



HAL
open science

L'immunité entraînée contre *S. aureus* induite par des bactéries probiotiques lactiques dans les cellules monocytiques THP-1

Kratchkovsky Tonin

► **To cite this version:**

Kratchkovsky Tonin. L'immunité entraînée contre *S. aureus* induite par des bactéries probiotiques lactiques dans les cellules monocytiques THP-1. *Microbiologie et Parasitologie*. 2024. hal-04615133

HAL Id: hal-04615133

<https://hal.inrae.fr/hal-04615133>

Submitted on 18 Jun 2024

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License



UNIVERSITE DE RENNES
(U.F.R. Sciences de la Vie et de l'Environnement)



UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE
(U.F.R. des Sciences)

Master Sciences, Technologie, Santé : mention MICROBIOLOGIE
Parcours : Microbiologie Fondamentale et Appliquée – MFA

2023-2024

L'immunité entraînée contre *S. aureus* induite par des bactéries probiotiques lactiques dans les cellules monocytiques THP-1

Mémoire de Master 2 présenté le 25 Juin 2024

Par

Tonin Kratchkovsky

**Stage effectué au laboratoire des Sciences et Technologie du Lait et de l'œuf (STLO)
UMR 1253 INRAE, Rennes**



Remerciements

Je tiens à remercier les présidents du centre INRAE Bretagne-Normandie, Mme Hélène LUCAS et Mr Florent GUHL, de même que le directeur de l'UMR STLO, Mr Yves LE LOIR ainsi que le chef de l'équipe Microbio, Mr Éric GUEDON pour m'avoir accueilli dans ce laboratoire afin de réaliser ce stage.

Je souhaite aussi remercier mon encadrante, Mme Nadejda BERKOVA et mon co-encadrant Mr Gwénaél JAN pour m'avoir guidé et conseillé avec beaucoup de patience et de bienveillance tout en me transmettant une partie de leur expérience. Leur présence m'a permis de murir et d'apprendre beaucoup durant ce stage.

Je remercie aussi Sandrine PERON qui m'a offert de son temps pour m'apprendre le fonctionnement du laboratoire et me corriger durant mes manipulations. Merci également à Nathalie DANIEL, Lucie RAULT, Julia PAPAIL pour m'avoir présenté les laboratoires P2 et pour avoir répondu à mes questions avec gentillesse.

Merci évidemment à toute les membres de l'équipe MICROBIO pour leur accueil chaleureux et pour avoir été prêt à m'aider en cas de besoin. Vous m'avez permis de travailler dans un environnement vraiment convivial et rassurant.

Je voudrais aussi remercier mes professeurs de l'université de Rennes 1 pour leur enseignements et efforts qu'ils m'ont fourni durant mes années d'études ici.

Je remercie également mes proches et ma famille pour leurs soutiens moral et physique qui m'ont permis de garder la forme et d'arriver jusqu'ici.

Ce stage a été réalisé dans le cadre de la 2^e année du Master Microbiologie Fondamentale et Appliquée en collaboration avec l'Université de Bretagne Occidentale durant l'année universitaire 2023-2024. Le projet vise à développer un modèle de mémoire de l'immunité innée avec les cellules monocytiques THP-1 contre *Staphylococcus aureus* et à tester si des souches bactériennes probiotiques peuvent induire cette mémoire dans le contexte d'une infection. Le stage a été réalisé par Tonin KRATCHKOVSKY et est encadré par Madame Nadejda BERKOVA et co-encadré par Monsieur Gwénaél JAN. Il se déroule dans le laboratoire de l'UMR 1253 STLO, « Science et Technologie du Lait et de l'œuf », INRAE, l'institut Agro, Agrocampus Ouest, 65 Rue de Saint-Brieuc, 35000, du 4 Janvier 2024 au 8 Juillet 2024.

Je soussigné Tonin Kratchkovsky assure avoir pris connaissance de la charte anti plagiat de l'Université de Rennes.

Je déclare être pleinement conscient que le plagiat total ou partiel de documents publiés sous différentes formes, y compris sur internet, constitue une violation des droits d'auteurs ainsi qu'une fraude caractérisée.

Je m'engage à citer toutes les sources utilisées pour rédiger ce travail.

T.K.

Sommaire

Introduction.....	1
I. <i>Staphylococcus aureus</i>	1
II. Les deux faces de l'immunité : innée et adaptative.....	3
III. L'immunité entraînée.....	5
IV. Les probiotiques.....	8
V. Hypothèse.....	9
VI. Objectif et stratégie.....	10
Matériel et méthode.....	12
I. Conditions de culture des cellules monocytes THP-1.....	12
II. Conditions de culture des souches bactériennes.....	12
III. Cinétique de croissance.....	13
IV. Dénombrement bactérien par micro-méthode.....	13
V. Différenciation des cellules THP-1.....	14
VI. Comptage cellulaire.....	15
VII. Interaction entre cellules différenciées et surnageant de <i>S. aureus USA300</i>	16
VIII. Mesure de la sécrétion d'IL-6 par ELISA.....	17
IX. Induction de l'immunité entraînée chez les cellules THP-1.....	18
X. Analyse statistique.....	20
Résultats et discussion.....	21
I. Optimisation des conditions de culture des cellules THP-1 différenciées.....	21
II. Détermination des paramètres de croissance de <i>L. lactis MG1363</i>	24
III. Mise au point du modèle d'interaction entre cellules différenciées et surnageant de <i>S. aureus USA300</i>	25
IV. Induction par le probiotique <i>L. lactis MG1363</i> de l'immunité entraînée de cellules THP-1d contre le surnageant de <i>S. aureus USA30</i>	27
Conclusion et perspectives.....	30
Bibliographie.....	32
Résumés.....	38

Liste des Figures

Figure 1. Illustration des différentes pathologies engendrées par <i>S. aureus</i> chez l'humain et les ruminants.....	1
Figure 2. Schéma récapitulatif de l'évasion du système immunitaire par <i>S. aureus</i>	3
Figure 3. Mise en place de l'immunité entraînée (A) et de la tolérance (B).....	6
Figure 4. Lien entre épigénétique et métabolisme dans le cadre l'immunité entraînée.....	7
Figure 5. Effet potentiel d'un probiotique sur une cellule immunitaire dans le cadre de l'immunité entraînée contre une infection par <i>S. aureus</i>	10
Figure 6. Schéma d'un suivi de croissance bactérienne à partir d'une préculture de nuit.....	13
Figure 7. Schéma du dénombrement d'une culture bactérienne par micro-méthode.....	14
Figure 8. Schéma de la différenciation des cellules THP-1.....	15
Figure 9. Evaluation de la cytotoxicité du surnageant de <i>S. aureus</i> USA300 sur des cellules THP-1 différenciées.....	16
Figure 10. Schéma du principe de l'ELISA pour IL-6 humain (Thermo Fisher Scientific)....	17
Figure 11. Déroulement d'une expérience d'induction de l'immunité entraînée.....	18
Figure 12. Induction de l'immunité entraînée chez les THP-1 par <i>L. lactis</i> MG1363.....	19
Figure 13. Images de cellules THP-1 en milieu DMEMis-c prise (A) avant, (B) pendant et (C) après différenciation avec 100 nM de PMA (microscopie Optique, microscope inversé).....	22
Figure 14. L'adhésion des cellules THP-1, après traitement par PMA, varie selon les concentrations utilisées (milieu DMEM).....	23
Figure 15. Cinétiques de croissance de <i>L. lactis</i> MG1363.....	24
Figure 16. Production d'IL-6 par les cellules THP-1d en fonction de la dilution du surnageant de <i>S. aureus</i> USA 3000.....	25
Figure 17. Production d'IL-6 et taux de mortalité des cellules THP-1 en fonction de la dilution du surnageant de <i>S. aureus</i> USA 300 et du temps d'exposition	26
Figure 18. Production d'IL-8 et mortalité des THP-1d en fonction du temps de contact et de la concentration en SSA et bactérie	29

Liste d'abréviations :

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AMP : Antimicrobial peptide (peptide anti-microbien).

CIRM-BIA : Centre internationale des ressources microbiologiques pour bactéries à intérêt alimentaire.

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité.

CMP : Common myeloïd progenitor.

CPA : Cellule présentatrice d'antigène.

DMEM : Dulbecco modified Eagle medium (milieu).

DMEMis : DMEM Iscove (milieu).

DMEMis-c : DMEM Iscove + 10% FBS + 1% P/S.

DMEMis-gen100 (ou -gen25) : DMEM Iscove + 10% FBS +100 (ou 25) µg/mL gentamicine.

ELISA : Enzyme linked immunosorbent assay.

FBS : Fœtale bovin serum.

GRAS : Generally recognized as safe.

HAT : Histone acétyltransférase.

IL-6(ou IL-8) : Interleukine 6 (ou Interleukine 8).

L. lactis : *Lactococcus lactis*.

LPS : Lipopolysaccharides.

MAMP : Microbe associated molecular patern

MDP : Muramyldipeptide.

MOI : Multiplicity of infection.

MRSA : Methicillin-resistant *S. aureus*.

NLR : NOD-like receptor.

ORF : Open reading frame (Cadre de lecture ouvert).

PAMP : Pathogen associated molecular patern.

PMA : Phorbol 12-myristate-13-acetate.

P/S : Pénicilline / Streptomycine.

PRR : Patern recognition receptor.

ROS : Reactive oxygen species.

RPMI : Roswell Park Memorial Institute (milieu).

RPMI-c : RPMI + 10% FBS + 1% P/S

S. aureus : *Staphylococcus aureus*.

SSA : Surnageant de *S. aureus* USA300.

SFP : Staphylococcal food poisoning.

THP-1 : Tohoku Hospital Pediatrics-1.

THP-1d : THP-1 différenciés (macrophage-like).

TLR : Toll-like receptor.

Introduction :

I – *Staphylococcus aureus* :

La bactérie Gram + *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) est un pathogène opportuniste chez les humains et les animaux, présent chez 30 % de la population humaine (Tong *et al.*, 2015).

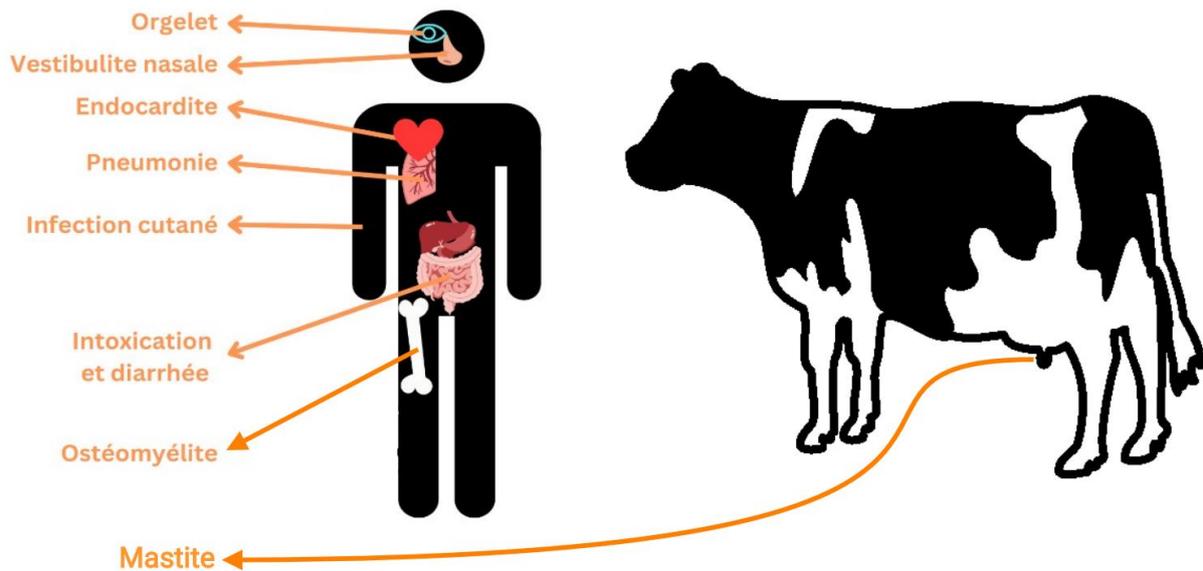


Figure 1. Illustration des différentes pathologies engendrées par *S. aureus* chez l'humain et les ruminants.

S. aureus est impliquée dans de nombreuses pathologies (Figure 1) plus ou moins sévères comme les infections pleuropulmonaires, cardiovasculaires et également de nombreuses bactériémies nosocomiales (Cheung *et al.*, 2021). Les infections humaines bénignes, souvent cutanées, représentent un nombre de cas difficilement déterminable mondialement. Mais *S. aureus* est aussi la principale responsable des endocardites infectieuses et ostéomyélites chez l'homme (Fowler *et al.*, 2005; Cahill *et al.*, 2017). Ces infections sont souvent contractées à cause de matériels médicaux contaminés (Masters *et al.*, 2022). Ces pathologies présentent des millions de cas chaque années (Tong *et al.*, 2015). Les ostéomyélites sont notamment de graves inflammations des os qui peuvent être causées par des bactéries pathogènes ayant infecté le squelette (ostéomyélites hématogènes), et donc souvent liées à des interventions chirurgicales et aux installations de prothèses (Urish and Cassat, 2020). Les ostéomyélites sont souvent associées avec des infections nosocomiales et des souche de *S. aureus* multi-résistantes à divers antibiotiques (MRSA) (Pimentel de Araujo *et al.*, 2021). Les infections nosocomiales impliquant *S. aureus* sont donc difficiles à traiter et peuvent devenir chroniques (Fisher and

Mobashery, 2021) (Tong *et al.*, 2015; Turner *et al.*, 2019). Il est important de noter que le nombre d'infections liées à l'installation de prothèses (et autres interventions médicales) augmente et que ces infections sont potentiellement létales pour les patients, surtout si immunodéprimés.

S. aureus est aussi une des causes majeures d'infections chroniques des mamelles chez les ruminants (mammites), qui posent de graves problèmes au bien-être des animaux, en plus des importantes pertes économiques et des problématiques sanitaires (Campos *et al.*, 2022). Certaines souches de *S. aureus* sont particulièrement néfastes pour les troupeaux bovins, comme les vaches laitières, en cas de mammite (Graber and Bodmer, 2019), à cause des coûts pour traiter le bétail et les pertes de lait. Les toxines extracellulaires produites par *S. aureus* durant ces infections, comme des hémolysines et des leukocidines, entre autres, donnent des lésions cutanées à l'animal et, si consommées par des humains, peuvent provoquer un empoisonnement alimentaire par Staphylocoque (*Staphylococcal food poisoning*, SFP) (G Abril *et al.*, 2020).

S. aureus est connue depuis longtemps et ses mécanismes de virulence ont bien été étudiés. Parmi ces nombreux facteurs de virulence, la plupart sont orientés autour de l'évasion du système immunitaire, en particulier la réponse innée, comme présenté en Figure 2. La bactérie est capable de limiter l'extravasation des neutrophiles au niveau des vaisseaux sanguins, se protège de la phagocytose en formant des abcès ou des biofilms, inhibe la réponse antibactérienne du complément et des cellules immunitaires via divers mécanismes. Par exemple, la staphyloxanthin protège la bactérie des espèces réactives à l'oxygène (ROS), certaines protéases diminuent l'effet des peptide anti-microbiens (AMPs) et l'aureolysine inhibe la phagocytose et le complément (Cheung *et al.*, 2021; Masters *et al.*, 2022). Ces facteurs sont essentiels dans le cadre des infections systémiques de *S. aureus*. Ces infections permettent à *S. aureus* d'attaquer différents organes (os, poumons, intestins ou cœur) et de persister dans la circulation sanguine. Ce sont la plasticité génétique de *S. aureus* et ses nombreux changements génétiques intervenant lors de son passage de bactérie commensale à pathogène invasif qui permettent de comprendre sa grande capacité d'adaptation qui la rend si difficile à traiter (Howden *et al.*, 2023).

