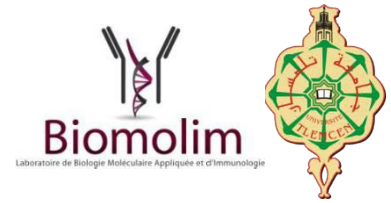


**TLEMCEM**  
**N° d'Ordre XXXXX**



**UNIVERSITÉ DE TLEMCEM – ABOU-BEKRBELKAÏD**  
**FACULTÉ SNV-STU – DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE**

**LABORATOIRE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE APPLIQUEE ET IMMUNOLOGIE - BIOMOLIM**

**THÈSE**

présentée pour l'obtention du grade de  
**Docteur 3<sup>ème</sup> Cycle LMD en Biologie**  
**Spécialité Immunologie Appliquée**

par :

**Sara DAHOU épouse BERRAYAH**

**Soutenue publiquement le 03 Juillet 2023**

***Intitulé :***

**Effets de la vitamine C sur la réponse immunitaire/inflammatoire par les cellules endothéliales au cours de l'infection à *Staphylococcus aureus***

**Jury**

<b>Pr. ARIBI Mourad</b>	Université de Tlemcen, Algérie	Président
<b>Pr. SMAHI Mohammed ChemsEddine</b>	Université de Tlemcen, Algérie	Dir.de Thèse
<b>Pr. TOUIL-BOUKOFFA Chafia</b>	USTHB, Algérie	Examinatrice
<b>Pr. BELLOU Abdelouahab</b>	Guangdong Academy of Medical Sciences, China	Examinateur
<b>Dr. MENNECHET Franck</b>	Université de Montpellier, France	Examinateur

## Résumé

**Introduction :** *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) est une bactérie opportuniste fréquemment responsable d'infections sévères et récurrentes. Les cellules endothéliales (CEs) se situent en première ligne des défenses immunitaires contre *S. aureus* mais représentent aussi l'un des principaux moyens de dissémination de l'infection. La vitamine C (acide ascorbique, AsCH<sub>2</sub>) est largement impliquée dans l'immunité contre l'inflammation chronique, où elle joue un rôle immunostimulant, anti-inflammatoire et antibactérien. Dans ce contexte, l'effet *ex-vivo* de l'AsCH<sub>2</sub> a été évalué sur des cellules endothéliales primaires au cours de l'infection à *S.aureus*.

**Matériels et méthodes:** Les CEs ont été isolées à partir de la veine du cordon ombilical humain (HUVECs), après trois passages, les cellules ont été infectées ou non par *S. aureus*, puis traitées ou non par l'AsCH<sub>2</sub>. Les expériences ont été effectuées sur des cellules isolées, des surnageants de culture cellulaire et des lysats de cellules.

**Résultats:** Le traitement par AsCH<sub>2</sub> a induit une baisse remarquable de la production du monoxyde d'azote (NO) et une augmentation modérée de l'activité de l'arginase chez les HUVECs infectées par *S. aureus* ( $p < 0,05$  et  $p > 0,05$  respectivement). Bien que les niveaux de sécrétion des molécules d'adhésion sICAM-1 (sCD54) et sE-sélectine (sCD62E) n'étaient pas significativement différentes entre les HUVECs infectées traitées et celles infectées non traitées, le traitement par AsCH<sub>2</sub> pourrait exercer un effet inverse sur sICAM-1 par rapport aux HUVECs contrôles non infectées. De plus, le traitement par AsCH<sub>2</sub> semble avoir un effet significatif sur la prévention de la nécrose HUVEC induite par l'infection à *S. aureus* ( $p < 0,05$ ). Ainsi, AsCH<sub>2</sub> a augmenté significativement l'activité redox protectrice chez les cellules infectées, comme le montre l'activité du superoxyde dismutase (SOD) ( $p < 0,05$ ). L'infection par *S. aureus* a induit une diminution considérable de concentrations d'ions de calcium liés totaux ( ${}_b\text{Ca}^{2+}$ ) par rapport aux HUVECs contrôles, tandis que le traitement par AsCH<sub>2</sub> a entraîné une légère augmentation des concentrations de  ${}_b\text{Ca}^{2+}$  dans les HUVECs infectées par rapport aux HUVECs infectées et non traitées ( $p > 0,05$ ). De plus, le traitement par AsCH<sub>2</sub> a baissé l'élévation de cholestérol cellulaire total ( ${}_{\text{cc}}\text{CHOL}$ ) intracellulaire induite par l'infection à *S. aureus* ( $p < 0,05$ ). Par ailleurs, l'AsCH<sub>2</sub> a contre régulé l'augmentation des niveaux d'iGLU générés lors de l'infection à *S. aureus* ( $p < 0,05$ ). De plus, il a significativement décru la croissance de *S. aureus* ( $p < 0,05$ ) et il a significativement augmenté son internalisation et sa lyse intracellulaire par HUVEC ( $p < 0,05$ ), ainsi, l'AsCH<sub>2</sub> a induit l'activation du cycle cellulaire des HUVECs ( $p < 0,01$ ). Enfin, le traitement par AsCH<sub>2</sub> a réduit la production d'IL-6 et d'IL-1 $\beta$  chez les HUVEC infectées par *S. aureus* ( $p > 0,05$  et  $p < 0,05$  respectivement).

**Conclusions :** Nos résultats démontrent qu'au cours de l'infection à *S. aureus*, le traitement par AsCH<sub>2</sub> favorise la survie, améliore les activités fonctionnelles des EC humains, et prévient l'exacerbation de la réponse inflammatoire, tout en induisant l'augmentation de l'activité bactéricide des HUVECs.

**Mots clé :** Activité bactéricide; activités fonctionnelles et survie des CE; cellules endothéliales; effet immunomodulateur; infection à *S.aureus*; vitamine C; réponse immunitaire/inflammatoire.

**Abstract**

**Introduction:** *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is an opportunistic bacterium frequently responsible for severe and recurrent infections. Endothelial cells (ECs) are one of the first lines of immune defenses against *S. aureus* but are also one of the main means of spreading the infection, leading to persistent chronic infections associated with endothelial dysfunction. Vitamin C (ascorbic acid, AsCH<sub>2</sub>) is widely involved in immunity against chronic inflammation, where it plays an immunostimulant, anti-inflammatory and antibacterial role. Here, we studied the *ex vivo* effects of AsCH<sub>2</sub> on primary endothelial cells during *S. aureus* infection.

**Material and Methods:** ECs were isolated from the human umbilical cord vein (HUVECs), after three passages, cells were infected or not with *S. aureus*, then treated or not with AsCH<sub>2</sub>, experiments were carried out on isolated cells, cell culture supernatants and cell lysates.

**Results:** AsCH<sub>2</sub> treatment induced a marked downregulation of NO production and a moderate upregulation of arginase activity in *S. aureus*-infected HUVECs (respectively,  $p < 0.05$  and  $p > 0.05$ ). Although the upregulated release levels of sICAM-1 (sCD54) and sE-selectin (sCD62E) were not significantly different between treated and untreated *S. aureus*-infected HUVECs, AsCH<sub>2</sub> treatment induced reversing effect on sICAM-1 release when comparing to uninfected control HUVECs. Moreover, AsCH<sub>2</sub> treatment appears to have a significant effect on preventing HUVEC necrosis induced by *S. aureus* infection ( $p < 0.05$ ). Furthermore, AsCH<sub>2</sub> treatment induced a significant upregulation of cell protective redox biomarker in *S. aureus*-infected, as shown by superoxide dismutase (SOD) activity ( $p < 0.05$ ), but not by catalase activity ( $p > 0.05$ ). Additionally, AsCH<sub>2</sub> treatment induced a slight upregulation of  ${}^b\text{Ca}^{2+}$  levels in infected HUVECs as compared to infected and untreated HUVECs ( $p > 0.05$ ). On the other hand, AsCH<sub>2</sub> treatment downregulated increased total cellular cholesterol content ( ${}_{\text{tcc}}\text{CHOL}$ ) levels in HUVECs induced by *S. aureus* infection ( $p < 0.05$ ). In addition, AsCH<sub>2</sub> treatment markedly reversed *S. aureus* effect on upregulation of  ${}^i\text{GLU}$  levels within infected HUVECs ( $p < 0.05$ ). Moreover, AsCH<sub>2</sub> treatment significantly downregulated *S. aureus* growth ( $p < 0.05$ ), and significantly upregulated bacterial internalization and intracellular killing by HUVECs ( $p < 0.05$ ), as well as their cell cycle activation ( $p < 0.01$ ). Finally, AsCH<sub>2</sub> treatment has a slight effect on the production of IL-6, but induced a marked downregulation of that of IL-1 $\beta$  in *S. aureus*-infected HUVECs (respectively,  $p > 0.05$ , and  $p < 0.05$ ).

**Conclusions:** Our outcomes demonstrated that, during *S. aureus* infection, vitamin C treatment promotes human ECs survival and function, as well as prevents inflammatory response exacerbation, while inducing bactericidal activity.

**Keywords:** Bactericidal activity; endothelial cells; EC survival and functional activities; Inflammatory/immune response; Immunomodulatory effect; *S. aureus* infection; vitamin C.

## ملخص

## مقدمة:

تعد المكورات العنقودية الذهبية (*S. aureus*) من البكتيريا المسببة للعدوى الشديدة والمتكررة في غالب الأحيان. تنصدر الخلايا الباطنية الدفاع المناعي ضد المكورات العنقودية الذهبية لكنها تمثل أيضا إحدى الوسائل الرئيسية لنشر وتفشي العدوى المزمنة مرفوقة بخلل وظائف الخلايا الباطنية. يشارك فيتامين سي (حمض الأسكوربيك، AsCH2) على نطاق واسع في المناعة ضد الالتهاب المزمن حيث يلعب دورا هاما في تحسين المناعة ويعتبر كمضاد للالتهابات وكذا مضاد للبكتيريا. في هذه الأطروحة، درسنا تأثير حمض الأسكوربيك على الخلايا الباطنية خلال العدوى بالمكورات العنقودية الذهبية.

## الطرق والمواد:

لقد تم دراسة تأثير فيتامين سي (حمض الأسكوربيك، AsCH2) على الخلايا الباطنية الأولية بعد اصابتها بالمكورات العنقودية الذهبية وذلك باستخدام نموذج الخلايا الباطنية لأوردة الحبل السري البشري و اصابتها بالمكورات العنقودية الذهبية (ATCC 29523).

## النتائج:

المعالجة بـ حمض الأسكوربيك (AsCH2) قام بخفض واضح لمستوى أول أكسيد النيتروجين (NO) و رفع طفيف لمستوى Arginase في الخلايا الباطنية المصابة بالبكتيريا. رغم أن مستويات طرح جزيئات الالتصاق (Eselectin, ICAM-1) لم تكن مختلفة بين الخلايا المصابة و الغير المصابة و لكن المعالجة بـ حمض الأسكوربيك أثر تأثيرا عكسيا مقارنة بالخلايا الشاهدة. و زيادة على ذلك، المعالجة بـ AsCH2 أثر تأثيرا هاما في حماية الخلايا الباطنية من الموت و النخر الناتج خلال الإصابة بالبكتيريا *S. aureus*.

أدى العلاج بـ AsCH2 بإحداث زيادة ملحوظة في النشاط الوظيفي الحيوي الوقائي للخلايا المصابة، كما تسببت العدوى بـ *S. aureus* في انخفاض إجمالي في تركيز أيونات الكالسيوم المرتبطة ( $Ca^{2+}$ ) مقارنة مع الخلايا الغير المصابة و الغير المعالجة كما أدى العلاج بـ خفض المستوى المرتفع للكوليسترول الخلوي الكلي (CHOL) الناتج عن عدوى المكورات العنقودية الذهبية.

و بالإضافة الى ذلك، تبين أن العلاج بـ AsCH2 ينظم و يثبط الزيادة في مستويات الغلوكوز الخلوي الذي نتج خلال الإصابة بالبكتيريا (*S. aureus*)، و بالإضافة الى ذلك أدى العلاج الى خفض نمو البكتيريا و زاد الى حد كبير من قدرة الخلايا على بلعمة البكتيريا و كذا قتلها داخل الخلية و كذا تحفيز عملية و دورة الخلايا و أخيرا فان العلاج أدى الى انخفاض في مستوى إنتاج IL-6 و IL-1 $\beta$  في الخلايا الباطنية المصابة بـ *S. aureus*.

## خلاصة:

ان النتائج تبين أن خلال الإصابة ببكتيريا المكورات العنقودية الذهبية، العلاج بفيتامين سي يعزز بقاء الخلايا و يحسن النشاط الوظيفي للخلايا الباطنية للانسان و يمنع تفاقم الاستجابة الالتهابية وذلك بتحفيز النشاط المضاد للبكتيريا داخل الخلية.

## كلمات البحث:

فيتامين سي، الخلايا الباطنية، الاستجابة الالتهابية، القدرة على قتل البكتيريا، النشاط الوظيفي، القدرة على الحياة، الإصابة بعدوى المكورات العنقودية الذهبية

## Remerciements

Le présent travail rentre dans le cadre de l'obtention du diplôme de Docteur 3ème Cycle LMD en Biologie, spécialité Immunologie Appliquée. Toutes les expérimentations ont été réalisées au sein du laboratoire de Biologie moléculaire appliquée et d'Immunologie (BIOMOLIM), sous la direction de Monsieur le Professeur Mourad ARIBI.

A l'issue de ce travail, je tiens à adresser mes plus sincères remerciements au Pr. Mohammed Chems Eddine SMAHI (Université de Tlemcen), mon Directeur de Thèse, pour sa gentillesse, sa disponibilité permanente et pour les nombreux encouragements qu'il m'a prodigués. Merci infiniment d'avoir dirigé cette thèse et pour vos précieuses instructions qui m'ont énormément servie.

Je tiens à remercier, tout particulièrement, Monsieur le Pr. Mourad ARIBI. Merci vivement pour votre aide, votre disponibilité, votre dynamisme et vos précieux conseils. Merci de partager avec nous votre expertise, vos brillantes intuitions et vos profondes connaissances en immunologie. J'ai eu de la chance d'avoir une formation doctorale aussi riche et pertinente qu'innovante. Au cours de ces dernières années, j'ai évolué en tant que scientifique et en tant que personne, non seulement grâce à la formation que vous m'avez fournie, mais aussi grâce aux défis auxquels vous m'avez poussé à me confronter. Je ne serai pas là où je suis actuellement sans vos encouragements, votre rigueur, votre orientation et votre confiance. Merci de m'avoir poussée à isoler les cellules endothéliales primaires pour la première fois et de m'avoir donné l'opportunité de travailler la totalité des expérimentations au niveau de votre laboratoire.

Je voudrais également remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'ausculter ma Thèse et en acceptant d'en être les rapporteurs, à savoir Madame la Pr. Chafia TOUIL-BOUKOFFA (USTHB), Monsieur le Pr. Abdelouahab BELLOU (Université de Harvard, Boston, USA) et Monsieur le Pr. Franck MENNECHET (Université de Montpellier).

Je tiens à réitérer mes vifs remerciements au Pr. Mourad ARIBI pour avoir accepté de présider le jury.

Je tiens à formuler mes remerciements à l'endroit de :

Pr. Sid Ahmed Rebiahi, Dr. Souheila Benmansour, Dr. Wafa Nouari, Dr. Maroua Miliani, Dr. Lamia Ysmail-Dahlouk, Dr. Zeyneb Hadjij, M<sup>me</sup> Rabia Messali et M<sup>r</sup> Salim Habi ainsi qu'à tous les autres membres du laboratoire BIOMOLIM.

A Aida, Fadéla, Amina, Nassima, Yassine, Mouad, Fekhr-eddine, Yassine et Zoheir qui ont participé à la réalisation de la partie expérimentale de cette étude.

Enfin, aux membres du service de gynécologie-obstétrique de « l'EHS mère et enfant, Tlemcen » et plus spécialement au Dr. Loubna Bouhmama, pour nous avoir aimablement aidés.

## Dedicaces

*Je dédie ce travail à :*

*Mes parents, sans qui, je ne serais rien aujourd'hui et qui m'ont toujours  
soutenu :*

*Maman, pour les inestimables sacrifices que tu as consentis pour moi, tu as tant  
souhaité que je parviens à ce but.*

*Papa, je te serai reconnaissante toute ma vie pour tes précieux conseils,  
Qu'Allah vous accorde longue vie dans la santé !*

*Mon mari Younes et Mes enfants : Radjaa, Mouemina, Israe et Abd el Hadi,  
pour l'amour, le soutien et l'affection qu'ils m'ont donnés tout au long de ma  
thèse.*

*Mes beaux-parents et ma tante Hakima pour le soutien et l'encouragement qu'ils  
m'ont toujours prodigués.*

*Mes Chers frères et beaux-frères : Hicham, Walid, Feth-eddine, Boumedienne,  
Taha, Zoheir, Zaki et Hadjoudja.*

*Mes chères Sœurs et belles sœurs : Asmae, Soumia, Moufida, Khouira, Naima,  
Wissam et Samira.*

*Mes chères amies Chahinez, Imane, pour leur présence et leur soutien moral  
inlassable*

*Mes amies : Hanane, Hanene, Amel et mes cousines Soumia et Wafae*

*Toute personne qui m'a aidé à mener cette thèse à son terme.*

*Merci infiniment*

*Sara DAHOU*

Table des matières

Résumé .....	iii
Abstract .....	iv
ملخص.....	v
Remerciements.....	vi
Dedicaces.....	vii
Table des matières .....	viii
Liste des figures.....	xi
Liste des tableaux.....	xiii
listes des abbréviations.....	xiv
Introduction .....	1
CHAPITRE 1.....	3
Revue de la littérature.....	4
1.1. Staphylococcus aureus .....	5
1.1.1. Étymologie.....	5
1.1.2. Epidémiologie.....	5
1.1.3. Caractéristiques.....	6
1.1.3.1. Classification phylogénétique.....	6
1.1.3.2. Caractéristiques biochimiques et identification .....	6
1.1.4. Habitat.....	7
1.1.5. Pouvoir pathogène et facteurs de virulence .....	7
1.1.6. S. aureus et système immunitaire.....	11
1.1.6.1. Acteurs de l'immunité innée de l'hôte contre S. aureus.....	11
1.1.6.2. Mécanismes d'échappement du S.aureus au système immunitaire de l'hôte... 15	15
1.2. Cellules endothéliales .....	17
1.2.1. Ontogénie et phylogénie.....	17
1.2.2. Structure, hétérogénéité et plasticité .....	18
1.2.3. Marqueurs.....	19
1.2.4. Métabolisme.....	20
1.2.4.1. Métabolisme glucidique.....	20
1.2.4.2. Métabolisme lipidique.....	21
1.2.4.3. Métabolisme protidique .....	22
1.2.4.3.1. Métabolisme de l'arginine.....	22
1.2.4.3.1.1 Le monoxyde d'azote (NO).....	22
1.2.4.3.1.2. L'arginase.....	23
1.2.5. Fonctions.....	23
1.2.5.1. Barrière sélective .....	23
1.2.5.2. Hémostase, coagulation et fibrinolyse .....	24
1.2.5.3. Angiogénèse et vasculogénèse.....	25
1.2.5.4. Immunité et réactions inflammatoires .....	25
1.2.5.4.1. Rôle de cellules sentinelles et détections des PAMPs.....	25
1.2.5.4.2. Amplification de la réponse immunitaires et recrutement des leucocytes .....	25
1.2.5.4.3. Contrôle du trafic leucocytaire .....	26
1.2.5.4.4. Régulation de la réponse des cellules immunitaires (stimulation et immunosuppression).....	26



1.2.5.4.5. Rôle de cellules phagocytaires non professionnelles.....	27
1.2.5.4.6. Rôle de cellules présentatrices d'antigènes non professionnelles .....	28
1.2.6. Dysfonctionnement endothélial .....	28
1.3. Vitamine C .....	30
1.3.1. Structures chimiques et caractéristiques.....	31
1.3.2. Biosynthèse.....	31
1.3.3. Métabolisme et biodisponibilité .....	32
1.3.4. Effets et fonctions biologiques de la vitamine C.....	33
1.3.4.1. Fonctions biochimiques.....	34
1.3.4.2. Effets pro-oxydants .....	35
1.3.4.3. Effets sur le système immunitaire.....	35
1.3.5. Vitamine C et cellules endothéliales.....	36
1.3.5.1. Mouvements cellulaires.....	36
1.3.5.2. Fonctions cellulaires.....	37
1.3.5.2.1. Rôle antioxydant .....	37
1.3.5.2.2. Rôle d'enzyme cofacteur.....	37
1.3.5.2.3. Prolifération cellulaire et apoptose.....	37
1.3.5.2.4. Modulation du tonus vasculaire .....	38
1.3.4.2.5. Supplémentation en vitamine C et fonctions endothéliales.....	39
1.4. Problématique et objectifs .....	40
1.4.1. Problématique.....	40
1.4.2. Objectifs.....	40
1.4.3. But .....	40
CHAPITRE 2.....	41
2. 1. Matériel et méthodes.....	44
2.1.1. Conception de l'étude.....	44
2.1.2. Déclaration d'éthique et récolte des cordons ombilicaux .....	44
2.1.3. Préparation, infection et traitement des CEs .....	44
2.1.4. Récupération des surnageants de culture et lyse cellulaire .....	46
2.1.5. Dosage des protéines totales.....	46
2.1.6. Dosage de la production de NO .....	46
2.1.7. Détermination de l'activité de l'arginase .....	47
2.1.8. Dosage de sICAM-1 et de sE-sélectine.....	47
2.1.9. Détermination de la nécrose cellulaire.....	47
2.1.10. Evaluation de l'activité protectrice redox cellulaire.....	47
2.1.10.1. Evaluation de l'activité de la catalase .....	47
2.1.10.2. Evaluation de l'activité de la SOD.....	48
2.1.11. Mesure du ${}_iCa^{2+}$ .....	48
2.1.12. Mesure du ${}_{tc}CHOL$ .....	48
2.1.13. Mesure du ${}_iGLU$ .....	48
2.1.14. Evaluation de l'activité bactéricide cellulaire (internalisation et lyse bactérienne) ...	50
2.1.15. Evaluation de la croissance bactérienne intracellulaire.....	51
2.1.16. Activation du cycle cellulaire.....	51
2.1.17. Dosage des cytokines .....	51
2.1.18. Analyses statistiques.....	51
2.2. Résultats.....	52
2.2.1. Le traitement par la vitamine C/Asch2 induit une diminution de la production du NO et une augmentation légère de l'activité de l'arginase dans les HUVECs infectées par	



<i>S. aureus</i> .....	52
2.2.2. Le traitement par la vitamine C/Asch2 pourrait avoir un effet inverse de l'infection à <i>S. aureus</i> sur le relâchement de sICAM-1/sCD54 de sE-sélectine/sCD62E par les HUVECs infectées par <i>S.aureus</i> .....	53
2.2.3. Le traitement par la vitamine C/Asch2 protège contre la nécrose de HUVEC induite par l'infection à <i>S.aureus</i> .....	54
2.2.4. Le traitement par la vitamine C/Asch2 induit une augmentation légère des concentrations de $Ca^{2+}$ dans les HUVECs infectées par <i>S.aureus</i> .....	55
2.2.5. Le traitement par la vitamine C/ Asch2 module l'augmentation des concentrations de $CHOL$ dans les HUVECs induite par l'infection à <i>S.aureus</i> .....	55
2.2.6. Le traitement par la vitamine C/Asch2 inverse l'effet de <i>S.aureus</i> sur l'augmentation des niveaux d'iGLU dans les HUVECs.....	56
2.2.7. Le traitement par la vitamine C/Asch2 diminue la croissance de <i>S.aureus</i> et augmente l'internalisation bactérienne et la lyse intracellulaire par les HUVECs.....	57
2.2.8. Le traitement par la vitamine C/Asch2 améliore l'activation du cycle cellulaire chez les HUVECs infectées par <i>S.aureus</i> et non infectées.....	58
2.2.9. Le traitement par la vitamine C/Asch2 a légèrement influencé la production d'IL-6, mais a induit une baisse de celle de l'IL-1 $\beta$ chez les HUVECs infectées par <i>S.aureus</i> .....	59
2.3. Discussion .....	60
2.3.1. Effets de la vitamine C/Asch2 sur la production de NO et l'activité de l'arginase des HUVECs au cours de l'infection à <i>S. aureus</i> .....	61
2.3.2. Effet de la vitamine C/Asch2 sur la sécrétion de sICAM-1 et de sE-sélectine par les HUVECs au cours de l'infection à <i>S. aureus</i> .....	63
2.3.3. Effet de l'Asch2 sur la nécrose cellulaire et la protection cellulaire basée sur les biomarqueurs de la signalisation redox chez les HUVECs au cours de l'infection à <i>S. aureus</i> .....	63
2.3.4. Effet de la vitamine C/Asch2 sur les taux de $Ca^{2+}$ par les HUVECs au cours de l'infection à <i>S. aureus</i> .....	64
2.3.5. Effet de la vitamine C/l'Asch2 sur les taux de $CHOL$ pendant l'infection des HUVECs à <i>S. aureus</i> .....	65
2.3.6. Effet de la vitamine C/Asch2 sur les taux d'iGLU au cours de l'infection des HUVECs par <i>S. aureus</i> .....	65
2.3.7. Effet de la vitamine C/Asch2 sur la croissance de <i>S. aureus</i> , son internalisation et sa lyse par les HUVECs.....	66
2.3.8. Effet de la vitamine C/Asch2 sur l'activation du cycle cellulaire des HUVECs au cours de l'infection à <i>S. aureus</i> .....	68
2.3.9. Effets de la vitamine C/Asch2 sur la production d'IL-1 $\beta$ et d'IL-6 par les HUVECs au cours de l'infection à <i>S. aureus</i> .....	68
CHAPITRE 3.....	71
3. Conclusions et perspectives.....	72
Bibliographie .....	75
Annexe .....	97

**Liste des figures**

Figure 1.1. <i>S. aureus</i> en microscopie électronique à balayage.	7
Figure 1.2. La croissance de <i>S.aureus</i> et principaux facteurs de virulence.	8
Figure 1.3. Facteurs de pathogénicité sécrétés par <i>S.aureus</i> .	9
Figure 1.4. Reconnaissance de <i>S. aureus</i> et voies de signalisation TLRs et NOD2.se	12
Figure 1.5. Les différents acteurs de la réponse immune innée contre <i>S.aureus</i> .	14
Figure 1.6. La survie de <i>S. aureus</i> à l'intérieur de neutrophile.	16
Figure1.7. Origine et différenciation des cellules progénitrice endothéliales.	18
Figure 1.8. Hétérogénéité des cellules endothéliales.	19
Figure 1.9. Métabolisme des CEs.	21
Figure 1.10. Métabolisme de la L-arginine par le NOSe et l'arginase.	22
Figure 1.11. Les différents types de jonctions endothéliales.	24
Figure 1.12. Etapes et les molécules d'adhésion impliquées dans le recrutement des leucocytes	27
Figure 1.13. Fonctions immunitaires des cellules endothéliales.	28
Figure 1.14. Les changements spectaculaires dans les fonctions de CEs durant sepsis	29
Figure1.15. Rôle des isoformes de l'arginase dans le métabolisme de NO dans le système vasculaire.	30
Figure 1.16 Structures des espèces chimiques associées à la vitamine C	31
Figure1.17 Biosynthèse de la vitamine C à partir de la D-glucose chez les animaux et différentes voies de transformation chimique de l'acide ascorbique	32
Figure1.18. L'absorption et la distribution de la vitamine C à travers le lit vasculaire	33
Figure1.19 Effets biologiques de la vitamine C	34
Figure1.20. Effets de la vitamine C sur la phagocytose	36
Figure 1.21. Absorption et recyclage de la vitamine C par la cellule endothéliale	37
Figure1.22. Divers mécanismes de la vitamine C sur le monoxyde d'azote et la barrière de perméabilité endothéliale	38
Figure 1.23. Modulation intracellulaire des effets délétères du sepsis sur les cellules endothéliales.	39
Figure 2.1. Rationnel et la conception de l'étude.	49
Figure2.2. Cellules endothéliales confluentes à 80-90% observées au microscope optique inversé (x 40)	50

Figure2.3. Effet de l'AsCH2 sur la production du NO et l'expression de l'activité arginase par les HUVECs infectées par <i>S. aureus</i> .	52
Figure 2.4. Effet de l'AsCH2 sur le relâchement des sICAM-1 and sE-sélectine au cours de l'infection à <i>S.aureus</i> .	53
Figure 2.5. Effet de l'AsCH2 sur la nécrose et l'activité SOD et l'activité catalase au cours de l'infection à <i>S.aureus</i> .	54
Figure2.6. Effet de l'AsCH2 sur les niveaux de bCa <sup>2+</sup> au cours de l'infection à <i>S.aureus</i> .	55
Figure 2.7. Effet de l'AsCH2 sur les niveaux de tccCHOL au cours de l'infection à <i>S.aureus</i> .	56
Figure2.8. Effet de l'AsCH2 sur les niveaux de iGlu au cours de l'infection à <i>S.aureus</i> .	57
Figure2.9. Effet de l'AsCH2 sur la croissance bactérienne, l'internalisation et la lyse bactérienne au cours de l'infection à <i>S.aureus</i> .	58
Figure2.10. Effet de l'AsCH2 sur l'activation du cycle des HUVECs infectées par <i>S.aureus</i> .	59
Figure2.11. Effet de l'AsCH2 sur la production l'IL-1 $\beta$ et l'IL-6 des HUVECs infectées par <i>S. aureus</i> .	60

**Liste des tableaux**

Tableau 1.1. Principales protéines de surface de <i>S. aureus</i> et leurs fonctions	11
Tableau 1.2. Les principaux récepteurs TLRs, NLRs, CLR s impliqués lors de la reconnaissance de <i>S. aureus</i> par l'hôte	13

**listes des abréviations**

**A**

AA : acide ascorbique

Ag: acides gras

AGE: produits de fin de glycation des protéines

Agr: quorum-sensing accessory gene regulator

AhpCF: les sous-unités d'hydroperoxyde réductase d'alkyle C et F

AKT: tyrosine Kinases

AP-1 : activator protein 1

APP: protéines de la phase aiguë

Asc<sup>•-</sup> : radical ascorbate

AscH<sup>-</sup> : ascorbate monoanionique

AscH<sub>2</sub> : acide ascorbique/L-threo-2,3,4,5,6-pentahydroxyhex-2-acideénoïque-4-lactone

ATP: adénosine triphosphate (ATP)

Aur : auréolysine

**B**

BH4 : tétrahydrobioptérine

BHIB : brain-Heart Infusion Broth

BIOMOLIM : laboratoire de biologie moléculaire appliquée et d'immunologie

Bsa A: glutathion peroxydase

BSA: incidence de la bactériémie de *S.aureus*

**C**

C : fraction du complément

CaM: ca<sup>2+</sup>/calmoduline

CCL : chimiokines

CD : cluster de différenciation

CE : cellules endothéliales

cGMP: monophosphate de guanosine cyclique (cGMP).

