenbeek, T.B., et al., *Marginal zone macrophages express a murine homologue of DC-SIGN that captures blood-borne antigens in vivo*. Blood, 2002. **100**(8): p. 2908-16.
205. Trammell, R.A. and L.A. Toth, *Markers for predicting death as an outcome for mice used in infectious disease research*. Comp Med, 2011. **61**(6): p. 492-8.
206. Lauriano, C.M., et al., *MglA regulates transcription of virulence factors necessary for Francisella tularensis intraamoebae and intramacrophage survival*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(12): p. 4246-9.
207. Bachmanov, A.A., et al., *Food intake, water intake, and drinking spout side preference of 28 mouse strains*. Behav Genet, 2002. **32**(6): p. 435-43.

208. Steward, J., et al., *Comparison of gatifloxacin, moxifloxacin and ciprofloxacin for treatment of experimental Burkholderia pseudomallei infection*. J Antimicrob Chemother, 2005. **55**(4): p. 523-7.
209. Sutherland, M.D., et al., *Post-exposure immunization against Francisella tularensis membrane proteins augments protective efficacy of gentamicin in a mouse model of pneumonic tularemia*. Vaccine, 2012. **30**(33): p. 4977-82.
210. Mares, C.A., et al., *Attenuated response of aged mice to respiratory Francisella novicida is characterized by reduced cell death and absence of subsequent hypercytokinemia*. PLoS One, 2010. **5**(11): p. e14088.
211. Fritz, D.L., et al., *Mouse models of aerosol-acquired tularemia caused by Francisella tularensis types A and B*. Comp Med, 2014. **64**(5): p. 341-50.
212. Kawauchi, Y., et al., *SIGNR1-mediated phagocytosis, but not SIGNR1-mediated endocytosis or cell adhesion, suppresses LPS-induced secretion of IL-6 from murine macrophages*. Cytokine, 2015. **71**(1): p. 45-53.
213. Kannan, R.M., et al., *Emerging concepts in dendrimer-based nanomedicine: from design principles to clinical applications*. J Intern Med, 2014. **276**(6): p. 579-617.
214. Raetz, C.R. and C. Whitfield, *Lipopolysaccharide endotoxins*. Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 635-700.
215. Kang, J.Y. and J.O. Lee, *Structural biology of the Toll-like receptor family*. Annu Rev Biochem, 2011. **80**: p. 917-41.
216. Wang, X., et al., *Structure and biosynthesis of free lipid A molecules that replace lipopolysaccharide in Francisella tularensis subsp. novicida*. Biochemistry, 2006. **45**(48): p. 14427-40.
217. Phillips, N.J., et al., *Novel modification of lipid A of Francisella tularensis*. Infect Immun, 2004. **72**(9): p. 5340-8.
218. Matsuura, M., *Structural modifications of bacterial lipopolysaccharide that facilitate Gram-negative bacteria evasion of host innate immunity*. Front Immunol, 2013. **4**.
219. Li, Y., et al., *LPS remodeling is an evolved survival strategy for bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(22): p. 8716-21.
220. Shaffer, S.A., et al., *Structural heterogeneity and environmentally regulated remodeling of Francisella tularensis subspecies novicida lipid A characterized by tandem mass spectrometry*. J Am Soc Mass Spectrom, 2007. **18**(6): p. 1080-92.
221. Scott, A.J., et al., *Norharmane Matrix Enhances Detection of Endotoxin by MALDI-MS for Simultaneous Profiling of Pathogen, Host, and Vector Systems*. Pathog Dis, 2016.
222. Neyrolles, O., et al., *Mycobacteria, metals, and the macrophage*. Immunol Rev, 2015. **264**(1): p. 249-63.
223. Di Russo Case, E. and J.E. Samuel, *Contrasting Lifestyles Within the Host Cell*. Microbiol Spectr, 2016. **4**(1).