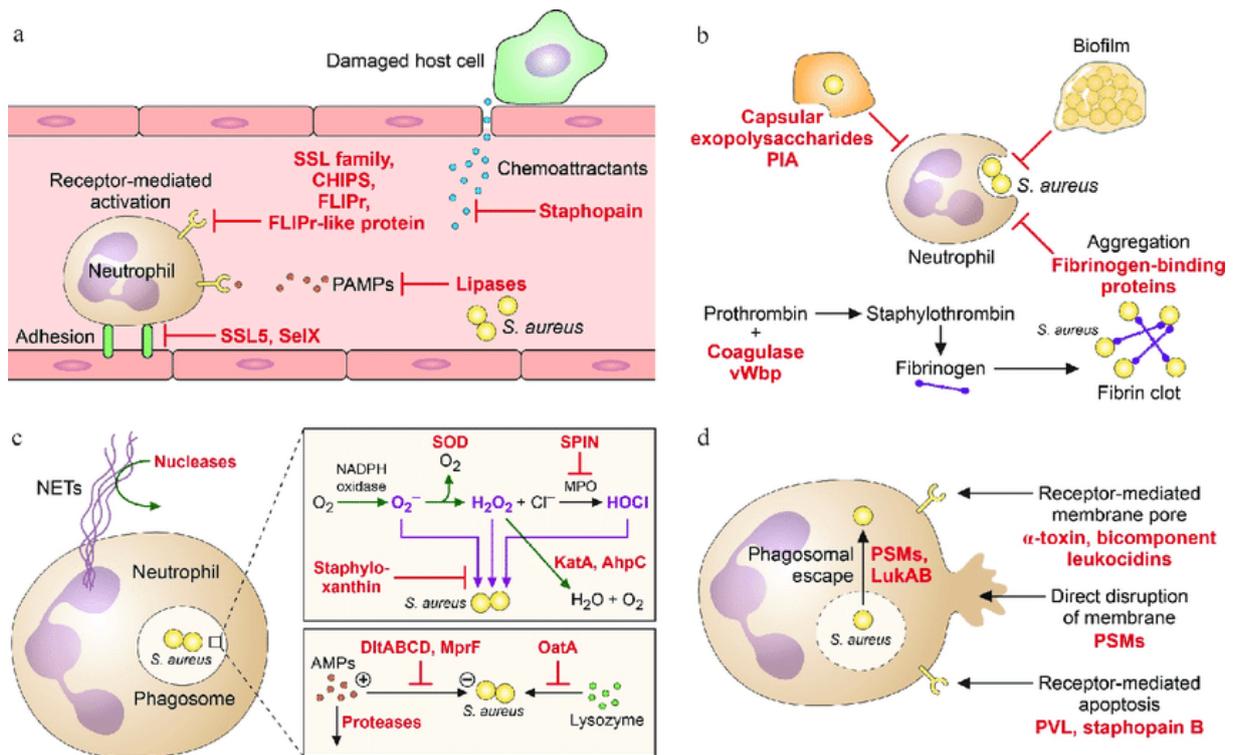


Figure 2. Schéma récapitulatif de l'évasion du système immunitaire par *S. aureus*. (De Cheung, Gordon & Bae, Justin & Otto, Michael. (2021). Virulence. 12.)

S. aureus évite d'être éliminée par les mécanismes de défense de l'hôte (surtout de l'immunité innée) en les inhibant à différents niveaux. Elle utilise l'inhibition de la reconnaissance/opsonisation immunitaire (A), la production de matrice/l'agrégation (B), la résistance aux mécanismes bactéricides de la phagocytose (C) et l'élimination directe de phagocytes et autres cellules immunitaires (D).

II – Les deux faces de l'immunité : innée et adaptative :

Traditionnellement, l'immunité est divisée en deux types de défense : L'immunité innée et l'adaptative.

L'immunité innée est une réponse non-spécifique et immédiate constituant la première ligne de défense contre divers agents pathogènes comme les bactéries, virus et parasites. Elle fait intervenir principalement des cellules immunitaires de la lignée myéloïde, comme les monocytes, neutrophiles ou macrophages (Rosowski, 2020; Rasmussen and Hawkins, 2022; Luo *et al.*, 2022). Cette lignée cellulaire provient de cellules progénitrices pluripotentes communes (CMP, common myeloïde progenitor) situées dans la moelle osseuse (Mitroulis *et al.*, 2018). Ces cellules immunitaires ont de nombreux rôles, mais sont similaires dans la non-spécificité de leurs attaques et leur capacité de tolérance pour les micro-organismes commensaux (Adams *et al.*, 2020). Parmi ces cellules on trouve les macrophages. On peut différencier les macrophages en deux sous-populations, avec des rôles différents dans la

réponse immunitaire et l'homéostasie des tissus : les M1 et les M2. Les M1 sont pro-inflammatoires et microbicides et les M2 sont moins microbicides et régulent la réponse immunitaire (Mege and Capo, 2010; Atri *et al.*, 2018). Les macrophages de type M1/M2 sont capables de reconnaître un organisme intrusif comme une bactérie portant des peptides du non-soi, d'une cellule du soi portant des complexes majeures d'histocompatibilité I (CMH I) (Yunna *et al.*, 2020) (Kadomoto *et al.*, 2021). Les macrophages sont spécialisés dans la phagocytose et expriment beaucoup de CMH II, ce qui leur permet de présenter à leur surface des peptides provenant de pathogènes phagocytés. Ils remplissent alors le rôle de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) pour activer les lymphocytes T CD4⁺ naïfs, ce qui permet de mettre en place la réponse adaptative (Ogino and Takeda, 2023). Ils produisent aussi des cytokines permettant le recrutement de plus de cellule (neutrophiles, monocytes, basophiles) sur le site d'une infection/inflammation, notamment par chimiotactisme et jouent un rôle important dans la restauration de l'homéostasie après une infection (Atri *et al.*, 2018).

Il y a également des éléments moléculaires intervenant, comme le complément (Baines and Brodsky, 2017). Le complément est un ensemble de protéines solubles présentes dans le milieu extracellulaire du système sanguin (C1 à C9) dont les activités dépendent de multiples cascades de régulations : une antigène-anticorps dépendante, une lectine dépendante et d'autres voies alternatives. Le système du complément lie la réponse innée et la réponse adaptative, ses fonctions physiologiques sont variées et évidemment très strictement régulées (Merle *et al.*, 2015a) (Merle *et al.*, 2015b). Les rôles de cette réponse sont d'éliminer les menaces potentiellement pathogènes avant qu'elles ne déclenchent une pathologie, de participer à maintenir les différents microbiotes dans un état sain et surtout d'initier la mise en place de la réponse adaptative en cas d'infection plus ou moins sévère mais qui perdure dans le temps (Merle *et al.*, 2015b; Atri *et al.*, 2018; Ogino and Takeda, 2023).

L'immunité adaptative est une réponse tardive et antigène-spécifique, à la présentation de molécules antigéniques par une CPA aux cellules impliquées et à la stimulation par des cytokines permettant la différenciation, l'activation et la prolifération de cellules immunitaires durant une longue période. Les cellules les plus impliqués dans cette réponse sont celles de la lignée lymphoïde, une autre lignée cellulaires dont les cellules progénitrices pluripotentes se situent dans la moelle osseuse (Chapman and Zhang, 2024). Tous les lymphocytes sont des cellules ayant subis une maturation résultant en de nombreux changements génétiques, mais qui restent inactives tant qu'un antigène ne leur a pas été présenté par une CPA (cellules

dendritiques ou macrophages) (Ogino and Takeda, 2023). La spécificité de la réponse adaptative est sa force et sa faiblesse, car les mécanismes régulant son activation sont indispensables pour éviter les pathologies auto-immunes et sont partiellement responsables du délais de la réponse (Dikiy and Rudensky, 2023). Mais l'immunité adaptative possède également une forme de mémoire. En effet, cette mémoire existe sous la forme de lymphocytes T CD4 mémoire : des cellules immunitaires capables de survivre beaucoup plus longtemps que les autres et d'activer très efficacement certaines lignées cellulaires en fonction d'un antigène auquel elles ont été exposées. Et toutes ces cellules immunitaires activées produisent des cytokines et chimiokines régulant la prolifération cellulaire et leurs activités anti-pathogènes (Bonilla and Oettgen, 2010).

III – L'immunité entraînée :

Les invertébrés n'ont pas d'immunité adaptative, seulement une immunité innée (Torre *et al.*, 2017) et ne devraient donc pas avoir de mémoire immunitaire. Or, depuis au moins 1980, il a été montré que la réponse innée de ces organismes présente une forme de mémoire (Torre *et al.*, 2017). La Figure 3 montre que la réponse immunitaire peut être modulée lors du contact avec des antigènes précédé d'un autre contact avec un antigène, généralement indépendant (Ochando *et al.*, 2023). Cette réponse est appelée « immunité entraînée ». Il a été démontré que les cellules « entraînées » montrent une activité pro-inflammatoire accrue, comme une plus forte production de cytokines pro-inflammatoire IL-6 ou d'IFN- α (Adams *et al.*, 2020). On a aussi déterminé que cette mémoire est très dépendante de la concentration en antigène dans certains cas. Les LPS, par exemple, sont tolérogènes à des concentrations supérieures ou égales à 10 ng/mL mais induisent un entraînement à des concentrations inférieures (van Dijk *et al.*, 2022). Cette mémoire a bien été retrouvée *in vitro* chez des cellules humaines mais le fonctionnement n'a pas encore été bien compris et exploré. Cependant, on connaît les mécanismes permettant aux cellules immunitaires de reconnaître et de réagir à la présence d'antigènes. Les récepteurs responsables de la reconnaissance des motifs moléculaires microbiens (PRRs) sont des récepteurs cellulaires, présents dans la membrane, l'endosome, le lysosome et le cytosol des cellules. Ils sont capables de reconnaître et de lier des molécules étrangères à l'organisme. Ils peuvent alors réguler l'expression de gènes liés à la réponses immunitaire ainsi que certaines voies métaboliques (Takeuchi and Akira, 2010). Il existe plusieurs catégories de PRRs, comme les Toll-like receptors (TLRs) ou les NOD-like receptors (NLRs), qui jouent

différents rôles dans l'expression de gènes. Les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs), sont des molécules, provenant de pathogènes, reconnues par le système immunitaire. On peut aussi parler de motifs moléculaires associés aux microbes (MAMPs) dans le cadre de bactéries, car elles ne sont pas forcément pathogènes. Parmi les PAMPs les plus étudiés dans le cadre de l'immunité entraînée, on trouve le β -glucane et le muramyl-dipeptide (MDP) (Quintin *et al.*, 2012; Ifrim *et al.*, 2014). Le premier est une molécule provenant de la paroi d'espèce fongiques, mais qu'on peut retrouver dans d'autres organismes (levure, bactérie, archées). Le MDP est un des constituants du peptidoglycane de la paroi bactérienne. C'est l'interaction entre des MAMPs et des PRRs qui induit l'entraînement de l'immunité (Sánchez-Ramón *et al.*, 2018).

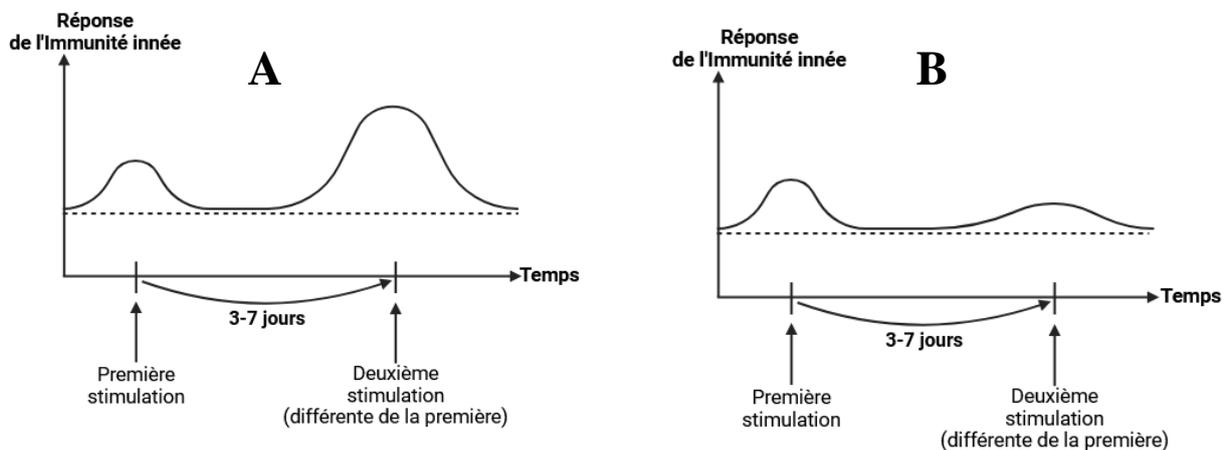


Figure 3. Mise en place de l'immunité entraînée (A) et de la tolérance (B).

La réponse immunitaire innée peut être mesurée par la production de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-6 ou l'IL-8.

L'immunité entraînée est caractérisée par une réponse accrue d'un organisme exposé à un inducteur en cas de contact ultérieur avec un stimulus indépendant, associée à des modifications épigénétiques de nombreux gènes liés à l'activité immunitaire des cellules et à une reprogrammation métabolique (Ochando *et al.*, 2023). Les modifications épigénétiques des cellules peuvent être la déméthylation de l'ADN et les modifications des histones, ce qui change la conformation de la chromatine et l'accessibilité des gènes. Par exemple, certaines études montrent qu'il y a un rôle important d'une certaine famille d'enzymes faisant partie des histones acétyltransférase (HAT) dans l'entraînement des cellules immunitaire (Saeed *et al.*, 2014; van der Heijden *et al.*, 2018; Van Dijk *et al.*, 2022).

La reprogrammation métabolique augmente la production des substrats et de l'énergie nécessaires pour l'expression plus importante des gènes liés à la réponse immune et peut perdurer de quelques jours à plusieurs mois (ter Steeg *et al.*, 2021; Jentho *et al.*, 2021). Elle consiste en une augmentation de la production d'énergie, avec la glycolyse aérobie, et l'augmentation de l'activité des voies métaboliques comme celle du cholestérol et la synthèse d'acides gras (ter Steeg *et al.*, 2021). Cette reprogrammation influence aussi les mécanismes épigénétiques (Figure 4). Par exemple, l'acétylation des histones dépendante de la disponibilité de substrats, comme l'acétyl-Co-enzyme A, pour une enzyme histone acétyltransférase : moins ces substrats sont utilisés par d'autres voies et plus ils sont produits par d'autres, plus les histones sont acétylées (ter Steeg *et al.*, 2021). L'acétylation des histones diminue leur charge positive, ce qui diminue leur affinité avec l'ADN et qui permet de libérer certains cadres de lecture (ORFs) pour la transcription.

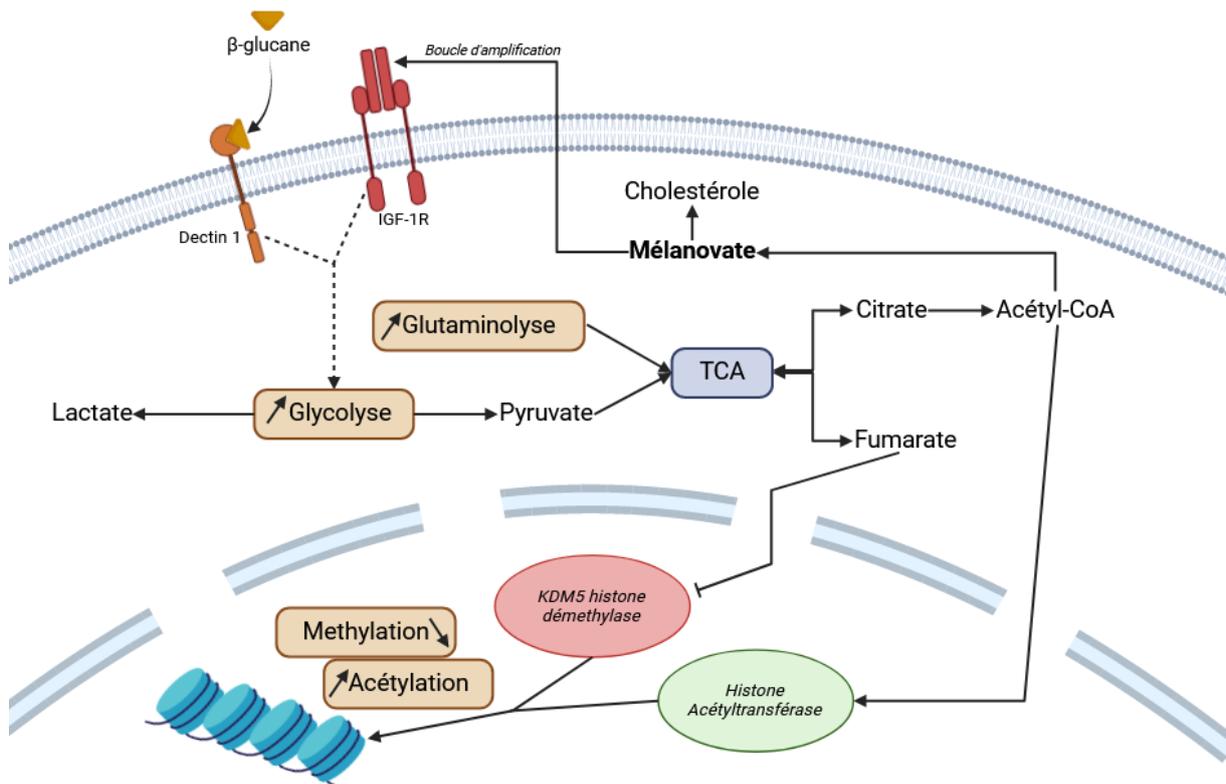


Figure 4. Lien entre épigénétique et métabolisme dans le cadre l'immunité entraînée.
(Modifié à partir de Ter Steeg L et al., 2021, Clin Microbiol, Rev 34)

Impacte de l'activation du PRR Dectin 1 par son agoniste le β -glucane sur le métabolisme des monocytes. Quelques interactions entre les changements métaboliques et les modifications épigénétiques opérant dans les cellules sont montrées. Les pointillés indiquent une cascade d'activation qui n'apparaît pas pour simplifier la lecture.

Des modèles *in vivo* ont permis de montrer que l'immunité entraînée peut perdurer jusqu'à plusieurs mois après infection. La persistance de cette mémoire pourrait être expliquée par

l'entraînement des cellules progénitrices hématopoïétiques, ou de cellules non-immunitaires (épithéliales par exemple), et la transmission des modifications épigénétiques aux cellules filles (Vinci *et al.*, 2024; Cao *et al.*, 2024).