CHIPS : chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus* , Protéine staphylococcique inhibitrice de chimiotactisme

Clf A : clumping factor A

Clf B : clumping factor B

Clf: facteur d'agglutination

CLRs: C lectin like receptors

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

Cna : protéine de liaison au collagène ou collagène adhésine

CoA : coagulase canonique

COUP-TFII: chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II

CPEs: cellules progénitrice endothéliales

CPG: cytosine-phosphate-guanosine

CPS: capsule

CRP: protéine C-réactive

CWG: cell wall glycopolymer

## **D**

DHA : acide déshydroascrobique

DMEM : delbecco's Modified Eagle Medium

dNTP: désoxyribonucléotide triphosphate

DPBS: phosphate buffer salin

**E**

Eap : protéine d'adhérence extracellulaire

Ecb : protéine extracellulaire de transport du complément

ECM: extracellular matrix

EDTA : acide éthylène dinitrilotétra acétique

Efb : protéine extracellulaire de transport du fibrinogène , Fibrinogen-binding protein

EpHB4: vein marker ephrin receptor B4

E-selectin : endothelial selectin

ET-1: endothéline-1

**F**

FAK : focal adhesion kinase

Fbp : fibronectin binding protein

fH : facteur H

fl : facteur I

FLIPr: protéine inhibitrice de type récepteur peptidique formylique 1

fMLP: N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine;

FnBP : protéine de liaison à la fibronectine

FnBPAB: protéines A et B de liaison à la fibronectine

**G**

GLS: glutaminase

GLUT : transporteurs de glucose Na<sup>+</sup> indépendants

GPCRs: récepteur hétérotrimérique couplé à la protéine G

GSSG: glutathione disulfide



**H**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peroxyde d'hydrogène

HBSS : hank's balanced salt solution

HIF : facteur de transcription induit par l'hypoxie

Hla: α-hémolysine

HlgABC: sous-unités gamma-hémolysine A, B, et C

HSC: cellules souches hématopoïétiques

HUVEC : cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine

**I**

IcaADBCR: sous-unités d'adhésine intercellulaire A, D, B, C et R

I-CAM- 1 : intracellular cell adhesion molecule 1

IFN-α : interféron gamma

Ig : immunoglobulines

IκBK: inhibitor-kappa B Kinase

IL : interleukine

IL-1β : interleukine-1 bêta

IL-6: interleukine-6

iNOS: monoxyde d'azote (NO) synthase inductible, oxyde nitrique synthase inductible

IRAK:iL-1 Receptor Associated Kinase

IRF-1: facteur de régulation de l'interféron-1

Isd: déterminant de surface à base de fer

**J**

JAM: molécules d'adhésion de jonction -1

**K**

KatA: catalase

KDR : kinase insert domain receptor

K-W : test non paramétrique de Kruskal-Wallis

**L**

LDH: lactate déshydrogénase

LFA-1: lymphocyte function-associated antigen-1

LPS : lipopolysaccharides

LTA: acide Lipoteichoïque

Luk: leucocidine

**M**

MAC : complexe d'attaque membranaire

MAC-1: macrophage-1 antigen (MAC-1) ou CD11b/CD18

MBL: mannose binding lectin

MDP: muramyl dipeptide

MOI : multiplicité d'infection

MPO: myéloperoxydase

MprF: multiple peptide resistance factor

MSCRAMM: microbial Surface components Recognizing Adhesive Matrix Molecules

MSCs: cellules souches mésenchymateuses

mTOR: la voie de mammalian target of rapamycin

MW : test non paramétrique de Mann Whitney *U*

MyD88: myeloid differentiation primary response gene 88

**N**

NETs: neutrophil extracellular traps

NFκB: nuclear Factor-kappa B

NLRs: (Nucleotide-binding and oligomerization domain) NOD like receptors

NO: monoxyde d'azote

**O**

O<sup>2-</sup>: ion superoxide

OatA: O-acetyltransferase A

OONO<sup>-</sup>: anion peroxydinitrite

oxLDL: lipoprotéines de basse densité oxydées

**P**

PAF : facteur d'activation plaquettaire

PBS : phosphate buffer salin

PDL: ligand de mort programmée

PECAM-1: molécule d'adhésion des cellules endothéliales plaquettaires-1

PFT: platelet-fibrin thrombi

PFTs : toxines formant des pores

PGF : facteur de croissance placentaire

PGI<sub>2</sub> : prostaglandine I<sub>2</sub>

PI3K : phosphoinositide-3- Kinase

PLG : plasminogène

PMN: polymorphonucléaires neutrophiles

PP2A: protéine phosphatase de type 2A.

PRR: pathogen recognition receptors

P-selectin: platlet selectin

PSGL-1: P-sélectine glycoprotéine ligand-1

PSM: phenol-soluble modulin

PVL: panton-Valentine Leukocidin

**R**

RICK: CARD-containing serine/threonine kinase

ROS: reactive Oxygen Species

RNS: reactive Nitrogen Species

**S**

*S. albus*: *Staphylococcus albus*

*S. aureus* : *Staphylococcus aureus*

*S. epidermidis*: *Staphylococcus aureus*

Sak : Staphylokinase

Sak: Staphylokinase

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

SARM-AC: *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline associé aux infections communautaires

SARM-AH: *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline associée aux infections hospitalières

Sbi : transporteur staphylococcique des immunoglobulines

Sbi: staphylococcal IgG-binding protein

SCIN : inhibiteur staphylococcique du complément, Staphylococcal complement inhibitor

SCGF: facteur de croissance des cellules souches bêta

SEs: staphylococcal enterotoxin

SdrCDE,: Ser-Asp rich fibrinogen/bone sialoprotein-binding protein subunits C, D, and E

SDRA: syndrome de détresse respiratoire aiguë

SOD: superoxide dismutase

SodA et SodM: super oxide dismutases A et M.

SP: surfactant protein

SpA : protéine staphylococcique A, Staphylococcal protein A

SSL : staphylococcal superantigen-like protein

SVCT : transporteur de vitamine C sodium Na<sup>+</sup> dépendant

SVF : sérum de vœu fœtal

SXN: staphyloxanthin

## **T**

TAB: TAK1 binding protein

TAK1: growth factor-β-activated kinase-1

TCR:T cell receptor

TET: methylcytosine oxidase ten-eleven translocation proteins

TiOSO<sub>4</sub>: oxysulfate de titane (IV) saturé

TIRAP: TIR associated protein

TLR: Toll like Receptors

TM: Thrombomoduline

TNF-α: Tumor necrosis factor

t-PA: Activateur du plasminogène tissulaire

TRAF: Tumor necrosis factor receptor-associated factor

TrxAB: Thioredoxine (TrxA) and Thioredoxine réductase (TrxB)

TSST-1 : Toxine du syndrome de choc septique 1

**U**

UFC : Unité formant colonie

**V**

VCAM : molécule d'adhésion des cellules vasculaires

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VEGFR : Récepteur du Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VEGFR2: récepteurs de facteur de croissance endothélial vasculaire 2

vein marker ephrin receptor B4) et COUP-TFII (Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II )

vWbp : Protéine de transport du vWF, von Willebrand factor binding protein

vWF : Facteur de Von Willebrand

**W**

WTA: Wall Toll like receptors

# Introduction



## Introduction

### Introduction

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) est une bactérie ubiquitaire, opportuniste, pathogène capable de causer diverses infections hospitalières et communautaires (Alonzo and Torres, 2014; Knox et al., 2015; Tong et al., 2015; Uhlemann et al., 2014) allant des infections superficielles de la peau et des tissus mous jusqu'aux bactériémies associées au sepsis et au syndrome du choc toxique (Thomer et al., 2016). *S. aureus*, grâce à une panoplie de facteurs de virulences, pourrait survivre, proliférer et induire la mort cellulaire au sein d'une large variété de cellules phagocytaires professionnelles et non professionnelles, y compris les cellules endothéliales (CEs) (Blättner et al., 2016; Horn et al., 2017; Rollin et al., 2017; Strobel et al., 2016). Les CEs, ensemble cellulaire profondément hétérogène et plastique qui tapisse la face interne de l'endothélium, sont actuellement reconnues comme des cellules de l'immunité innée qui modulent les réponses immunitaires et inflammatoires, en plus de leurs fonctions physiologiques classiques (Mai et al., 2013; Pober and Sessa, 2007; Sumpio et al., 2002). En outre, étant à l'interface « sang-organes », les CEs sont parmi les premières cellules sentinelles pouvant détecter des agents pathogènes circulants, entraînant par la suite la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'interleukine-1 bêta (IL-1 $\beta$ ) et l'IL-6 (Kofler et al., 2005), et l'expression de molécules d'adhésion, comme la E-sélectine /CD62E et la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1 / CD54). Il en résulte une transmigration des leucocytes et leur recrutement vers le site inflammatoire, amplifiant ainsi la réponse immune. Les CEs sont ainsi douées d'activité phagocytaire non professionnelle et sont en mesure d'internaliser des hématies apoptotiques (Fens et al., 2012) ou bien des bactéries (Kozarov, 2012) y compris *S. aureus* (Lowy et al., 1988; Menzies and Kourteva, 1998). Néanmoins, l'internalisation et la croissance intracellulaire de bactéries à l'exemple de *S. aureus* sont mise en avant pour expliquer la dissémination de certaines infections (Menzies and Kourteva, 1998; Rollin et al., 2017). De plus, plusieurs études ont rapporté que les CEs incontrôlées sont impliquées dans la progression des maladies inflammatoires et du sepsis (Gimbrone et al., 1999; Kofler et al., 2005), ainsi que dans la pathogenèse de nombreux types d'infections humaines, en particulier les septicémies à *S. aureus* (Rollin et al., 2017; Seidl et al., 2012; Thomer et al., 2016), où les CEs serviraient de véhicule pour l'invasion et la dissémination du pathogène vers les tissus et les organes (pyohémie), conduisant à des infections chroniques persistantes, associées au dysfonctionnement de la CE. Ce processus est secondaire à : i) l'expression dominante et persistante de cytokines pro-inflammatoires par activation incontrôlée de la CE ; ii) l'altération de l'expression des cytokines régulatrices / anti-inflammatoires (Shao et al., 2014) ; iii) l'accumulation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) due au dérèglement de la capacité antioxydante cellulaire, entraînant un désaccouplement du monoxyde d'azote (NO) synthase endothéliale (eNOS) et

## Introduction

une diminution de la biodisponibilité du NO (Ince et *al.*, 2016), conduisant à un déficit dans la défense antibactérienne de l'hôte dépendante du NO endothélial (Yang et *al.*, 2009).

De nombreuses stratégies thérapeutiques récentes ont ciblé le dysfonctionnement des CE afin de prévenir, à un stade précoce, la progression des inflammations systémiques sévères due à des infections bactériennes, vers un état de choc septique (Cepinskas and Wilson, 2008; Nerviani and Mauro, 2018; Pober and Sessa, 2007; Shao et *al.*, 2014). Dans ce contexte, plusieurs essais cliniques ont démontré l'efficacité de la vitamine C comme traitement adjuvant dans le sepsis (Cepinskas and Wilson, 2008; Sorice et *al.*, 2014). En outre, la supplémentation en vitamine C dans des états septiques a montré des effets prometteurs sur les fonctions endothéliales en réduisant les ROS et en préservant la production de NO. Cet effet est rapide et durable du fait de l'accumulation importante de l'ascorbate dans les CE (Wilson, 2009). La vitamine C, micronutriment hydrosoluble essentiel, est synthétisée de manière endogène dans le foie chez la plupart des mammifères; tandis que les humains et les autres primates, dépourvus de l'enzyme gulonolactone oxydase nécessaire à la biosynthèse de l'ascorbate, dépendent de leur régime alimentaire comme source exogène de vitamine C (Corpe et *al.*, 2010; Mandl et *al.*, 2009). Les deux formes de vitamine C, AsC<sub>2</sub> (forme réduite) et acide déhydroascorbique (DHAA, forme oxydée) (Wilson, 2005), sont transportées vers les CE par leurs propres transporteurs. Ainsi, l'ascorbate monoanionique / AsC<sup>-</sup> pénètre dans la CE principalement par le transporteur de la vitamine C dépendant du sodium 2 (SVCT2), tandis que le DHAA diffuse par les transporteurs facilitateurs du glucose (GLUT), puis est rapidement réduit en ascorbate dans la cellule (May and Harrison, 2013). Il a été rapporté que la vitamine C, molécule antioxydante par excellence, est principalement impliquée dans l'immunité anti-infectieuse et dans la protection contre l'inflammation chronique, où elle joue un rôle immunostimulant, anti-inflammatoire et antibactérien (Sorice et *al.*, 2014). De plus, il a été démontré que la carence en vitamine C pourrait induire des effets délétères sur l'immunité et exacerber l'inflammation, augmentant le risque de développement de plusieurs maladies et la susceptibilité aux infections (Carr and Maggini, 2017; Hemilä, 2017). Dans ce contexte, nous avons essayé pour la première fois de montrer que la vitamine C/AsC<sub>2</sub> pourrait moduler et améliorer les activités fonctionnelles des CE et améliorer leur survie au cours de l'infection à *S. aureus*.

# CHAPITRE 1

## CHAPITRE 1

### Revue de la littérature

1.1. <i>S. aureus</i>	5
1.2. Cellule endothéliale	16
1.3. Vitamine C	29
1.4. Problématique et objectifs	40

### CHAPITRE1

#### Revue de la littérature

##### 1.1. *Staphylococcus aureus*

Bien que *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) est largement répandu comme un germe commensal, il est à l'origine d'un grand nombre d'infections pouvant être graves en raison du terrain fragile sur lequel il se greffe et de l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques. Ces infections sont superficielles sous forme d'abcès ou d'impétigo, ou invasives comme l'arthrite, l'endocardite, la bactériémie associée au sepsis ou encore le syndrome du choc toxique (Foster, 2005; Thomer et al., 2016; Tong et al., 2015).

###### 1.1.1. Étymologie

*S. aureus* a été isolé pour la première fois à partir d'un pus d'un abcès chirurgical en 1880 par le chirurgien écossais Alexandre Ogston qui lui a initialement attribué le nom de microcoques en se référant à la forme sphérique des bactéries (Ogston, 1881). Après, il a pu les nommer Staphylocoques, du grecque *Staphyle* qui définit l'aspect caractéristique des bactéries en grappe de raisin, et qui les distingue des Streptocoques en chaîne, également associés aux infections de plaies chirurgicales. Ogston a décrit les Staphylocoques comme des cocci se regroupant en masses qui ressemblent à des grappes de raisin. En 1884, le médecin allemand Friedrich Julius Rosenbach a dénommé *S. aureus* par la couleur jaune des colonies ou Staphylocoque doré, qui provient du latin *aurum* signifiant or, le distinguant ainsi de *S. albus* (du latin *albus* qui veut dire blanc) (Rosenbach, 1884). *S. albus* a ensuite été renommé *S. epidermidis* en raison de son ubiquité sur la peau humaine (Licitra, 2013).

###### 1.1.2. Épidémiologie

*S. aureus* est un germe à la fois commensal et pathogène. Il colonise environs 30% de la population mondiale, soit en permanence soit de façon intermittente et en même temps, il représente l'une des espèces les plus isolées en milieu hospitalier et communautaire (Wertheim et al., 2005). L'incidence annuelle des bactériémies à *S. aureus* dans les pays industrialisés est de 10-30/100000 personnes (Laupland et al., 2013). Cette incidence s'est stabilisée depuis la fin des années 1990 après une forte augmentation du fait de l'importance de l'acquisition hospitalière qui s'explique par la hausse des admissions et des interventions médicales invasives. L'émergence de souches résistantes à la méticilline (SARM) en milieu hospitalier et communautaire (SARM-AH, SARM-AC respectivement) a largement contribué à cette augmentation même si la fréquence des bactériémies à SARM est en diminution du fait de l'amélioration des procédures de soins (Tong et al., 2015). Néanmoins, les SARM demeurent un sujet de préoccupation en l'absence de nouveaux traitements antibiotiques efficaces ainsi que le brassage génétique de ces variants via l'homme et ses activités.

## Chapitre1. Revue de littérature

*S. aureus* est la cause majeure d'infections sévères et récurrentes responsables de maladie invasive, de la bactériémie et du sepsis, dont les facteurs à risque qui augmente l'incidence de la bactériémie de *S.aureus* (BSA) sont l'âge (un déterminant puissant de BSA, avec des taux d'infection les plus élevés aux deux extrêmes de la vie), cathétérisme, intubation endotrachéale, traumatisme, interventions chirurgicales, hémodialyse, dialyse péritonéale, diabète et le traitement immunosuppresseur ou anticancéreux(Thomer et *al.*, 2016; Tong et *al.*, 2015).

### 1.1.3. Caractéristiques

#### 1.1.3.1. Classification phylogénétique

*S. aureus* appartient au genre du *Staphylococcus*, famille des *Staphylococacea*, ordre des *Bacillales*, Classe III des *Bacilli*, Phylum XIII des *Firmicutes*, volume des bactéries à Gram positif avec une faible teneur en G+C (30–38%), et Domaine des *Bacteria*, selon la deuxième édition du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Joanne M. Willey et *al.*, 2019).

#### 1.1.3.2. Caractéristiques biochimiques et identification

*Staphylococcus* regroupe les bactéries chimioorganotrophes qui se distinguent des streptocoques par le pouvoir de dégrader le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) grâce à la disposition de l'enzyme catalase. Par ailleurs, elles sont dépourvues de l'enzyme oxydase, ce qui les différencie des microcoques. Elles peuvent utiliser l'oxygène comme un accepteur terminal d'électrons mais en absence d'oxygène elles peuvent utiliser les nitrates comme accepteur d'électrons. Elles peuvent également fermenter le glucose et le convertir principalement en lactate.

*S. aureus* est l'espèce la plus pathogène chez l'homme et la cause majeure d'infections fréquentes d'aspects cliniques très variés. Elle se distingue des autres staphylocoques à coagulase négative par la pigmentation dorée de ses colonies, d'où provient son nom, et qui est due à la présence de la Staphyloxanthine, une caroténoïde liée à la membrane (Thomer et *al.*, 2016), ainsi que par sa capacité à fermenter le mannitol et à synthétiser une coagulase et une désoxyribonucléase (Joanne M. Willey et *al.*, 2019).

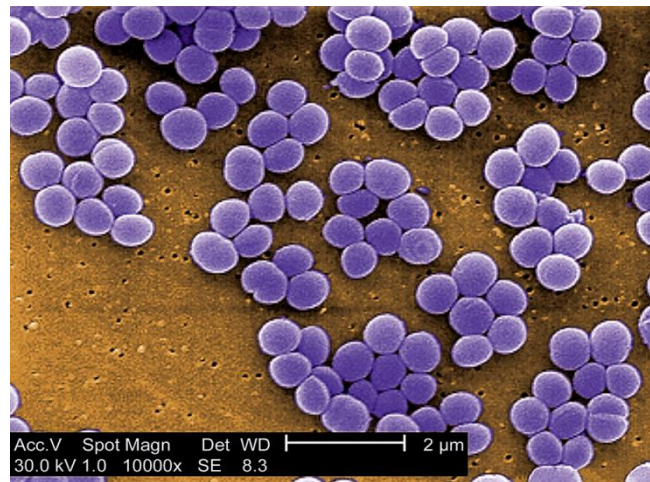
*S. aureus* sont des Cocci à Gram-positif de 0.5 à 1.0 µm de diamètre qui apparaissent le plus souvent en amas typiques dits « grappes de raisin » (figure1.1). Elles peuvent également être isolées, ou regroupées par paires (diplocoques) ou en courtes chaînettes. Ce sont des bactéries immobiles, asporulés, possédant le plus souvent une capsule polysaccharidique, anaérobies facultative, catalase positive, oxydase négative, coagulase positive, mésophiles (température optimale est de 37°C), neutrophiles (pH optimal est de 7), et halotolérants (elles

## Chapitre1. Revue de littérature

colonisent des milieux contenant du chlorure de sodium (NaCl) à une concentration supérieure à 3M) (Joanne M. Willey et *al.*, 2019).

### 1.1.4. Habitat

*S. aureus* est un germe ubiquitaire et fréquemment contaminant de plusieurs sites environnementaux, en milieu hospitalier et communautaire. Son réservoir naturel et préférentiel est l'homme et les animaux à sang chaud. Cette bactérie commensale fait partie de la microflore normale de la peau, des conjonctives, du nez, de l'oropharynx ainsi que du tractus intestinal et vaginal d'environ 30 % des personnes saines de façon persistante ou intermittente (Joanne M. Willey et *al.*, 2019; Thomer et *al.*, 2016). Cependant, elle est capable d'envahir et d'infecter de nombreux types de tissus et d'organes, notamment la peau, les poumons, l'endothélium cardiaque, les os et les tissus mous (Kumar et *al.*, 2015), en particulier chez les immunodéprimés et les sujets portant un cathéter vasculaire. Elle représente la cause majeure de bactériémies, d'endocardites infectieuses, d'infections ostéoarticulaires et pleuropulmonaires et de sepsis (Blättner et *al.*, 2016; Foster et *al.*, 2014; Thomer et *al.*, 2016).



**Figure 1.1. *S. aureus* en microscopie électronique à balayage** (Joanne M. Willey et *al.*, 2019)

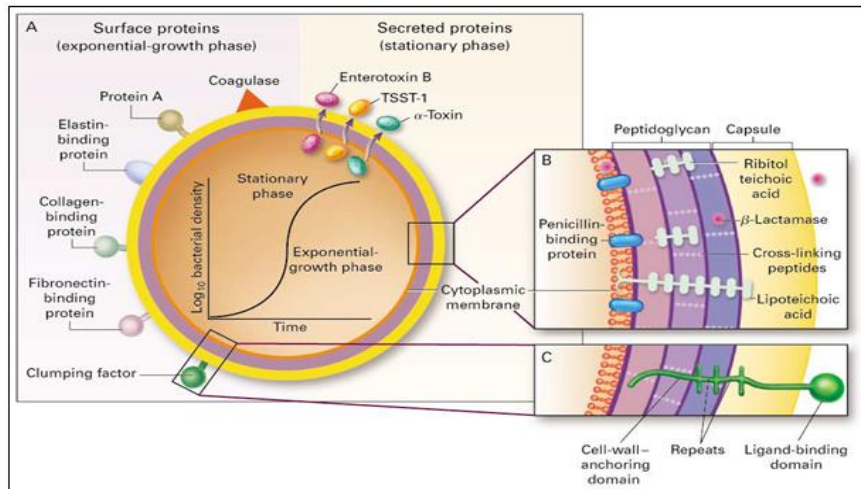
### 1.1.5. Pouvoir pathogène et facteurs de virulence

*S. aureus* est une bactérie multirésistante vis-à-vis des antibiotiques et des antiseptiques. Elle est très invasive, capable d'adhésion aux tissus de l'hôte, de survie et d'induction de l'apoptose chez plusieurs types de cellules de mammifères, immunitaires et non immunitaires (Blättner et *al.*, 2016; Horn et *al.*, 2017; Thomer et *al.*, 2016). Elle provoque de ce fait une large gamme d'infections allant des infections superficielles de la peau et des tissus mous jusqu'au sepsis et au syndrome du choc toxique (Thomer et *al.*, 2016). Cette pathogénicité s'explique par la grande diversité des facteurs de virulence qu'elle exprime (facteurs de virulence



## Chapitre1. Revue de littérature

exprimés) ou qu'elle sécrète (facteurs de virulence sécrétés) (figure 1.2), et qui sont également en mesure de contrecarrer les défenses de l'hôte, et permettent ainsi d'envahir les différents tissus humains et d'inhiber le recrutement des neutrophiles.



**Figure 1.2. Croissance de *S.aureus* et principaux facteurs de virulence** (Lowy, 1998). La synthèse de protéines de *S.aureus* est dépendante de la phase de croissance. TSST-1 : Toxine du syndrome de choc septique 1.

### 1.1.5.1 Facteurs de virulence sécrétés

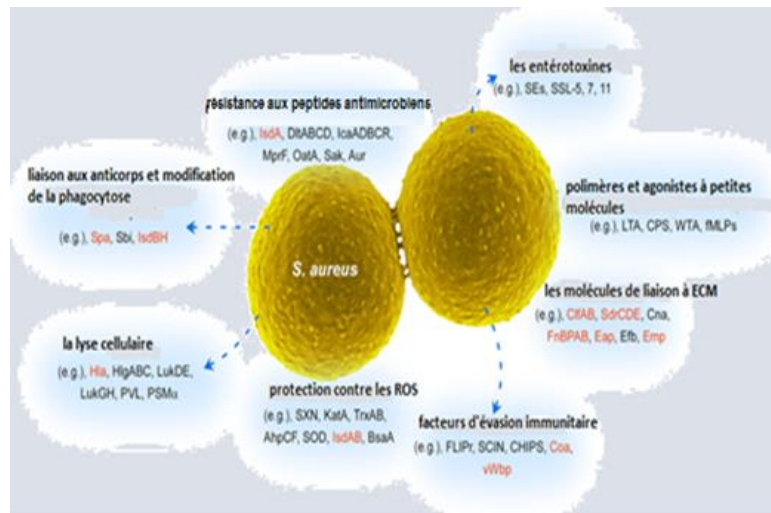
*S. aureus* a en effet la capacité de sécréter, après invasion, des facteurs d'adhésion, des toxines qui ont des activités composant la virulence de *S. aureus* (figure 1.3), y compris :

- **Les molécules de la résistance aux peptides antimicrobiens** (ex. Staphylokinase (Sak), Déterminant de surface à base de fer (isdA), facteur de résistance aux multiples peptides (mprF), Auréolysine (Aur) etc.),
- **Les molécules lytiques** (ex. Hla ( $\alpha$ -hémolysine), PVL (Panton-Valentine leukocidin), psm (phenol-soluble moduline), hlgabc (Sous-unités gamma-hémolysine A, B, et C), etc),
- **Les molécules protectrices contre les espèces réactives d'oxygène (ROS)** (ex. SOD (Superoxide dismutase), SXN (staphyloxanthin), katA (catalase), trxAB (thioredoxine (TrxA) et thioredoxine réductase (TrxB), ahpCF (Les sous-unités d'hydroperoxyde réductase d'alkyle C et F) etc),
- **Les facteurs d'évasion immunitaire** (ex. CHIPS (chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus*), SCIN (staphylococcal complement inhibitor), flplr (Protéine inhibitrice de type récepteur peptidique formylique 1), vWbp (von Willebrand factor binding protein), Coa (coagulase),
- **Les molécules de liaison à la matrice extracellulaire (ECM)** (ex. ClFAB, sdrCde, CNA (la protéine de liaison au collagène), FnBPAB (Protéines A et B de liaison à la fibronectine), Eap (Protéine d'adhérence extracellulaire), Efb (Protéine de liaison au

## Chapitre1. Revue de littérature

fibrinogène extracellulaire), etc),

- **Les molécules agonistes** (ex. LTA (acide lipoteichoïque), CPS (capsule staphylococcique), WTA, (acide téichoïque de la paroi), et les entérotoxines (ex. SEs (entérotoxine staphylococcique), staphylococcal superantigen-like protein (SSL) (SSL-5,7,11)).



**Figure 1.3. Facteurs de pathogénicité sécrétés par *S.aureus*** (Kobayashi et *al.*, 2015) avec

**modifications.** AhpCF, Les sous-unités d'hydroperoxyde réductase d'alkyle C et F ; Aur, Auréolysine; BsaA, glutathion peroxydase; CHIPS, Protéine staphylococcique inhibitrice de chimiotactisme; Clf Facteur d'agglutination; Cna, collagène adhésine; Coa, coagulase; CPS, capsule; Eap, Protéine d'adhérence extracellulaire; Efb, Protéine de liaison au fibrinogène extracellulaire; FLIPr, Protéine inhibitrice de type récepteur peptidique formylique 1; fMLP, N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine; FnBPAB, Protéines A et B de liaison à la fibronectine; Hla,  $\alpha$ -hémolysine; HigABC, Sous-unités gamma-hémolysine A, B, et C; IcaADBCR, Sous-unités d'adhésine intercellulaire A, D, B, C et R; Icd, Déterminant de surface à base de fer; KatA, Catalase; LTA, Acide lipoteichoïque; Luk, leucocidine; MprF, multiple peptide resistance factor; OatA, O-acetyltransferase A; PSM, phenol-soluble modulín; PVL, Pantón-Valentine leukocidin; ROS, reactive oxygen species; Sak, staphylokinase; Sbi, staphylococcal IgG-binding protein; SCIN, staphylococcal complement inhibitor; SdrCDE, Ser-Asprich fibrinogen / bone sialoprotein-binding protein subunits C, D, and E; SE, staphylococcal enterotoxin; SOD, superoxide dismutase; Spa, staphylococcal protein A; SSL, staphylococcal superantigen-like protein; SXN, staphyloxanthin; TrxAB, thioredoxin (TrxA) and thioredoxinreductase (TrxB); vWbp, von Willebrand factor binding protein; WTA, walltechoic acid.

On distingue plusieurs groupes de toxines qui diffèrent par leurs activités cytolytiques, protéolytiques, superantigéniques ou ADP-ribosylantes.

- **Toxines formant des pores (PFTs)** : Ce sont des toxines cytolytiques qui agissent en détruisant les cellules immunitaires de l'hôte par la formation de pores dans leurs membranes cellulaires et par l'altération de la barrière épithéliale ou endothéliale (Bonar et *al.*, 2015)

## Chapitre 1. Revue de littérature

(Exp. les hémolysines  $\alpha$ ,  $\delta$  et  $\gamma$ , les leucocidines (LukE-D) et la toxine PVL (Panton-Valentine Leukocidin) (Choi et *al.*, 2014; Los et *al.*, 2013).