IV – Les probiotiques :

Un probiotique est un microorganisme (bactérie ou levure) vivant qui, si administré en quantité adéquate, a un ou des effet(s) bénéfique sur la santé de son hôte (Gupta and Garg, 2009). Parmi les exemples les plus utilisés, on trouve des bactéries des genres *Lactococcus*, *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* souvent ajoutés dans les produits laitiers (fromage, yaourt, etc.) comme *Lactocaseibacillus casei* ou *Bifidobacterium lactis* (Gill *et al.*, 2000; Sniffen *et al.*, 2018). On retrouve aussi les espèces *Streptococcus thermophilus*, *Escherichia coli*, *Bacillus clausii* ou encore *Saccharomyces boulardii* pour les levures. Ces microorganismes doivent être généralement considérés comme sans danger (Generally Recognized As Safe, GRAS) et répondre à certains des critères suivants pour être des probiotiques (Gupta and Garg, 2009). Critères qui sont :

- La capacité de résister aux pH acides et une très bonne viabilité des bactéries dans l'hôte.
- La capacité de survivre dans l'intestin, même si incapable de le coloniser.
- La capacité d'adhésion à l'épithélium intestinal pour contrer le péristaltisme.
- La capacité d'interagir/envoyer un signal aux cellules du système immunitaire associé à l'intestin.
- La capacité de résister aux traitements (notamment alimentaires).
- La capacité d'influencer l'activité métabolique localement.
- Devrait, si possible, être d'origine humaine.
- Devrait être non-pathogène.

Les mécanismes par lesquels les probiotiques, et/ou leurs produits métaboliques (postbiotiques), influent sur la santé de leur hôte ne sont pas encore tous compris. Mais il a été montré que les probiotiques peuvent empêcher ou limiter la croissance de pathogène, renforcer les fonctions de l'épithélium la barrière intestinale et influencer sur le système immunitaire de l'hôte (Gill *et al.*, 2000; Elean *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2023). Les probiotiques sont étroitement liés au microbiote intestinal et sont parfois utilisés pour traiter des infections entériques (Lai *et al.*, 2019).

Lactococcus lactis est une bactérie lactique Gram positive généralement non-pathogène pour l'humain et utilisée dans la fermentation de nombreux produits fromagés (Cavanagh *et al.*, 2015). *L. lactis* est anaérobie aérotole'ante et sa voie métabolique productrice d'énergie est l'homofémentation par glycolyse de sucres comme le glucose ou le lactose en pyruvate, puis en lactate. *L. lactis* acidifie ainsi le milieu de croissance en fermentant le lactose en acide lactique. L'effet de cette bactérie a déjà été testé dans le contexte de l'immunité entraînée au laboratoire d'accueil, *in vitro* sur des cellules non-immunitaires ostéoblastes MG-63 (Chaumond *et al.*, 2023). Et une expérience similaire a été dirigée *in vivo*, sur des Cardeaux hirame (*Paralichthys olivaceus*), afin de tester les effets modulateurs de cette bactérie sur l'immunité (Beck *et al.*, 2016). Les effets immunomodulateurs de nombreuses souches de *L. lactis* ont été testés et montrent un effet pro-inflammatoire, impactant l'immunité innée et adaptative (Saleena *et al.*, 2023). Cependant, il n'y a pas beaucoup de travaux qui l'étudient dans le cadre de l'immunité entraînée.

V – Hypothèse :

Les propriétés immunomodulatrices de certaines bactéries lactiques bénéfiques pour l'humain ont été démontrées sur des cellules humaines non-immunitaires (ostéoblaste-like MG-63 (Chaumond *et al.*, 2023)) et sur des cellules immunitaires (cellules dendritiques (Suzuki *et al.*, 2018)). De plus, des études indiquent que certains composants bactériens, notamment le β -glucane et le MDP, induisent un état pro-inflammatoire chez les cellules de l'immunité innée (Van Dijk *et al.*, 2022).

Nous avons émis l'hypothèse que des bactéries probiotiques pourraient induire l'immunité entraînée dans des cellules immunitaires dans le contexte d'une infection ultérieure causée par *S. aureus*, entraînant une réponse immunitaire plus forte (Figure 5).

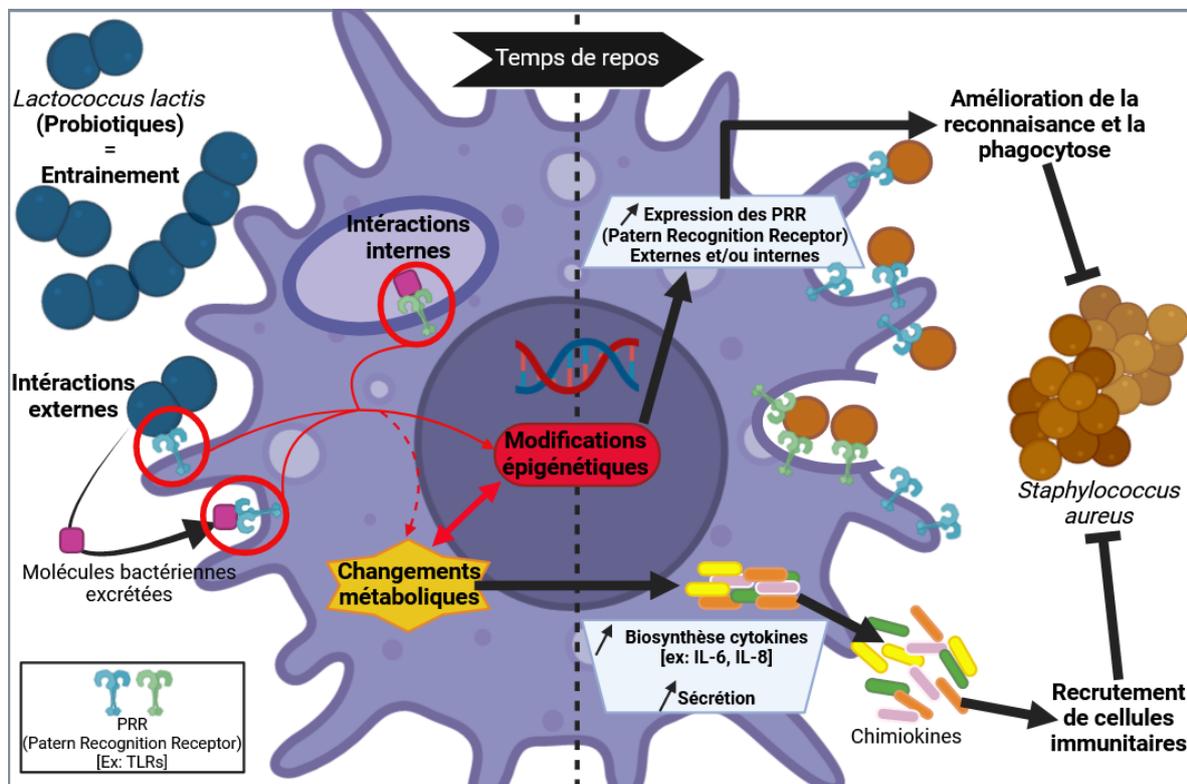


Figure 5. Effet potentiel d'un probiotique sur une cellule immunitaire dans le cadre de l'immunité entraînée contre une infection par *S. aureus*.

Un probiotique (ronds bleus) peut interagir soit directement (via ses protéines de surface par exemple), soit indirectement via une molécule excrétée avec un PRR. Si le macrophage phagocyte le probiotique, il est également possible que les composants bactériens soient extraits par la cellule à l'intérieur du phagolysosome. La reconnaissance d'un antigène provoque des changements épigénétiques et influence le métabolisme de la cellule. Les modifications métaboliques induisent des changements épigénétiques, et inversement. Ces changements perdurent dans le temps, même en absence d'antigène. En cas d'une infection, ici à *S. aureus* (ronds jaunes), les modifications épigénétiques et métaboliques permettent à la cellule une production et sécrétion de cytokines plus forte. La cellule synthétise plus de récepteur et/ou optimise les voies d'activation de gènes impliqués dans la réponse immunitaire. Cette réponse amplifiée de la cellule résulte en une inhibition rapide et efficace de la croissance de la population de *S. aureus*, prévenant ainsi une infection sévère ou la formation de biofilm.

VI – Objectifs et stratégies :

Notre objectif est de rechercher les bactéries probiotiques capables d'induire l'immunité entraînée. Ce travail est centré sur la mise au point d'un modèle d'induction de l'immunité entraînée par un probiotique dans des cellules immunitaires (macrophages), ce qui induirait une réponse accrue contre *S. aureus*.

Notre stratégie consiste à comparer le niveau de réponse des cellules en fonction du stimulus, notamment en comparant la concentration de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-8) sécrétées par les cellules avec ou sans induction préalable par *L. lactis*, choisi comme modèle de bactérie lactique immunomodulatrice. Les bactéries *S. aureus* seront remplacées par un surnageant de culture bactérienne fourni par le laboratoire. Des études ont déjà montré qu'un surnageant bactérien a un effet immunomodulateur (Zhu *et al.*, 2013; Neumann *et al.*,

2021). On utilise ce surnageant bactérien pour interagir avec les cellules eucaryotes afin de simplifier nos manipulations, de réduire les risques d'erreur et de contamination dû à la manipulation de *S. aureus*. De plus, le surnageant bactérien contient principalement les produits métaboliques sécrétés par *S. aureus*. Ce qui nous permettra d'orienter nos futures analyses visant à établir précisément le(s) mécanisme(s) impliqués dans l'immunité entraînée contre *S. aureus*.

Matériels et méthodes :

I – Conditions de culture des cellules monocytes THP-1 :

Les cellules THP-1, provenant du sang périphérique d'un humain âgé de 1 an et atteint d'une leucémie, sont fournies par ATCC (TIB-202). Elles sont cultivées dans du milieu RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, R8758) auquel est ajouté du sérum de veau foetal (FBS) à 10 % (v/v), 100 U/mL de pénicilline et 100 mg/mL de streptomycine (P/S, solution x100, P4333, Sigma-Aldrich). L'incubation se fait à 37°C + 5 % CO₂, dans des flasques de 10 mL et elles sont repiquées tous les 4 jours, environs. Le nombre de repiquage est noté passage (P).

II – Conditions de culture des souches bactériennes :

Staphylococcus aureus

La souche *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) MW2 (USA 400) est résistante à la pénicilline (MRSA) et a été fournie par le Laboratory of Bacteriology NIH, USA (Joo & Otto, 2014 ; Wang et al., 2007). *S. aureus* est cultivée dans du milieu BHI (Brain-Heart Infusion : Extrait de cœur-cerveau 17,5g/L ; peptone de gélatine 10g/L ; NaCl 5g/L ; phosphate disodique 2,5 g/L et glucose 2g/L). Les précultures sont lancées à partir de cryotubes de 500 µL stockés à -80°C (milieu BHI et glycérol 15 %) en repiquant 100 µL dans 9,9 mL de BHI, incubé une nuit à 37°C sans agitation.

Lactococcus lactis

La souche de *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) sous-espèce *cremoris* MG1363, une souche lactose négative utilisant le glucose comme source de carbone, est fourni par le Centres International de Ressources Microbiologique pour les Bactéries à Intérêt Alimentaire (CIRM-BIA) du STLO (INRAE, Rennes). *L. lactis* est cultivée dans du milieu M17 (acide ascorbique 0,5 g/L ; sulfate de magnésium 0,25 g/L ; extraits de viande 5 g/L ; peptone de viande (peptique) 2,5 g/L ; sodium glycérophosphate 19 g/L ; peptone de soja (papainique) 5 g/L ; tryptone 2,5 g/L ; extraits de levure 2,5 g/L), additionné de 0,5 % de glucose (m/v) comme substitut pour le lactose (M17glu). Les précultures sont lancées à partir de cryotubes de 500 µL stockés à -

80°C (milieu M17glu et glycérol 15 %) en repiquant 100 µL dans 9,9 mL de M17glu, incubé une nuit à 30°C sans agitation.

III – Cinétiques de croissance :

Des cinétiques de croissance ont été réalisées pour *L. lactis* et *S. aureus* sur une journée complète. Pour les deux souches, des lectures de DO ont été effectuées toutes les heures sur deux ou trois cultures identiques issues de la même préculture. Pour *S. aureus*, la DO était prise à 600 nm sur 10h et pour *L. lactis*, à 650 nm pour 8h. La concentration en CFU/mL/unité de DO a été déterminé pour chaque souche avec des dénombrements par micro-méthode.

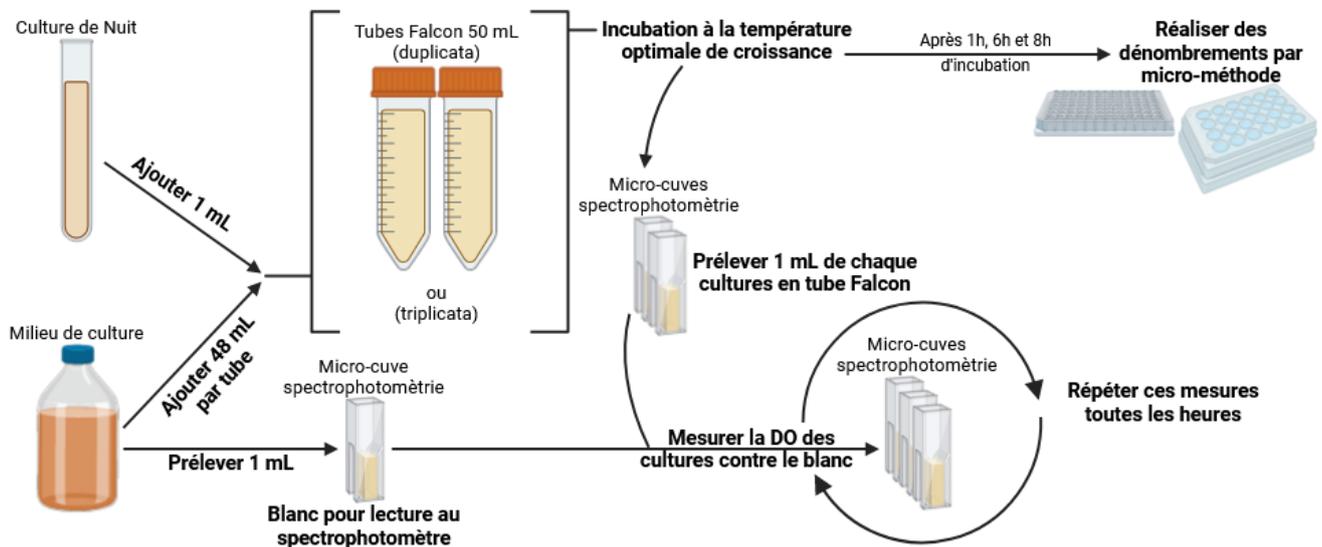


Figure 6. Schéma d'un suivi de croissance bactérienne à partir d'une préculture de nuit.

IV – Dénombrement des bactéries par micro-méthode :

Les dénombrements des souches bactériennes ont été effectués dans des plaques Falcon de 24 puits incubées une nuit à la température optimale de croissance de la bactérie : respectivement 37°C pour *S. aureus* et 30°C pour *L. lactis*. Des dilutions décimales des cultures furent réalisées, comme montrer ci-dessous (Figure 7), dans 180µL d'eau tryptonnée stérile. Ces dilutions ont servi à ensemercer dans la masse les milieux de cultures adaptés à la souche : milieu BHI agar pour *S. aureus* et milieu M17glu agar pour *L. lactis*.

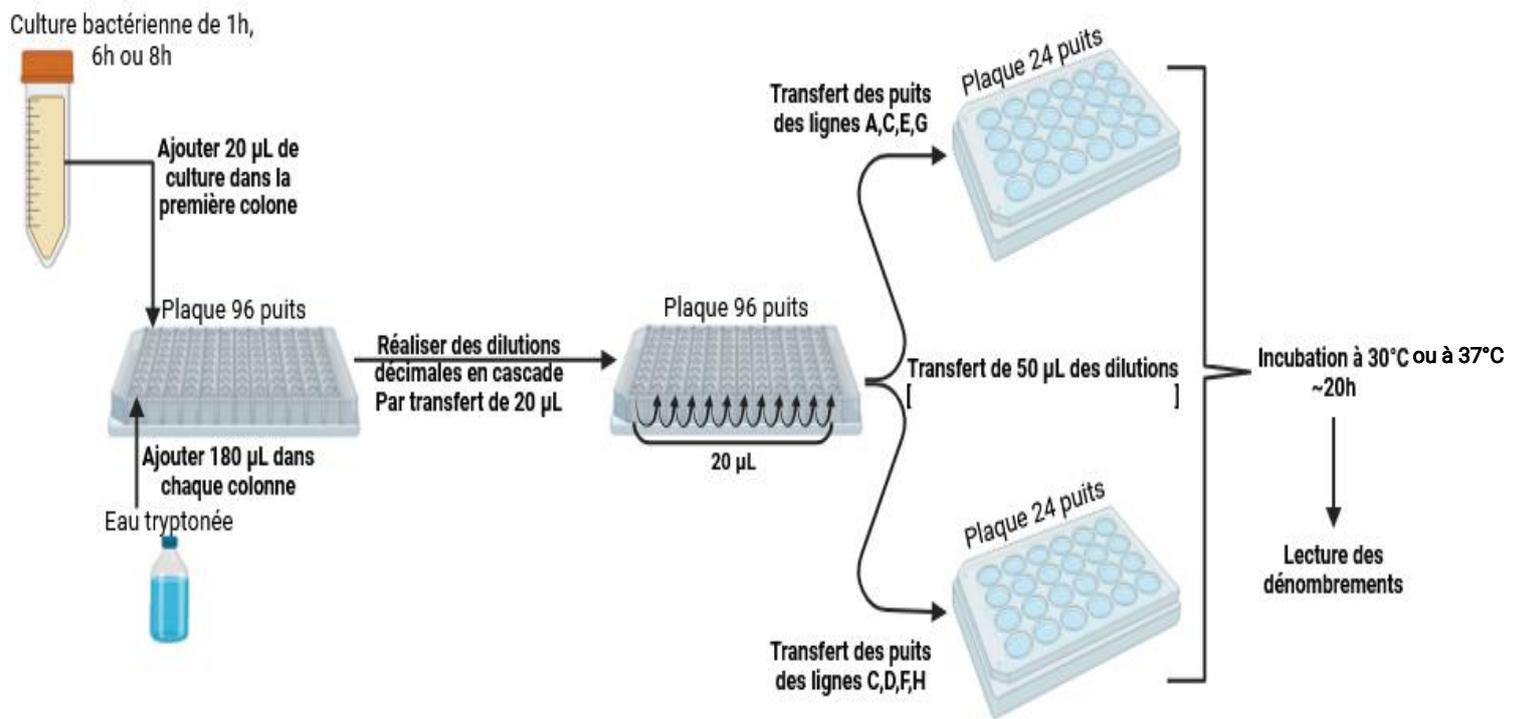


Figure 7. Schéma du dénombrement d'une culture bactérienne par micro-méthode.

V – Différentiation des cellules THP-1 :

Les cellules THP-1 sont différenciées par 100 nM de PMA (phorbol 12-myristate-13-acétate), pour 48h d'exposition, en cellules de type macrophage et deviennent adhérentes aux surfaces (Liu *et al.*, 2023). Les cellules différenciées sont cultivées en plaque Falcon de 24 puits, dans 1 mL de DMEM Iscove (Dominic Dutscher, L0191-500) additionné de 10 % (v/v) de FBS, 1 % (P/S) (DMEMIs-c). Les puits contiennent chacun $2 \cdot 10^5$ cellules et leur milieu est changé tous les 4 jours. Pour changer de milieu ou laver les puits, on utilise une pompe pour en aspirer le contenu liquide. Du PBS est utilisé pour laver les puits entre chaque changement de milieu. Les plaques de culture sont incubées à 37°C avec 5 % CO₂.

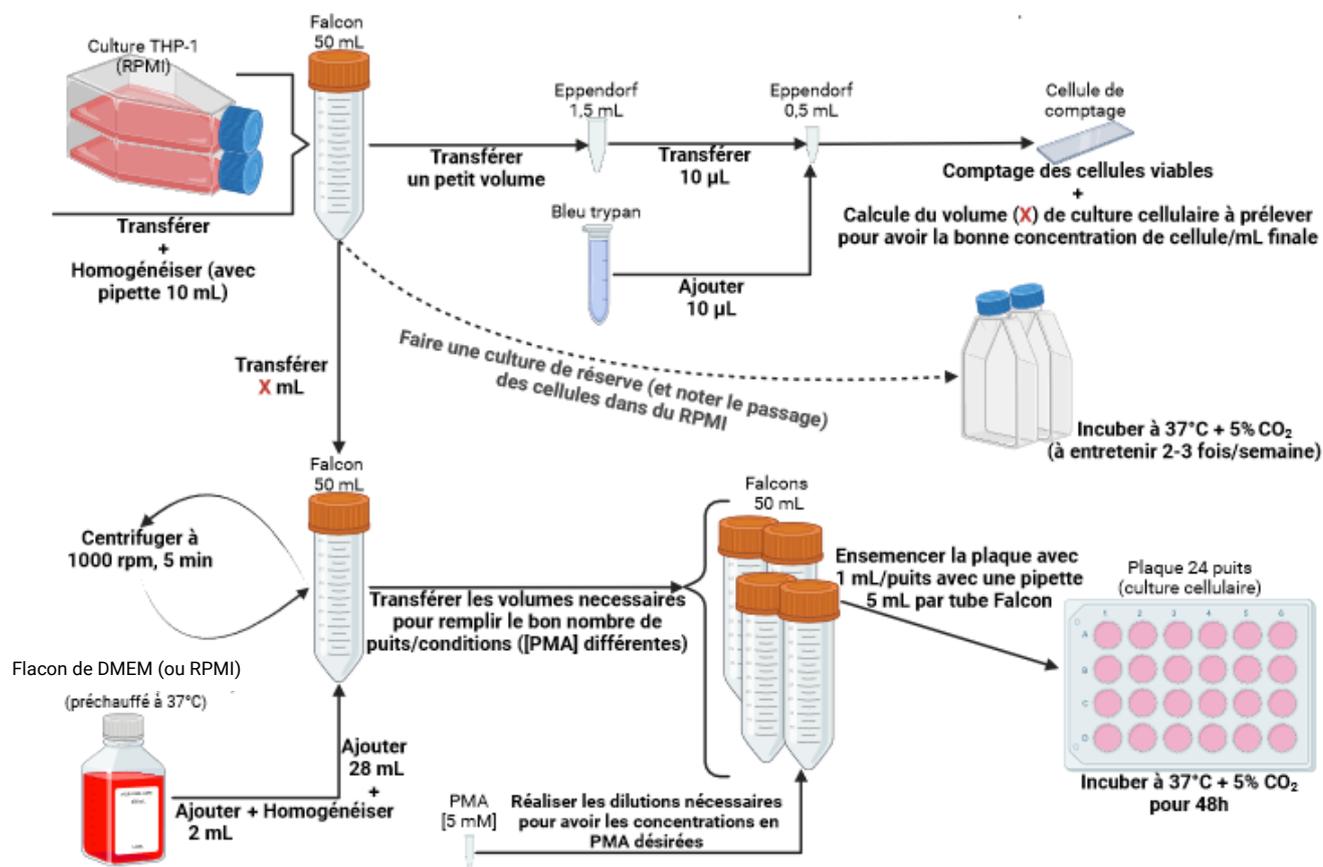


Figure 8. Schéma de la différenciation des cellules TPH-1.

Les concentrations de PMA 10, 25 et 50 nM ont été testées lors de la mise au point de cette méthode. Les concentrations de cellules $0,5 \cdot 10^5$ et $1 \cdot 10^5$ ont aussi été testées dans chaque conditions et également dans du milieu RPMI 10 % FBS et 1 % P/S (RPMIc) et dans du simple DMEM 10 % FBS et 1 % P/S (DMEMc).

VI – Comptage cellulaire :

Les cellules THP-1 sont comptées par un compteur automatique TC20 (Biorad) avec une coloration au bleu trypan afin de déterminer le taux de viabilité des cellules (ou pourcentage de cellules saines). Pour les THP-1 différenciées, elles sont détachées des surfaces par un traitement de 10-20 min à la trypsine à 37°C. Pour inactiver la trypsine, on ajoute du milieu DMEM Iscove (ou RPMI) avec 10 % ou 20 % de FBS. On prélève alors 10 µL de culture, auxquels on ajoute 10 µL de bleu trypan. L'exclusion prend 2-3 min, après quoi on peut faire la lecture.

VII – Interaction entre cellules différenciées et surnageant de *S. aureus* USA300 :

Le surnageant de *S. aureus* USA300 est utilisé comme substitut bactérien dans nos expériences afin de simplifier la manipulation et d'exclure l'influence des métabolites bactériens sécrétés pendant l'interaction avec les cellules THP-1 différenciés (THP-1d) en vue de futures analyses métaboliques des THP-1. La souche USA300 provient d'une infection chronique de *S. aureus*.

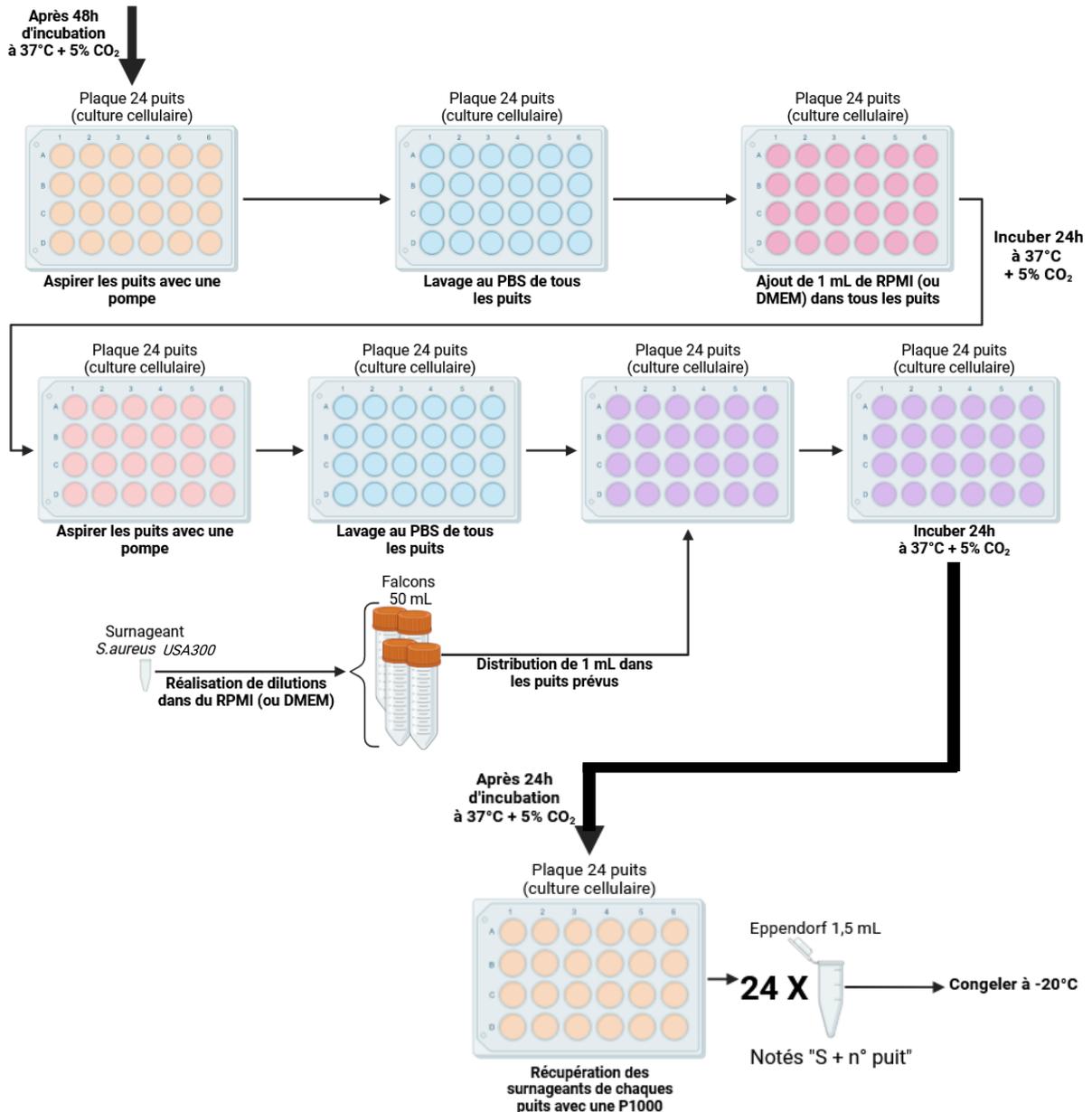


Figure 9. Evaluation de la cytotoxicité du surnageant de *S. aureus* USA300 sur des cellules THP-1 différenciées.

Le surnageant de *S. aureus* USA300 a été concentré 150 fois par centrifugation et filtration dans des colonnes Vivaspinn 15R (cut off 2000 Da) dans le laboratoire d'accueil, puis 300 µL ont

été prélevés dans des tubes à Eppendorf et congelés à -20°C . Ce surnageant est ensuite dilué dans du DMEMIs-c (ou RPMIc). Les dilutions du surnageant de *S. aureus* 1/4000 ; 1/2000 ; 1/1000 ; 1/500 ; 1/250 ; 1/100 et 1/50 ont été testées pour leur cytotoxicité et la réponse des cellules THP-1 (différenciées ou non). Les cellules restent en contact avec le surnageant de *S. aureus* dilué pendant 24h et 96h, puis le surnageant des cellules THP-1 est récupéré en tube Eppendorf et congelé à -20°C . Les cellules (adhérentes ou flottantes) de chaque puits sont comptées avec la coloration d'exclusion afin de normaliser les résultats de la future ELISA.

VIII – Mesure de la sécrétion d'IL-6 et 8 par ELISA :

Les tests ELISA ont été réalisés avec les kits de détection de l'IL-6 et de l'IL-8, *human IL-6 (IL-8) uncoated ELISA* (Thermo Fisher Scientific, 88-7066) en suivant le protocole du fournisseur.

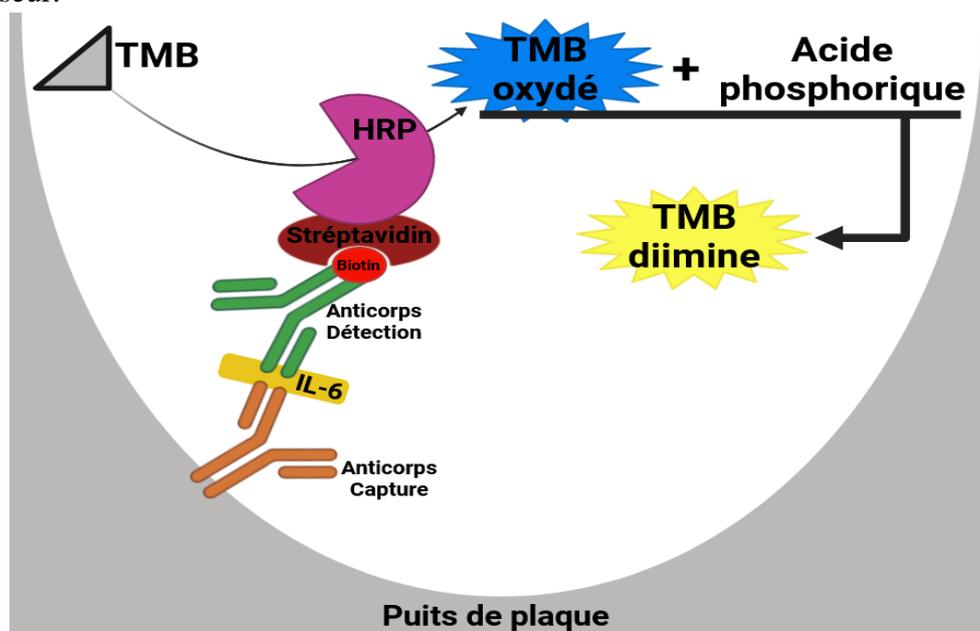


Figure 10. Schéma du principe de l'ELISA pour IL-6 humain (Thermo Fisher Scientific).

Une plaque de 96 puits en polystyrène Pierce™ (Thermo Scientific, 15041) est remplie d'une solution de PBS et d'anticorps de capture anti-IL-6. La plaque scellée est laissée une nuit à 4°C pour permettre à l'anticorps de s'adsorber aux parois des puits. Un lavage par un tampon PBS-Tween20 (0,05 %) est réalisé après chaque étape. Les surfaces des puits de la plaque sont saturées par une solution d'ELISPOT, puis incubée au moins 2h à 4°C . La solution ELISPOT est une solution de FBS, contenant aussi un tampon phosphate, dont les protéines sériques permettent d'éviter les liaisons non-spécifiques à la surface de la plaque.

On ajoute alors les échantillons, les dilutions du standards et les blancs (L'ELISPOT sert de blanc). L'incubation avec les échantillons dure une nuit à 4°C pour avoir une meilleure sensibilité. On ajoute une solution d'anticorps de détection conjugué à la biotin dans la plaque, incubée 1h à température ambiante. Ensuite la stréptavidin-Horse Radish Peroxydase (HRP) est ajoutée dans les puits et incubée 30 min, à température ambiante. Enfin, on ajoute le TMB qu'on laisse incuber à température ambiante 15 min sans lumière, pour éviter l'auto-oxydation du substrat. Les complexes anticorps-Interleukine-anticorps-biotin-stréptavidin-HRP oxydent le TMB, donnant une coloration bleue au puits contenant de l'IL-6 en quantité détectable (>2 pg). Enfin, on arrête la réaction enzymatique avec une solution d'acide phosphorique, ce qui change le TMB oxydé en TMB diimine, donnant une coloration jaune lisible à 450nm au spectrophotomètre. L'ELISA IL-8 fonctionne de la même façon, mais avec de l'avidin-HRP en tant qu'enzyme.

IX – Induction de l'immunité entraînée chez les cellules THP-1 :

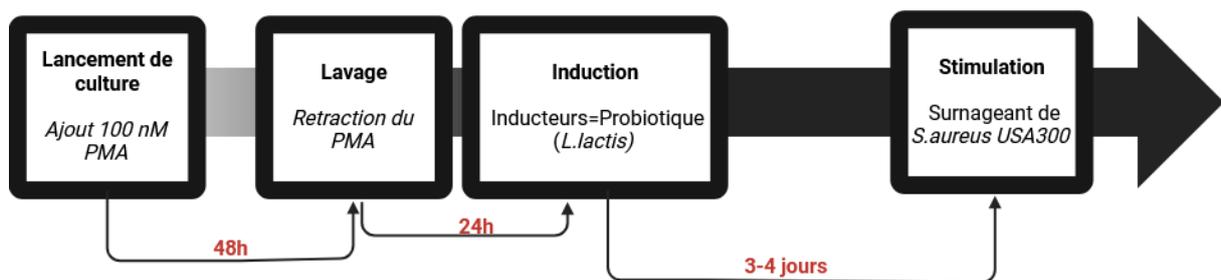


Figure 11. Déroulement d'une expérience d'induction de l'immunité entraînée.