- **Toxines à activité protéolytique ou anti-protéolytique** : Elles regroupent les sérines protéases dont les plus importantes sont les épidermolysines et les inhibiteurs de protéases parmi lesquels les protéines staphylococciques inhibitrices de chimiotaxie (CHIPS). Le mécanisme d'action des épidermolysines est l'hydrolyse des protéines sur un site spécifique. Leur principale cible est la desmogéline-1, une protéine importante de l'épiderme. En revanche, CHIPS pourrait empêcher le chimiotactisme des neutrophiles en se fixant à l'anaphylatoxine C5a du complément. Elle peut aussi diminuer l'opsonisation et altérer la maturation des acteurs de la réponse immune adaptative (Otto, 2014).
- **Superantigènes** : Ce sont les plus puissants mitogènes des cellules T. Plus de trente superantigènes ont été identifiés chez *S. aureus*. Ces protéines, dont les entérotoxines, sont capables d'interagir avec la liaison entre CMH de classe II du macrophage et le récepteur TCR des lymphocytes T entraînant la stimulation massive du système immunitaire avec une libération incontrôlée de cytokines proinflammatoires et notamment de facteur de nécrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), d'interleukine 1 (IL-1), d'interleukine 2 (IL-2) et d'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) (Proft and Fraser, 2003).

### 1.1.5.2. Protéines de surface

*S. aureus* peut exprimer plus de 24 protéines de surface différentes qui ont la capacité de se fixer sur les molécules de l'hôte. La grande majorité de ces protéines appartiennent à la famille des MSCRAMM (Microbial Surface components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) (Brown et *al.*, 2014). Parmi les mieux caractérisées, on peut citer la protéine de liaison au collagène (CNA), les protéines de liaison à la fibronectine (FnBP)A (FnBPA), et B (FnBPB), et les protéines de liaison au fibrinogène (ClfA et ClfB) (Choi et *al.*, 2014). Leur expression dépend des conditions de croissance de la bactérie (figure 1.2.). Ces protéines ont un rôle crucial dans la survie et la croissance bactérienne aussi bien dans les conditions commensales que pathogènes. Une seule protéine peut avoir de multiples fonctions et parallèlement, plusieurs protéines peuvent avoir des fonctions redondantes (Foster et *al.*, 2013; Kwiecinski et *al.*, 2014)(Tableau 1.1).

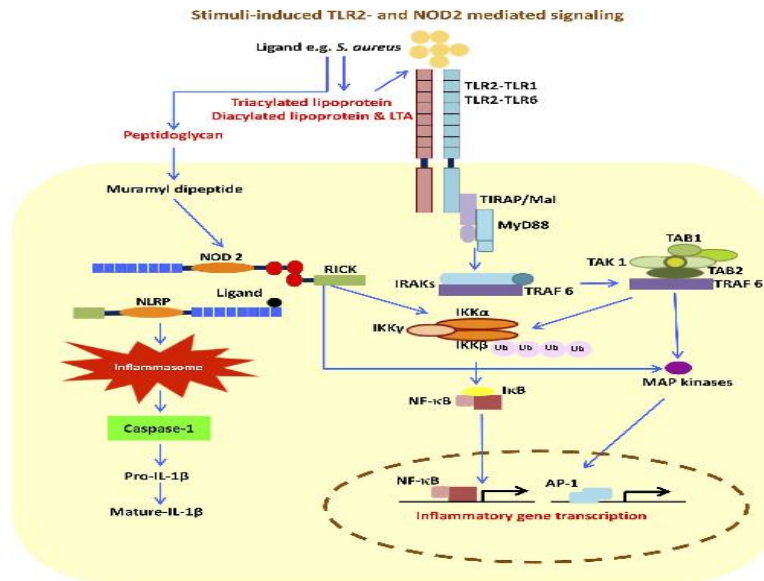
**Tableau 1.1 Principales protéines de surface de *S. aureus* et leurs fonctions** (Foster et al., 2013)

Protéine	Fonction
<b>Protéine A</b>	Inhibition de l'opsonisation et de la phagocytose Inflammation
<b>Clumping factor A (Clf A)</b>	Adhésion au fibrinogène immobilisé Immuno-invasion par liaison au fibrinogène soluble et par dégradation du C3b
<b>Clumping factor B (Clf B)</b>	Adhésion aux cellules épithéliales desquamées Colonisation nasale
<b><i>S. aureus</i> surface protein X (SasX)</b>	Formation des biofilms, agrégation cellulaire et adhésion aux cellules des squames
<b>Protéine de liaison au collagène (Cna)</b>	Adhésion aux tissus riches en collagène Prévention de l'activation de la voie classique du complément
<b>Protéine de liaison à la fibronectine (FnBP)</b>	Adhésion à la matrice extracellulaire Invasion

### 1.1.6. *S. aureus* et système immunitaire

#### 1.1.6.1. Acteurs de l'immunité innée de l'hôte contre *S. aureus*

L'immunité innée contre l'infection à *S. aureus* comporte de multiples facettes et est spécifique aux tissus (Brandt et al., 2018). Plusieurs études ont montré le rôle clé des PRRs (pathogen recognition receptors) et des voies de signalisation de cytokines spécifiques comme l'IL-1 dans la pathogénèse de *S. aureus* (Bekeredjian-Ding et al., 2017; Brandt et al., 2018). La signalisation des PRRs parmi lesquels Toll like receptors (TLRs), NOD like receptors (NLRs) et C lectin like receptors (CLRs), est activée subséquentement à la reconnaissance spécifique des différents compartiments bactérien (Askarian et al., 2018), en effet, TLR2 détecte en particulier les lipoprotéines et l'acide lipoteichoïque, tandis que NOD2 détecte le peptidoglycane staphylococcique (Askarian et al., 2018; Fournier, 2013; Fournier and Philpott, 2005) (figure 1.4). Cette reconnaissance induit l'activation de facteurs de transcription comme MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88), IRAK (IL-1 Receptor Associated Kinase), I $\kappa$ BK (Inhibitor-kappa B Kinase) et NF $\kappa$ B (Nuclear Factor-kappa B), et stimule l'activation de l'inflammasome qui est requis pour la maturation de la caspase-1 permettant ainsi la synthèse de différentes cytokines et chimiokines qui participent à la réponse inflammatoire et au recrutement des neutrophiles vers le site de l'infection (Askarian et al., 2018; Brandt et al., 2018; Miller and Cho, 2011) (Tableau1.2).



**Figure 1.4. Reconnaissance de *S. aureus* et voies de signalisation TLRs et NOD2** ( Askarian et al., 2018). MyD88:myeloid differentiation factor-88, TIRAP: TIR associated protein, IRAK: IL-1 receptor associated kinase, TRAF: tumor necrosis factor receptor-associated factor, TAK1: growth factor- $\beta$ -activated kinase-1, TAB: TAK1 binding protein 1, IKK: IkappaB kinase, MAPK: mitogen activated protein kinase, NF- $\kappa$ B: nuclear factor kappa B, AP-1: activator protein 1, RICK: CARD-containing serine/threonine kinase.

Le système du complément participe surtout dans l'opsonisation et la promotion de la phagocytose par les phagocytes professionnels qui comprennent les neutrophiles et les macrophages et par les phagocytes non professionnels tels que les cellules endothéliales (Pietrocola et al., 2017). Ces actions induisent l'expression des VCAM (vascular cell adhesion molecule), ICAMs (Intercellular adhesion molecule), des récepteurs du Fc (fragment cristallisable) et la sécrétion des IL-1 , IL-6 , et IL-8 (Interleukine-1,6,8) (figure 1.5) , en plus des facteurs de chimiotactisme comme CXCL1, CXCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL27, et CCL20 (Brandt et al., 2018). Elles entraînent également la production par les cellules endothéliales dites résidentes d'IL-8, GRO-alpha (growth related protein) et C5a (Complement component 5a). L'influx des neutrophiles est suivi par la sécrétion d'IL-1, IL-6, IL-8, et TNF-alpha (tumor necrosis factor alpha) par les monocytes et les macrophages (Lowy et al., 1988). Par ailleurs, Les lymphocytes T (LT) peuvent également s'activer via la sécrétion massive des superantigènes staphylococciques (Bröker et al., 2016) et participent à l'activation des macrophages et des neutrophiles en sécrétant l'IFN- $\gamma$ . Les neutrophiles activées dégradent et éliminent les *S.aureus* par la libération des ROS (comme l'O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et HOCl), et les RNS (comme NO), qui sont produites après la phagocytose par les actions de la NADPH oxydase, de la myéloperoxydase (MPO) et de NOS, et peuvent tuer directement les bactéries ou faciliter leur destruction (Brandt et al., 2018; Nauseef, 2019).

**Tableau1.2. Principaux récepteurs TLRs, NLRs, CLR s impliqués dans la reconnaissance de *S.aureus* par l'hôte** (Askarian et *al.*, 2018).

Famille de récepteurs	Récepteurs spécifiques	Ligand associé à <i>S.aureus</i>
<b>TLRs</b>	TLR2	Lipopeptide-lipoprotéine
	TLR2-TLR1/TLR6	LTA, lipoprotéine,
	TLR-2-CD14	LTA, peptidoglycane
	TLR-2-CD36	LTA, glycérides diacylés
	TLR8	ARN à <i>S.aureus</i>
	TLR9	ADN avec des motifs de (CPG)Cytosine-phosphate-guanosine non-méthylé
<b>NLRs</b>	NOD	Peptidoglycane (MDP)
<b>CLRs</b>	MBL	LTA
	L-ficoline	LTA
	SP-A	LTA, CWG

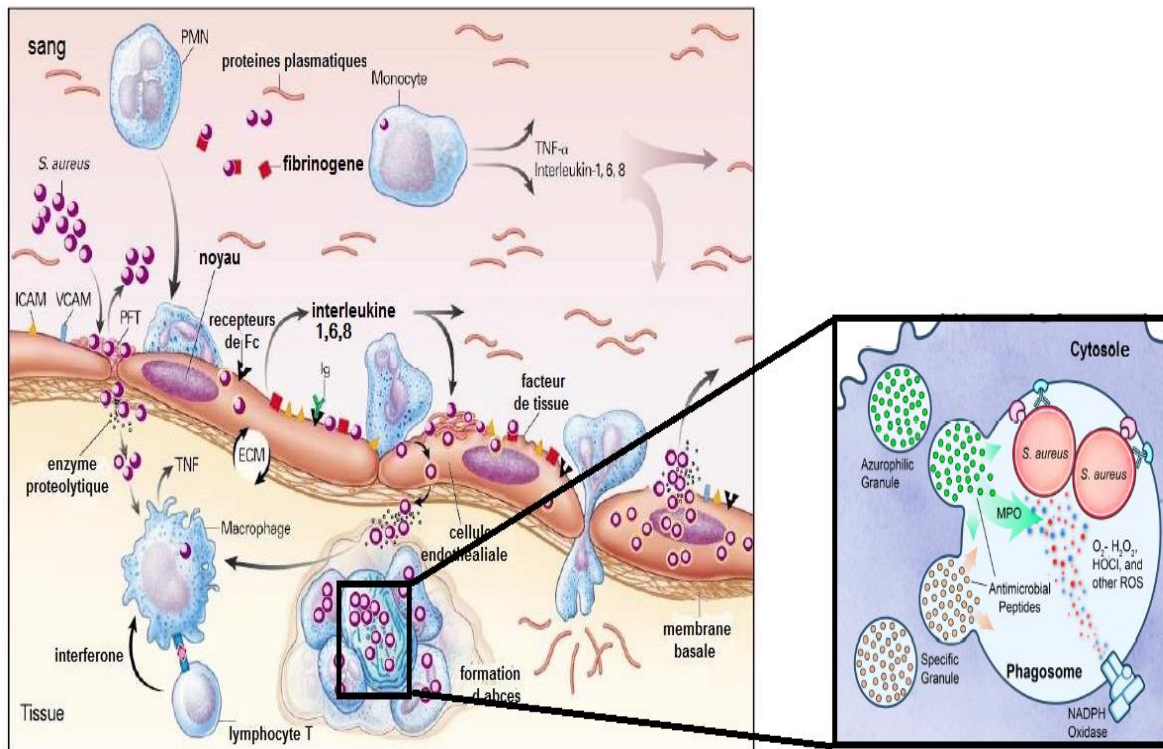
LTA: lipoteichoic acid; CPG: cytosine-phosphate-guanosine; MDP: muramyl dipeptide; MBL: mannose binding lectin; CWG: cell wall glycopolymer; SP: surfactant protein.

Le NADPH oxydase est une enzyme antioxydante présente dans une variété de cellules, en particulier, les cellules phagocytaires professionnelles (Nauseef, 2019) et les cellules endothéliales (Frey et *al.*, 2009). Il s'agit d'une enzyme qui réduit le dioxygène en superoxyde ( $O_2^-$ ), qui a un pouvoir antimicrobien très puissant, et qui peut être produite par l'eNOS découplé (Mittal et *al.*, 2014). Par la suite, le superoxyde dismutase (SOD) catalyse la conversion du  $O_2^-$  en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (Kobayashi et *al.*, 2015). Cependant, en présence du NO, synthétisé par le NOS et qui joue un rôle antimicrobien et immunomodulateur majeur, l' $O_2^-$  réagit rapidement avec le NO, ce qui entraîne la formation de peroxyde d'azote ( $ONOO^-$ ) qui est très toxique.  $H_2O_2$  et les ions  $Cl^-$  pourraient servir de substrats à l'enzyme MPO pour produire l'acide hypochloreux (HOCl), qui joue un rôle important dans la destruction bactérienne (McKenna and Davies, 1988). En absence des granules azurophiliques protéiques MPO, le phagosome est pauvre en HOCl et contient des quantités plus élevées en  $H_2O_2$ . Les neutrophiles pourrait également tuer *S.aureus* par dégranulation des composants peptidiques antimicrobiens tels que la cathélicidine et les défensines, l'azurocidine, les cathepsines, la lactoferrine, les lysozymes, la protéinase-3 et l'élastase (Brandt et *al.*, 2018). En plus des mécanismes immunitaires défensifs déjà cités, les cellules immunitaires sont dotées d'une activité protectrice redox, dont la SOD et la catalase, et qui améliorent nettement



## Chapitre1. Revue de littérature

les fonctions endothéliales (Muzykantov, 2001; Sena et al., 2013). La SOD représente la première et la plus importante ligne de défense antioxydante enzymatique contre les ROS. Trois isoformes distinctes de SOD ont été identifiées dans le tissu vasculaire: Cu/ZnSOD situé dans le cytoplasme, MnSOD dans les mitochondries et SOD extracellulaire. De plus, la catalase pourrait fournir une protection modérée contre les ROS (Muzykantov, 2001; Sena et al., 2013). Elle réduit  $H_2O_2$  en  $H_2O$  et  $O_2$ . C'est aussi une enzyme à haute activité catalysante, principalement située dans les peroxysomes et fonctionne dans le cytosol. Afin de contrôler les infections à *S.aureus*, les neutrophiles sécrètent des structures riches en ADN, appelées pièges extracellulaires des neutrophiles (NETs), et qui sont dépendantes de MyD88 et TLR2. Elles limitent la propagation des pathogènes (Brandt et al., 2018). Cependant, *S.aureus* a développé un arsenal de facteurs pour contourner les différentes réponses immunitaires.



**Figure 1.5. Les différents acteurs de la réponse immune innée contre *S.aureus*** (Lowy, 1998; McGuinness et al., 2016). ECM: extracellular matrix, ICAM: Intercellular adhesion molecule, MPO: myeloperoxidase, PFT: platelet–fibrin thrombi, ROS: reactive oxygen species, VCAM-1 vascular cell adhesion molecule.



### 1.1.6.2. Mécanismes d'échappement du *S.aureus* au système immunitaire de l'hôte

#### 1.1.6.2.1 Mécanismes d'échappement du *S.aureus* au processus de la phagocytose

*S.aureus* est armé de nombreuses stratégies pour échapper aux défenses immunitaires innées de l'hôte. C'est une véritable machinerie de protéines qui agit sur :

##### 1. Le système du complément (activités C3 et C5 convertase)

*S.aureus* peut bloquer les différentes voies du complément en inhibant l'activité de C3 convertase, et le clivage de C3b, principalement via l'inhibiteur staphylococcique du complément (SCIN). Il sécrète également l'auréolysine qui clive et inhibe C3. De plus, Eap sécrété peut empêcher la formation de C3b en déstabilisant la formation de C4bC2 proconvertase nécessaire pour la voie classique et la voie des lectines du complément (Speziale and Pietrocola, 2021). *S.aureus* peut résister à la lyse par le complexe d'attaque membranaire (MAC) (Okumura and Nizet, 2014). Il produit SSL7 qui inactive C5. Pour empêcher l'opsonisation par les immunoglobulines, *S.aureus* sécrète la protéine A qui bloque leur fraction Fc (Thammavongsa et al., 2015).

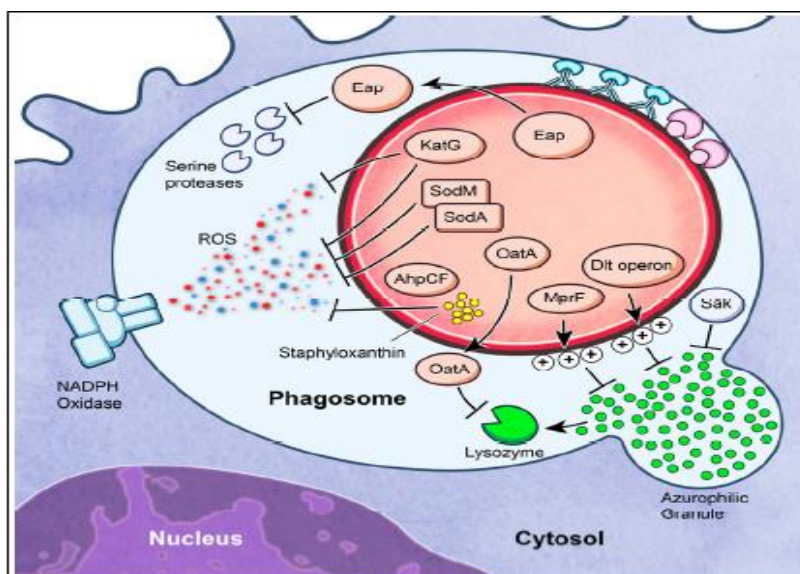
2. Inhibition du recrutement des neutrophiles par la protéine CHIPS et par production de superantigènes-like 5 et 10 (SSL5 et SSL10). La protéine CHIPS se fixe aussi sur le récepteur C5a (C5aR), en inhibant la chimiotaxie des neutrophiles et des monocytes (Haas et al., 2004). *S. aureus* empêche également le roulement des neutrophiles sur l'endothélium.

3. Echappement à l'élimination par les phagocytes et survie intracellulaire (figure1.6) :

*S. aureus* sécrète la staphyloxanthine, la catalase (Kat G), l'hydroperoxyde réductase d'alkyle (AhpC) et les superoxyde dismutases (SodA et SodM) qui le protègent contre les ROS antimicrobienne (Thammavongsa et al., 2015) (figure1.6). Il peut également modifier son enveloppe pour renforcer sa résistance aux enzymes lysosomales (Thomer et al., 2016). Enfin, il sécrète des toxines qui altèrent l'intégrité et le fonctionnement des cellules endothéliales comme les PFTs (McGuinness et al., 2016; Wilke and Bubeck Wardenburg, 2010). En effet, l'ajout de L-alanine à l'acide teichoïque de la paroi de *S. aureus* permet à la bactérie de résister à l'attaque des peptides antimicrobiens (Collins et al., 2002).

*S. aureus* est de surcroît, sécréteur de l'ADNase qui peut réduire considérablement l'activité NETosis ou NETs (Neutrophil extracellular traps) des neutrophiles en dégradant les filaments de l'ADN, provoquant ainsi la libération des bactéries des NETs ou par l'action suppressive de l'Eap sur la formation des NETs. De plus, la bactérie peut résister à la destruction par NET en

exprimant la protéine de surface FnBPB, qui neutralise l'activité bactéricide des histones. Ainsi, la formation du biofilm peut inhiber le processus de la nérose (Brandt et al., 2018 ;Pietrocola et al., 2017).



**Figure 1.6. Survie de *S. aureus* à l'intérieur du neutrophile** (McGuinness et al., 2016b). *S. aureus* est capable de produire des molécules pour inhiber les ROS et les molécules contenues dans les granules azurophiliques. AhpCF: alkyl hydroper oxide reductase, Eap: extracellular adherence protein, SAK: Staphylokinase, SodA et SodM: Super oxide dismutases.

### **1.1.6.2.2. Inhibition de la transmigration des phagocytes à travers l'endothélium**

*S. aureus* peut bloquer la migration des neutrophiles à travers l'endothélium principalement via l'hémolysine-bêta (Tajima et al., 2009). Il sécrète également l'Eap, qui inhibe l'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales en agissant sur la molécule d'adhésion intercellulaire1 (ICAM-1) (Athanasopoulos et al., 2006; Haggart et al., 2004) (figure1.6).

### **1.1.6.2.3. Interférence de *S. aureus* avec l'hémostase**

*S. aureus* est sécréteur de coagulase, un polypeptide qui se lie à la prothrombine et l'inactive entraînant la conversion du fibrinogène en fibrine et favorisant la coagulation. Deux autres substances participent à l'altération de la cascade de la coagulation. Ce sont la coagulase canonique (CoA) et la protéine de transport du vWF (vWbp) (Chavakis et al., 2005; McAdow et al., 2012).

### **1.1.6.2.4. Dissémination septicémique de *S. aureus***

*S. aureus* passe à travers la barrière hématologique essentiellement en utilisant les CEs auxquelles il adhère fortement via ses molécules d'adhésion en particulier les protéines de transport de la fibronectine (FnBPs). L'adhésion de *S. aureus* à l'endothélium, est une étape critique dans sa pathogénicité, vu qu'elle facilite sa dissémination à travers le sang vers les

## Chapitre 1. Revue de littérature

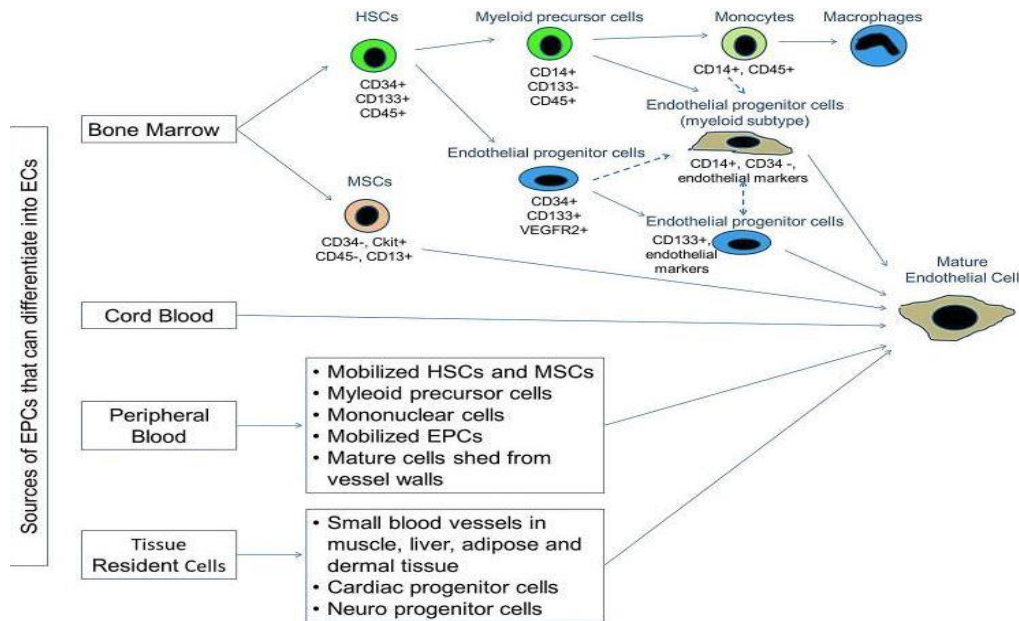
différents tissus et permet le passage d'une bactériémie vers un sepsis (Pöhlmann-Dietze et al., 2000). Après ingestion par les CEs, le mécanisme de sortie n'est pas connu. L'altération de la barrière endothéliale par les toxines constitue également une voie possible de dissémination de *S. aureus*. En plus, la capacité de cette bactérie à envahir et à survivre dans les CE contribue à sa propension à provoquer une infection endovasculaire persistante accompagnée d'une destruction endothéliale (Barbara et al., 1998). Les CEs pourraient constituer une niche favorable à la persistance et la résistance bactérienne intracellulaire vis-à-vis des actions antimicrobiennes de l'hôte et de l'antibiothérapie provoquant par la suite la progression des infections vers un sepsis et même un choc septique (Rollin et al., 2017; Thomer et al., 2016). Cependant, les CEs sont parmi les premières cellules sentinelles qui jouent un rôle important dans la réponse immunitaire et inflammatoire contre les pathogènes (Ince et al., 2016; Mai et al., 2013).

### 1.2. Cellules endothéliales

Les CEs représentent l'unique lignée cellulaire multifonctionnelle qui tapisse la face interne des vaisseaux sanguins et lymphatiques et forme ainsi une interface entre les éléments circulants et les cellules parenchymateuses des différents organes (Ince et al., 2016). Les CEs atteignent un nombre estimé à  $1.6 \times 10^{13}$  et représentent un poids d'environ 1 Kg dans l'organisme humain. Elles s'organisent en monocouche, liées avec des jonctions cellules/cellules ou cellule/matrice, qui caractérisent l'endothélium des vertébrés (Muñoz-Chápuli and Pérez-Pomares, 2010). Ces jonctions sont de trois types; les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les jonctions communicantes (Michiels, 2003).

#### 1.2.1. Ontogénie et phylogénie

Les CEs dérivent du mésoderme, une couche cellulaire se trouvant entre l'ectoderme et l'endoderme et qui est à l'origine du tissu conjonctif, des cellules sanguines, vasculaires, musculaires et rénales. Les CEs et les cellules hématopoïétiques auraient le même précurseur, l'hémangioblaste, une cellule ayant un double potentiel cellulaire (Choi et al., 1998). L'hémangioblaste se transforme en cellule pré-endothéliale intermédiaire qui se différencie soit en s'engageant dans la lignée hématopoïétique, soit en angioblaste. Ce dernier à son tour se différencie soit en cellule musculaire lisse ou en précurseur de cellule endothéliale puis en cellule endothéliale (Boshoff and Weiss, 2002) (Figure 1.7). Les CEs, peuvent se différencier par la suite, en cellules mésenchymateuses ou en cellules musculaires lisses (Arciniegas et al., 2000).



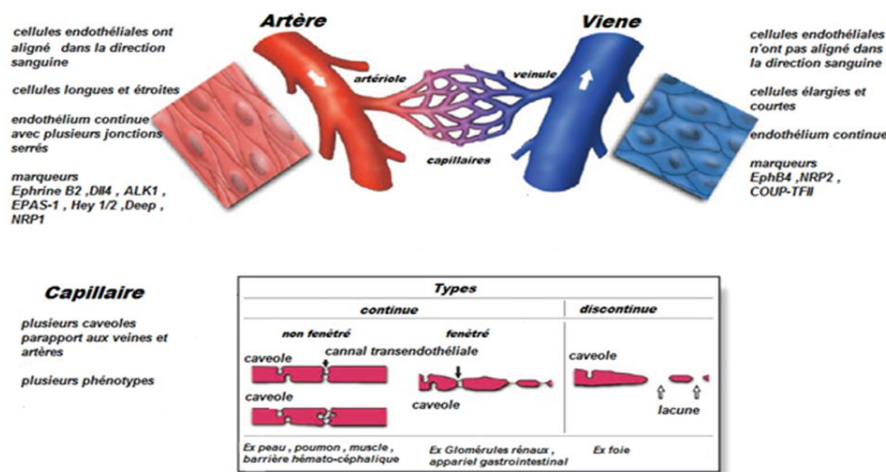
**Figure 1.7. Origine et différenciation des cellules progénitrices endothéliales** (Balaji *et al.*, 2013). HSC: cellules souches hématopoïétiques, MSCs: cellules souches mésenchymateuses, PCEs: cellules progénitrices endothéliales, VEGFR2: récepteurs de facteur de croissance endothélial vasculaire 2. Les cellules progénitrices peuvent se différencier en cellules endothéliales à partir de différentes sources. Principalement, les cellules souches hématopoïétiques (HSC) résidant dans la niche de la moelle osseuse (BM) donnent naissance à une population de cellules qui se différencient en progéniteur myéloïde ou sous-progéniteur endothélial. Ces sous-populations se différencient en fonction de leur type cellulaire mature respectif. D'autres voies (lignes pointillées) sont proposées pour donner naissance aux CPE, lorsque ces dernières proviennent directement des CSC ou d'un progéniteur myéloïde/intermédiaire monocyte. Les marqueurs de surface cellulaire différencient les cellules le long de la voie proposée de l'ontogenèse EPC.

### 1.2.2. Structure, hétérogénéité et plasticité

Bien qu'ayant des fonctions similaires, selon leurs positions dans l'arbre vasculaire, les cellules endothéliales exercent des fonctions prédominantes différentes, ainsi, elles présentent des variations phénotypiques, morphologiques et génotypiques entre les différents segments de l'arbre vasculaire et même au sein du même organe (Aird, 2012; Marcelo *et al.*, 2013; Stone *et al.*, 2021). Les CE possèdent des structures hétérogènes (figure 1.8). Au niveau des artères, elles sont longues, étroites et alignées dans la direction sanguine via des jonctions serrées, alors que les CE des veines sont larges et courtes, mais toutes les deux forment un endothélium continu et ont une épaisseur d'environ 1  $\mu\text{m}$ . En revanche, au niveau des capillaires, les CE sont plus minces de moins de 0,1  $\mu\text{m}$  (Aird, 2007). Cette hétérogénéité est principalement liée à des facteurs génétiques ou environnementaux. L'hétérogénéité est médiée d'une part, par une combinaison de voies de transduction de signal sensibles à l'environnement et réversibles, et par des mécanismes épigénétiques stables qui bloquent

## Chapitre1. Revue de littérature

l'expression du gène indépendamment de l'environnement, d'autre part (Aird, 2012). Les CEs sont principalement caractérisées par une grande plasticité, qui leur confère le pouvoir de transition entre différents arbres vasculaires et lymphatiques (Aird, 2007).