Les cellules THP-1 sont cultivées dans du DMEMis-c et différenciées par 100 nM de PMA. Les THP-1d sont ensuite exposées ou non à des bactéries lactiques *L. lactis* MG1363 (probiotique) et restent en repos pendant 3-4 jours. Puis, elles sont exposées au surnageant de *S. aureus* USA300 plus ou moins dilué.

Les ratios bactérie/cellules à l'inoculation sont d'environ 1/1000 (MOI 1000 :1), MOI 500 :1 et MOI 250 :1. La période d'incubation est de 4h30, à 37°C + 5 %CO₂. Ensuite, un lavage de 2h avec un milieu DMEM Iscove additionné de 100 µg/mL de gentamicine (DMEMis-100gen) est effectué. On utilise ensuite un milieu contenant 25 µg/mL de gentamicine (DMEMis-25). Les surnageants des cellules THP-1d de certains puits désignés sont récupérés, congelés à -20°C et les cellules sont comptées afin de comparer la production d'interleukines à la première stimulation et celle à la deuxième. S'en suis une période de repos

de 3-4 jours, ensuite les cellules sont exposées au surnageant de *S. aureus* USA300 dilué au 1/2000^e, 1/1000^e et 1/500^e. Les durées d'exposition sont de 24h, 48h et 72h, après lesquelles les surnageants des cellules THP-1 sont récupérés et congelés à -20°C. On compte également les cellules de chaque puits afin de normaliser les valeurs obtenues lors des ELISA réalisés sur tous les surnageants des cellules THP-1 récupérés.

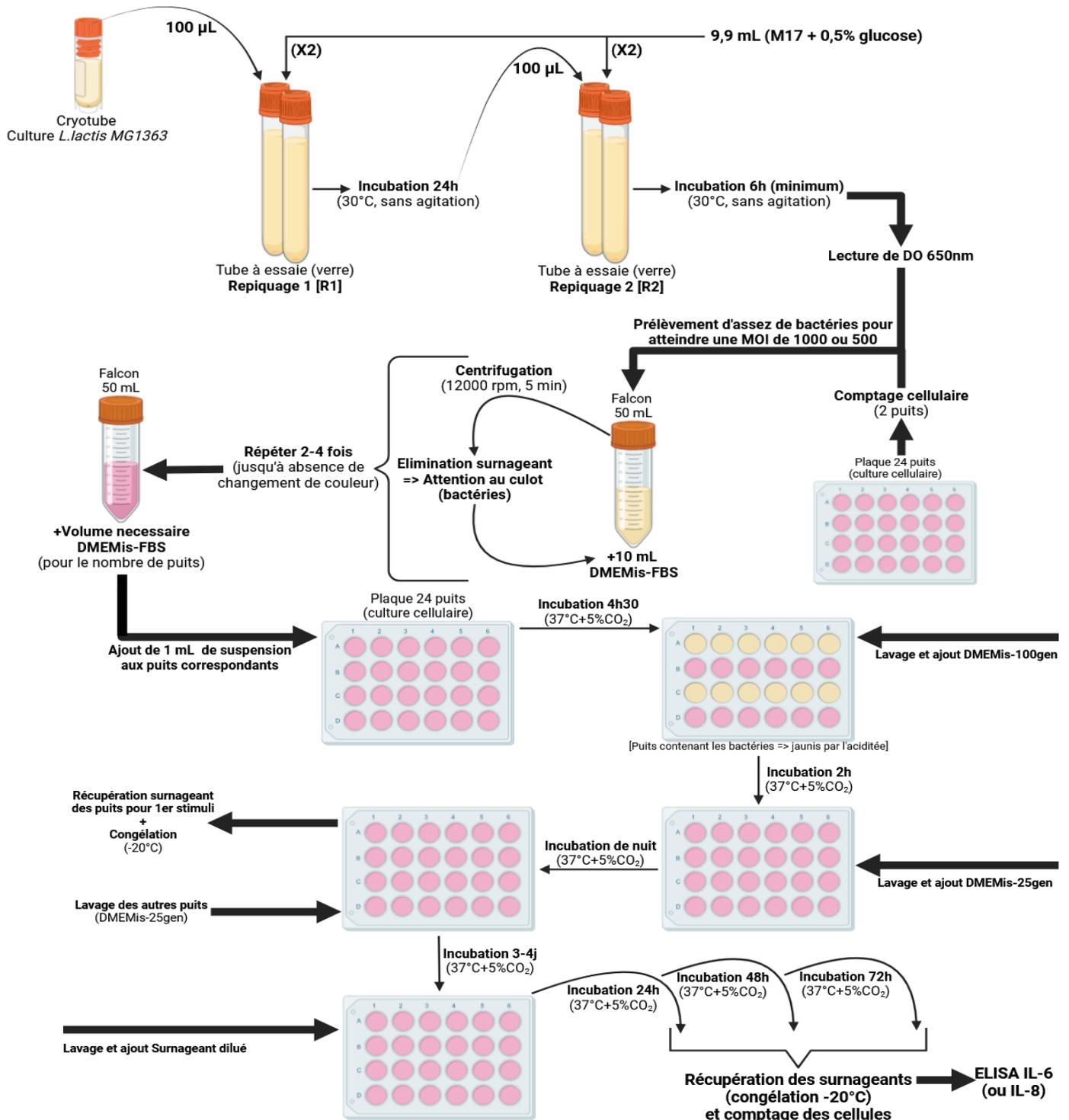


Figure 12. Induction de l'immunité entraînée chez les THP-1 par *L. lactis* MG1363.

X – Analyse statistique :

Les données ont été analysées dans RStudio, avec les bibliothèques stats et meanbp. Les résultats ont été comparés en utilisant le test de Student avec la correction de Bonferroni. Une P-value $< 0,05$ est considérée comme significative.

Résultats et discussion :

I – Optimisation des conditions de culture des cellules THP-1 différenciées :

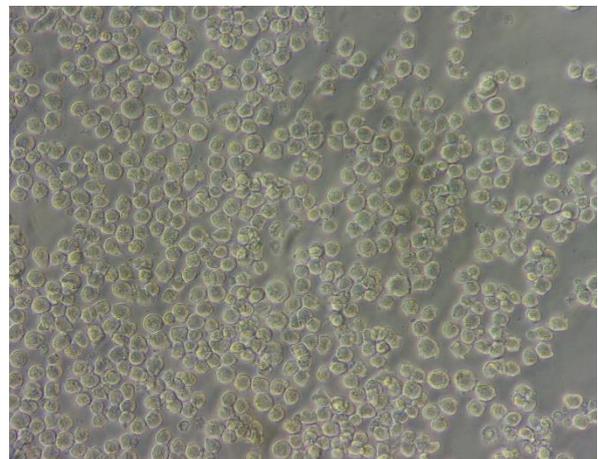
La différenciation des cellules THP-1 en cellules type macrophage se fait soit en milieu RPMI-c, soit en milieu DMEMis-c. Après différenciation, les cellules peuvent se différencier ou entrer en apoptose si les concentrations en PMA et en cellules ne sont pas optimales. On trouve dans la littérature que la culture de ces cellules différenciées se fait avec une concentration de PMA comprise entre 10 et 200 nM (Daigneault *et al.*, 2010; Van Dijk *et al.*, 2022). Nous avons donc testé les concentrations de PMA 10, 20, 50 et 100 nM avec des concentrations de cellules de $0,5 \times 10^5$; de 1×10^5 et de 2×10^5 cellules/mL. Les cellules ont été exposées 48h au PMA, suivit d'un changement de milieu sans PMA.

A



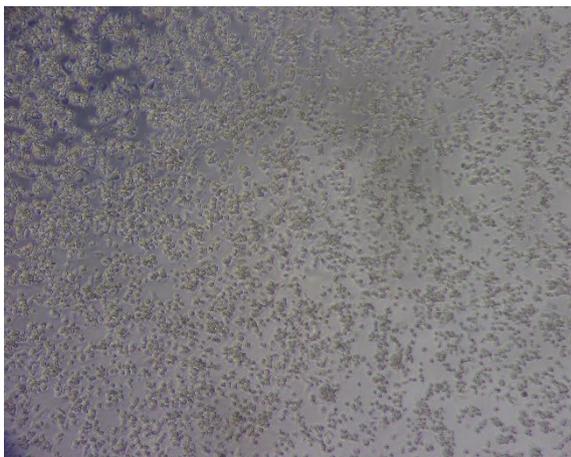
Sans PMA

(Optique X5)



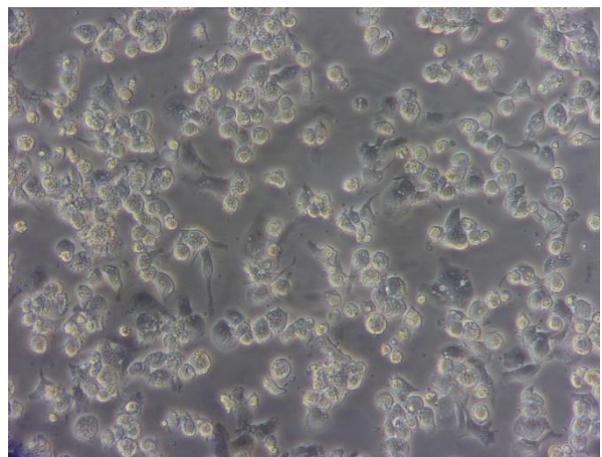
(Optique X20)

B



24h avec 100 nM PMA

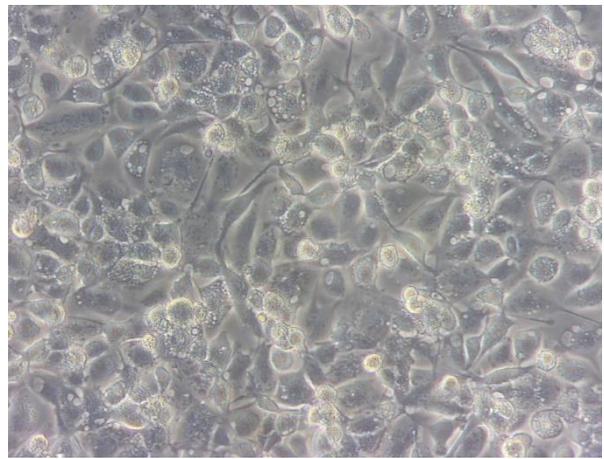
(Optique X5)



(Optique X20)



48h avec 100 nM PMA (Optique X5)

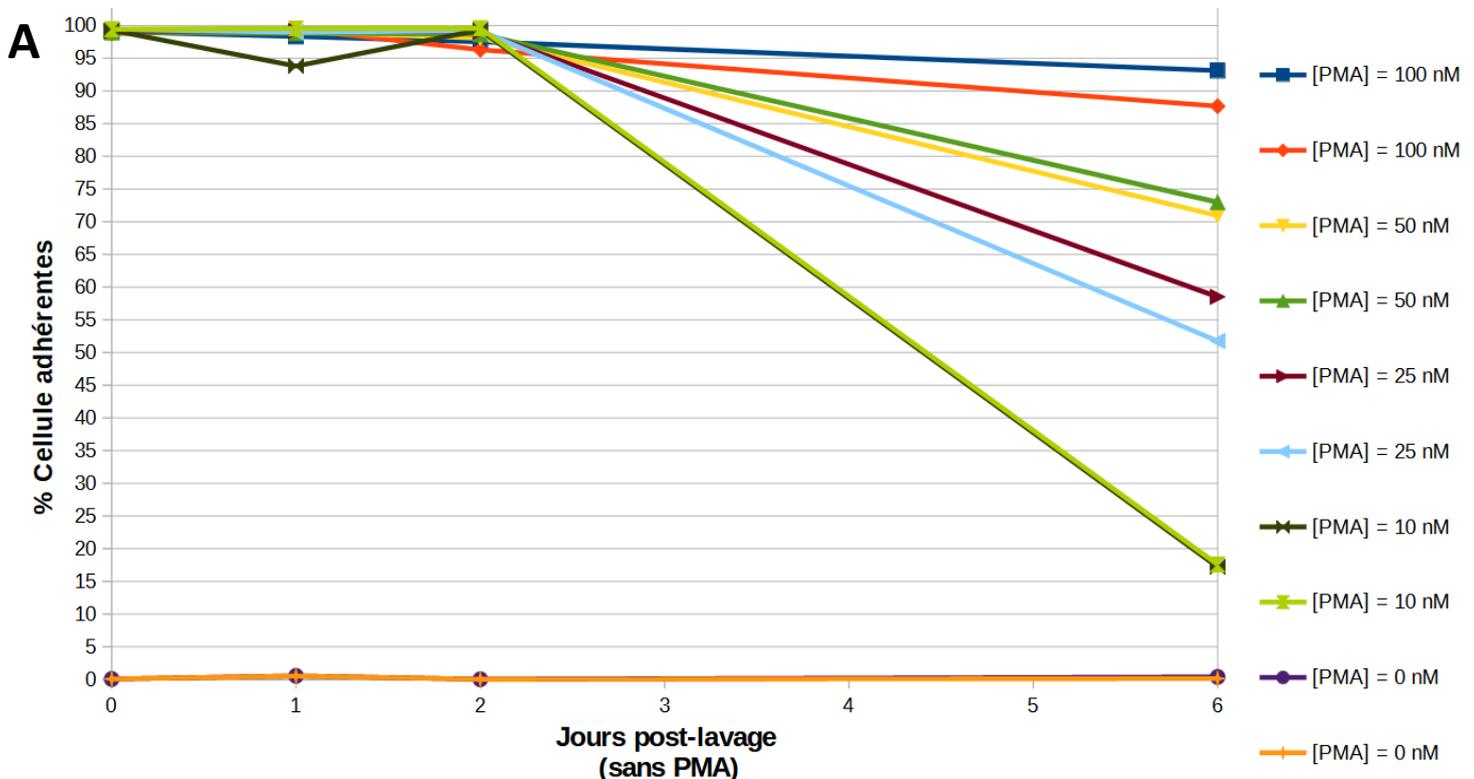


(Optique X20)

Figure 13. Images de cellules THP-1 en milieu DMEMis-c prise (A) avant, (B) pendant et (C) après différenciation avec 100 nM de PMA (microscopie Optique, microscope inversé).

Les cellules photographiées ici sont à une concentration de 2×10^5 cellules/mL. Les images ont été prises à (A) 0h, (B) 24h et (C) 48h après ajout de 100 nM de PMA.

Comme montré en Figure 13 (C), les cellules différenciées sont plus aplaties et allongées que les monocytes THP-1 (Figure 13 A). Nous avons ensuite comparé les pourcentages de cellules encore adhérentes, parmi les cellules vivantes, après 1, 2 et 6 jours sans PMA, entre les différentes conditions (Figure 14).



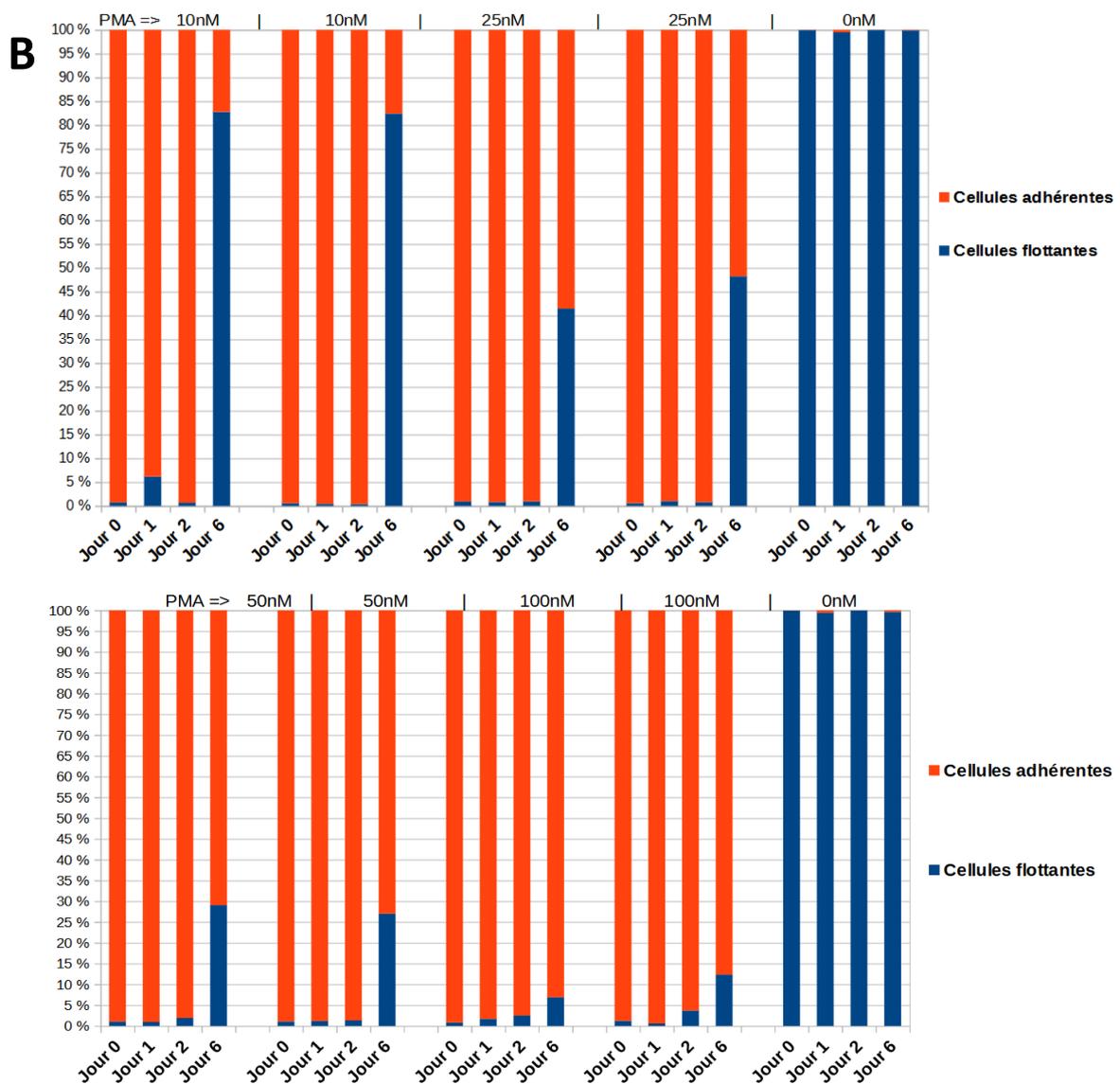


Figure 14. L'adhésion des cellules THP-1, après traitement par PMA, varie selon les concentrations utilisées (milieu DMEM).