**Figure 1.8. Hétérogénéité des cellules endothéliales (Aird, 2007).** Les CEs possèdent des structures et des phénotypes hétérogènes. Au niveau des artères ; elles sont continues et d'une épaisseur d'environ 1  $\mu\text{m}$ . Au niveau capillaire, elles sont plus minces (moins de 0,1  $\mu\text{m}$ ).

### 1.2.3. Marqueurs

Les CEs expriment des marqueurs de différenciation. Ce sont des molécules cytoplasmiques ou membranaires qui facilitent leur identification.

- **CD34** : Il est exprimé par les CEs jeunes et matures. N'étant pas exprimé par les CEs lymphatiques dans les conditions normales, il permet de distinguer l'origine des cellules endothéliales (Rakocevic et al., 2017).
- **CD31 (PECAM-1)** : C'est un récepteur de la superfamille des immunoglobulines. Il est exprimé par les CEs jeunes et matures. Il participe au renforcement des jonctions entre deux cellules voisines. Il est crucial pour la transmigration leucocytaire durant l'inflammation, pour les réactions immunes et l'angiogénèse (Rakocevic et al., 2017).
- **CD105 (endogelin)** : Il est exprimé par les CEs en prolifération active et de ce fait, son expression est marquée durant l'angiogénèse notamment dans les tissus inflammatoires et tumoraux. Il revêt une importance capitale pendant la période embryonnaire (Rakocevic et al., 2017).
- **La famille des récepteurs VEGF** : Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) est une protéine produite par des cellules et dont le rôle est de stimuler l'angiogénèse et la vasculogénèse. Il en existe sept isotypes connus dont cinq chez l'Homme (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F et le facteur de croissance placentaire – PGF) qui fonctionnent comme des mitogènes spécifiques des CE lymphatiques et vasculaires. L'action de VEGF s'exerce par l'interaction de ses récepteurs



VRGFR1 (KDR/FIk-1) et VEGFR2 (Flt-1). Ce sont des récepteurs de la famille des tyrosine-kinase. VEGFR2 est fortement exprimé par les CEs mais est aussi exprimé par les mégacaryocytes, les cellules souches hématopoïétiques, les progéniteurs endothéliaux et les plaquettes. L'interaction entre VEGF et ses récepteurs est essentielle pour le développement vasculaire embryonnaire et pour de nombreux autres processus physiologiques et pathologiques comme les maladies inflammatoires chroniques ou bien l'ischémie myocardique (Rakocevic et *al.*, 2017). VEGFR3 (Flt-4), un autre récepteur VEGF à tyrosine kinase est surtout porté par l'endothélium lymphatique. Ses ligands sont le VEGF-C et le VEGF-D qui sont les principaux régulateurs de la lymphangiogenèse (Alitalo and Carmeliet, 2002).

- **Von Willebrand factor (vWF)** : Il s'agit d'une glycoprotéine multimérique produite par la cellule endothéliale qui peut la sécréter en dehors de la cellule ou la stocker dans les corps de Weibel-Palade qui servent de marqueur d'identification cellulaire (Rakocevic et *al.*, 2017).

Les CEs issues de la veine du cordon ombilical humain (HUVEC) expriment des marqueurs exclusivement veineux comme EphB4 (vein marker ephrin receptor B4) et COUP-TFII (Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II ) expriment aussi l'ensemble des marqueurs spécifiques exprimés par les cellules endothéliales.

### 1.2.4. Métabolisme

La CE comporte un grand nombre de voies métaboliques. On distingue la glycolyse (figure 1.9) qui est utilisée par la CE comme une source d'énergie (De Bock et *al.*, 2013), et dans laquelle le glucose est nécessaire pour produire le pyruvate qui est utilisé dans le cycle de Krebs ou bien converti en lactate (Bierhansl et *al.*, 2017). La cellule possède une voie métabolique pour les acides gras ainsi qu'une voie pour les acides aminés comme la glutamine et l'arginine.

#### 1.2.4.1. Métabolisme glucidique

Malgré l'exposition continue des CEs à l'oxygène du flux sanguin, la voie énergétique préférable n'est pas la phosphorylation oxydative en raison du faible contenu mitochondrial, mais la glycolyse (Dagher et *al.*, 2001; Mertens et *al.*, 1990). En glycolyse, chaque molécule de glucose produit 34 molécules d'Adénosine triphosphate (ATP), un rendement inférieur comparé à la phosphorylation oxydative, ce qui nécessite un flux glucidique élevé pour produire plus d'ATP. La glycolyse aérobie dans les CEs permet d'éviter l'accumulation de taux élevés de ROS, la conservation de la quantité d'oxygène à destination tissulaire, l'adaptation à des situations d'hypoxie, et à la production de lactate qui joue un rôle dans la pro-angiogenèse (Ghesquière et *al.*, 2014). Le glucose peut être utilisé par la voie des pentoses phosphates pour la synthèse des nucléotides et des acides nucléiques, permettant



### 1.2.4.3. Métabolisme protidique

#### 1.2.4.3.1. Métabolisme de l'arginine

L'arginine se transforme en citrulline et en monoxyde d'azote (NO) par le NOS endothélial (NOSe), afin de réguler les diverses fonctions des CEs (Bierhansl et *al.*, 2017 ; Morris, 2009). Des études *in-vivo* ont montré que la supplémentation par cet acide aminé améliore la production du NO vasculaire (Wu and Meininger, 2000). En outre, l'arginine pourrait être catalysé par l'arginase pour générer l'ornithine et l'urée (Kim et *al.*, 2009). L'arginase est un médiateur pro-oxydant qui peut favoriser le dysfonctionnement endothélial (Rabelo et *al.*, 2015)(figure1.15) alors que son inhibition rétablit l'activité NOSe et inverse les anomalies qui affectent les fonctions endothéliales (Kim et *al.*, 2009) (figure1.10).

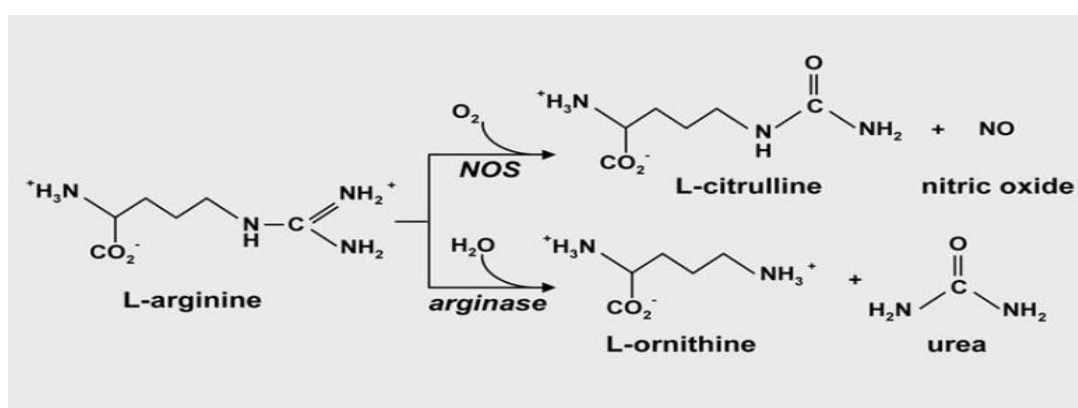


Figure 1.10 Métabolisme de L-arginie par le NOSe et l'arginase (Durante et *al.*, 2007).

##### 1.2.4.3.1.1 Le monoxyde d'azote (NO)

le NO est un gaz de durée de vie très courte. Dans les CEs, il est synthétisé à partir de la L-arginine par la eNOS, une enzyme constitutive, en réponse à des stimuli physiologiques (Versari et *al.*, 2009). Il peut également être produit en grande quantité à partir du monoxyde d'azote (NO) synthase inductible (iNOS), ce qui favorise l'installation de plusieurs pathologies.

Dans les CEs, le NO est impliqué dans les différents processus physiologiques, en régulant les fonctions endothéliales vasculaires (Dharmashankar et Widlansky, 2010), notamment le tonus vasculaire en relaxant les cellules musculaires lisses vasculaires (Kang, 2014) et la pression artérielle via l'activation de la guanylate cyclase soluble pour générer le monophosphate de guanosine cyclique (cGMP). Il joue également un rôle important dans la prévention de l'agrégation plaquettaire et l'inhibition de la prolifération vasculaire des cellules musculaires lisses. Il inhibe notamment l'apoptose des cellules endothéliales induites par différents stimuli (Förstermann et Sessa, 2012). De plus, le NO est un régulateur de la production d'énergie, et son fonctionnement dépend de l'état redox cellulaire. Il peut diminuer la respiration mitochondriale en inhibant d'une façon réversible le cytochrome c oxydase,



## Chapitre1. Revue de littérature

l'enzyme terminale dans la chaîne de transport d'électrons où il rentre en compétition avec l'oxygène induisant la libération de l'anion superoxyde et activant ainsi la signalisation de ROS mitochondriale qui peut conduire à la formation de l'espèce oxydante puissante, le peroxy-nitrite ( $\text{ONOO}^-$ ). Ce dernier est associé à une variété de maladies vasculaires (Moncada and Higgs, 2006).

Le NO a aussi un rôle clé dans la pathogenèse de l'inflammation. Il est considéré comme un médiateur pro-inflammatoire du fait de sa sur-production dans les situations pathologiques (Sharma *et al.*, 2007). De plus, il a été rapporté que la synthèse du NO peut être augmentée par activation des CEs par l'INF- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  (Yamaoka *et al.*, 2002). Par ailleurs, il joue également un rôle anti-inflammatoire dans les conditions physiologiques normales.

### 1.2.4.3.1.2. L'arginase

C'est une enzyme qui hydrolyse la L-arginine en urée et en ornithine. Elle régule négativement et réciproquement eNOS et le NO par la consommation de l'arginine. Une augmentation de l'arginase conduit à une diminution de la synthèse de NO par eNOS (Durante *et al.*, 2007). Il existe deux isoformes d'arginase: arginase I et arginase II, qui se trouve notamment dans les CEs (Morris, 2009). L'activité de cette enzyme peut être augmentée par les cytokines telles que l'IL-4 (Weinberg *et al.*, 2008), et induit la diminution de la biodisponibilité du NO par activation de NADPH oxydase dans les CEs (Walch *et al.*, 2006).

### 1.2.4.3.2. Métabolisme de la L-glutamine

Dans les CEs, la glutamine est considérée comme un important substrat anaplérotique pour le cycle de krebs pour générer de l'ATP. La glutaminase (GLS) catalyse la conversion de la glutamine en glutamate. L'activité GLS a été nettement observée dans les CEs en culture provenant de divers lits vasculaires, y compris les CEs microvasculaires, aortiques et veineuses. Elle est environ vingt fois plus élevées que dans d'autres types cellulaires (Kim *et al.*, 2017; Wong *et al.*, 2017). De plus, la glutamine améliore la prolifération et la viabilité des CEs (Kim *et al.*, 2017).

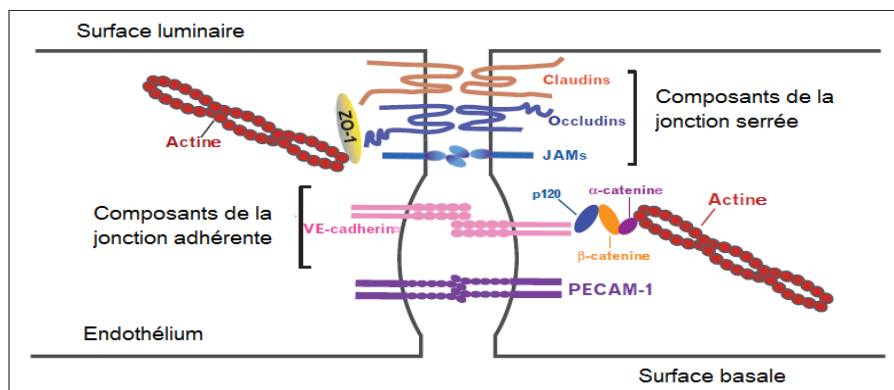
## 1.2.5. Fonctions

Les CEs sont des cellules multifonctionnelles uniques ayant des fonctions métaboliques et synthétiques basales inductibles et/ou constitutives. Elles réagissent avec les stimuli physiques et chimiques dans la circulation et régulent l'hémostase, le tonus vasomoteur, et les réponses immunitaires et inflammatoires (Sumpio *et al.*, 2002).

### 1.2.5.1. Barrière sélective

L'endothélium représente une barrière semi-perméable qui contrôle le transfert de petites et grosses molécules. La surface d'échanges que constitue l'endothélium est estimée chez l'être

humain à 350 m<sup>2</sup> (Pries et *al.*, 2000). Les CEs sont reliées entre elles par trois types de jonctions : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les jonctions lacunaires (figure1.11). Ces structures sont impliquées dans le contrôle de la perméabilité vasculaire aux cellules. Leur régulation est coordonnée par les besoins fonctionnels de l'organe irrigué. La perte de cette fonction barrière peut conduire à un œdème extra-cellulaire (Michiels, 2003).



**Figure 1.11. Les différents types de jonctions endothéliales** (Lertkiatmongkol et *al.*, 2016).

La barrière de perméabilité vasculaire est maintenue par des jonctions. Les jonctions serrées composées de claudines, d'occludines et de JAM; les jonctions adhérentes composées principalement de VE-cadhérine (vasculaire Cadherine endothéliale) associée au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de membres de la famille des caténines. Les compartiments spécialisés sont le récepteur de la surface de la cellule endothéliale le plus abondant, le PECAM-1. JAM: junctional adhesion molecule; PECAM-1 : platelet/endothelial cell adhesion molecule-1.

### 1.2.5.2. Hémostase, coagulation et fibrinolyse

A l'état basal, la surface d'un endothélium sain est à la fois anticoagulante et antithrombotique. Au repos, l'endothélium inhibe l'agrégation plaquettaire par production de NO, des prostacyclines (PGI<sub>2</sub>) (Sumpio et *al.*, 2002), et de l'ET-1 (l'endothéline-1). Seul le NO est synthétisé de manière constitutive (Murdaca et *al.*, 2012). Il inhibe également la coagulation par l'expression de thrombomoduline (TM) et par l'activation de la voie protéine C/protéine S qui inactive le facteur VIIIa et le Va. Le vWF agit également en liant et en protégeant le facteur VIII (Sumpio et *al.*, 2002). Enfin, l'endothélium active la fibrinolyse par production de l'activateur du plasminogène tissulaire (t-PA) et de l'urokinase qui permettent la transformation du plasminogène en plasmine qui dégrade les thrombi (Michiels, 2003). Cependant, une lésion vasculaire ou une exposition à certaines cytokines ou stimuli proinflammatoires déplace la balance vers un profil procoagulant et prothrombotique de l'endothélium. L'agrégation plaquettaire est activée par production du facteur d'activation plaquettaire (PAF) qui agit avec P-sélectine pour favoriser l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles à l'endothélium (Sumpio et *al.*, 2002). Il y a également une libération du vWF qui provient principalement des

## Chapitre1. Revue de littérature

CEs (Sumpio et *al.*, 2002). Enfin, la coagulation est activée par l'exposition du facteur tissulaire qui lie le facteur VII.

### 1.2.5.3. Angiogénèse et vasculogénèse

Les stades précoces de vasculogénèse requièrent le VEGF et son récepteur spécifique de la CE VEGFR2. L'angiogénèse qui correspond à la formation de nouveaux vaisseaux à partir de l'endothélium préexistant requiert également le VEGF mais aussi les angiopoëitines qui participent au remodelage et à la maturation des vaisseaux initiaux (Michiels, 2003).

### 1.2.5.4. Immunité et réactions inflammatoires

En plus de leurs fonctions physiologiques précédentes, les CEs jouent un rôle crucial dans les réactions immunitaires et inflammatoires (Michiels, 2003; Sumpio et *al.*, 2002) (figure1.13). Au cours du processus inflammatoire, les CEs s'activent en réponse à des stimuli variables. Cette activation est de deux types. Soit en réponses rapide, appelée aussi stimulation ou activation de type I, elle est indépendante de l'expression génétique, et elle est induite par la liaison des ligands aux domaines extracellulaires du ou en réponse relativement plus lente, c'est l'activation de type II dépendante d'une expression génétique et qui est plus soutenue (Pober and Cotran, 1990).

#### 1.2.5.4.1. Rôle de cellules sentinelles et détections des PAMPs

Les CEs sont parmi les premières lignées à interagir avec les microbes de part leur localisation privilégiée dans l'interface sang-organe. Ce sont de véritables sentinelles du système immunitaire du fait de leur expression de divers PRRs (figure1.13) comprenant TLR-2-4 et NOD2 en réponse à différents stimuli (Davey et *al.*, 2006; Mai et *al.*, 2013; Oh et *al.*, 2005), entre autres bactériens. Il a été rapporté que les CEs humaines sécrètent IL-6 via la signalisation NOD2 qui reconnaît le muramyl dipeptide (MDP), constituant du peptidoglycane bactérien (Davey et *al.*, 2006). De plus, une étude récente montre que les cellules aortiques humaines infectées par *Streptococcus mutans* sécrètent IL-6 et IL-8 par l'activation intracellulaire de TLR2 et de NOD2 (Nagata and Oho, 2017). D'autres PRRs ont été détectés dans les CEs tels que NOD1 (Opitz et *al.*, 2005, 2006), TLR-3 (Tissari et *al.*, 2005), TLR-4, TLR-9 (Kebir et *al.*, 2009), CD36 (Swerlick et *al.*, 1992) et CD14 (Jersmann et *al.*, 2001) suite à la reconnaissance de différents compartiments microbiens (Mai et *al.*, 2013).

#### 1.2.5.4.2. Amplification de la réponse immunitaires et recrutement des leucocytes

Suite à une interaction avec les lipopolysaccharides (LPS), les CEs produisent des cytokines proinflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-5, IL-6, etc) et des chimiokines (CCL2, CCL5, etc) (Vadeboncoeur et *al.*, 2003) qui amplifient la réponse immune en recrutant des cellules

## Chapitre1. Revue de littérature

immunitaires. Une fois activées, les CE surexpriment des molécules d'adhésion (I-CAM-1, V-CAM-1, P-sélectine, E-sélectine (Leeuwenberg et al., 1992; Lorenzon et al., 1998; Pigott et al., 1992; Videm and Albrigtsen, 2008), etc) (figure1.13), favorisant ainsi la transmigration des leucocytes vers les sites inflammatoires (Mai et al., 2013).

### 1.2.5.4.3. Contrôle du trafic leucocytaire

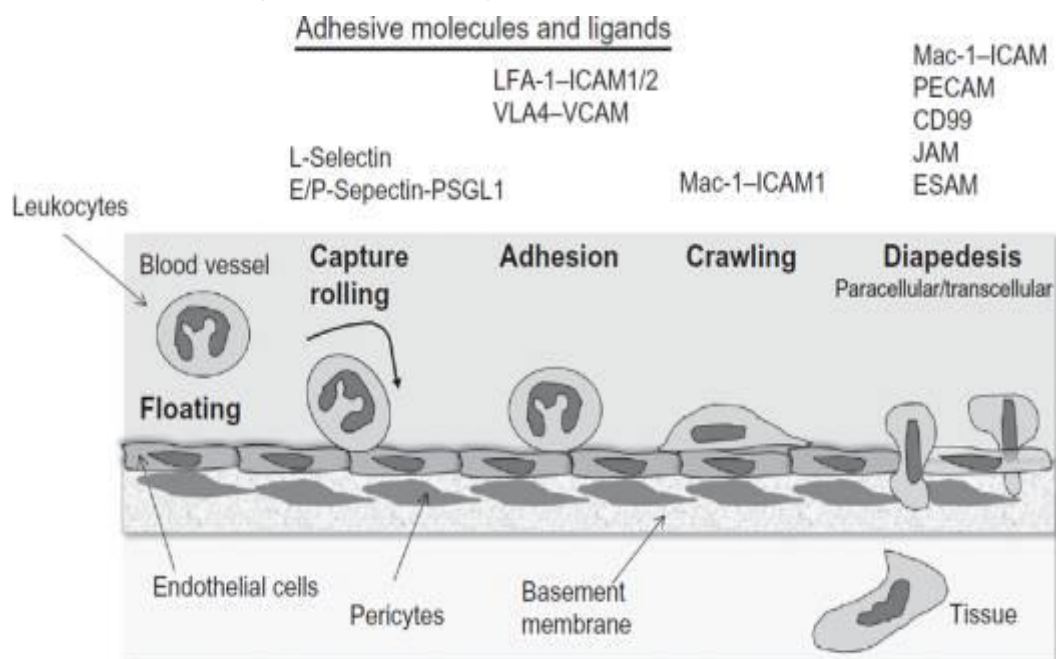
Le passage des leucocytes de la circulation vers les tissus environnants connu sous le terme de diapédèse nécessite l'adhésion des leucocytes à la surface des CEs faisant intervenir les phases de capture, d'adhérence labile et de roulement, d'adhérence forte et de transmigration (Muller, 2003) (figure1.12). La CE régule fortement ce processus d'extravasation par l'expression des molécules d'adhésion appropriées pour chaque étape (Filippi, 2016). Le roulement est dû à des liaisons entre la PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand) des leucocytes et des sélectines présentées à la surface des CEs, y compris, E-sélectine (CD62 antigen-like family member E (CD62E) ou endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1)) et P-sélectine (CD62P). L'adhésion ferme des leucocytes sur l'endothélium se fait par des interactions entre les intégrines  $\beta_2$  telles que  $\alpha_M\beta_2$  intégrine, ainsi nommé macrophage-1 antigen (MAC-1) ou CD11b/CD18 et LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1,  $\alpha_L\beta_2$  integrin ou CD11a/CD18), avec des molécules d'adhésion intercellulaires endothéliales (ICAM)-1 et (ICAM)-2 et la molécule d'adhésion des cellules vasculaires (VCAM)-1 (Langer and Chavakis, 2009). Enfin, la transmigration ou la diapédèse se fait par les molécules PECAM-1 (molécule d'adhésion des cellules endothéliales plaquettaires), CD99, et JAM-1 (molécule d'adhésion de jonction-1) qui sont préférentiellement situées dans les jonctions inter-endothéliales (Félétou, 2011). Les CE ont également la capacité de limiter ou de faciliter le passage tissulaire des cellules immunitaires comme les LT et les cellules dendritiques (Rita and Young, 2012). Cependant, les CE expriment également le ligand de mort programmée (PDL) 1 et 2 (PDL-1) et (PDL-2), qui inhibe la transmigration des LT CD4+ et LT CD8+ (Rita and Young, 2012).

### 1.2.5.4.4. Régulation de la réponse des cellules immunitaires (stimulation et immunosuppression)

Les CE induisent la production de cytokines par les cellules immunitaires sur lesquelles elles exercent une fonction régulatrice en activant ou en inhibant leurs activités (Mai et al., 2013; Rita and Young, 2012). Une large gamme de cytokines proinflammatoires sont exprimées par les CE parmi lesquelles IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, IL-11, IL-15, qui sont importantes pour potentialiser les réponses inflammatoires en induisant l'expression de gènes pro-inflammatoires et la sécrétion de cytokines par d'autres cellules immunitaires. Cependant, l'activation incontrôlée des CE pourrait causer des altérations fonctionnelles endothéliales

## Chapitre1. Revue de littérature

(Zhang, 2008). De ce fait, les CEs peuvent également produire des cytokines anti-inflammatoires comme le récepteur IL-1 antagoniste (IL-1ra), IL-10, IL-13 et TGF- $\beta$ , qui agissent soit en bloquant le processus initié par les cytokines pro-inflammatoires, soit en supprimant la progression de la cascade inflammatoire (Mai et al., 2013; Rita and Young, 2012), De plus, il a été rapporté que les CEs produisent des cytokines immunosuppressives / anti-inflammatoires afin d'inhiber le dysfonctionnement endothélial et la progression du syndrome inflammatoire (Shao et al., 2014).



**Figure 1.12. Etapes et molécules d'adhésion impliquées dans le recrutement des leucocytes** (Filippi, 2016). *PSGL-1: P-sélectine glycoprotéine ligand-1, ICAM: molécule d'adhésion intercellulaire, VCAM-1: molécule d'adhésion des cellules vasculaires-1, PECAM-1: molécule d'adhésion des cellules endothéliales plaquettaires-1, JAM: molécules d'adhésion de jonction -1.*

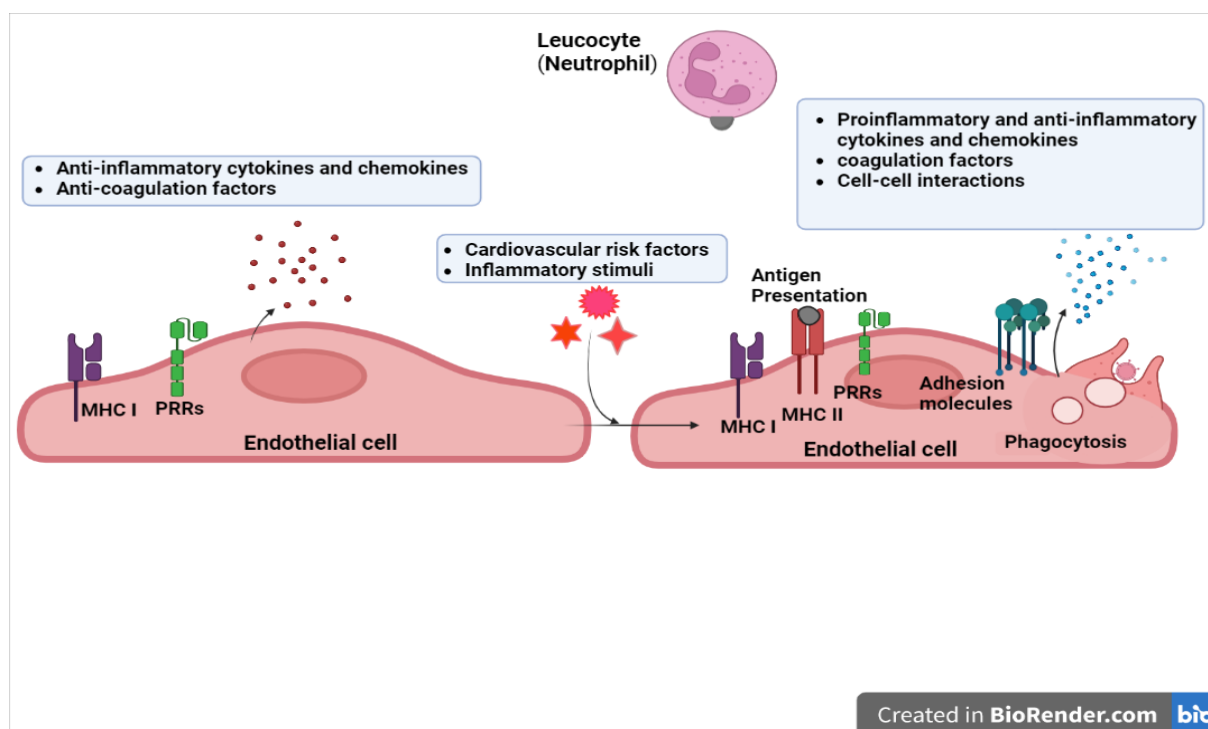
### 1.2.5.4.5. Rôle de cellules phagocytaires non professionnelles

Les CEs sont considérées comme des phagocytes non professionnels (figure 1.13) et peuvent internaliser des hématies apoptotiques (Fens et al., 2012) ou bien des bactéries (Kozarov, 2012). Les CEs phagocytent *S.aureus* suivant des étapes précises allant de l'adhérence jusqu'à la formation de phagosome (Lowy et al., 1988). Par la suite, même après fusion lysosomale, les CEs ne sont pas en mesure de tuer la bactérie ingérée. Ceci explique la fréquence et la persistance d'infections invasives à *S. aureus* impliquant des surfaces endothéliales (Endocardite, infection sur cathéter, etc) (Menzies and Kourteva, 1998). Cette invasion des CEs par *S. aureus* a pour conséquence une cytotoxicité induisant la mort des CEs par apoptose et une croissance bactérienne intracellulaire. De ce fait, *S. aureus* n'est plus

considéré comme un germe exclusivement extracellulaire (Alexander and Hudson, 2001; Lowy et *al.*, 1988).

### 1.2.5.4.6. Rôle de cellules présentatrices d'antigènes non professionnelles

Les CEs expriment les molécules du complexe majeurs d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) (Danese et *al.*, 2007), et les molécules accessoires tels que CD40, CD80, CD 86, CD134. Elles présentent également l'antigène associé au CMH de classe I ou de classe II à des effecteurs circulants ou à des LT mémoires (Choi et *al.*, 2004) (Figure1.13).



**Figure 1.13. Fonctions immunitaires des cellules endothéliales (Mai et *al.*, 2013) avec des modifications.** A l'état basal, les CEs expriment CMH I et PRR. Après stimulation, les CEs expriment CMH II et des molécules d'adhésion de surface, facilitent la transmigration et libèrent des cytokines inflammatoires et des chimiokines.

### 1.2.6. Dysfonctionnement endothélial

L'endothélium joue un rôle fondamental dans le contrôle du tonus vasomoteur, le trafic cellulaire et macromoléculaire, le maintien de la fluidité sanguine et les processus d'angiogénèse. Au cours du sepsis sévère, il y a d'importantes modifications du phénotype endothélial dues aux altérations des activités fonctionnelles des CEs (figure1.14) et qui sont en grande partie, responsable des défaillances d'organes. Les CEs deviennent proadhésives, procoagulantes et antifibrinolytiques (Theofilis et *al.*, 2021). La libération endothéliale du NO est aussi fortement dérégulée (Ince et *al.*, 2016) suite au désaccouplement de eNOS et est affectée par l'expression abusive de l'activité arginase prooxydante (Rabelo et *al.*, 2015)





1.3. Vitamine C

La vitamine C, aussi appelée acide ascorbique (AA) a été isolée pour la première fois en 1923 par le biochimiste Hongrois Szent-Gyorgyi, qui obtint le prix Nobel de médecine en 1937. Quelques années plus tard, on fit le lien entre cette vitamine et une maladie hémorragique appelée Scorbut. Elle a été ensuite synthétisée par Howarth et Hirst (Chambial et *al.*, 2013; Covarrubias-Pinto et *al.*, 2015). Il s'agit d'un composé hydrosoluble possédant un grand potentiel antioxydant et qui intervient dans de nombreuses fonctions biologiques, mais pouvant paradoxalement exercer des effets pro-oxydants (Kaźmierczak-Barańska et *al.*, 2020). La carence en vitamine C est à l'origine de signes hémorragiques, d'anémie, de troubles neurologiques et musculaires alors que le surdosage n'entraîne pas d'effets majeurs (Chambial et *al.*, 2013).