Résultats des tests réalisés en milieu DMEM avec 2×10^5 cellules/mL, les résultats dans les autres milieux sont similaires. (A) Pourcentage de cellules THP-1 adhérentes, considérées comme différenciées, au cours du temps avec différentes concentration de PMA [10, 25, 50 et 100], avec 2 essais par conditions. (B) Proportions de cellules flottantes et adhérentes par jours, selon les mêmes conditions. Un essai par jour et par condition.

Cette expérience a été reproduite dans 3 milieux différents : Du RPMI (+10 % FBS ; +1 % P/S), du DMEM (+10 % FBS ; +1 % P/S) et du DMEM Iscove (+10 % FBS ; +1 % P/S). Le milieu le plus souvent utilisé pour la culture de THP-1d est le RPMI (Chanput *et al.*, 2012; Tulk *et al.*, 2015). Cependant, nous avons également testé un milieu commun de culture cellulaire eucaryote, le DMEM, et un milieu plus riche, le DMEM Iscove.

On observe dans les Figures 14 (A) et (B) que la proportion de cellules adhérentes après 1 ou 2 jours est similaire dans toutes les conditions. Cependant, après 6 jours, on voit une nette différence. La proportion de cellules adhérentes baisse beaucoup avec les concentrations de 10 et 25 nM de PMA. C'est avec 100 nM que la majorité des cellules restent différenciées le plus longtemps.

Nous avons déterminé que les meilleures conditions de culture sont 100 nM de PMA avec 2.10^5 cellules/mL dans du DMEM Iscove. La concentration cellulaire 2×10^5 cellules/mL permet d'obtenir une confluence proche mais inférieure à 90% durant les 5 premiers jours. Cela nous garantit un nombre suffisant de cellules productrices d'interleukines pour l'analyse. Comme ces cellules peuvent rentrer en sénescence quand trop nombreuse, il est préférable de ne pas dépasser 90% de confluence. Ces conditions sont appliquées à toutes les cultures cellulaires suivantes.

II – Détermination des paramètres de croissance de *L. lactis* MG1363 :

L. lactis MG1363 a été cultivée à partir de cultures en cryotube comme indiqué précédemment (Figure 6). Quatre suivis cinétiques de croissance (Figure 15) ont été effectués afin de pouvoir calculer le nombre de bactéries à mettre en contact avec les THP-1d. Le calcul de MOI demande de corrélérer la DO_{650nm} d'une suspension de *L. lactis* avec une concentration en bactérie par mL.

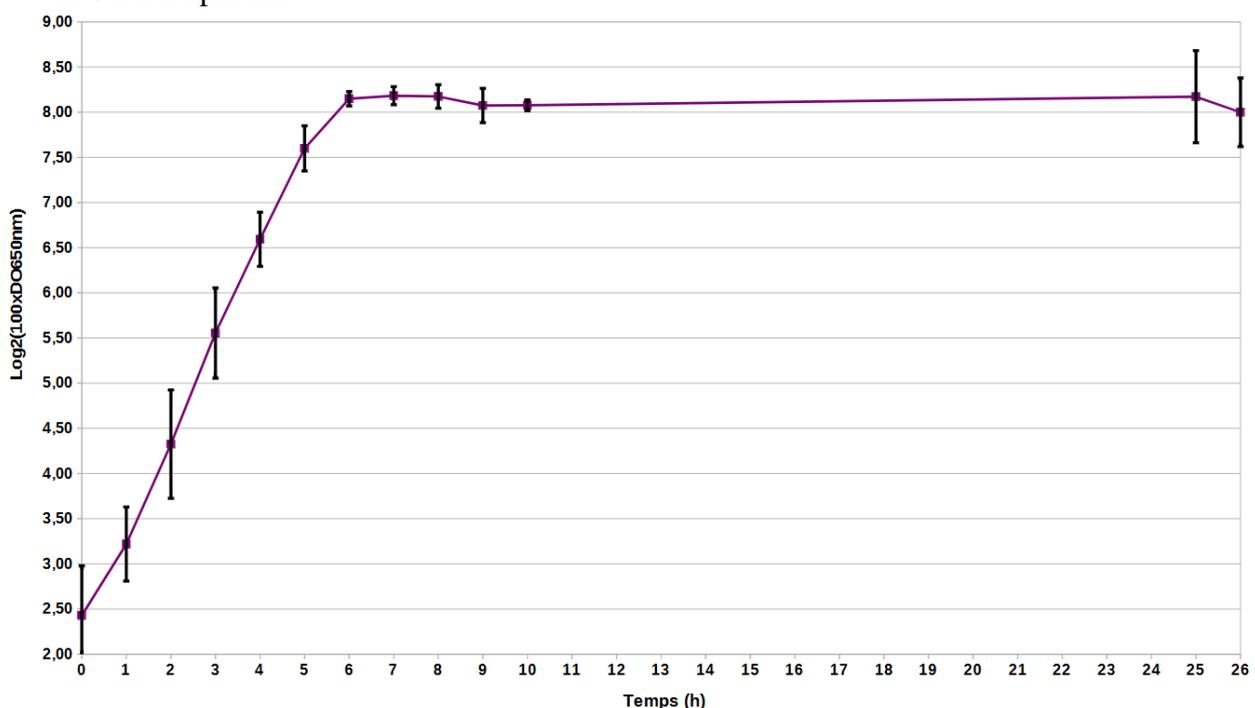


Figure 15. Cinétique de croissance de *L. lactis* MG1363

Les suivis de croissance ont été réalisés dans du milieu M17+0,5% glucose. Données de 4 suivis présentées sous forme de moyennes ± Erreur standard (intervalle de confiance = 95%).

Ces cinétiques nous permettent de déterminer que la souche atteint sa phase stationnaire après 6h. Le temps de doublement est estimé à environ 0,7 h. Grâce à plusieurs dénombrements bactériens, nous avons pu déterminer que la concentration bactérienne correspondante à une DO_{650nm}=1 est d'environ $1,20.10^9$ CFU/mL. Pour choisir les MOI, nous utiliserons l'étude

réalisée par le laboratoire d'accueil sur des cellules ostéoblastes MG-63 (Chaumond *et al.*, 2023) qui avait déterminé la MOI 500 :1 comme le ratio optimale. Le type de cellule étant différent, nous testerons les MOI 1000 :1, 500 :1 et 250 :1.

III – Mise au point du modèle d'interaction entre cellules différenciées et surnageant de *S. aureus* USA300 :

Les cellules THP-1d ont été mises en contact avec le surnageant de *S. aureus* USA 300 (SSA) dilué au 1/50^e, 1/100^e, 1/250^e, 1/500^e, 1/1000^e, 1/2000^e, 1/4000^e et 1/8000^e suivant la méthode décrite plus tôt (Figure 9). Les dilutions au 1/50^e et 1/100^e sont cytotoxiques et nous servent donc de témoins de toxicité. Les durées d'exposition au SSA sont de 24h et 96h. Après quoi, la proportion de cellules viables est déterminée et le surnageant cellulaire est récupéré et conservé à -20°C. Une exposition de 4h a été testée, mais aucune production d'IL-6 n'a été détectée. La raison reste à déterminer, mais on peut supposer que l'absence de structures, comme la membrane bactérienne, rend l'interaction avec les composants du SSA moins efficace qu'avec la bactérie complète. Pour chaque essai, un témoin négatif sans SSA a été utilisé. On utilise également une gamme de solutions de LPS avec 1 ; 0,1 et 0,01 µg/mL comme témoins positifs, car le LPS induit une réponse immunitaire conduisant à la production de cytokine chez les monocytes THP-1 (Van Dijk *et al.*, 2022).

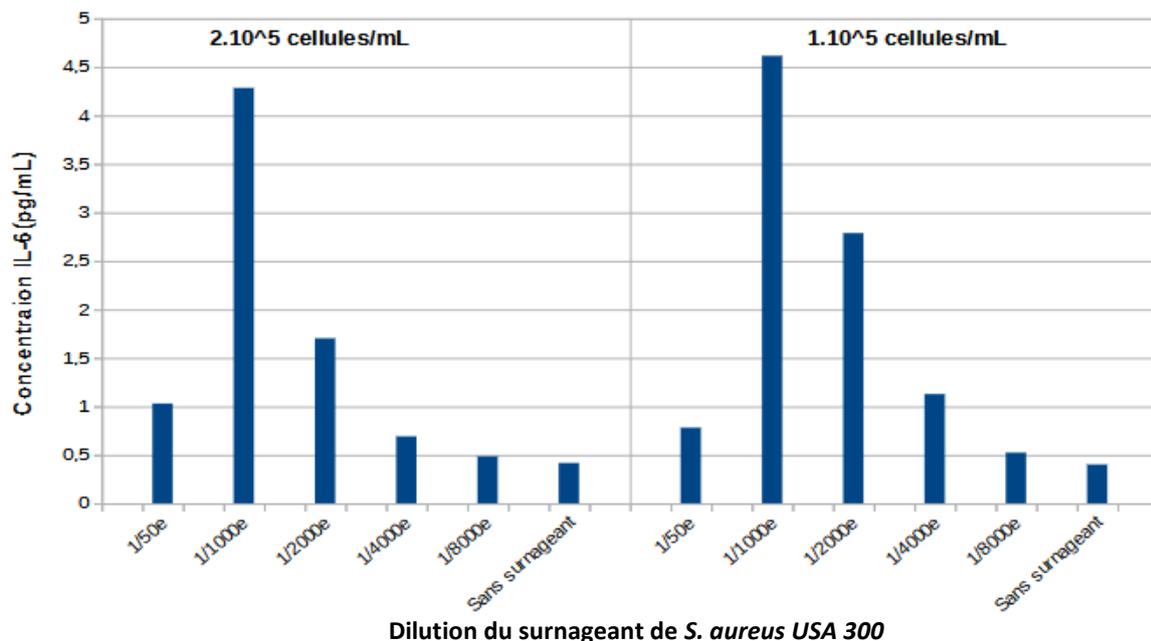


Figure 16. Production d'IL-6 par les cellules THP-1d en fonction de la dilution du surnageant de *S. aureus* USA 300.

Les cellules THP-1d ont été cultivées en milieu DMEMis-c et exposé aux dilutions du SSA pendant 24h. Les dilutions testées sont 1/50^e (cytotoxique), 1/100^e, 1/200^e, 1/400^e et 1/800^e. La concentration d'IL-6 n'est pas

normalisée. L'expérience a été réalisée avec 2×10^5 et 1×10^5 cellules/mL. Un seul essai a été effectué pour chaque condition.

La production d'IL-6 par les THP-1d augmente visiblement quand exposée au SSA pendant 24h (Figure 16). Et moins le SSA est dilué, plus la réponse est forte. Excepté pour la dilution 1/50^e, pour laquelle la concentration d'IL-6 produit est quatre fois moins importante qu'à 1/1000^e. La cytotoxicité du SSA devient trop forte entre les dilutions 1/50^e et 1/1000^e. Nous avons donc testé les concentrations 1/100^e, 1/250^e, 1/500^e et 1/1000^e afin de vérifier s'il y a une dilution qui serait un meilleur compromis entre production d'IL-6 et cytotoxicité.

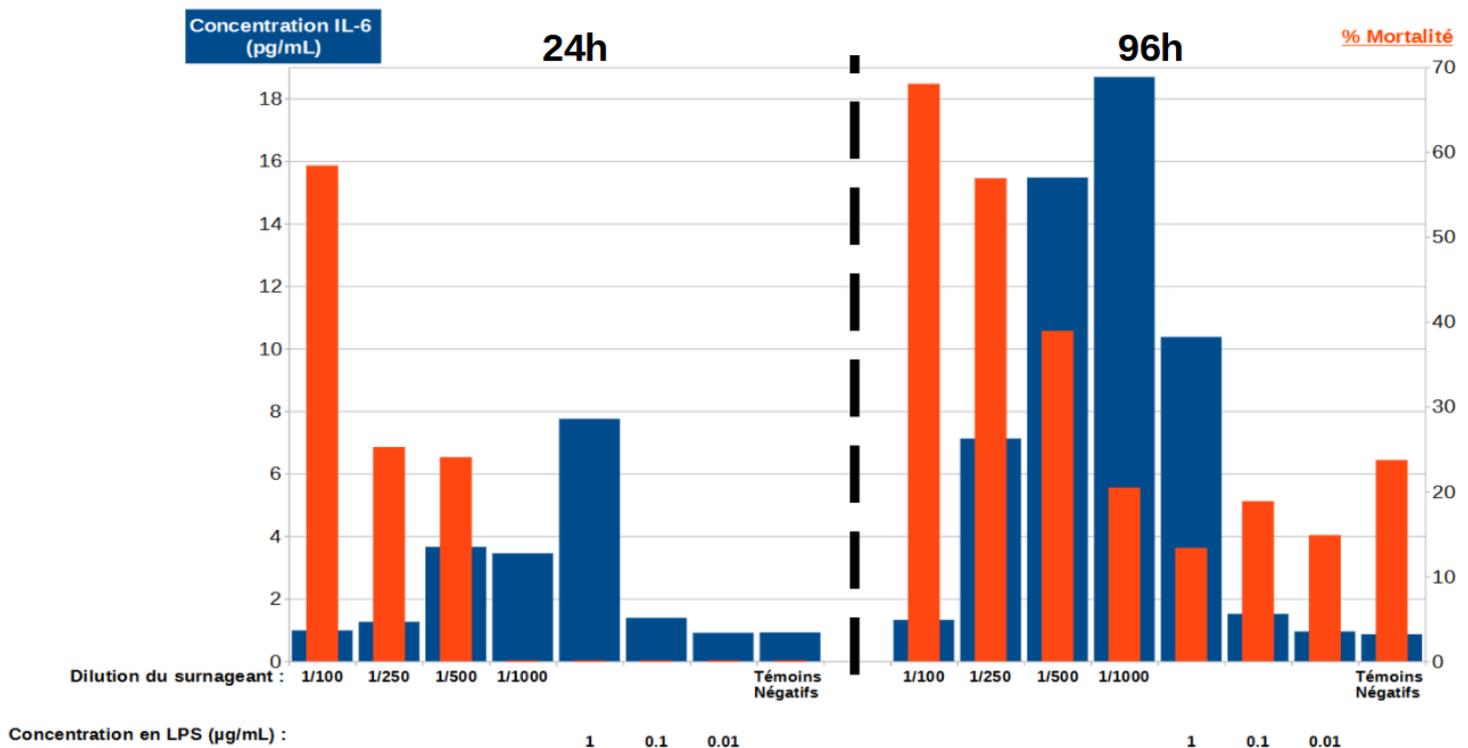


Figure 17. Production d'IL-6 et taux de mortalité des cellules THP-1 en fonction de la dilution du surnageant de *S. aureus* USA 300 et du temps d'exposition.

Les cellules THP-1d ont été cultivées à une concentration de 2×10^5 cellules/mL en milieu DMEMis-c et exposées aux dilutions du SSA pendant 24h et 96h. Les dilutions testées ici sont 1/100^e, 1/250^e, 1/500^e et 1/1000^e. Un essai par condition. Le taux de mortalité (axe de droite, orange) est calculé sur les cellules adhérentes, considérées encore différenciées. La concentration d'IL-6 (axe de gauche, bleu) n'est pas normalisée.

Les cultures cellulaires exposées à la dilution au 1/100^e du SSA pendant 24h présentent un taux de mortalité d'environ 58 % (Figure 17) et la totalité des cellules sont redevenue flottantes, elles se sont différenciées. Le taux de mortalité baisse jusqu'à 25 % avec la dilution au 1/250^e, mais il ne reste que 40 % de cellules adhérentes. Avec les dilutions 1/500^e et 1/1000^e, on observe respectivement 55 % et 87 % de cellules adhérentes et le cytoplasme des cellules est toujours visiblement étiré au microscope. Le taux de survie dans ces deux conditions est respectivement de 76 % et 100 %. Cependant, une exposition prolongée, de 96h, augmente la mortalité. Les

taux de survie des cellules exposé aux mêmes dilutions sont alors de 61 % et 80 % respectivement. Les taux de mortalités des THP-1d ont aussi été déterminés pour une exposition de 24h aux dilutions 1/2000^e, 1/4000^e et 1/8000^e du SSA et sont proches, voir égaux à 0 %.