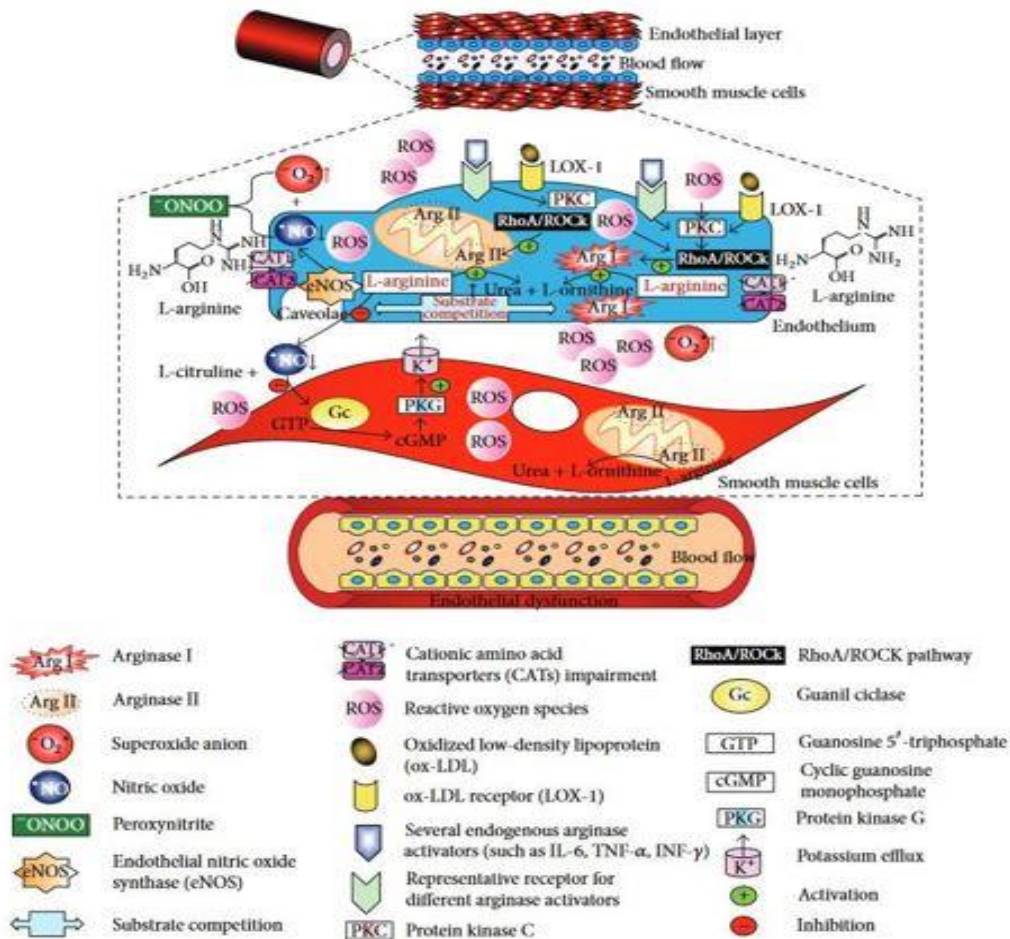


Figure 1.15. Rôle des isoformes de l'arginase dans le métabolisme du NO dans le système vasculaire. Modifié d'après (Rabelo et *al.*, 2015). Le réseau complexe d'interactions entre les facteurs de circulation, les récepteurs membranaires et les voies de signalisation intracellulaires interfère directement avec l'homéostasie vasculaire. L'équilibre entre les activités de eNOS et les isoformes d'arginase est essentiel pour maintenir la biodisponibilité adéquate de NO. Une fois le déséquilibre établi, soit par une production accrue d'espèces réactives d'oxygène, ou une disponibilité réduite de NO, ou les deux, le phénomène de dysfonctionnement endothélial s'installe.



### 1.3.1. Structures chimiques et caractéristiques

L'acide ascorbique ( $\text{AscH}_2$ ) correspondant au nom trivial  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ , est un composé hydrosoluble, photosensible et thermolabile, possédant deux groupes hydroxyles. Son poids moléculaire est égal à 176.12g/mol.

La dénomination commune internationale (DCI) de la vitamine C correspond à l'acide ascorbique. Les dénominations chimiques sont représentées par l'acide L-ascorbique, l'acide L-xyloascorbique, le 3-oxo L-gulofuranolactone (forme énolique), l'acide L-3cétothréohexuronique lactone, la lactone de la forme énolique de l'acide 2, voire encore l'acide 3-céto-L-gulonique (André Rougereau.,1993). Actuellement, il est courant d'utiliser la nomenclature L(+) - acide ascorbique, L-Thréo acide ascorbique (PubChem), et L-Threo-2,3,4,5,6-pentahydroxy-1-hexenoicacid-4-lactone.

Il se présente sous plusieurs formes chimiques parmi lesquelles la forme ascorbate monoanionique ( $\text{AscH}^-$ ) est physiologiquement prédominante (Chambial et *al.*, 2013; Du et *al.*, 2012). Les autres isoformes métaboliquement actives sont : le radical ascorbate ( $\text{Asc}^\bullet$ ) et l'acide déshydroascorbique (DHA) (Figure 1.16).

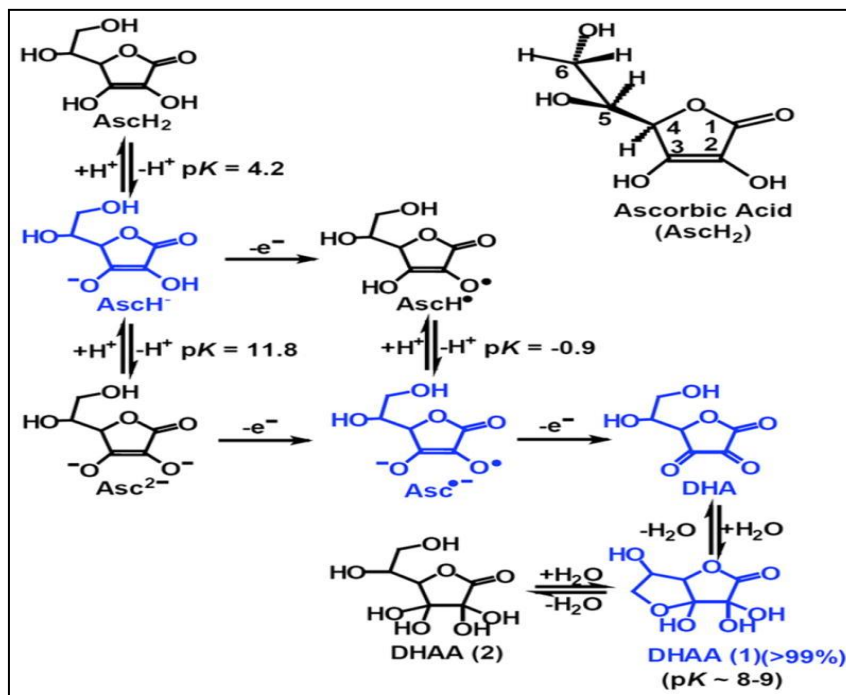


Figure 1.16 Structures des espèces chimiques associées à la vitamine C (Du et *al.*, 2012).

En bleu, les structures bichimiquement dominantes.

### 1.3.2. Biosynthèse

Chez la plupart des mammifères, la synthèse de La vitamine C se fait au niveau du foie (Harrison et *al.*, 2014). Seuls l'homme, le cochon de Guinée, la chauve-souris et les primates sont incapables de le synthétiser, parce qu'ils ne possèdent pas le gène codant de la

## Chapitre1. Revue de littérature

gulonolactone oxydase, l'enzyme nécessaire à la synthèse de la vitamine C (figure 1.17) à partir du glucose, et dépendent de leur régime alimentaire comme source exogène de vitamine C (Corpe et *al.*, 2010; Mandl et *al.*, 2009).

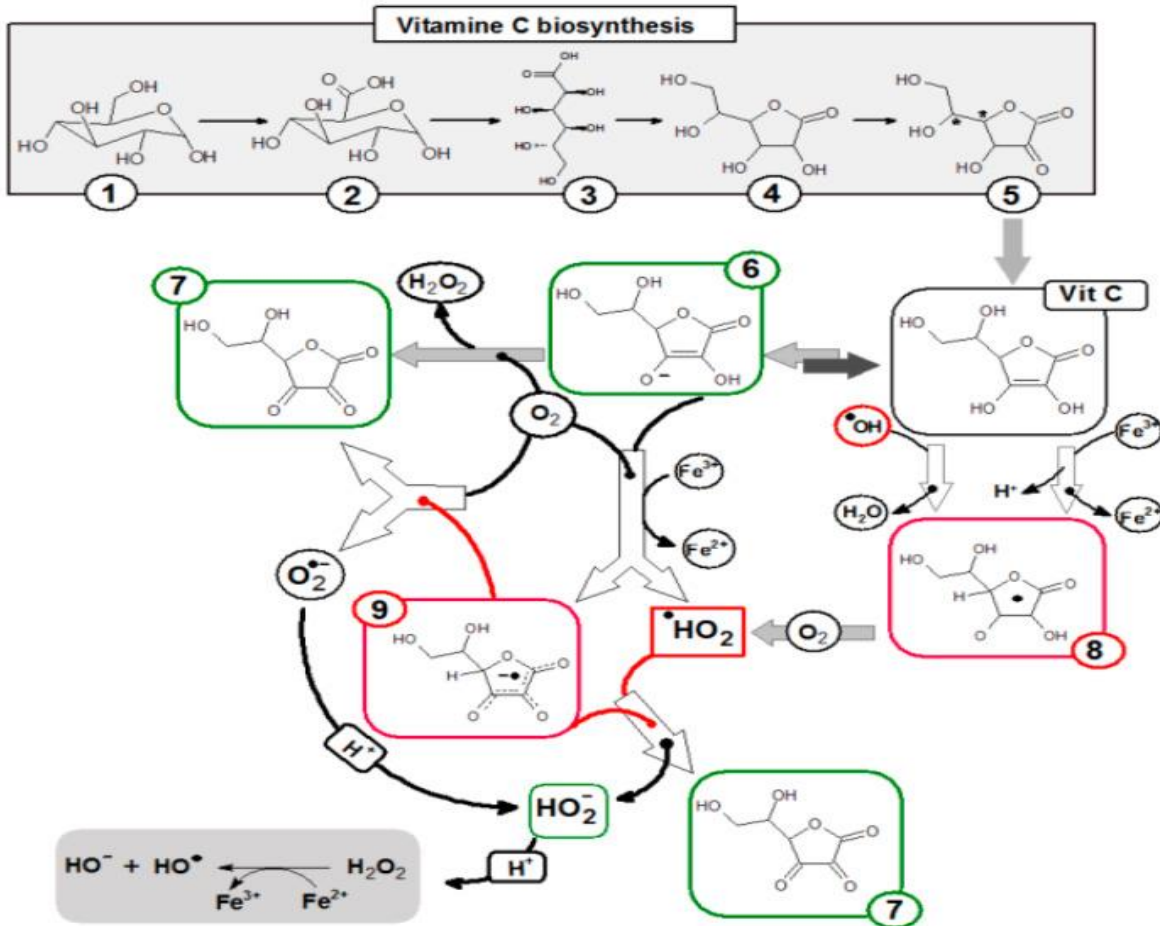
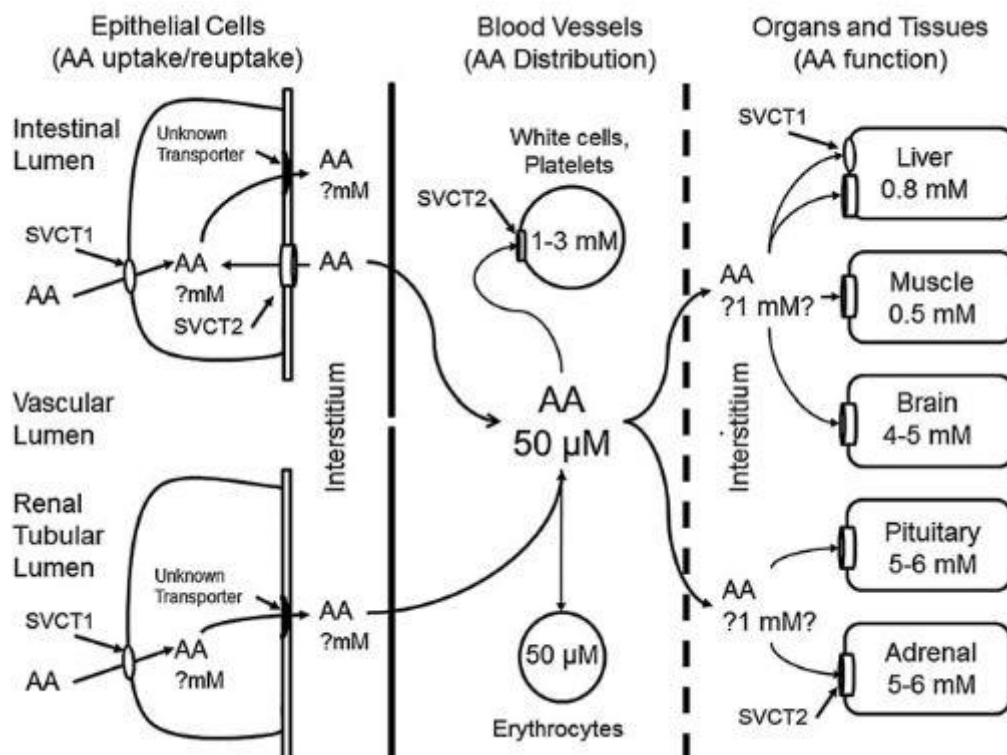


Figure1.17. Biosynthèse de la vitamine C à partir de la D-glucose chez les animaux et différentes voies de transformation chimique de l'acide ascorbique (Każmierczak-Barańska et *al.*, 2020). (1) α-D-glucopyranose; (2) D-glucuronic acid; (3) Gulonic acid; (4) L-gulonolactone; (5) 2-keto L-gulonolactone; (6) Ascorbate anion; (7) Dehydroascorbic acid; (8) Ascorbyl radical; (9) Ascorbyl radical anion.

### 1.3.3. Métabolisme et biodisponibilité

L'acide ascorbique apporté par l'alimentation est prêt à être absorbé par les entérocytes de l'intestin grêle. La vitamine C s'accumule dans les cellules à travers des transporteurs de vitamine C sodium (Na<sup>+</sup>) dépendants (SVCTs)1 (SVCT1) et 2 (SVCT2), alors que le DHA est diffusé via des transporteurs de glucose Na<sup>+</sup> indépendants (GLUT) (Nualart, 2014). SVCT1 dont l'affinité pour la vitamine C est faible, est exprimé par les tissus épithéliaux et est responsable de l'absorption intestinale et de la réabsorption rénale. SVCT2 est exprimé par les cellules non-épithéliales et notamment endothéliales (Carr and Vissers, 2013; May and

Harrison, 2013). Des concentrations intracellulaires élevées en ascorbate sous-régulent les SVCTs et entraînent une baisse de l'absorption intestinale alors que des concentrations faibles ont l'effet inverse. La biodisponibilité est déterminée par l'absorption intestinale et la réabsorption rénales (Du et *al.*, 2012). La demi-vie est de 10 à 20 jours avec une concentration plasmatique d'environ 50  $\mu\text{mol/L}$  (Naidu, 2003). La concentration intracellulaire d'ascorbate est plus élevée que dans les liquides extracellulaires (Du et *al.*, 2012) (figure1.18).

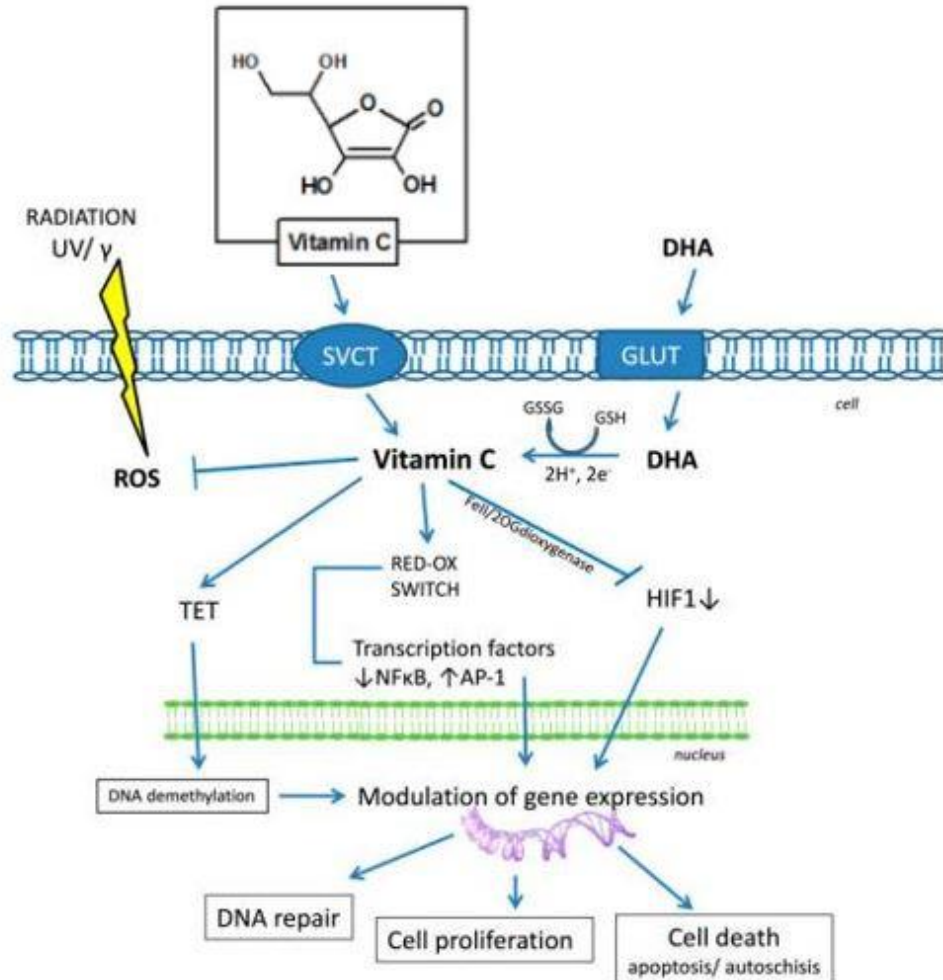


**Figure1.18. Absorption et distribution de la vitamine C à travers le lit vasculaire** (May and Harrison, 2013).

### 1.3.4. Effets et fonctions biologiques de la vitamine C

Toutes les fonctions biologiques de la vitamine C sont dues à ses propriétés oxydo-réductrices et notamment à son habilité à donner des électrons. Elle représente un co-substrat important d'une grande classe d'enzymes, notamment, les hydroxylases et les mono-oxygénases et régule l'expression des gènes en interagissant avec des facteurs de transcription indispensables tels que NF- $\kappa$ B et AP-1 (activator protein 1) (Kaźmierczak-Barańska et *al.*, 2020). De plus, Elle est impliquée dans la synthèse du collagène, de la carnitine, des catécholamines, du cholestérol, des acides aminées et de certaines hormones peptidiques (May and Harrison, 2013). Elle joue également un rôle majeur dans la protection contre le stress au cours du processus inflammatoire et immunitaire (Chambial et *al.*, 2013; Sorice et *al.*, 2014), en réduisant les ROS et les RNS, et en désactivant le facteur HIF-1 (Hypoxia-inducible factor 1). Aussi, elle agirait comme antimicrobien et participe au contrôle des

infections et dans l'immunité anti-infectieuse (Hemilä, 2017; Sorice et al., 2014). Par ailleurs, la vitamine C stimule la prolifération cellulaire et prévient l'apoptose des cellules induite par différents agents (figure1.19).



**Figure1.19 Effets biologiques de la vitamine C** (Kaźmierczak-Barańska et al., 2020). SVCT, sodium-dependent vitamin C transporter; DHA, dehydroascorbic acid; GLUT, Glucose transporter; GSH, glutathione; GSSG, glutathione disulfide; HIF-1, Hypoxia-inducible factor 1; TET, methylcytosine oxidase ten-eleven translocation proteins; NF-κB, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; AP-1, activator protein 1.

### 1.3.4.1. Fonctions biochimiques

La vitamine C est un cofacteur des hydroxylases et des mono-oxygénases. Ces deux enzymes sont impliquées dans la synthèse du collagène, principale protéine constitutive de plusieurs tissus (ex : peau, os, dents, vaisseaux sanguins, etc), de la carnitine et des neurotransmetteurs. L'AA accélère l'hydroxylation de la proline et de la lysine qui jouent un rôle dans la synthèse du collagène. Il est essentiel pour la synthèse de la carnitine musculaire impliquée dans le transfert des acides gras dans la mitochondrie à des fins de production

## Chapitre1. Revue de littérature

énergétique. C'est aussi un cofacteur de l'enzyme dopamine-béta-hydroxylase qui catalyse la conversion de la dopamine en norépinéphrine. La vitamine C est nécessaire pour la transformation du cholestérol en acides biliaires empêchant son accumulation.

L'AA a aussi un rôle dans la désactivation du facteur de transcription induit par l'hypoxie (HIF), en situation de normoxie (Mandl et *al.*, 2009). Il facilite l'absorption duodénale du fer non-héminique en formant un chélate à un pH acide qui reste soluble à pH duodénal alcalin (Abbaspour et *al.*, 2014).

### 1.3.4.2. Effets pro-oxydants

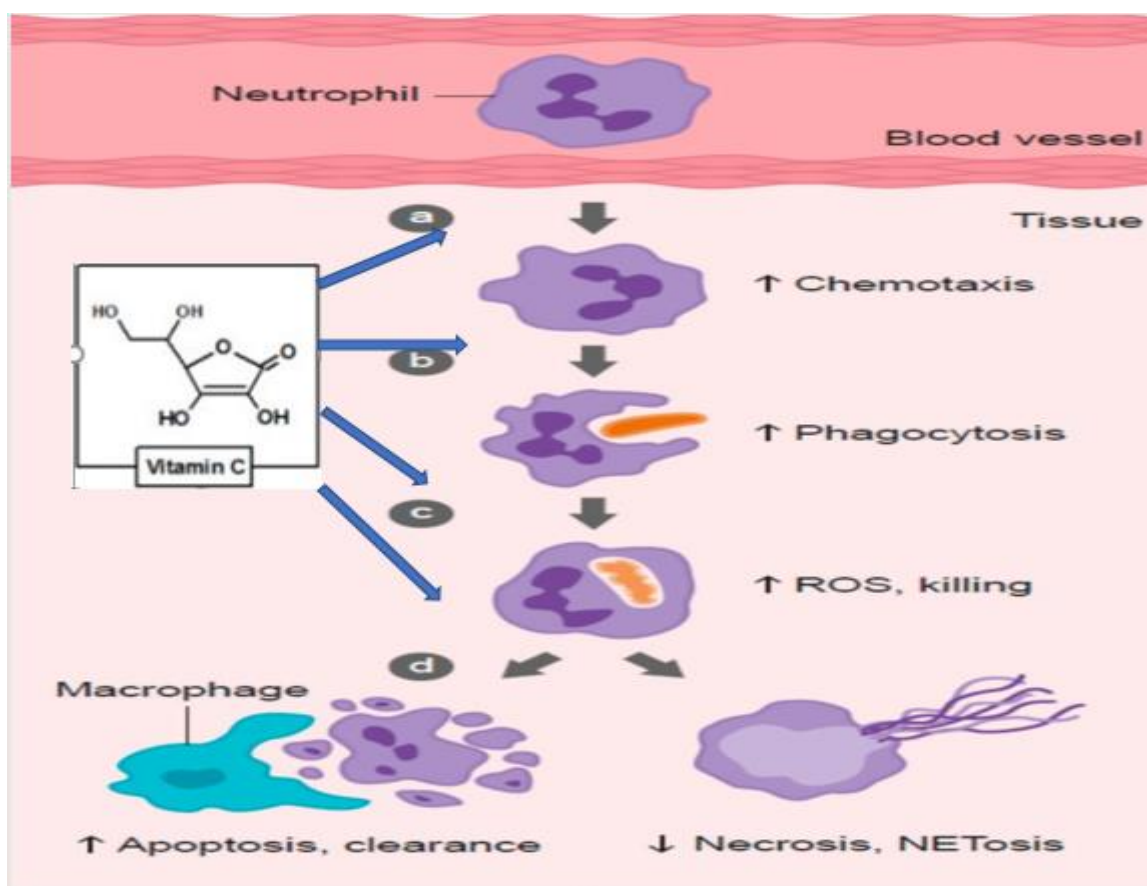
Dans certaines conditions (faible concentration, présence d'ions libres de fer ou de cuivre, etc), la vitamine C peut avoir un effet pro-oxydant (Kaźmierczak-Barańska et *al.*, 2020; Mandl et *al.*, 2009). Cet effet qui peut paraître désavantageux peut avoir des bénéfices notamment dans certains cancers (Putchala et *al.*, 2013). Il apparaît néanmoins que ces effets pro-oxydants sont moindres *in vivo* par rapport aux effets antioxydants (Naidu, 2003).

### 1.3.4.3. Effets sur le système immunitaire

La vitamine C affecte pratiquement tous les composants du système immunitaire du fait que sa concentration intracellulaire dans les phagocytes et des lymphocytes est largement supérieure à celle du plasma. De même, le processus de phagocytose entraîne la libération d'agents oxydants délétères qui peuvent être réduits par la vitamine C (Carr and Maggini, 2017). Lors du choc septique, la vitamine C influence l'activité des macrophages en régulant le processus de phagocytose par la diminution de l'adhésion, du chimiotactisme, de l'internalisation et aussi de la production du superoxyde. La phagocytose s'accompagne de libération de cytokines et de radicaux libres impliqués dans la pathogénèse du choc septique (Victor et *al.*, 2000). De plus, la vitamine C possède des effets bactériostatiques (Oudemans-van Straaten et *al.*, 2014). La vitamine C renforce de nombreuses fonctions des neutrophiles comme le chimiotactisme et la phagocytose (figure1.20) et elle exerce des effets stimulateurs de l'immunité adaptative aussi bien cellulaire que humorale (Carr and Maggini, 2017).

La vitamine C renforce la barrière cutanée en synergie avec d'autres micronutriments et répare les dégâts cellulaires secondaires au stress oxydatif. Elle renforce la réponse immune de type Th1 médiée par les cytokines. Elle protège également les cellules immunitaires contre les radicaux libres (Chambial et *al.*, 2013). Par ailleurs, des taux plasmatiques faibles d'ascorbate sont associés à plusieurs états pathologiques notamment au sepsis (Wilson, 2009). A ce propos, des études ont montré l'effet positif de la vitamine C sur le renforcement de la réponse immunitaire au cours du sepsis et son rôle bactériostatique notamment vis-à-vis de *S. aureus* (Kallio et *al.*, 2012; Wilson, 2009).





**Figure1.20. Effets de la vitamine C sur la phagocytose** (Carr and Maggini, 2017). La vitamine C : a) favorise la migration des neutrophiles (chimiotaxis), b) favorise l'absorption (phagocytose) des microbes et c) stimule la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS) et tue les microbes. La vitamine C induit l'apoptose dépendant de la caspase (cysteine-asparticprotease), améliorant l'absorption et la clairance par les macrophages, et inhibe la nécrose et la nétose, améliorant ainsi la réponse inflammatoire et réduisant les dommages tissulaires.

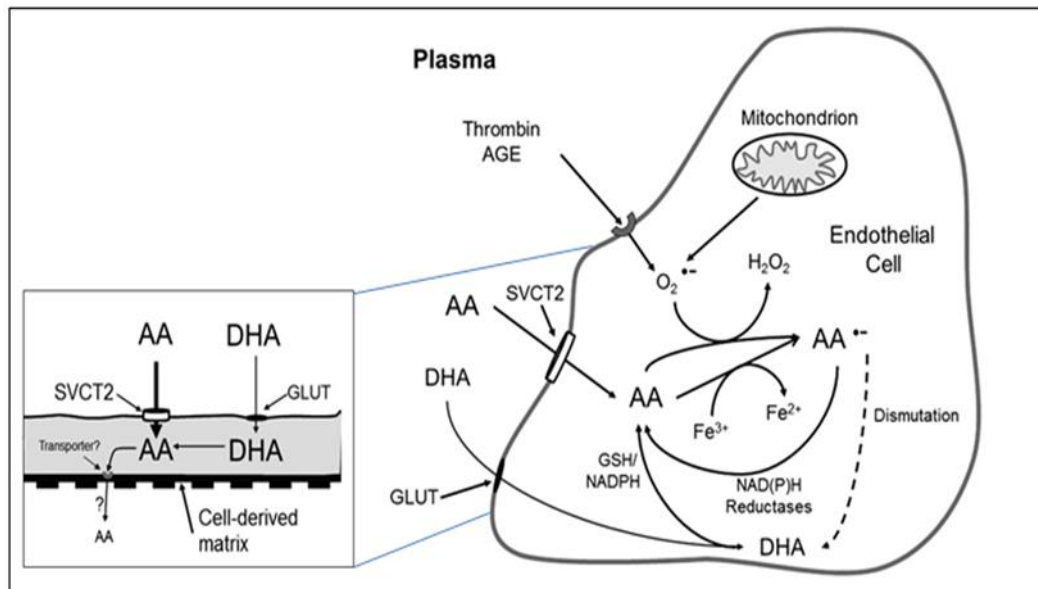
### 1.3.5. Vitamine C et cellules endothéliales

#### 1.3.5.1. Mouvements cellulaires

L'entrée de la vitamine C dans la cellule endothéliale se fait principalement à travers le transporteur SVTC2 que la plupart des CE expriment (May and Qu, 2009). Elle peut également pénétrer sous forme de DHA par transfert facilité à travers les récepteurs ubiquitaires GLUT. Elle est rapidement réduite en ascorbate (Meredith et *al.*, 2011). Une fois dans la cellule, elle exerce ses fonctions en cédant un électron à différentes espèces de radicaux libres (fer ferrique, superoxyde, etc). Le radical ascorbate ( $Asc^{\cdot-}$ ) qui en résulte est rapidement réduit en ascorbate monoanionique ( $AsCH^-$ ) par les NADPH réductases (Figure 1.21). Les mécanismes de libération d'ascorbate par les cellules demeure incertain, mais on sait qu'elle est renforcée par l'augmentation de calcium intracellulaire (Figueroa-Méndez and Rivas-Arancibia, 2015).

## Chapitre 1. Revue de littérature

Les concentrations intracellulaires de l'ascorbate sont plutôt basses, de l'ordre de 1 à 4 mM (May and Harrison, 2013).



**Figure 1.21. Absorption et recyclage de la vitamine C par la cellule endothéliale (May, James M, 2013).** La vitamine C pénètre dans la cellule principalement par SVCT2, et accessoirement sous forme de DHA par GLUT pour être réduite rapidement en ascorbate. A l'intérieur, il peut donner un électron au Fe<sup>+3</sup> à O<sup>-2</sup> ou aux autres radicaux libres mitochondriaux ou générés par l'activation de récepteurs de surface comme le récepteur de thrombine ou des produits finis de la glycation (AGE). AA<sup>•-</sup> qui en résulte est réduit en ascorbate par NADPH réductase ou dismuté en AA et DHA.

### 1.3.5.2. Fonctions cellulaires

#### 1.3.5.2.1. Rôle antioxydant

La vitamine C est un antioxydant cellulaire puissant, qui élimine les ROS et les RNS exogènes ou celles accumulés à l'intérieur de la CE au cours du métabolisme mitochondrial par NADPH oxydase, la xanthine oxydase et eNOS et participe à l'élimination du superoxyde en excès par la superoxyde dismutase et diminue de ce fait également le peroxy-nitrite (May and Harrison, 2013).

#### 1.3.5.2.2. Rôle d'enzyme cofacteur

La fonction d'enzyme cofacteur exercée par la vitamine C et décrite précédemment est également présente dans les cellules endothéliales.

#### 1.3.5.2.3. Prolifération cellulaire et apoptose

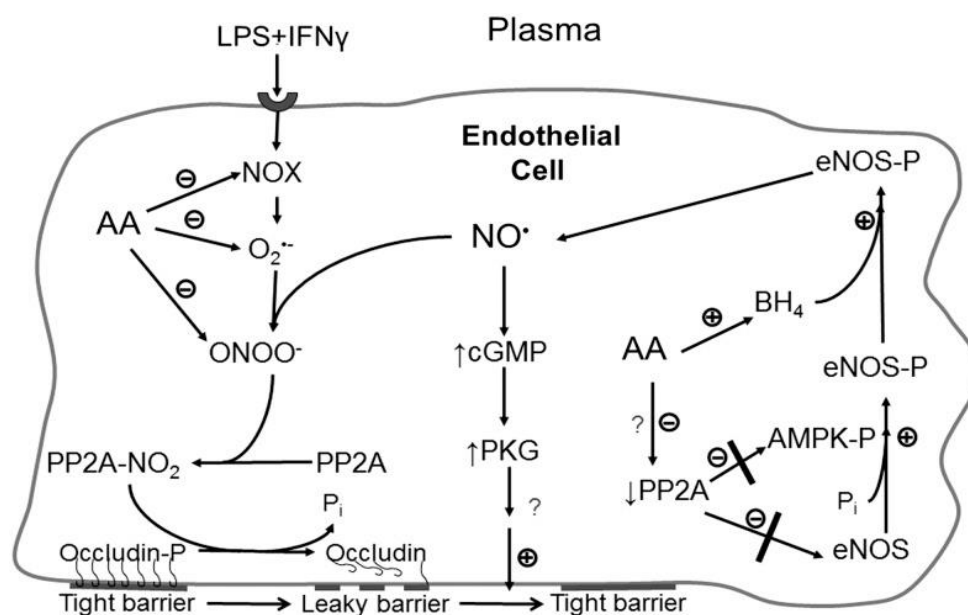
En culture, la vitamine C stimule la prolifération cellulaire et la formation de structures analogues aux capillaires, grâce à sa capacité de stimuler la synthèse du collagène de type

IV (Schor et al., 1983; Shekhonin et al., 1987). Elle a également un effet préventif sur l'apoptose des CE induite par différents agents (May and Harrison, 2013).

Ces effets ne sont pas observés si des doses très élevées de vitamine C sont utilisées (Mikirova et al., 2010).

#### 1.3.5.2.4. Modulation du tonus vasculaire

La vitamine C favorise la vasodilatation vasculaire dépendante du NO en préservant le NO intracellulaire notamment par le recyclage du tétrahydrobioptérine (BH4) (figure1.22) (May and Harrison, 2013).



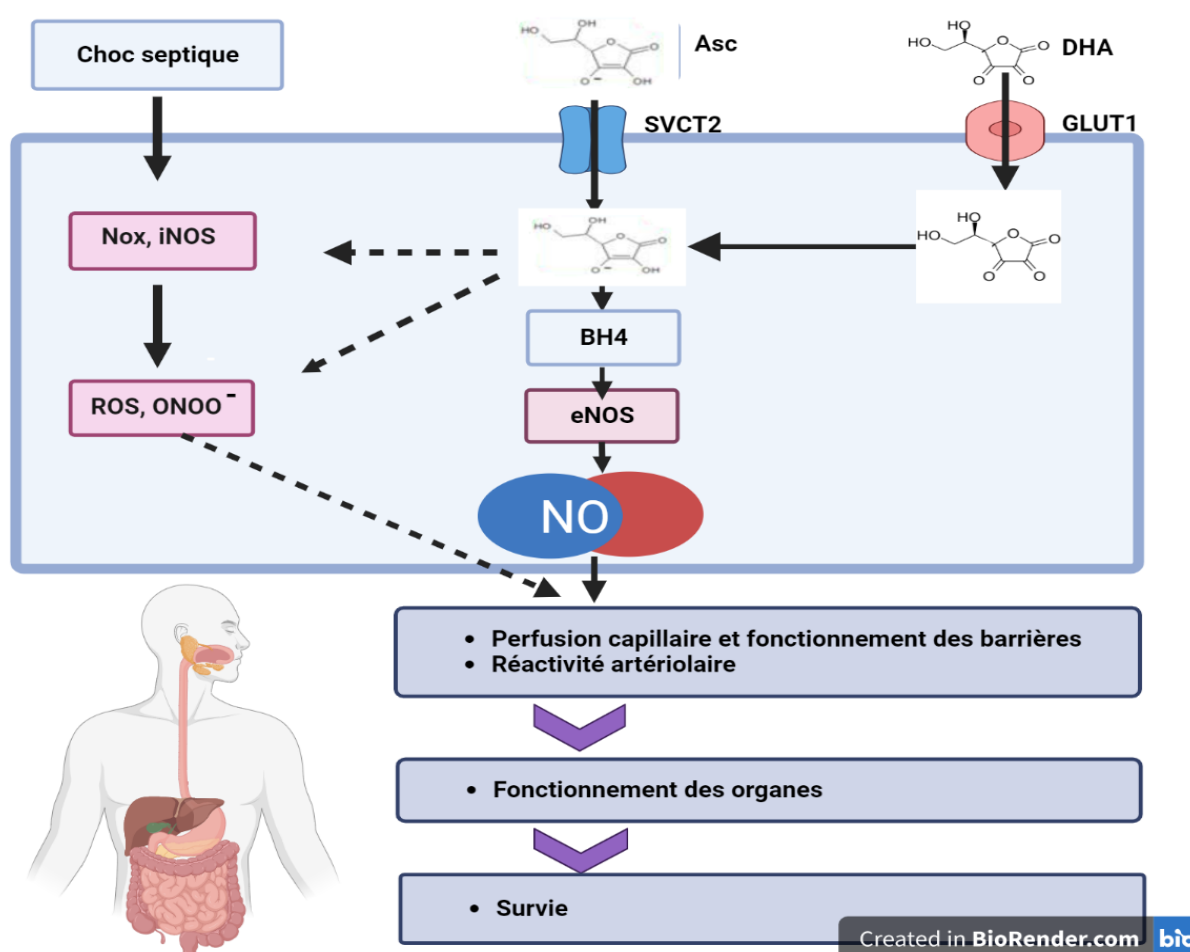
**Figure1.22. Mécanismes d'action de la vitamine C sur le monoxyde d'azote et la barrière de perméabilité endothéliale** (May and Harrison, 2013). Suite à des différentes stimulations, la NADPH oxydase (NOX) est activée, le superoxyde généré (O $_2^{\bullet-}$ ) réagit avec le monoxyde d'azote (NO $\bullet$ ) disponible pour former du peroxynitrite (ONOO $^-$ ), qui active le PP2A. La phosphatase déphosphorylée ensuite se produit, ce qui l'éloigne de la membrane et affaiblit les structures de jonction serrées. La vitamine C empêche l'activation du PP2A dans cette voie en inhibant la fonction NOX et en récupérant l'O $_2^{\bullet-}$  et l'ONOO $^-$ . Dans les cellules non stimulées (avec probablement de faibles niveaux d'ONOO $^-$ , la vitamine C améliore également la production de NO en inhibant le PP2A par un mécanisme inconnu. Cela empêche le PP2A de se déphosphoryler et donc de désactiver l'eNOS lui-même, ainsi que la kinase dépendante de l'AMP (AMPK). L'augmentation résultante de la phosphorylation de l'eNOS est médiée, au moins en partie, par l'activation de l'AMPK qui dépend de la phosphorylation et qui active l'eNOS pour produire du NO. Ceci, en combinaison avec la préservation de BH $_4$  par l'ascorbate, augmente le NO intracellulaire, qui génère ensuite des BPF cycliques par la voie canonique pour finalement resserrer la barrière de perméabilité endothéliale. PP2A, protéine phosphatase de type 2A.



### 1.3.4.2.5. Supplémentation en vitamine C et fonctions endothéliales

En 2014, une méta-analyse a confirmé l'effet bénéfique de la vitamine C dans le diabète, l'athérosclérose et l'insuffisance cardiaque. En revanche, aucun effet positif n'a été constaté chez des sujets sains, fumeurs ou hypertendus (Ashor et al., 2014). Cet effet est probablement dû à la grande implication de la vitamine C dans le fonctionnement cellulaire endothélial.

Au cours du sepsis, l'apport intraveineux de vitamine C est bénéfique. En effet, il s'ensuit une accumulation rapide dans les CE, une augmentation de la production de NO et un balayage des ROS (Figure 1.13). Ces effets sont rapides et durables justifiant la place de la vitamine C comme traitement adjuvant (Wilson, 2009).



**Figure 1.23. Modulation intracellulaire des effets délétères du sepsis sur les cellules endothéliales par la vitamine C (Wilson, John X, 2009) avec des modifications.** La cellule endothéliale est représentée par le grand rectangle. Les lignes continues signifient la stimulation alors que les lignes discontinues signifient l'inhibition. Le sepsis stimule la NADPH oxydase (Nox) et l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) qui augmentent les ROS et le peroxy-nitrique (ONOO<sup>-</sup>). Ces radicaux libres ont des effets néfastes sur les fonctions vasculaires. La vitamine C récupère les radicaux libres et stimule eNOS (Oxyde nitrique synthase endothéliale) qui dépend de BH4 (Tetrahydrobioptérine) pour augmenter le NO. L'Asc inhibe aussi Nox et iNOS.

### 1.4. Problématique et objectifs

#### 1.4.1. Problématique

*Staphylococcus aureus* est une bactérie opportuniste fréquemment responsable d'infections sévères. Sa capacité à déjouer les réponses immunitaires explique en grande partie sa virulence. La cellule endothéliale, se situe en première ligne des défenses immunitaires contre *S. aureus*, en raison de sa localisation privilégiée entre le sang et les tissus adjacents mais représente aussi l'un des principaux moyens de dissémination de l'infection. En effet, la cellule endothéliale douée de fonctions immunitaires et inflammatoires, dont la détection des pathogènes circulants, le recrutement des leucocytes vers le site inflammatoire via la sécrétion des cytokines et des molécules d'adhésion et de la phagocytose non professionnelle, ce qui permettent à la CE d'internaliser *S. aureus*, mais les facteurs de virulence exprimés permettent le plus souvent à la bactérie d'échapper à la lyse intracellulaire, de poursuivre sa croissance et même de se disséminer à travers la paroi endothéliale vers les tissus environnants et les organes, conduisant à des infections chroniques, persistantes et associées à un dysfonctionnement endothélial. De nombreuses stratégies thérapeutiques récentes ont ciblé le dysfonctionnement de CE afin de prévenir la progression du sepsis à des stades précoces. Parmi ces stratégies, l'administration de la vitamine C(Asch2) a fait l'objet de nombreux travaux. En effet, il est admis que la vitamine C, substance antioxydante par excellence, apporte des effets positifs lors du sepsis notamment à travers son action sur les cellules endothéliales. Cependant ses effets immunomodulateurs sur les cellules endothéliales au cours de l'infection à *S. aureus* ne sont pas connus.

#### 1.4.2. Objectifs

- ✓ Évaluer l'effet *ex vivo* de la vitamine C/Asch2 sur les activités fonctionnelles des cellules endothéliales y compris l'activité bactéricide, les fonctions immunométaboliques et immunophysiologiques ainsi que la réponse inflammatoire au cours de l'infection à *S. aureus*.
- ✓ Évaluer l'effet *ex vivo* de la vitamine C/Asch2 sur la mort et la réparation cellulaire au cours de l'infection à *S. aureus*.

#### 1.4.3. But

Montrer que la vitamine C/Asch2 pourrait exercer un effet immunomodulateur sur les activités fonctionnelles des CE et améliorer leur survie lors de l'infection à *S. aureus*.

# **CHAPITRE 2**

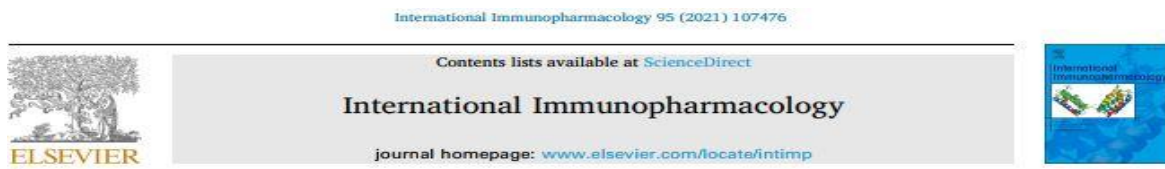
**Chapitre 2. Le traitement à la vitamine C/L-Thréo acide ascorbique stimule la survie et le fonctionnement des cellules endothéliales infectées par *S. aureus*, ainsi que la bactéricidie intracellulaire, et immunomodule la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  et l'ICAM-1 soluble**

## **CHAPITRE 2**

<b>2.1. Matériel et Méthodes</b>	<b>44</b>
<b>2.2. Résultats</b>	<b>52</b>
<b>2.3. Discussion</b>	<b>61</b>

## Chapitre 2. Le traitement à la vitamine C/L-Thréo acide ascorbique stimule la survie et le fonctionnement des cellules endothéliales infectées par *S. aureus*, ainsi que la bactéricidie intracellulaire, et immunomodule la sécrétion de l'IL-1 $\beta$ et l'ICAM-1 soluble

Cette thèse a fait l'objet d'une publication internationale après des révisions mineures dans une revue de Catégorie A, avec Comité de lecture spécialisé en Immunologie, d'un impact factor 5.714, international immunopharmacology.



### L-Threoascorbic acid treatment promotes *S. aureus*-infected primary human endothelial cells survival and function, as well as intracellular bacterial killing, and immunomodulates the release of IL-1 $\beta$ and soluble ICAM-1

Sara Dahou<sup>a</sup>, Mohammed Chems-Eddine Smahi<sup>a,b,1</sup>, Wafa Nouari<sup>a</sup>, Zoheir Dahmani<sup>a</sup>, Souheila Benmansour<sup>a,b</sup>, Lamia Ysmail-Dahlouk<sup>a</sup>, Maroua Miliani<sup>a</sup>, Fadela Yebdri<sup>a</sup>, Nassima Fakir<sup>a</sup>, Mohammed Yassine Laoufi<sup>a,b</sup>, Mouad Chaib-Draa<sup>a</sup>, Amina Tourabi<sup>a</sup>, Mourad Aribi<sup>a,2</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, W0414100, University of Tlemcen, 13000 Tlemcen, Algeria  
<sup>b</sup> Neonatal Department of Specialized Maternal and Child Hospital of Tlemcen, 13000, Tlemcen, Algeria

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

AsCH2  
Bactericidal activity  
Primary human umbilical vein endothelial cells  
HUVEC survival and function  
Immunomodulatory effect  
*S. aureus* infection

#### ABSTRACT

**Background:** Vitamin C (ascorbic acid, AsCH2) has been shown to enhance immunity. Here, we studied its immunomodulatory effect on human endothelial cells (ECs) during *S. aureus* infection.

**Materials and methods:** The ex vivo effects of AsCH2 were performed on primary human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) infected or not with *S. aureus*.

**Results:** AsCH2 treatment induced a marked downregulation of nitric oxide (NO) production and a moderate upregulation of arginase activity in *S. aureus*-infected HUVECs (respectively,  $p < 0.05$  and  $p > 0.05$ ). Although the upregulated release levels of soluble intercellular adhesion molecular 1 (sICAM-1/sCD54) and sE-selectin (sCD62E) molecules were not significantly different between treated and untreated *S. aureus*-infected HUVECs, AsCH2 treatment induced reversing effect on sICAM-1 release when comparing to uninfected control HUVECs. Moreover, AsCH2 treatment appears to have a significant effect on preventing HUVEC necrosis induced by *S. aureus* infection ( $p < 0.05$ ). Furthermore, AsCH2 treatment induced a significant upregulation of cell protective redox biomarker in *S. aureus*-infected, as shown by superoxide dismutase (SOD) activity ( $p < 0.05$ ).

### Bureau éditorial :

<https://www.sciencedirect.com/journal/international-immunopharmacology/about/editorial-board>.

Editeur en chef : J.E. Talmadge, USA.

### Indexation

1. Scopus
2. SIIC Data Bases
3. Current Contents - Life Sciences and ClinicalMedicine
4. Science Citation Index
5. Cambridge Scientific Abstracts
6. Chemical Abstracts
7. Embase
8. PubMed/Medline
9. Pascal Francis
10. CurrentAwareness in Biological Sciences
11. Elsevier BIOBASE

## **Chapitre 2. Le traitement à la vitamine C/L-Thréo acide ascorbique stimule la survie et le fonctionnement des cellules endothéliales infectées par *S. aureus*, ainsi que la bactéricidie intracellulaire, et immunomodule la sécrétion de l'IL-1 $\beta$ et l'ICAM-1 soluble**

### **2. 1. Matériel et méthodes**

#### **2.1.1. Conception de l'étude**

La totalité des travaux ont été réalisés au sein de laboratoire de biologie moléculaire appliquée et d'immunologie (BIOMOLIM) sous la direction de Monsieur le Professeur Mourad Aribi. Cette étude montre les effets *ex vivo* de la vitamine C/ l'Asch2 sur les CE humaines primaires au cours de l'infection à *S.aureus*, en utilisant le modèle HUVEC, infectée ou non par *S. aureus* et traitée ou non par l'AsH2. Les expériences ont été effectuées sur des cellules isolées, des surnageants de culture cellulaire et des lysats de cellules. Les effets du traitement par la vitamine C/Asch2 sur la production du NO, la libération du lactate déshydrogénase (LDH) (cytotoxicité basée sur le relâchement du LDH / nécrose cellulaire), la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-6, ainsi que sur l'expression de molécules d'adhésion soluble (sICAM- 1) (CD54) et sE-sélectine (sE-sélectine) (CD62) ont été déterminés au niveau des surnageants de la culture cellulaire. De plus, les effets de la supplémentation en vitamine C/Asch2 sur l'activité de l'arginase, l'activité redox protectrice cellulaire (activités catalase et superoxyde dismutase (SOD)), les ions calcium totaux liés / complexés ( $Ca^{2+}$ ), la teneur totale en cholestérol cellulaire ( $_{tcc}CHOL$ ) et le taux du glucose intracellulaire ( $_{i}Glu$ ) ont été déterminés au niveau des lysats cellulaires. L'effet de la supplémentation en vitamine C sur l'activation du cycle cellulaire BrdU a été réalisé sur des HUVECs adhérentes infectées ou non par *S. aureus*. La croissance bactérienne, l'activité d'internalisation et de l'activité bactéricide ont été réalisés sur des HUVECs cultivées avec *S. aureus* traitées ou non traitées par Asch2. Chaque expérience a été répétée au moins trois fois. Le rationnel et la conception de l'étude sont résumés dans la figure 2.1.

#### **2.1.2. Déclaration d'éthique et récolte des cordons ombilicaux**

Des consentements éclairés et écrits pour la collecte de cordons ombilicaux ont été obtenus des parturientes saines à terme, ayant une tranche d'âge similaire (25-35 ans), hospitalisées à la maternité de l'Établissement Hospitalier Spécialisé Mère-Enfant de Tlemcen.

Les critères d'exclusion étaient le tabagisme ; les antécédents d'ischémie, d'occlusion vasculaire ou d'artériopathies périphériques ; l'hypertension artérielle ou tout autre maladie cardiovasculaire ; l'obésité, le diabète pré-gestationnel ou gestationnel, la pré-éclampsie, les maladies métaboliques, l'infection, l'inflammation, les maladies auto-immunes, les grossesses compliquées et les cordons traumatisés. Les cordons ont été collectés aseptiquement immédiatement après la délivrance, conservés dans un tampon de transport stérile à 4 °C et acheminés directement au Laboratoire BIOMOLIM.

#### **2.1.3. Préparation, infection et traitement des CE**

Brièvement, les CE ont été isolées à partir de la veine du cordon ombilical par digestion enzymatique

## **Chapitre 2. Le traitement à la vitamine C/L-Thréo acide ascorbique stimule la survie et le fonctionnement des cellules endothéliales infectées par *S. aureus*, ainsi que la bactéricidie intracellulaire, et immunomodule la sécrétion de l'IL-1 $\beta$ et l'ICAM-1 soluble**

par la collagénase. Ensuite, elles ont été cultivées jusqu'à atteindre la confluence, puis elles ont subi des passages avec de la trypsine-Acide éthylène diamine tetra acétique (EDTA) au quatrième passage. Enfin, les HUVECs ont été infectées ou non avec *S. aureus*, puis traitées avec 1 mM de l'AsC<sub>2</sub>H pendant 24 h.

### **2.1.3.1. Isolation des HUVECs et culture cellulaire**

Les HUVECs ont été isolées à partir de cordons ombilicaux humains par digestion enzymatique à la collagénase de l'intérieur de la veine ombilicale comme décrit précédemment (Crampton et *al.*, 2007) avec des modifications mineurs. L'excès de sang a été éliminé et les sections du cordon ombilical ont été coupées aux deux extrémités avec un scalpel stérile. La veine ombilicale a été cathétérisée par une aiguille 21G et le cordon a été serré à son extrémité, puis une solution saline tamponnée de Hank (HBSS) (Sigma Chemical Co., St, Louis, USA) a été perfusée en utilisant une seringue de 20 mL pour le lavage de la veine. Après un lavage supplémentaire, une solution de collagénase (0,1% p/v dans HBSS, Gibco) a été injectée dans la veine avec une pression modérée en utilisant une seringue de 10 mL. Le cordon pré-rempli a été refermé aux deux extrémités avec des pinces stériles, puis un massage très délicat a été effectué pour faciliter le détachement des CEs. Le cordon clampé contenant la solution de collagénase a été incubé dans une solution saline tamponnée phosphatée de Dulbecco (DPBS, Sigma Chemical Co., St, Louis, USA) au bain-marie à 37°C pendant 15 minutes. Après incubation, la solution de collagénase contenant les CEs a été récupérée de la veine en perfusant 20 mL de HBSS, puis collectée dans un tube stérile de 50 mL contenant 10 mL de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) avec 2 mM de L-glutamine (Sigma Chemical Co., St, Louis, USA)(Krüger-Genge et *al.*, 2017) supplémenté avec 20% de sérum bovin fœtal (SVF, Sigma Chemical Co., St, Louis, USA), 100 UI / mL de Pénicilline (Sigma) et 100  $\mu$ g / mL de Streptomycine (Sigma)(Baudin et *al.*, 2007; Marin et *al.*, 2001). Après centrifugation à 250 x g pendant 10 min (Jaffe et *al.*, 1973), le surnageant a été jeté et le culot a été lavé deux fois puis remis en suspension dans 5 mL de milieu de culture frais. Les CEs ont ensuite été incubées dans un flasque de culture cellulaire T25 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), préalablement recouvert de gélatine 1% (Sigma), à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO<sub>2</sub> (Marin et *al.*, 2001). Le milieu de culture a été remplacé après 24 h pour éliminer les cellules non adhérentes, puis chaque deux jours jusqu'à atteindre 80% à 90% de confluence. A chaque étape, la confluence a été vérifiée par microscopie inversée (Baudin et *al.*, 2007; Marin et *al.*, 2001)(figure 2.2). Les HUVECs ont été subcultivées à un rapport de 1:3 en utilisant la méthode de détachement à la trypsine/EDTA à 0,05% et 0,02% respectivement (Marin et *al.*, 2001). Les HUVECs ont été utilisées au quatrième passage pour les expériences décrites ci-dessous. La viabilité des HUVECS a été évaluée en utilisant le test d'exclusion au bleu Trypan (TBET) tout au long des expérimentations (Strober, 2001).

### **2.1.3.2. Souche bactérienne et conditions de croissance**

*S. aureus* (American Type Culture Collection [ATCC] 25923) a été utilisé comme une souche de



## **Chapitre 2. Le traitement à la vitamine C/L-Thréo acide ascorbique stimule la survie et le fonctionnement des cellules endothéliales infectées par *S. aureus*, ainsi que la bactéricidie intracellulaire, et immunomodule la sécrétion de l'IL-1 $\beta$ et l'ICAM-1 soluble**

référence. La souche bactérienne a été inoculée dans 10 mL de bouillon Cœur-Cervelle (BHIB) (Sigma), et cultivée pendant une nuit jusqu'à la phase de croissance exponentielle (phase logarithmique) à 37°C (Hamill et al., 1986). Ensuite, les cellules bactériennes ont été recueillies par centrifugation (3 000 x g, 10 min) à température ambiante (Cheung, 2007), lavées deux fois avec du PBS (solution saline tamponnée phosphatée), puis remises en suspension dans du DMEM supplémenté avec de la L-glutamine (2 mM) et 20% de SVF à l'aide du spectrophotomètre à 600 nm et une densité optique égale à 1,0, ce qui correspond à  $\sim 10^9$  unités formant colonie (UFC) mL<sup>-1</sup> (Edwards and Massey, 2011).

### **2.1.3.3. Infection des HUVECs et traitement par Asch2**

Les HUVECs à une confluence de  $10^6$ /puits ont été cultivées dans du DMEM supplémenté avec de la L-glutamine, 20% de SVF et de la pénicilline/streptomycine (100 UI/mL, 100  $\mu$ g/mL, respectivement), sur une plaque de 24 puits à fond plat pré-enduite de gélatine (Sigma). Les cellules adhérentes ont été lavées doucement trois fois avec du PBS puis infectées ou non par *S. aureus* avec une multiplicité de l'infection (MOI) de 50 en ajoutant une suspension de *S. aureus*,ensemencée dans le DMEM supplémenté par la L-glutamine, 20% SVF, sans antibiotique, à la concentration finale de  $5 \cdot 10^7$  UFC/puits, puis incubées pendant 2 h à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Après incubation, les cellules infectées et non infectées ont été doucement lavées trois fois avec du PBS, puis traitées avec une concentration finale de L- acide ascorbique à 1 mM (Sigma Chemical Co., St, Louis, USA) dans du DMEM avec L-glutamine, 20% de SVF et pénicilline/streptomycine (100 UI/mL, 100  $\mu$ g/ mL, respectivement) pendant 24 h à 37 °C et 5% de CO<sub>2</sub> dans une atmosphère humide.

### **2.1.4. Récupération des surnageants de culture et lyse cellulaire**

Après incubation, les surnageants exempts de cellules ont été aspirés délicatement de chaque puits et les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS et lysées par traitement pendant 30 min avec 500  $\mu$ L de Triton X-100 à 0,1% (TX100). La réaction a été stoppée par l'addition d'un volume égal d'un mélange contenant Tris-HCl et MnCl<sub>2</sub>. Les lysats cellulaires ont ensuite été aspirés pour les analyses requises (Nouari et al., 2016; Ysmaïl-Dahlouk et al., 2016).

### **2.1.5. Dosage des protéines totales**

La concentration des protéines totales a été mesurée au niveau des lysats de culture cellulaire à 540 nm en utilisant un kit commercial (Thermo Fisher Scientific Inc., Middletown, USA).

### **2.1.6. Dosage de la production de NO**

L'évaluation de la production du NO a été effectuée par la réaction colorimétrique sensible de Griess. Cette méthode repose sur la mesure de l'accumulation des métabolites oxydatifs (NO<sub>x</sub>, nitrate et nitrite) (Aribi, 2018). Après déprotéinisation avec de l'acide trichloracétique (TCA), 100 ml des surnageants de la culture ont été incubés avec 100  $\mu$ L de la Vanadium (III) chloride et 50 $\mu$ L du réactif



## **Chapitre 2. Le traitement à la vitamine C/L-Thréo acide ascorbique stimule la survie et le fonctionnement des cellules endothéliales infectées par *S. aureus*, ainsi que la bactéricidie intracellulaire, et immunomodule la sécrétion de l'IL-1 $\beta$ et l'ICAM-1 soluble**

de Griess (v/v; 1/2) pendant 30 min à 37°C. L'intensité de la couleur du produit formé a été mesurée à une longueur d'onde de 540 nm. Par la suite, les concentrations des NOx ont été déterminées à l'aide d'une courbe d'étalonnage ayant des concentrations allant de 0 à 150  $\mu\text{mol/L}$  de nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ). Les niveaux du NO ont été rapportés en  $\mu\text{M}/10^6$  cellules/mL.