La production d'IL-6 est mesurée par ELISA sandwich (Figure 10). On peut voir sur la Figure 17 que la production d'IL-6 est plus importante pour les dilutions les plus forte. Cela s'explique par les forts taux de mortalités et la différenciation des cellules THP-1 quand le SSA est trop concentré. Les dilutions 1/500^e et 1/1000^e induisent toutes les deux une forte réponse chez les THP-1d. Toutefois, la dilution 1/500^e possède encore une certaine cytotoxicité, ce qui pourrait fausser nos résultats.

La dilution optimale pour notre modèle d'interaction avec les cellules THP-1 est donc 1/1000^e car elle est très peu cytotoxique mais induit tout de même une production accrue d'interleukine.

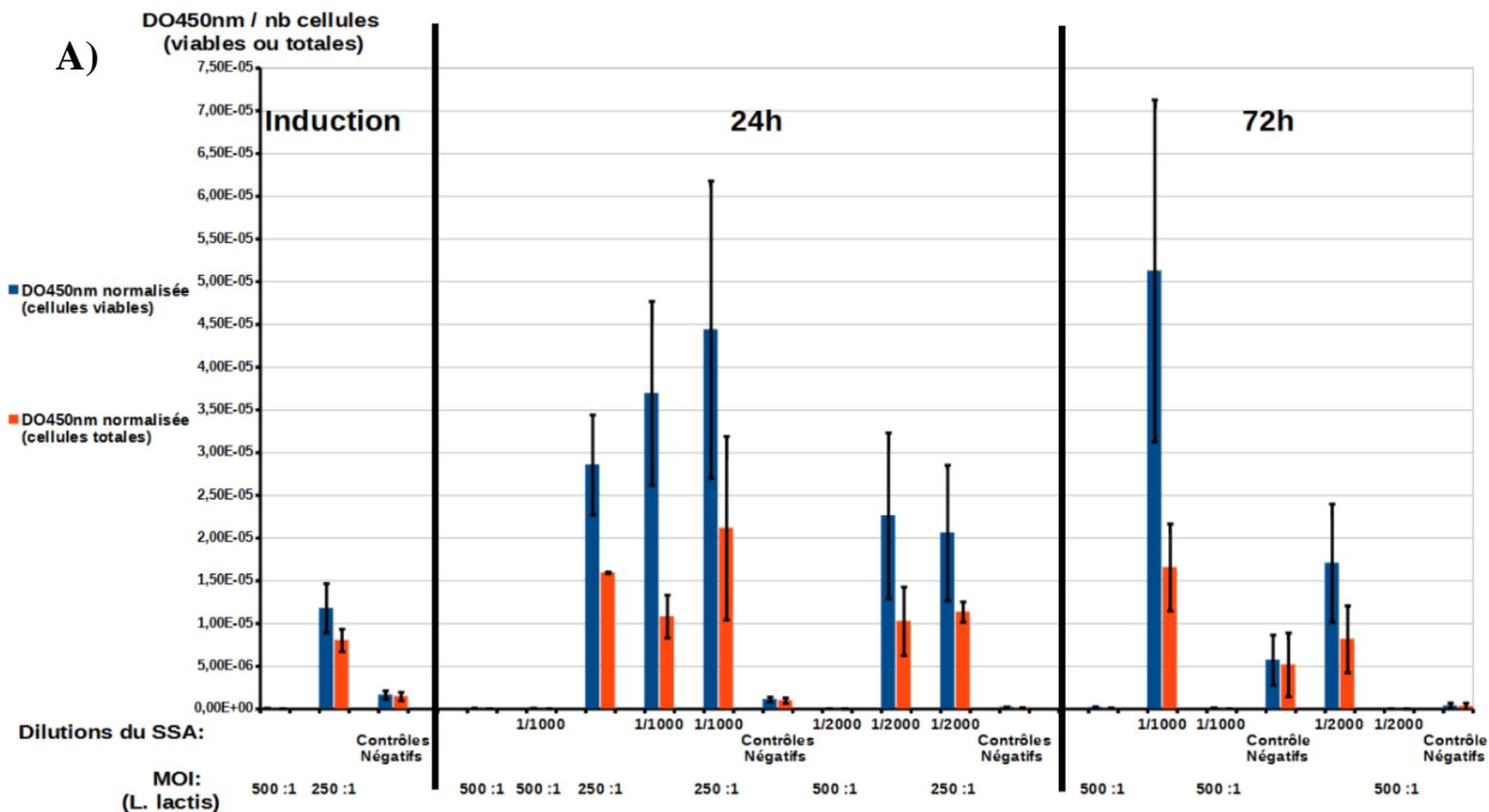
IV – Induction par le probiotique *L. lactis* MG1363 de l'immunité entraînée de cellules THP-1d contre le surnageant de *S. aureus* USA300 :

Les cellules THP-1 utilisées dans cette étude sont des modèles pour l'étude *in vitro* des cellules immunitaires type monocyte macrophage M1/M2. On sait qu'il est possible d'induire l'immunité entraînée dans les monocytes THP-1 contre *S. aureus* (de Homdedeu *et al.*, 2023). Et d'autres ont montré qu'il est possible d'utiliser la mycobactérie *Mycobacterium manresensis* pour induire l'immunité entraînée dans des monocytes contre le SARS-CoV-2 et *S. aureus* (de Homdedeu *et al.*, 2023). Cependant, l'objectif de notre étude cible les infections de souches *S. aureus* multi-résistantes et cherche à identifier les probiotiques lactiques susceptibles d'induire l'immunité entraînée.

Afin d'induire l'immunité entraînée dans les THP-1d, on doit les mettre en contact avec une quantité suffisante de bactéries par cellule. Il a été montré dans un travail précédent du laboratoire d'accueil que *L. lactis* induit l'immunité entraînée dans des cellules non-immunitaires à une MOI d'environ 500 :1 (Chaumond *et al.*, 2023). Nous utiliserons les MOI 500 :1 et 250 :1 afin de réduire de risque de tuer la totalité des THP-1 tout en ajoutant suffisamment de bactéries pour une interaction efficace avec les THP-1d. Les bactéries ont été laissées 4h30 en contact avec les cellules, résultant en une acidification du milieu. Après une

période de repos de 4 jours, nous avons exposé les cellules THP-1d aux dilutions du SSA au 1/1000^e et 1/2000^e.

Nous avons pu réaliser deux essais d'induction de l'immunité innée avec *L. lactis*. La production d'IL-8 a été mesurée. Les THP-1d produisent plus d'IL-8 que d'IL-6 quand exposées au SSA, ce qui a été déterminée par un dosage ELISA réalisés sur les mêmes échantillons que l'expérience précédente. Cependant, la concentration d'IL-8 est trop importante et nécessite une dilution. Nous avons dilué au 1/10^e les échantillons dans de l'ELISPOT afin de pouvoir lire les résultats. Nous avons dû arrêter la réaction enzymatique prématurément car la concentration d'IL-8 était encore trop forte. Nous n'avons donc pas pu utiliser la courbe standard.



B)

DO450nm

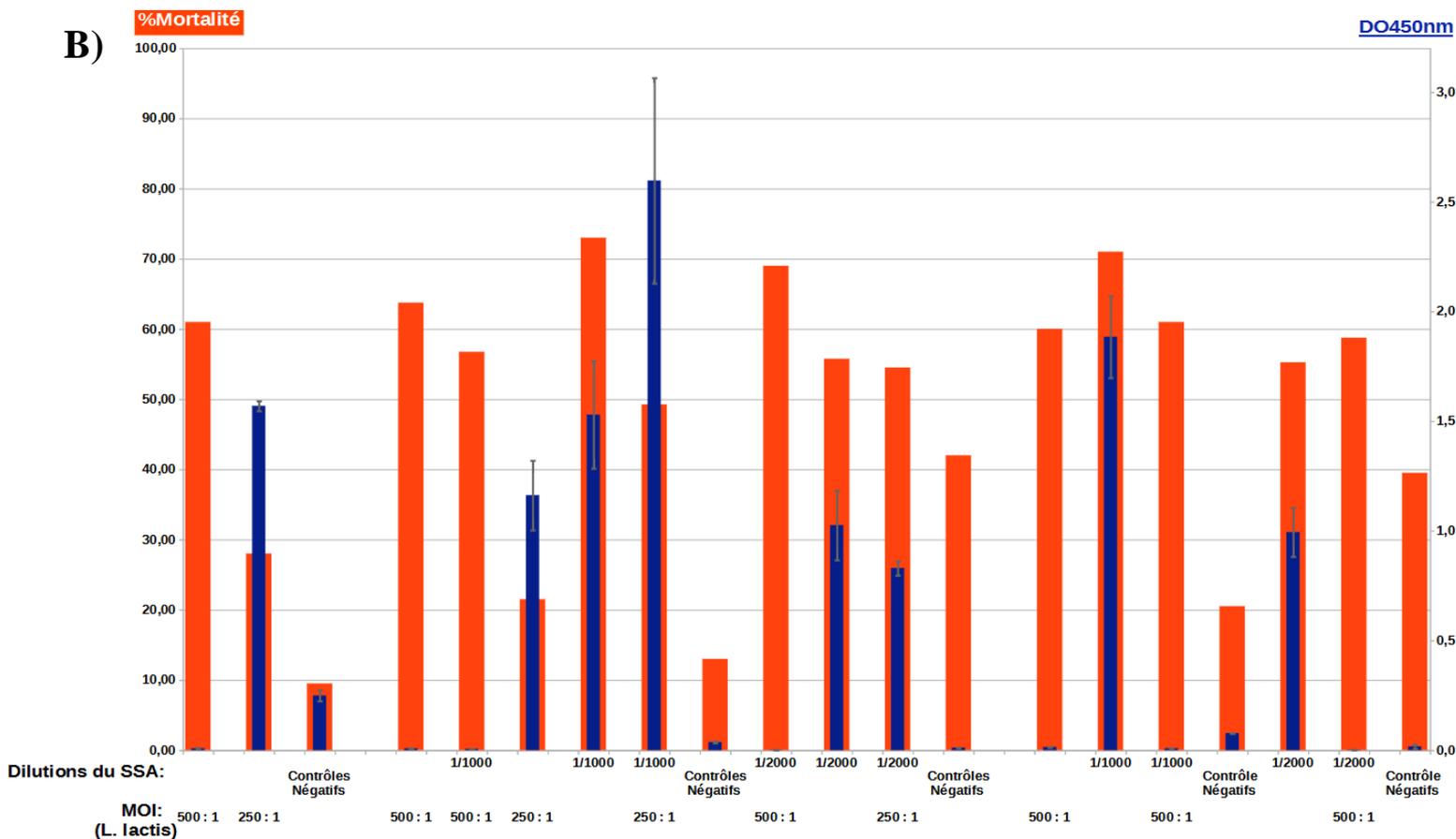


Figure 18. Production d'IL-8 et mortalité des THP-1d en fonction du temps de contact et de la concentration en SSA et bactérie.

(A) Les valeurs présentées sont des moyennes des densités optiques 450nm, normalisées par le nombre de cellules viables (ou totales) pour chaque échantillons (réalisés en duplicatas), elles ne représentent pas de concentration. (B) Le taux de mortalité (axe de droite, orange) est calculé sur les cellules adhérentes et la DO450nm (axe de gauche, bleu) n'est pas normalisée. Les données sont sous forme de moyenne \pm écart-type. Test de Student (correction Bonferroni). ($P < 0,05$ = différence significative).

Nos résultats (Figure 18) indiquent une absence de production d'IL-8 pour les cellules exposées à une MOI de 500 :1, ce qui peut s'expliquer par une mortalité importante. Cependant, avec une MOI de 250 :1, il y a une production d'IL-8 à l'induction, indiquant que les cellules THP-1 survivent avec cette concentration de bactérie. Après 24h en contact avec le SSA dilué au 1/1000e, il semble qu'il y a une production accrue d'IL-8 par les cellules entraînées avec *L. lactis* comparée à celle des cellules non-entraînées.

Cependant, cette différence n'est pas significative et la mortalité des THP-1d est plus haute qu'attendue. Ces résultats demandent à être vérifiés en répétant l'expérience avec une MOI de 250 :1 et la dilution au 1/1000^e du SSA.

Conclusion et perspective :

Nous avons mis au point un modèle d'induction de l'immunité entraînée par *L. lactis* contre *S. aureus* dans les cellules THP-1, dans la continuité du travail de Chaumont *et al.* (Chaumont *et al.*, 2023). Cependant nous avons utilisé les cellules immunitaires THP-1 et un surnageant de *S. aureus* USA300.

Nous avons pu optimiser plusieurs paramètres, tels que le milieu de culture pour les cellules THP-1 et la concentration optimale en PMA pour la différenciation et le maintien de cellules présentant un phénotype type macrophage pendant la durée de l'expérience. De plus, nous avons déterminé les paramètres de croissance de *L. lactis* MG1363. Nous avons également évalué la cytotoxicité du surnageant de *S. aureus* USA300 afin de déterminer les dilutions optimales sans compromettre la survie des cellules. Cela nous a aussi permis de confirmer que le SSA induit bien une réponse des cellules sous la forme d'une production d'IL-6 et d'IL-8 accrue.

Ces résultats corroborent ceux de Zhu *et al.* et Neumann *et al.* qui ont montré l'effet pro-inflammatoire de surnageants bactériens (Zhu *et al.*, 2013)(Neumann *et al.*, 2021)

Finalement, après l'expérience d'induction de l'immunité entraînée, *L. lactis* MG1363 semble capable d'induire une production d'interleukine accrue chez les cellules THP-1d contre les composés du surnageant de *S. aureus*, ce qui suggèrent l'induction de l'immunité entraînée. Les composés sécrétés peuvent contenir des toxines (comme l' α -toxine) et autres facteurs de virulence essentiels à la bactérie lors d'une infection, ainsi que des vésicules extracellulaires impliquées dans l'interaction hôte-pathogène (Cheung *et al.*, 2021a; Uppu *et al.*, 2023). Or, ces molécules et vésicules diffusent dans les tissus voisins des sites infectés et peuvent donc facilement entrer en contact avec des cellules de l'immunité innée. L'amplification de la réponse des cellules immunitaires contre les composés excrétés de *S. aureus* diminuerait l'efficacité de ses stratégies d'évasion du système immunitaire et réduirait globalement le risque d'infection.

Des données supplémentaires sont nécessaires pour confirmer la significativité des différences observées dans la production de cytokine. Il faut reproduire l'expérience afin d'affiner notre analyse statistique.

Notre modèle d'induction de l'immunité entraînée permettra de tester différentes bactéries probiotiques afin d'identifier celles capables d'induire le plus efficacement l'immunité

entraînée dans les THP-1d. Les résultats devront être confirmés avec une autre lignée cellulaire (comme la lignée U937 (Córdova-Dávalos *et al.*, 2023)) suivit par une expérience sur les cellules d'une culture primaire. Cela nous permettra de tester les probiotiques identifiés, dans une expérience *in vivo* avant de lancer les essais cliniques.

L'analyse de la production d'autres cytokines pro-inflammatoires (comme le TNF- α), ainsi que des mécanismes impliqués dans la réponse accrue des cellules THP-1d sera requise. Il serait intéressant d'analyser le métabolisme des cellules entraînées, on s'attend notamment à observer une amplification de la glycolyse et de l'accumulation de métabolites du cycle des TCA (Acides TriCarboxyliques) comme le fumarate, le malate et le citrate (ter Steeg *et al.*, 2021). Les cellules consomment plus de glucose, d'oxygène et produisent plus de lactate, ce qui pourrait être mesuré afin d'établir combien de temps perdurent ces modifications métaboliques.

Il faudra également étudier les modifications épigénétiques subies par les cellules THP-1d, comme la méthylation de l'ADN et les modifications octamères d'histones (comme l'acétylation) qui sont parmi les marqueurs de modification épigénétique les mieux caractérisés et étudiés (Stoll *et al.*, 2018; Feng and Lou, 2019). Il serait judicieux de mesurer l'impact d'une grande variété de marqueurs associés à des gènes liés à la réponse immunitaire, afin d'identifier précisément les mécanismes moléculaires à l'origine de ces modifications.

L'une des applications possibles de cette étude est l'utilisation des probiotiques induisant l'immunité entraînée afin de renforcer les défenses immunitaires de patients contre les infections de *S. aureus*. Une prévention qui serait utile avant une opération chirurgicale et diminuerait le risque de développer une infection nosocomiale.

Cette approche permettrait de lutter contre la résistance aux antibiotiques et de réduire l'utilisation d'antibiotiques, réduisant les risques d'émergences de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques.

La compréhension des mécanismes par lesquels les probiotiques testés induisent l'immunité entraînée dans les cellules THP-1 et l'identification des molécules provenant des probiotiques susceptibles d'induire l'immunité entraînée permettrait le développement de traitements préventifs plus efficaces et moins coûteux.