### **2.1.7. Détermination de l'activité de l'arginase**

L'activité de l'arginase (EC 3.5.3.1) a été déterminée par spectrophotométrie au niveau des lysats cellulaires en se basant sur la mesure de la formation d'urée après incubation avec la L-arginine comme décrit (Aribi et al., 2015; Nouari et al., 2016). L'activité de l'arginase a été exprimée en nmol d'urée par mg de protéines par heure.

### **2.1.8. Dosage de sICAM-1 et de sE-sélectine**

Les quantités de sICAM-1 et de sE-sélectine ont été déterminés au niveau des surnageants de la culture cellulaire avec des kits ELISA humains (Sigma Aldrich Co., St.Louis, USA), et l'absorbance a été mesurée à 450 nm avec un lecteur de plaque ELISA (BiochromAnthos 2020, Cambridge, Royaume-Uni). Les quantités de sICAM-1 et de sE-sélectine ont été calculées à partir de leurs courbes d'étalonnages selon les instructions du fabricant. Les limites de détection (LOD) étaient de 150 pg / mL pour sICAM-1 et de 30 pg / mL pour sE-sélectine.

### **2.1.9. Détermination de la nécrose cellulaire**

La nécrose cellulaire a été déterminée au niveau des surnageants de la culture cellulaire par la méthode de cytotoxicité basée sur la libération de LDH par les cellules endommagées (Chan et al., 2013), en utilisant le kit de dosage colorimétrique LDH (Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA), selon les instructions du fabricant. Les quantités relatives de la libération de LDH ont été mesurées à 490 nm en utilisant un lecteur ELISA pour microplaques. La nécrose cellulaire a été exprimée en pourcentage de cytotoxicité à base de LDH comme décrit (Kubica et al., 2008).

### **2.1.10. Evaluation de l'activité protectrice redox cellulaire**

Les activités de catalase et de SOD ont été mesurées en tant que biomarqueurs de l'activité redox protectrice des cellules (Dahmani et al., 2020).

#### **2.1.10.1. Evaluation de l'activité de la catalase**

L'activité de la catalase (EC 1.11.1.6) a été déterminée au niveau des lysats de la culture cellulaire par une méthode spectrophotométrique, basée sur la mesure de la décomposition du peroxyde d'hydrogène comme décrit avec des modifications mineures (Walton and Pizzitelli, 2012). Dix  $\mu\text{L}$  de lysats cellulaires ont été incubés avec un volume égal du mélange réactionnel contenant du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) pendant 5 minute (min) à température ambiante, puis la réaction a été arrêtée en utilisant de l'oxysulfate de titane (IV) saturé ( $\text{TiOSO}_4$ ) dans 1 M de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , qui réagit avec  $\text{H}_2\text{O}_2$  restant

## **Chapitre 2. Le traitement à la vitamine C/L-Thréo acide ascorbique stimule la survie et le fonctionnement des cellules endothéliales infectées par *S. aureus*, ainsi que la bactéricidie intracellulaire, et immunomodule la sécrétion de l'IL-1 $\beta$ et l'ICAM-1 soluble**

pour produire un complexe de Peroxotitanium (PTC) de couleur jaune. L'absorbance a été mesurée à 410 nm contre un blanc. L'activité de la catalase a été rapportée en U/min/mL

### **2.1.10.2. Evaluation de l'activité de la SOD**

L'activité de la SOD (EC 1.15.1.1) a été évaluée au niveau des lysats de la culture cellulaire en utilisant le kit colorimétrique SOD-WST (19160, Sigma Aldrich). La technique est basée sur la mesure du formazan hydrosoluble coloré généré par la réduction du sel de tétrazolium hautement hydrosoluble (WST-1) [2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2Htetrazolium, monosodiumsalt] par les ions superoxydes générés par la xanthine/xanthineoxydase (XO) (Ukeda et *al.*, 1999). L'absorbance est lue à 450 nm en utilisant un lecteur ELISA pour microplaques (BiochromAnthos 2020, Cambridge, Royaume-Uni). L'activité de la SOD (pourcentage d'inhibition de WST-1 [IC50]) liée à celle de la XO, est calculée selon les instructions du fabricant et exprimée en tant que 50% de l'activité XO.

### **2.1.11. Mesure du ${}_b\text{Ca}^{2+}$**

Les niveaux de  ${}_b\text{Ca}^{2+}$  ont été quantifiés dans les lysats cellulaires, après élimination des surnageants, en utilisant une méthode spectrophotométrique très sensible et spécifique basé sur Arsenazo III (1,8-Dihydroxy-3,6-disulpho-2,7-naphthalene-bis(azo) dibenzene arsonic acid) ASIII- $\text{Ca}^{2+}$ ) (Chutipongtanate and Thongboonkerd, 2010; McBurney and Neering, 1985). Les niveaux de  ${}_b\text{Ca}^{2+}$  ont été exprimés en  $\mu\text{Eq}/\text{mg}$  de protéines.

### **2.1.12. Mesure du ${}_{\text{tcc}}\text{CHOL}$**

Les taux de  ${}_{\text{tcc}}\text{CHOL}$  ont été déterminés au niveau des lysats cellulaires par méthode spectrophotométrique enzymatique (Luo et *al.*, 2010; Song et *al.*, 2013), en utilisant des réactifs commerciaux (SPINREACT, S.A./S.A.U. Ctra. Santa Coloma, Espagne), et les quantités de  ${}_{\text{tcc}}\text{CHOL}$  ont été exprimés en  $\mu\text{g}$  par mg de protéines.

### **2.1.13. Mesure du ${}_i\text{GLU}$**

Les concentrations de  ${}_i\text{GLU}$  ont été mesurées au niveau des lysats des HUVECs en se basant sur l'oxydation du glucose en gluconate par l'enzyme glucose oxydase (GOD), et le  $\text{H}_2\text{O}_2$  produit a été détecté à 505 nm avec un accepteur d'oxygène chromogène, phénol, 4 aminophénazone (4-AP) en présence de peroxydase (POD) (Belhassena et *al.*, 2020). Les quantités d' ${}_i\text{GLU}$  ont été exprimées en nmol par mg de protéines.

**Chapitre 2. Le traitement à la vitamine C/L-Thréo acide ascorbique stimule la survie et le fonctionnement des cellules endothéliales infectées par S. aureus, ainsi que la bactéricidie intracellulaire, et immunomodule la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  et l'ICAM-1 soluble**

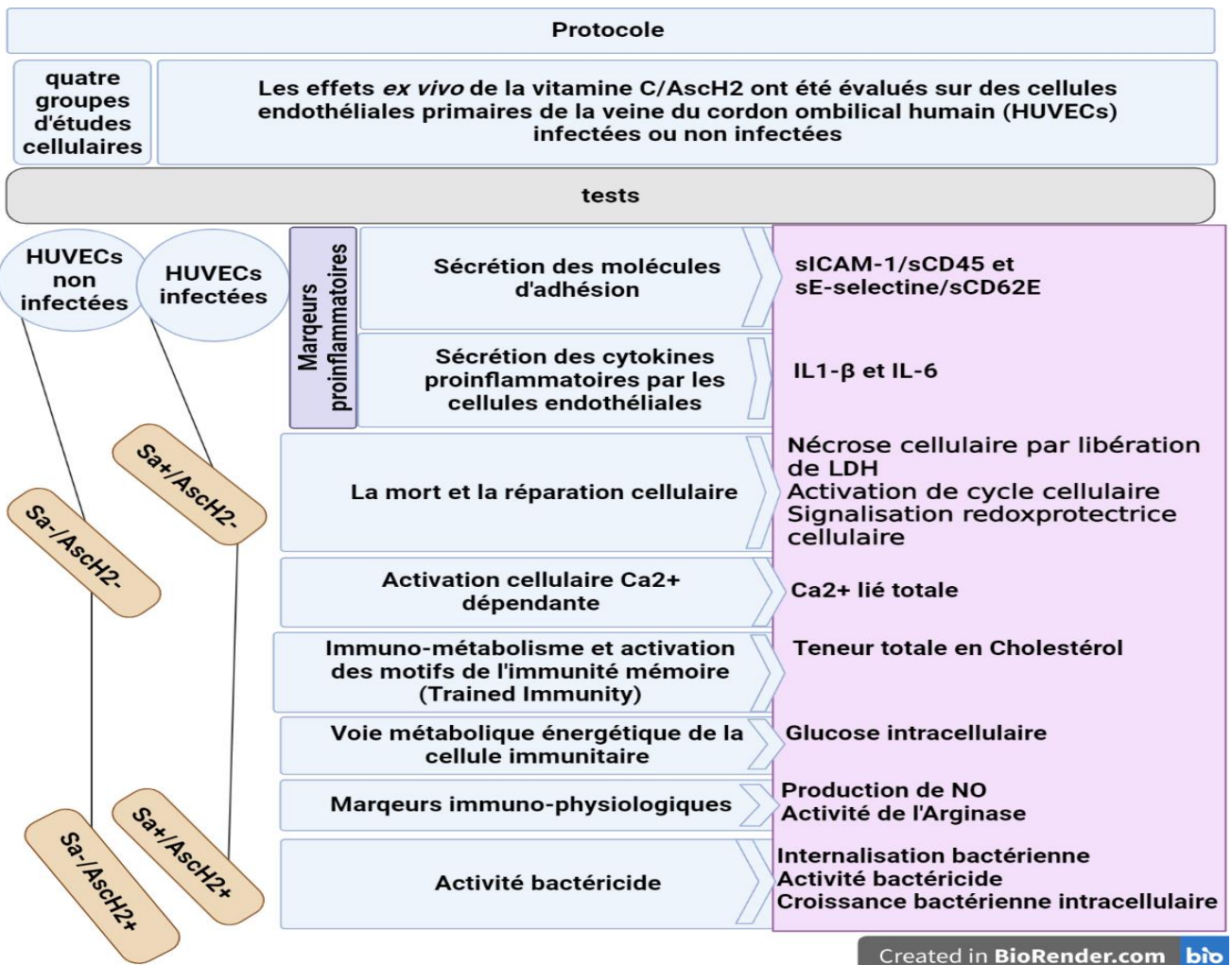
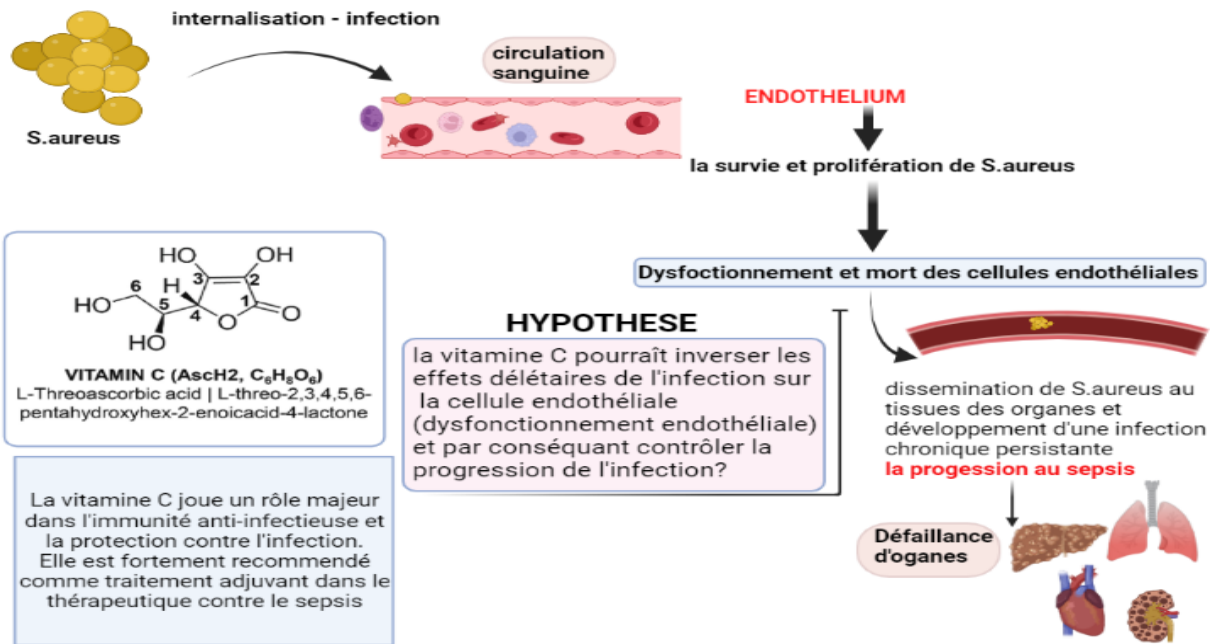
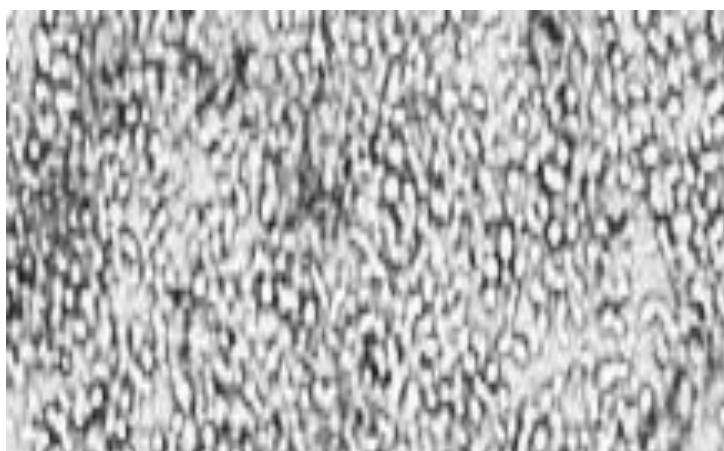


Figure 2.1. Rationnel et conception de l'étude.

#### **2.1.14. Evaluation de l'activité bactéricide cellulaire (internalisation et lyse bactérienne)**

Une suspension de *S. aureus* dans DMEM supplémenté avec 2 mM de L-glutamine, 20% de SVF, contenant ou non 1 mM d'AsC<sub>2</sub> a été ajoutée à 10<sup>6</sup> HUVECs par puits pré cultivées dans une plaque de culture à 24 puits, enduites de gélatine, à une concentration finale de 5 × 10<sup>7</sup>UFC (le rapport bactéries/HUVEC était de 50:1), correspondant à une MOI de 50. Une autre suspension de *S. aureus* a été cultivée seule comme témoin (Nouari et al., 2016). Les mélanges et les bactéries seules ont été incubés pendant 2 h dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C (Kubica et al., 2008), puis les surnageants ont été récupérés et des dilutions en série ont été étalées sur le milieu de Chapman. Après une incubation de 24h, les bactéries extracellulaires ont été déterminées en comptant les UFC bactériennes. Les expériences ont été effectués à 0 (t<sub>0</sub>) et à 1 h (t<sub>1</sub>), et le pourcentage d'internalisation bactérienne a été exprimé comme le pourcentage de diminution des bactéries extracellulaires viables comme il a été rapporté en détail (Aribi, 2018; Aribi et al., 2015; Nibbering et al., 1996). Les monocouches des HUVECs ont ensuite été lavées doucement trois fois avec du PBS, puis cultivées dans DMEM supplémenté avec 2 mM de L-glutamine, 20% de SVF contenant 50 µg/mL de la gentamicine pour tuer toutes les bactéries restantes pendant 1 h. Ensuite, la moitié des puits ont été lysés en utilisant 1% de Triton X-100 dans du PBS à t<sub>0</sub>, tandis que les autres ont été réincubées pendant 1 h (t<sub>1</sub>) dans DMEM supplémenté avec 2 mM de L-glutamine, 20% de SVF sans antibiotique, puis lysés en utilisant 1% de triton X-100 dans du PBS. Les lysats cellulaires ont été récupérés et des dilutions en série ont été étalées sur le milieu de Chapman et incubées pendant une nuit à 37 °C. Le nombre de bactéries intracellulaires viables (UFC) à t<sub>0</sub> et t<sub>1</sub> a été déterminé comme décrit (Aribi, 2018). Le pourcentage de capacité de bactéricidie cellulaire a été exprimé en pourcentage de diminution des bactéries intracellulaires. Des contrôles comprenant des puits contenant des HUVECs non infectées ou des bactéries seules étaient nécessaires durant les expériences.



**Figure 2.2.** Cellules endothéliales confluentes à 80-90% observées au microscope optique inversé (x 40).

## **Chapitre 2. Le traitement à la vitamine C/L-Thréo acide ascorbique stimule la survie et le fonctionnement des cellules endothéliales infectées par *S. aureus*, ainsi que la bactéricidie intracellulaire, et immunomodule la sécrétion de l'IL-1 $\beta$ et l'ICAM-1 soluble**

### **2.1.15. Evaluation de la croissance bactérienne intracellulaire**

L'effet de la supplémentation de l'Asch2 sur la croissance bactérienne a été évalué comme décrit (Aribi et al., 2015).

### **2.1.16. Activation du cycle cellulaire**

L'activation du cycle cellulaire a été déterminée selon le test d'incorporation de BrdU (Bromodeoxyuridine [5-bromo-2'-désoxyuridine]) (kit de prolifération cellulaire ab126556-BrdU, Abcam, Allemagne), en respectant les instructions du fabricant. Brièvement, les HUVECs ont étéensemencées dans une plaque à fond plat à 96 puits à une densité de  $2 \times 10^4$  cellules/puits, et laissées s'adhérer pendant 24 h à 37 °C dans une atmosphère humidifiée et 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules ont été infectées ou non pendant 2 h avec *S. aureus*, puis lavées deux fois avec du PBS. Les cellules infectées et non infectées ont été traitées ou non avec l'Asch2 pendant 24 h. Ensuite, les cellules ont été incubées pendant une nuit avec un marqueur 1x BrdU, et ensuite rincées trois fois avec un tampon de rinçage. Les cellules ont été préalablement fixées en utilisant une solution de fixation afin de dénaturer l'ADN, puis l'incorporation du BrdU a été détectée en utilisant un anticorps détecteur monoclonal anti-BrdU, pendant 1 h à une température ambiante. Après plusieurs rinçages, les cellules ont été incubées avec l'anticorps conjugué à l'HRP (peroxydase). Les cellules ont ensuite été rincées et incubées avec la tétraméthylbenzidine (TMB) comme substrat de la peroxydase pendant 30 min à une température ambiante, à l'obscurité. Les densités optiques (DO) ont été mesurées à 450 nm en utilisant un lecteur de plaques ELISA Biochrom Anthos 2020 (Cambridge, Royaume-Uni), et l'absorbance des cellules sans BrdU (contrôle) a été soustraite de chaque lecture.

### **2.1.17. Dosage des cytokines**

Les quantités de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-6 ont été déterminées au niveau des surnageants de la culture cellulaire par un dosage ELISA, avec des kits commerciaux en utilisant des Kits ELISA humains (BD OptEIA, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA), conformément aux instructions du fabricant. Les DO ont été mesurées à 450 nm à l'aide d'un lecteur de plaques ELISA BiochromAnthos 2020 (Cambridge, Royaume-Uni). Les limites de détection (LOD) étaient de 4 pg/mL pour les deux cytokines.

### **2.1.18. Analyses statistiques**

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel SPSS version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Toutes les données ont été présentées sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne (SEM). La normalité a été vérifiée avant les procédures statistiques. Étant donné que la distribution des résultats n'était pas normalement distribuée, les comparaisons ont été effectuées avec les tests non paramétriques Kruskal-Wallis et Mann-Whitney *U* pour rechercher les différences entre les quatre groupes et entre deux groupes, respectivement.



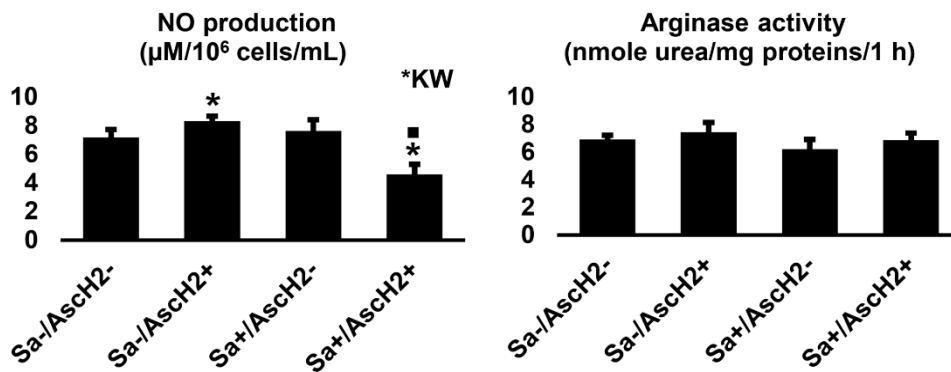
## Chapitre 2. Le traitement à la vitamine C/L-Thréo acide ascorbique stimule la survie et le fonctionnement des cellules endothéliales infectées par *S. aureus*, ainsi que la bactéricidie intracellulaire, et immunomodule la sécrétion de l'IL-1 $\beta$ et l'ICAM-1 soluble

### 2.2. Résultats

Dans la présente étude, nous avons examiné les effets immunomodulateurs *ex vivo* du traitement par la vitamine C/Asch2 sur les activités fonctionnelles des HUVEC infectées par *S.aureus*.

#### 2.2.1. Le traitement par la vitamine C/Asch2 induit une diminution de la production du NO et une augmentation légère de l'activité de l'arginase dans les HUVECs infectées par *S. aureus*

Comme le montre la figure 2.3, le traitement par la vitamine C/Asch2 a induit une augmentation remarquable de la production de NO et une augmentation légère de l'activité arginase dans les HUVECs non infectées par rapport aux cellules témoins non infectées et non traitées, et, inversement, il a induit une baisse significative de la production du NO ( $p < 0,05$  par le test Mann-Whitney  $U$ ) et une faible augmentation de l'activité de l'arginase dans les HUVECs infectées par rapport aux HUVEC infectées et non traitées. Néanmoins, les différences entre les deux comparaisons n'ont pas été significatives pour l'activité arginase ( $p > 0,05$  par le test Mann-Whitney  $U$ ). Pour des comparaisons multiples par test Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$  pour la production de NO et  $p > 0,05$  pour l'activité arginase.

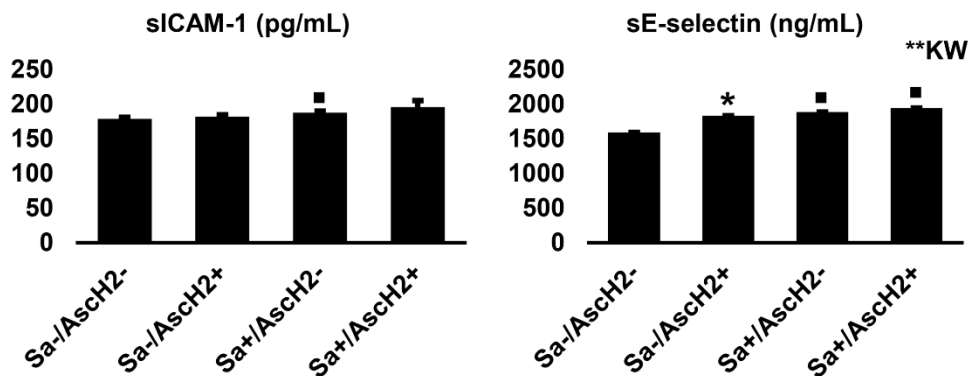


**Figure 2.3. Effet de l'Asch2 sur la production du NO et l'expression de l'activité arginase par les HUVECs infectés par *S. aureus*.** Les niveaux de NO ont été mesurés par la méthode de Griess. L'activité de l'arginase a été déterminée par spectrophotométrie en mesurant la concentration de l'urée. Les valeurs sont présentées sous forme de la moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne. Asch2: acide ascorbique/L-threo-2,3,4,5,6-pentahydroxyhex-2-acide énoïque-4-lactone, HUVECs : cellules endothéliales dérivées de la veine du cordon ombilical humain, NO : oxyde nitrique, Sa-/Asch2- : HUVEC non infectées par *S.aureus* et non traitées par Asch2, Sa-/Asch2+ : HUVEC non infectées par *S.aureus* et traitées par Asch2, Sa+/Asch2- : HUVEC infectées par *S.aureus* et non traitées par Asch2, Sa+/Asch2+ : HUVEC infectées par *S.aureus* et traitées par Asch2. Les astérisques (\*) indiquent les différences significatives entre les groupes cellulaires non infectés ou infectés en utilisant le test de Mann-Whitney  $U$  ( $*p < 0,05$ ). Les cases noires (■) indiquent les différences significatives en comparant avec les Contrôles (HUVEC non infectées par *S.aureus* et non traitées par Asch2) par le test de Mann-Whitney  $U$  ( $*p < 0,05$ ). \*KM : différences significatives entre les quatre groupes selon le test de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

## Chapitre 2. Le traitement à la vitamine C/L-Thréo acide ascorbique stimule la survie et le fonctionnement des cellules endothéliales infectées par *S. aureus*, ainsi que la bactéricidie intracellulaire, et immunomodule la sécrétion de l'IL-1 $\beta$ et l'ICAM-1 soluble

### 2.2.2. Le traitement par la vitamine C/Asch2 pourrait avoir un effet inverse de l'infection à *S. aureus* sur le relâchement de sICAM-1/sCD54 de sE-sélectine/sCD62E par les HUVECs infectées par *S.aureus*

Comme le montre la figure 2.4, le traitement par Asch2 n'a pas exercé un effet significatif sur les niveaux de relâchement de sICAM-1 par les HUVECs infectées ou non par *S.aureus*. Les HUVECs non traitées mais infectées par *S.aureus* libèrent de façon significative la sICAM-1 en comparant avec les HUVECs non traitées et non infectées ( $p < 0,05$ ). De plus, il n'y a pas de différence dans les niveaux de libération de sE-sélectine par les HUVECs infectées et traitées par Asch2 par rapport aux HUVEC infectées et non traitées par Asch2. En revanche, le traitement par Asch2 a induit une augmentation significative des niveaux de libération de la s-E-sélectine dans les HUVECs non infectées ( $p < 0,05$ ). Par ailleurs, l'infection à *S.aureus* a induit une augmentation importante des concentrations de sE-sélectine chez les HUVECs infectées et traitées ou non traitées par rapport aux cellules témoins non infectées et non traitées ( $p < 0,05$  pour les deux comparaisons). Pour toutes les comparaisons en utilisant le test Kruskal-Wallis, la valeur de  $p$  était supérieure à 0,05 pour sICAM-1 et inférieure à 0,01 pour sE-sélectine.



**Figure 2.4. Effet de l'Asch2 sur le relâchement des sICAM-1 et sE-sélectine au cours de l'infection à *S.aureus*.** Les concentrations de sICAM-1 et de sE-sélectine ont été mesurées par méthode ELISA. Les valeurs sont présentées sous forme de la moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne. Asch2: acide ascorbique/Lthreo-2,3,4,5,6-pentahydroxyhex-2-acide énoïque-4-lactone, HUVECs :cellules endothéliales de la veine du cordon ombilical humaine, sICAM-1: molécule d'adhésion intercellulaire-1 soluble/s(CD54), sE-sélectine : E-sélectine soluble/s(CD62), Sa-/Asch2- : HUVEC non infectées par *S.aureus* et non traitées par Asch2, Sa-/Asch2+ : HUVEC non infectées par *S.aureus* et traitées par Asch2, Sa+/Asch2- : HUVEC infectées par *S.aureus* et non traitées par Asch2, Sa+/Asch2+ : HUVEC infectées par *S.aureus* et traitées par Asch2. Les astérisques (\*) indiquent les différences significatives entre les groupes cellulaires non infectés ou infectés utilisant le test de Mann-Whitney  $U$  ( $*p < 0,05$ ). Les cases noires (•) indiquent les différences significatives en comparant avec les Contrôles (HUVEC non infectées par *S.aureus* et non traitées par Asch2) par le test Mann-Whitney  $U$  ( $*p < 0,05$ ). \*\*KM : différences significatives entre les quatre groupes selon le test Kruskal-Wallis ( $p <$

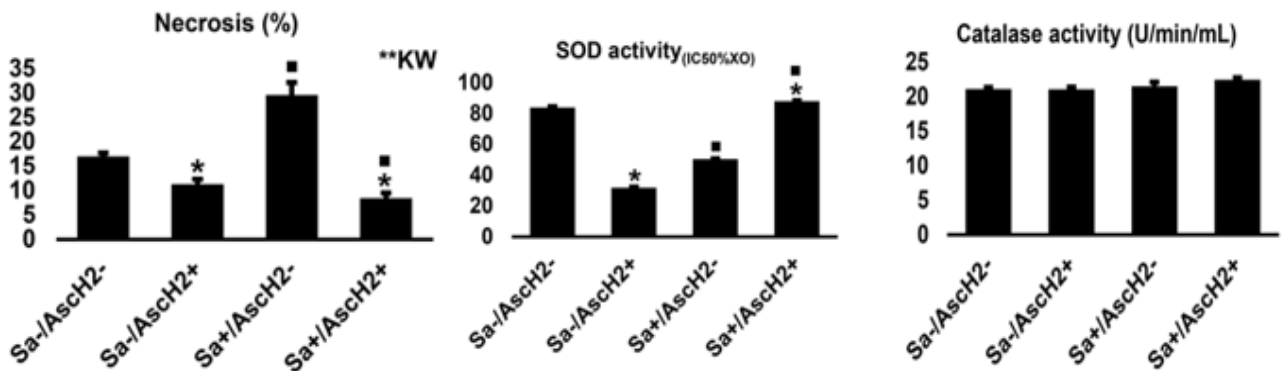


**Chapitre 2. Le traitement à la vitamine C/L-Thréo acide ascorbique stimule la survie et le fonctionnement des cellules endothéliales infectées par *S. aureus*, ainsi que la bactéricidie intracellulaire, et immunomodule la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  et l'ICAM-1 soluble**

0,01).