Bibliographie :

Adams, K., Weber, K.S., and Johnson, S.M. (2020) Exposome and Immunity Training: How Pathogen Exposure Order Influences Innate Immune Cell Lineage Commitment and Function. *Int J Mol Sci* **21**: 8462.

Atri, C., Guerfali, F.Z., and Laouini, D. (2018) Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *Int J Mol Sci* **19**: 1801.

Baines, A.C., and Brodsky, R.A. (2017) Complementopathies. *Blood Reviews* **31**: 213–223 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268960X1630056X>. Accessed January 31, 2024.

Beck, B.R., Song, J.H., Park, B.S., Kim, D., Kwak, J.-H., Do, H.K., *et al.* (2016) Distinct immune tones are established by *Lactococcus lactis* BFE920 and *Lactobacillus plantarum* FGL0001 in the gut of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish & Shellfish Immunology* **55**: 434–443 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464816303825>. Accessed June 3, 2024.

Bonilla, F.A., and Oettgen, H.C. (2010) Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol* **125**: S33-40.

Cahill, T.J., Baddour, L.M., Habib, G., Hoen, B., Salaun, E., Pettersson, G.B., *et al.* (2017) Challenges in Infective Endocarditis. *J Am Coll Cardiol* **69**: 325–344.

Campos, B., Pickering, A.C., Rocha, L.S., Aguilar, A.P., Fabres-Klein, M.H., Oliveira Mendes, T.A. de, *et al.* (2022) Diversity and pathogenesis of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis: current understanding and future perspectives. *BMC Veterinary Research* **18**: 115 <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03197-5>. Accessed January 5, 2024.

Cao, R., Thatavarty, A., and King, K.Y. (2024) Forged in the Fire: Lasting Impacts of Inflammation on Hematopoietic Progenitors. *Experimental Hematology* 104215 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301472X24000742>. Accessed April 9, 2024.

Cavanagh, D., Fitzgerald, G.F., and McAuliffe, O. (2015) From field to fermentation: The origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. *Food Microbiology* **47**: 45–61 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002014002615>. Accessed June 6, 2024.

Chanput, W., Reitsma, M., Kleinjans, L., Mes, J.J., Savelkoul, H.F.J., and Wichers, H.J. (2012) β -Glucans are involved in immune-modulation of THP-1 macrophages. *Molecular Nutrition & Food Research* **56**: 822–833 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mnfr.201100715>. Accessed June 5, 2024.

Chapman, J., and Zhang, Y. (2024) Histology, Hematopoiesis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534246/>. Accessed May 29, 2024.

Chaumond, E., Peron, S., Daniel, N., Le Gouar, Y., Guédon, É., Williams, D.L., *et al.* (2023) Development of innate immune memory by non-immune cells during *Staphylococcus aureus* infection depends on reactive oxygen species. *Front Immunol* **14**: 1138539.

Cheung, G., Bae, J., and Otto, M. (2021) Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence* **12**: 547–569.

Córdova-Dávalos, L.E., Cervantes-García, D., Ballona-Alba, M.F., Santos-López, A., Esquivel-Basaldúa, A.S., Gallegos-Alcalá, P., *et al.* (2023) Protective Effect of Glycomacropeptide on the Inflammatory Response of U937 Macrophages. *Foods* **12**: 1528.

Daigneault, M., Preston, J.A., Marriott, H.M., Whyte, M.K.B., and Dockrell, D.H. (2010) The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages. *PLOS ONE* **5**: e8668
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0008668>. Accessed June 6, 2024.

Dikiy, S., and Rudensky, A.Y. (2023) Principles of regulatory T cell function. *Immunity* **56**: 240–255.

Elean, M., Albarracín, L., Cataldo, P.G., Londero, A., Kitazawa, H., Saavedra, L., *et al.* (2020) New immunobiotics from highly proteolytic *Lactobacillus delbrueckii* strains: their impact on intestinal antiviral innate immune response. *Benef Microbes* **11**: 375–390.

Feng, L., and Lou, J. (2019) DNA Methylation Analysis. *Methods Mol Biol* **1894**: 181–227.

Fisher, J.F., and Mobashery, S. (2021) β -Lactams against the Fortress of the Gram-Positive *Staphylococcus aureus* Bacterium. *Chem Rev* **121**: 3412–3463
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8653850/>. Accessed January 5, 2024.

Fowler, V.G., Miro, J.M., Hoen, B., Cabell, C.H., Abrutyn, E., Rubinstein, E., *et al.* (2005) *Staphylococcus aureus* endocarditis: a consequence of medical progress. *JAMA* **293**: 3012–3021.

G Abril, A., G Villa, T., Barros-Velázquez, J., Cañas, B., Sánchez-Pérez, A., Calo-Mata, P., and Carrera, M. (2020) *Staphylococcus aureus* Exotoxins and Their Detection in the Dairy Industry and Mastitis. *Toxins (Basel)* **12**: 537.

Gill, H.S., Rutherford, K.J., Prasad, J., and Gopal, P.K. (2000) Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Br J Nutr* **83**: 167–176.

Graber, H., and Bodmer, M. (2019) [*Staphylococcus aureus* and its genotypes as a mastitis pathogen in dairy cattles - a review]. *Schweiz Arch Tierheilkd* **161**: 611–617.

Gupta, V., and Garg, R. (2009) Probiotics. *Indian J Med Microbiol* **27**: 202–209.

Heijden, C.D.C.C. van der, Noz, M.P., Joosten, L.A.B., Netea, M.G., Riksen, N.P., and Keating, S.T. (2018) Epigenetics and Trained Immunity. *Antioxid Redox Signal* **29**: 1023–1040
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6121175/>. Accessed January 5, 2024.

- Homdedeu, M. de, Sanchez-Moral, L., Violán, C., Ràfols, N., Ouchi, D., Martín, B., *et al.* (2023) *Mycobacterium manresensis* induces trained immunity in vitro. *iScience* **26**: 106873 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2589004223009501>. Accessed June 5, 2024.
- Howden, B.P., Giulieri, S.G., Wong Fok Lung, T., Baines, S.L., Sharkey, L.K., Lee, J.Y.H., *et al.* (2023) Staphylococcus aureus host interactions and adaptation. *Nat Rev Microbiol* **21**: 380–395.
- Ifrim, D.C., Quintin, J., Joosten, L.A.B., Jacobs, C., Jansen, T., Jacobs, L., *et al.* (2014) Trained Immunity or Tolerance: Opposing Functional Programs Induced in Human Monocytes after Engagement of Various Pattern Recognition Receptors. *Clinical and Vaccine Immunology* **21**: 534–545 <https://journals.asm.org/doi/10.1128/cvi.00688-13>. Accessed June 11, 2024.
- Jenthó, E., Ruiz-Moreno, C., Novakovic, B., Kourtzelis, I., Megchelenbrink, W.L., Martins, R., *et al.* (2021) Trained innate immunity, long-lasting epigenetic modulation, and skewed myelopoiesis by heme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **118**: e2102698118.
- Kadomoto, S., Izumi, K., and Mizokami, A. (2021) Macrophage Polarity and Disease Control. *Int J Mol Sci* **23**: 144.
- Lai, H.-H., Chiu, C.-H., Kong, M.-S., Chang, C.-J., and Chen, C.-C. (2019) Probiotic Lactobacillus casei: Effective for Managing Childhood Diarrhea by Altering Gut Microbiota and Attenuating Fecal Inflammatory Markers. *Nutrients* **11**: 1150.
- Liu, T., Huang, T., Li, J., Li, A., Li, C., Huang, X., *et al.* (2023) Optimization of differentiation and transcriptomic profile of THP-1 cells into macrophage by PMA. *PLOS ONE* **18**: e0286056 <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0286056>. Accessed June 6, 2024.
- Luo, W.-W., Tong, Z., Cao, P., Wang, F.-B., Liu, Y., Zheng, Z.-Q., *et al.* (2022) Transcription-independent regulation of STING activation and innate immune responses by IRF8 in monocytes. *Nat Commun* **13**: 4822.
- Masters, E.A., Ricciardi, B.F., Bentley, K.L. de M., Moriarty, T.F., Schwarz, E.M., and Muthukrishnan, G. (2022) Skeletal infections: microbial pathogenesis, immunity and clinical management. *Nat Rev Microbiol* **20**: 385–400.
- Mege, J.-L., and Capo, C. (2010) La polarisation des macrophages, le noeud gordien des infections bactériennes ? *Med Sci (Paris)* **26**: 83–88 <https://www.medicinesciences.org/articles/medsci/abs/2010/02/medsci2010261p83/medsci2010261p83.html>. Accessed May 24, 2024.
- Merle, N.S., Church, S.E., Fremeaux-Bacchi, V., and Roumenina, L.T. (2015a) Complement System Part I – Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Frontiers in Immunology* **6** <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2015.00262>. Accessed January 9, 2024.
- Merle, N.S., Noe, R., Halbwachs-Mecarelli, L., Fremeaux-Bacchi, V., and Roumenina, L.T. (2015b) Complement System Part II: Role in Immunity. *Front Immunol* **6**: 257.

Mitroulis, I., Ruppova, K., Wang, B., Chen, L.-S., Grzybek, M., Grinenko, T., *et al.* (2018) Modulation of Myelopoiesis Progenitors Is an Integral Component of Trained Immunity. *Cell* **172**: 147-161.e12.

Neumann, A., Happonen, L., Karlsson, C., Bahnan, W., Frick, I.-M., and Björck, L. (2021) Streptococcal protein SIC activates monocytes and induces inflammation. *iScience* **24**: 102339 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2589004221003072>. Accessed June 4, 2024.

Ochando, J., Mulder, W.J.M., Madsen, J.C., Netea, M.G., and Duivenvoorden, R. (2023) Trained immunity - basic concepts and contributions to immunopathology. *Nat Rev Nephrol* **19**: 23–37.

Ogino, T., and Takeda, K. (2023) Immunoregulation by antigen-presenting cells in human intestinal lamina propria. *Front Immunol* **14**: 1138971.

Pimentel de Araujo, F., Monaco, M., Del Grosso, M., Pirolo, M., Visca, P., and Pantosti, A. (2021) Staphylococcus aureus clones causing osteomyelitis: a literature review (2000-2020). *J Glob Antimicrob Resist* **26**: 29–36.

Quintin, J., Saeed, S., Martens, J.H.A., Giamarellos-Bourboulis, E.J., Ifrim, D.C., Logie, C., *et al.* (2012) *Candida albicans* Infection Affords Protection against Reinfection via Functional Reprogramming of Monocytes. *Cell Host & Microbe* **12**: 223–232 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1931312812002326>. Accessed June 11, 2024.

Rasmussen, K.H., and Hawkins, C.L. (2022) Role of macrophage extracellular traps in innate immunity and inflammatory disease. *Biochem Soc Trans* **50**: 21–32.

Rosowski, E.E. (2020) Determining macrophage versus neutrophil contributions to innate immunity using larval zebrafish. *Dis Model Mech* **13**: dmm041889.

Saeed, S., Quintin, J., Kerstens, H.H.D., Rao, N.A., Aghajani-refah, A., Matarese, F., *et al.* (2014) Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science* **345**: 1251086.

Saleena, L.A.K., Teo, M.Y.M., How, Y.H., In, L.L.A., and Pui, L.P. (2023) Immunomodulatory action of *Lactococcus lactis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **135**: 1–9 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172322003371>. Accessed June 6, 2024.

Sánchez-Ramón, S., Conejero, L., Netea, M.G., Sancho, D., Palomares, Ó., and Subiza, J.L. (2018) Trained Immunity-Based Vaccines: A New Paradigm for the Development of Broad-Spectrum Anti-infectious Formulations. *Front Immunol* **9** <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2018.02936/full>. Accessed May 29, 2024.

Sniffen, J.C., McFarland, L.V., Evans, C.T., and Goldstein, E.J.C. (2018) Choosing an appropriate probiotic product for your patient: An evidence-based practical guide. *PLoS One* **13**: e0209205.

Steeg, L. ter, Domínguez-Andrés, J., Netea, M.G., Joosten, L.A.B., and Crevel, R. van (2021) Trained Immunity as a Preventive Measure for Surgical Site Infections. *Clinical Microbiology Reviews* **34**: e00049-21 <https://journals.asm.org/doi/10.1128/cmr.00049-21>. Accessed May 3, 2024.

Stoll, S., Wang, C., and Qiu, H. (2018) DNA Methylation and Histone Modification in Hypertension. *Int J Mol Sci* **19**: 1174.

Suzuki, H., Jounai, K., Ohshio, K., Fujii, T., and Fujiwara, D. (2018) Administration of plasmacytoid dendritic cell-stimulative lactic acid bacteria enhances antigen-specific immune responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **503**: 1315–1321 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X18315377>. Accessed January 15, 2024.

Takeuchi, O., and Akira, S. (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**: 805–820.

Tong, S.Y.C., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., and Fowler, V.G. (2015) Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clin Microbiol Rev* **28**: 603–661 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4451395/>. Accessed January 5, 2024.

Torre, C., Tsoumtsa, L.L., and Ghigo, É. (2017) La mémoire immunitaire entraînée chez les invertébrés - Que sait-on ? *Med Sci (Paris)* **33**: 979–983 <https://www.medecinesciences.org/articles/medsci/abs/2017/10/medsci20173311p979/medsci20173311p979.html>. Accessed January 9, 2024.

Tulk, S.E., Liao, K.-C., Muruve, D.A., Li, Y., Beck, P.L., and MacDonald, J.A. (2015) Vitamin D3 Metabolites Enhance the NLRP3-Dependent Secretion of IL-1 β From Human THP-1 Monocytic Cells. *Journal of Cellular Biochemistry* **116**: 711–720 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcb.24985>. Accessed June 5, 2024.

Turner, N.A., Sharma-Kuinkel, B.K., Maskarinec, S.A., Eichenberger, E.M., Shah, P.P., Carugati, M., *et al.* (2019) Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol* **17**: 203–218.

Uppu, D.S., Wang, X., and Lee, J.C. (2023) Contribution of Extracellular Membrane Vesicles To the Secretome of Staphylococcus aureus. *mBio* **14**: e0357122.

Urish, K.L., and Cassat, J.E. (2020) Staphylococcus aureus Osteomyelitis: Bone, Bugs, and Surgery. *Infect Immun* **88**: e00932-19.

Van Dijk, A., Anten, J., Bakker, A., Evers, N., Hoekstra, A.T., Chang, J.-C., *et al.* (2022) Innate Immune Training of Human Macrophages by Cathelicidin Analogs. *Front Immunol* **13**: 777530 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.777530/full>. Accessed May 29, 2024.

Vinci, M.C., Costantino, S., Damiano, G., Rurali, E., Rinaldi, R., Vigorelli, V., *et al.* (2024) Persistent epigenetic signals propel a senescence-associated secretory phenotype and trained innate immunity in CD34+ hematopoietic stem cells from diabetic patients. *Cardiovasc Diabetol* **23**: 107.

Wu, F., Xie, X., Du, T., Jiang, X., Miao, W., and Wang, T. (2023) *Lactococcus lactis*, a bacterium with probiotic functions and pathogenicity. *World J Microbiol Biotechnol* **39**: 325.

Yunna, C., Mengru, H., Lei, W., and Weidong, C. (2020) Macrophage M1/M2 polarization. *Eur J Pharmacol* **877**: 173090.

Zhu, C., Qin, H., Cheng, T., Tan, H.-L., Guo, Y.-Y., Shi, S.-F., *et al.* (2013) *Staphylococcus aureus* supernatant induces the release of mouse β -defensin-14 from osteoblasts via the p38 MAPK and NF- κ B pathways. *International Journal of Molecular Medicine* **31**: 1484–1494 <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2013.1346>. Accessed June 4, 2024.

Résumés / Abstracts :

Mots-clés : Immunité entraînée, *S. aureus* USA300, probiotiques, THP-1, screening.

L'immunité entraînée désigne la réponse amplifiée de l'immunité innée à un stimulus précédé d'une induction avec un antigène indépendant. Ce changement est causé par des modifications épigénétiques et métaboliques liées à des gènes impliqués dans la réponse immunitaire. Cette étude *In vitro* vise à identifier des bactéries probiotiques lactiques capables d'induire l'immunité entraînée contre des infections de *S. aureus*. Nous utilisons des cellules leucémiques monocytiques THP-1 différenciées en cellules macrophage-like comme modèle de l'immunité innée. La cible de la réponse immunitaire des THP-1d est un surnageant de *S. aureus* USA300. En utilisant un probiotique, ici *L. lactis*, comme inducteur, nous pouvons comparer la production de cytokine IL-6 entre des cellules entraînées et non-entraînées. Durant ce travail, nous avons fait la mise au point du protocole de screening des bactéries lactiques et réalisé un premier essai avec *L. lactis*.

Key-words : Trained immunity, *S. aureus* USA300, probiotics, THP-1, screening.

Trained immunity refers to an amplified innate immune response against a stimulus primed by an unrelated antigen. This altered response is caused by epigenetic and metabolic modifications linked to innate immune response genes. This *in vitro* study aims to identify probiotics lactic bacteria capable of inducing trained immunity against *S. aureus* infections. Our models for the innate immune response are leukemic monocytic cells THP-1 differentiated into macrophage-like cells. The target of the differentiated THP-1 immune response is a supernatant of *S. aureus* USA300. By using a probiotic, here *L. lactis*, as an inductor, we can compare cytokine IL-6 production between trained and untrained cells. During this work, we developed the screening protocol for lactic bacteria and tested it with *L. lactis*.