**2.2.3. Le traitement par la vitamine C/Asch2 protège contre la nécrose de HUVEC induite par l'infection à *S.aureus***

Comme le montre la figure 2.5, l'infection à *S.aureus* a fortement induit la nécrose des HUVEC ( $p < 0,05$ ). De plus, le traitement par Asch2 a entraîné une baisse importante de la nécrose chez les HUVECs infectées et non infectées par *S.aureus* ( $p < 0,05$ ). Il a aussi entraîné une diminution significative de l'activité de la SOD chez les HUVECs non infectées par rapport aux HUVEC témoins non traités ( $p < 0,05$ ) et, inversement, il a augmenté l'activité de la SOD chez les HUVECs infectés par *S.aureus* par rapport à celles non infectées non traitées ( $p < 0,05$ ). Le traitement par Asch2 a induit des changements mineurs dans l'activité de la catalase chez les HUVECs infectées par *S.aureus* et traitées par Asch2, mais la différence par rapport aux cellules non traitées et infectées était statistiquement insignifiante ( $p > 0,05$ ). La valeur de  $p$  était inférieure à 0,01 par test de Kruskal-Wallis pour la nécrose cellulaire et supérieure à 0,05 pour les activités de SOD et de catalase.



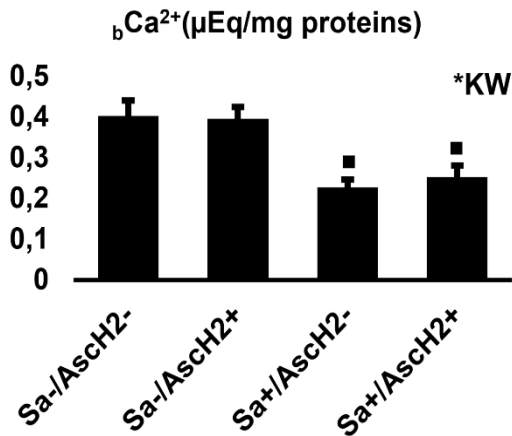
**Figure 2.5. Effet de l'Asch2 sur la nécrose et l'activité SOD et l'activité catalase au cours de l'infection à *S.aureus*.** Les pourcentages de la nécrose ont été mesurés par spectrophotométrie en déterminant les niveaux du relâchement de LDH. Les activités de catalase et de SOD ont été mesurées par spectrophotométrie, et sont considérées comme des biomarqueurs de la signalisation redox protectrice cellulaire. Les valeurs sont présentées sous forme de la moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne. Asch2 : acide ascorbique/Lthreo-2,3,4,5,6-pentahydroxyhex-2-acide énoïque-4-lactone, HUVECs : cellules endothéliales de la veine du cordon ombilical humaine, LDH : lactate déshydrogénase, SOD : Superoxyde dismutase, Sa-/Asch2- : HUVEC non infectées par *S.aureus* et non traitées par Asch2, Sa-/Asch2+ : HUVEC non infectées par *S.aureus* et traitées par Asch2, Sa+/Asch2- : HUVEC infectées par *S.aureus* et non traitées par Asch2, Sa+/Asch2+ : HUVEC infectées par *S.aureus* et traitées par Asch2. Les astérisques (\*) indiquent les différences significatives entre les groupes cellulaires non infectés ou infectés utilisant Mann-Whitney  $U$  test ( $*p < 0,05$ ). Les cases noires (•) indiquent les différences significatives en comparant avec les Contrôles (HUVEC non infectées par *S.aureus* et non traitées par Asch2) par le test Mann-Whitney  $U$  ( $*p < 0,05$ ). \*\*KM : différences significatives

## Chapitre 2. Le traitement à la vitamine C/L-Thréo acide ascorbique stimule la survie et le fonctionnement des cellules endothéliales infectées par *S. aureus*, ainsi que la bactéricidie intracellulaire, et immunomodule la sécrétion de l'IL-1 $\beta$ et l'ICAM-1 soluble

prises en lumière entre les quatre groupes selon le test de Kruskal-Wallis ( $p < 0,01$ ).

### 2.2.4. Le traitement par la vitamine C/Asch2 induit une augmentation légère des concentrations de ${}^b\text{Ca}^{2+}$ dans les HUVECs infectées par *S.aureus*

Nous avons montré (Figure 2.6) qu'il n'y a pas de différence significative dans les concentrations de  ${}^b\text{Ca}^{2+}$  lors de la comparaison des cellules traitées par Asch2 avec celles non traitées, infectées ou non infectées (pour toutes les comparaisons,  $p > 0,05$ ). Cependant, les cellules infectées, traitées ou non traitées à l'Asch2 ont montré une diminution significative des concentrations de  ${}^b\text{Ca}^{2+}$  par rapport aux cellules témoins non infectées et non traitées à l'Asch2 ( $p < 0,05$ ). Enfin, le traitement par Asch2 a provoqué une augmentation des niveaux de  ${}^b\text{Ca}^{2+}$  dans les HUVECs infectées, mais la différence n'a pas atteint le seuil de significativité ( $p > 0,05$ ). Pour toutes les comparaisons,  $p$ -value  $< 0,05$  par le test de Kruskal-Wallis.

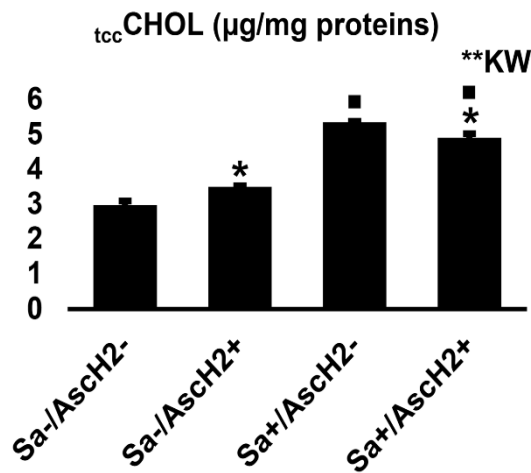


**Figure 2.6. Effet de l'Asch2 sur les niveaux de  ${}^b\text{Ca}^{2+}$  au cours de l'infection à *S.aureus*.** Les niveaux de  ${}^b\text{Ca}^{2+}$  ont été déterminés par méthode spectrophotométrique basée sur Arsenazo III (AS III- $\text{Ca}^{2+}$ ). Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne. Asch2: acide ascorbique/Lthreo-2,3,4,5,6-pentahydroxyhex-2-acide énoïque-4-lactone, HUVECs :cellules endothéliales de la veine du cordon ombilical humaine,  ${}^b\text{Ca}^{2+}$ : ions calcium complexés/liés totaux, Sa-/Asch2- : HUVEC non infectées par *S.aureus* et non traitées par Asch2, Sa-/Asch2+ : HUVEC non infectées par *S.aureus* et traitées par Asch2, Sa+/Asch2- : HUVEC infectées par *S.aureus* et non traitées par Asch2, Sa+/Asch2+ : HUVEC infectées par *S.aureus* et traitées par Asch2. Les astérisques (\*) indiquent les différences significatives entre les groupes cellulaires non infectés ou infectés utilisant Mann-Whitney  $U$  test ( $*p < 0,05$ ). Les cases noires (•) indiquent les différences significatives en comparant avec les Contrôles (HUVEC non infectées par *S.aureus* et non traitées par Asch2) par le test Mann-Whitney  $U$  ( $*p < 0,05$ ). \*KM : différences significatives mises en lumière entre les quatre groupes selon le test de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

### 2.2.5. Le traitement par la vitamine C/ Asch2 module l'augmentation des concentrations de ${}^{\text{ttc}}\text{CHOL}$ dans les HUVECs induite par l'infection à *S.aureus*

## Chapitre 2. Le traitement à la vitamine C/L-Thréo acide ascorbique stimule la survie et le fonctionnement des cellules endothéliales infectées par *S. aureus*, ainsi que la bactéricidie intracellulaire, et immunomodule la sécrétion de l'IL-1 $\beta$ et l'ICAM-1 soluble

La figure 2.7 montre que le traitement par AsCH2 a induit une augmentation des concentrations de CHOL dans les cellules non infectées par rapport aux cellules témoins non infectées et non traitées et, inversement, il a induit une baisse significative des concentrations de CHOL dans les HUVECs infectées, en comparant avec celles infectées et traitées. (Pour les deux comparaisons,  $p < 0,05$ ). De plus, les HUVECs infectées et traitées à l'AsCH2 ou non traitées présentent des niveaux de CHOL plus élevés que les cellules témoins non traitées à l'AsCH2 et les cellules témoins non infectées ( $p < 0,05$ ). Pour les comparaisons multiples par le test de Kruskal-Wallis, la valeur de  $p$  était inférieure à 0,01.



**Figure 2.7. Effet de l'AsCH2 sur les niveaux de tccCHOL au cours de l'infection à *S.aureus*.** Les niveaux de tccCHOL ont été déterminés par spectrophotométrie comme des motifs activateurs de l'immunité entraînée. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne. Asch2: acide ascorbique/Lthreo-2,3,4,5,6-pentahydroxyhex-2-acide énoïque- 4-lactone, HUVECs :cellules endothéliales de la veine du cordon ombilical humaine, tccCHOL : teneur cellulaire totale en cholestérol, Sa-/Asch2- : HUVEC non infectées par *S.aureus* et non traitées par Asch2, Sa-/Asch2+ : HUVEC non infectées par *S.aureus* et traitées par Asch2, Sa+/Asch2- : HUVEC infectées par *S.aureus* et non traitées par Asch2, Sa+/Asch2+ : HUVEC infectées par *S.aureus* et traitées par Asch2. Les astérisques (\*) indiquent les différences significatives entre les groupes cellulaires non infectés ou infectés utilisant le test de Mann-Whitney  $U$  ( $*p < 0,05$ ). Les cases noires (•) indiquent les différences significatives en comparant avec les Contrôles (HUVEC non infectées par *S.aureus* et non traitées par Asch2) par le test de Mann-Whitney  $U$  ( $*p < 0,05$ ). \*\*KM : différences significatives entre les quatre groupes selon le test de Kruskal-Wallis ( $p < 0,01$ ).

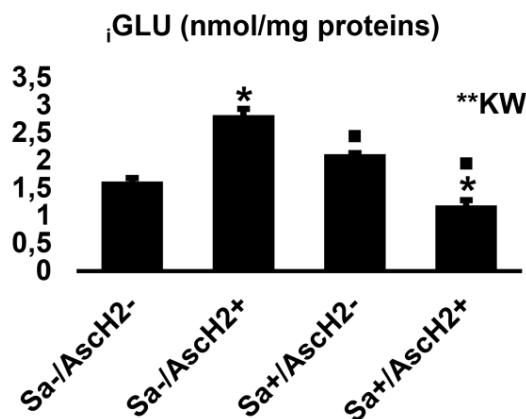
### 2.2.6. Le traitement par la vitamine C/AsCH2 inverse l'effet de *S.aureus* sur l'augmentation des niveaux d'iGLU dans les HUVECs

## Chapitre 2. Le traitement à la vitamine C/L-Thréo acide ascorbique stimule la survie et le fonctionnement des cellules endothéliales infectées par *S. aureus*, ainsi que la bactéricidie intracellulaire, et immunomodule la sécrétion de l'IL-1 $\beta$ et l'ICAM-1 soluble

Les résultats de la figure 2.8. montrent que les HUVECs non infectées et traitées par l'Asch2 ainsi que les HUVECs infectées et non traitées présentent des niveaux significativement plus élevés d'iGLU que dans les cellules témoins non traitées et non infectées ( $p < 0,05$  pour les deux comparaisons). Toutefois, le traitement par Asch2 a entraîné une diminution des concentrations d'iGLU chez les cellules infectées par *S.aureus* par rapport aux HUVECs infectées non traitées ou aux HUVECs non infectées non traitées (pour les deux comparaisons,  $p < 0,05$ ). Pour toutes les comparaisons effectuées par le test de Kruskal-Wallis, la valeur  $p$  était inférieure à 0,01.

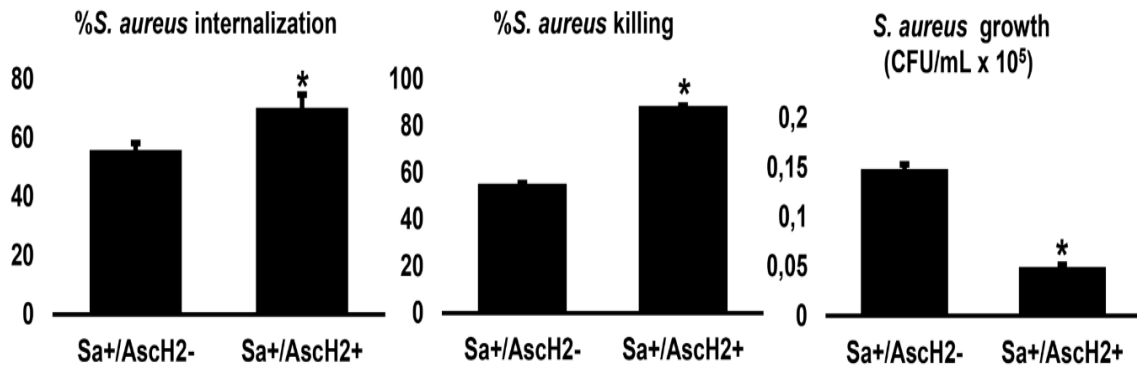
### 2.2.7. Le traitement par la vitamine C/Asch2 diminue la croissance de *S.aureus* et augmente l'internalisation bactérienne et la lyse intracellulaire par les HUVECs

Nous avons illustrés dans la figure 2.9 que le traitement par Asch2 a considérablement réduit la croissance de *S.aureus* tandis qu'il a nettement augmenté l'internalisation et la bactéricidie par les HUVECs (pour toutes les comparaisons,  $p < 0,05$  par le test de Mann-Whitney  $U$ ).



**Figure 2.8. Effet de l'Asch2 sur les niveaux de iGlu au cours de l'infection à *S.aureus*.** Les concentrations d'iGLU sont mesurées par spectrophotométrie révélant la voie métabolique cellulaire. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne. Asch2: acide ascorbique/Lthreo-2,3,4,5,6-pentahydroxyhex-2-acideénoïque-4lactone, HUVECs: cellules endothéliales de la veine du cordon ombilical humaine, iGLU: glucose intracellulaire, Sa-/Asch2- : HUVEC non infectées par *S.aureus* et non traitées par Asch2, Sa-/Asch2+ : HUVEC non infectées par *S.aureus* et traitées par Asch2, Sa+/Asch2- : HUVEC infectées par *S.aureus* et non traitées par Asch2, Sa+/Asch2+ : HUVEC infectées par *S.aureus* et traitées par Asch2. Les astérisques (\*) indiquent les différences significatives entre les groupes cellulaires non infectés ou infectés utilisant le test de Mann-Whitney  $U$  ( $*p < 0,05$ ). Les cases noires (■) indiquent les différences significatives en comparant avec les Contrôles (HUVEC non infectées par *S.aureus* et non traitées par Asch2) par le test de Mann-Whitney  $U$  ( $*p < 0,05$ ). \*\*KM : différences significatives entre tous les groupes par le test de Kruskal-Wallis ( $p < 0,01$ ).

**Chapitre 2. Le traitement à la vitamine C/L-Thréo acide ascorbique stimule la survie et le fonctionnement des cellules endothéliales infectées par *S. aureus*, ainsi que la bactéricidie intracellulaire, et immunomodule la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  et l'ICAM-1 soluble**

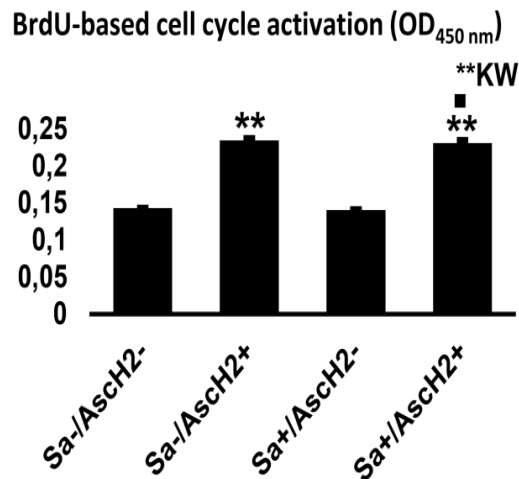


**Figure 2.9. Effet de l'Asch2 sur la croissance bactérienne, l'internalisation et la lyse bactérienne au cours de l'infection à *S.aureus*.** Après l'infection des HUVECs par *S.aureus* à une MOI de 50, le pourcentage d'internalisation bactérienne a été exprimé comme le pourcentage de diminution des bactéries extracellulaires viables. L'activité bactéricide cellulaire a été déterminée selon la méthode de protection à la gentamicine. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ erreur standard de la moyenne. Asch2: acide ascorbique/Lthreo-2,3,4,5,6-pentahydroxyhex-2-acide énoïque-4-lactone, HUVECs :cellules endothéliales de la veine du cordon ombilical humaine, CFU: colony forming unit, MOI: multiplicité de l'infection, Sa-/Asch2- : HUVEC non infectées par *S.aureus* et non traitées par Asch2, Sa-/Asch2+ : HUVEC non infectées par *S.aureus* et traitées par Asch2, Sa+/Asch2-: HUVEC infectées par *S.aureus* et non traitées par Asch2, Sa+/Asch2+ : HUVEC infectées par *S.aureus* et traitées par Asch2. Les astérisques (\*) indiquent les différences significatives entre les groupes cellulaires non infectés ou infectés utilisant le test de Mann-Whitney  $U$  (\* $p < 0,05$ ).

**2.2.8. Le traitement par la vitamine C/Asch2 améliore l'activation du cycle cellulaire chez les HUVECs infectées par *S.aureus* et non infectées**

Les résultats de la figure 2.10 montrent que le traitement par Asch2 a augmenté de façon significative l'activation du cycle cellulaire des HUVECs infectées et non infectées (Pour les deux comparaisons, la valeur  $p$  était inférieure à 0,001). Pour les comparaisons multiples utilisant le test de Kruskal-Wallis, la valeur  $p$  était inférieure à 0,01.

**Chapitre 2. Le traitement à la vitamine C/L-Thréo acide ascorbique stimule la survie et le fonctionnement des cellules endothéliales infectées par *S. aureus*, ainsi que la bactéricidie intracellulaire, et immunomodule la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  et l'ICAM-1 soluble**



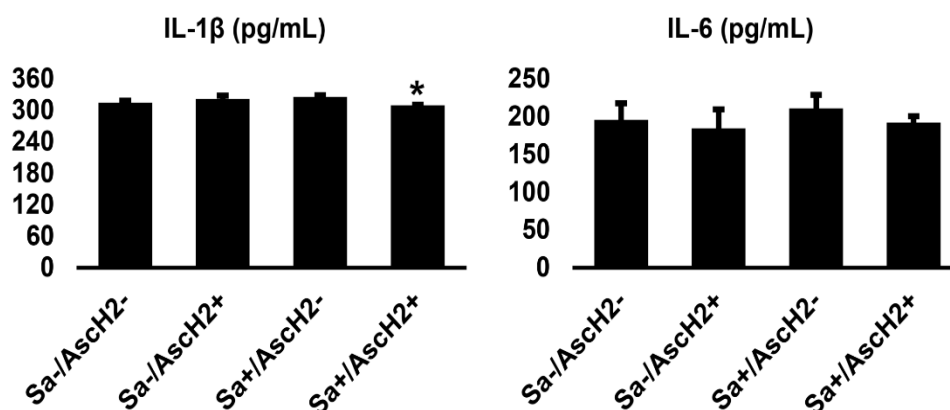
**Figure 2.10. Effet de l'Asch2 sur l'activation du cycle des HUVECs infectées par *S.aureus*.**

L'activation du cycle cellulaire a été déterminée selon le test d'incorporation de BrdU. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne. Asch2: acide ascorbique/Lthreo-2,3,4,5,6-pentahydroxyhex-2-acideénoïque-4-lactone, HUVECs: cellules endothéliales de la veine du cordon ombilical humaine, BrdU: bromodeoxyuridine [5- bromo-2'-deoxyuridine]), Sa-/Asch2- : HUVEC non infectées par *S.aureus* et non traitées par Asch2, Sa-/Asch2+: HUVEC non infectées par *S.aureus* et traitées par Asch2, Sa+/Asch2-: HUVEC infectées par *S.aureus* et non traitées par Asch2, Sa+/Asch2+ : HUVEC infectées par *S.aureus* et traitées par Asch2. Les astérisques (\*) indiquent les différences significatives entre les groupes cellulaires non infectés ou infectés utilisant le test de Mann-Whitney  $U$  (\*\* $p < 0,01$ ). Les cases noires (■) indiquent les différences significatives en comparant avec les Contrôles (HUVEC non infectées par *S.aureus* et non traitées par Asch2) par le test de Mann-Whitney  $U$  (■ $p < 0,05$ ). \*\*KM : différences significatives entre tous les groupes par le test de Kruskal-Wallis ( $p < 0,01$ ).

**2.2.9. Le traitement par la vitamine C/Asch2 a légèrement influencé la production d'IL-6, mais a induit une baisse de celle de l'IL-1 $\beta$  chez les HUVECs infectées par *S.aureus***

Comme le montre la figure 2.11 aucun changement significatif n'a été observé dans les niveaux de production d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6 dans les HUVECs traitées par Asch2, à l'exception de l'IL-1 $\beta$ , comparant entre les HUVECs infectées par *S.aureus* et celles non infectées non traitées (Respectivement  $p > 0,05$  et  $p < 0,05$  par le test de Mann-Whitney  $U$ ). Pour les comparaisons multiples effectuées par le test Kruskal-Wallis, la valeur  $p$  était supérieure à 0,05 pour l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6.

## Chapitre 2. Le traitement à la vitamine C/L-Thréo acide ascorbique stimule la survie et le fonctionnement des cellules endothéliales infectées par *S. aureus*, ainsi que la bactéricidie intracellulaire, et immunomodule la sécrétion de l'IL-1 $\beta$ et l'ICAM-1 soluble



**Figure 2.11. Effet de l'Asch2 sur la production d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6 des HUVECs infectées par *S. aureus*.** La production d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6 est déterminée par ELISA, Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne. Asch2: acide ascorbique/Lthreo-2,3,4,5,6-pentahydroxyhex-2-acide énoïque-4-lactone, HUVECs :cellules endothéliales de la veine du cordon ombilical humaine, IL: interleukin, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, Sa-/Asch2- : HUVEC non infectées par *S.aureus* et non traitées par Asch2, Sa-/Asch2+: HUVEC non infectées par *S.aureus* et traitées par Asch2, Sa+/Asch2-: HUVEC infectées par *S.aureus* et non traitées par Asch2, Sa+/Asch2+ : HUVEC infectées par *S.aureus* et traitées par Asch2. Les astérisques (\*) indiquent les différences significatives entre les groupes cellulaires infectés utilisant le test de Mann-Whitney  $U$  (\* $p < 0,05$ ).

### 2.3. Discussion

Bien que traditionnellement considérées seulement comme une barrière passive recouvrant la paroi interne des vaisseaux sanguins, les CE sont actuellement définies comme des cellules multifonctionnelles uniques qui remplissent plusieurs fonctions vitales basales et inductibles, métaboliques et synthétiques. Elles assurent le contrôle de l'homéostasie, du tonus vasomoteur, de la vasculogénèse et de l'angiogénèse, ainsi que la régulation des réponses immunitaires et inflammatoires (Michiels, 2003; Pober and Sessa, 2007; Sumpio et al., 2002). De plus, les CE ont récemment été considérées comme des cellules immunitaires innées accidentelles qui jouent un rôle crucial dans les pathologies inflammatoires et immunitaires (Mai et al., 2013). La localisation privilégiée des CE dans l'interface entre le sang et les tissus adjacents (Michiels, 2003; Sumpio et al., 2002), leur permet d'occuper une des premières lignes de défense immunitaire innée. En effet, elles patrouillent dans la circulation permettant ainsi de détecter les agents pathogènes via des PRRs appropriés, et elles orchestrent la réponse inflammatoire, par l'augmentation de l'expression des cytokines proinflammatoires (Kofler et al., 2005) et des molécules d'adhésions leucocytaires, y compris E-sélectine et ICAM-1, pour recruter des cellules phagocytaires professionnelles au foyer de l'infection. Cependant, Il a été rapporté que les réponses proinflammatoires excessives des CE augmentent le stress oxydatif (Ince et al., 2016; Kofler et al., 2005; Zhang, 2008), ce qui conduit à leur apoptose et à la diminution de l'activité eNOS (Ince et al., 2016; Kofler et al., 2005), causant, par conséquent, un



## **Chapitre 2. Le traitement à la vitamine C/L-Thréo acide ascorbique stimule la survie et le fonctionnement des cellules endothéliales infectées par *S. aureus*, ainsi que la bactéricidie intracellulaire, et immunomodule la sécrétion de l'IL-1 $\beta$ et l'ICAM-1 soluble**

dysfonctionnement endothélial (Gimbrone and García-Cardena, 2016) et participant à la progression des maladies inflammatoires (Gimbrone and García-Cardena, 2016; Kofler et al., 2005). Par ailleurs, une altération des fonctions immunitaires des CE pourrait favoriser le trafic incontrôlé des agents infectieux, notamment l'invasion de bactéries pathogènes, qui conduisent à des conditions létales, comme le sepsis et le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA). L'invasion par *S. aureus* est due principalement à sa capacité à envahir et à survivre dans les cellules endothéliales, ce qui contribue à sa propension à provoquer une infection endovasculaire persistante accompagnée d'une destruction endothéliale (Lowy et al., 1988; Menzies and Kourteva, 1998). En outre, son adhésion à l'endothélium, est une étape primordiale de sa pathogénicité, vu qu'elle facilite sa dissémination à travers la circulation sanguine ou lymphatique vers les différents tissus et qu'elle favorise l'évolution d'une bactériémie vers un sepsis (Pöhlmann-Dietze et al., 2000).

L'acide ascorbique, également connu sous le nom de vitamine C, est essentiellement connu pour ses propriétés antioxydantes. Il représente un co-substrat important d'une multitude d'enzymes et régule l'expression des gènes en interagissant avec des facteurs de transcription indispensables. Il joue également un rôle majeur dans la protection contre le stress au cours du processus inflammatoire et immunitaire (Chambial et al., 2013; Sorice et al., 2014), en réduisant les ROS et les RNS. Il agit également comme antimicrobien et participe au contrôle des infections et à l'immunité anti-infectieuse en général (Hemilä, 2017; Sorice et al., 2014).

Dans la présente étude, nous avons évalué les effets *ex vivo* immunomodulateurs de la vitamine C/l'Asch2 sur le fonctionnement des HUVECs primaires infectées par *S. aureus* en se basant sur son rôle principal dans l'immunité en tant que molécule immunostimulatrice, anti-inflammatoire et antibactérienne.

### **2.3.1. Effets de la vitamine C/Asch2 sur la production de NO et l'activité de l'arginase des HUVECs au cours de l'infection à *S. aureus***

Le NO est un médiateur gazeux de signalisation cellulaire, qui joue un rôle majeur en physiologie et en physiopathologie. Cette molécule est produite à partir de l'acide aminé L-arginine par l'enzyme NOS. Le NO dérivé de l'endothélium, synthétisé principalement par NOS endothélial, contribue particulièrement à la régulation de l'angiogenèse, au remodelage vasculaire et à la régulation de la pression artérielle systémique, et inhibe l'adhésion leucocytaire et l'agrégation plaquettaire (Dimmeler et al., 1999; Huang et al., 1995). En outre, les HUVECs sont productrices de quantité assez importante de NO, qui joue un rôle important dans la défense antimicrobienne (Bogdan, 2001). Il a été démontré que les HUVECs expriment le deuxième isoforme de NOS, NOS inductible (iNOS) (Cristina de Assis et al., 2002). Dans notre étude, nous avons observé que le traitement par Asch2 induisait une augmentation de la production de NO par les HUVECs non infectées. Par ailleurs, une étude antérieure menée sur le modèle HUVEC a démontré qu'un traitement à l'Asch2 pendant 24 h à des doses de 1  $\mu$ M jusqu'à 1 mM pourrait prévenir le dysfonctionnement endothélial en stimulant la

## Chapitre 2. Le traitement à la vitamine C/L-Thréo acide ascorbique stimule la survie et le fonctionnement des cellules endothéliales infectées par *S. aureus*, ainsi que la bactéricidie intracellulaire, et immunomodule la sécrétion de l'IL-1 $\beta$ et l'ICAM-1 soluble

synthèse adéquate du NO via la stabilisation chimique et l'augmentation de la durée de vie et la concentration du tétrahydrobioptérine (BH4) intracellulaire, cofacteur clé de l'enzyme eNOS, suggérant ainsi que la saturation des CEs par l'AsCH2 est nécessaire pour fournir des conditions optimales de la synthèse cellulaire du NO en protégeant l'oxydation de BH4 sans pour autant affecter l'expression de l'eNOS et la biodisponibilité de la L-arginine (Heller et *al.*, 2001). Cependant, la quantité de NO pourrait être limitée dans certaines conditions par l'augmentation de l'activité de l'arginase, sachant que la L-arginine pourrait également être utilisée par une autre voie métabolique, dans laquelle l'enzyme arginase catalyse la L-arginine en ornithine et urée. Par conséquent, une augmentation de la voie de l'arginase est considérée comme un mécanisme essentiel de diminution de la disponibilité de l'arginine, cette dernière étant considérée comme le substrat indispensable pour le métabolisme de NO (Chicoine et *al.*, 2004; Zhou et *al.*, 2015). Deux isoformes distinctes de l'arginase ont été identifiées : l'arginase I, qui est abondante et exprimée par les macrophages et les hépatocytes, et l'arginase II, qui est surtout exprimée dans les cellules rénales. Il est bien rapporté que les deux isoformes de l'arginase sont présentes dans les CEs (Bachetti, 2004). De plus, certaines études ont montré qu'il existe une relation entre la production de NO, l'activité de l'arginase endothéliale et le dysfonctionnement vasculaire (Loyaga-Rendon et *al.*, 2005; Ming et *al.*, 2004).

À notre connaissance, il s'agit de la première étude qui a évalué l'effet de l'AsCH2 sur l'activité de l'arginase et le NO dans les HUVECs infectées par *S. aureus*. Nous avons observé que le traitement par AsCH2 a diminué la production de NO dans les HUVECs infectées par *S. aureus* et qu'il a induit une augmentation légère de l'activité de l'arginase dans les HUVECs infectées et non infectées par *S. aureus* en comparaison avec leurs contrôles non traitées. Nos résultats sont cohérents avec les recherches antérieures montrant l'effet inhibiteur de la vitamine C sur l'expression de l'iNOS dans les CEs des muscles squelettiques de rats stimulées par l'endotoxine et l'IFN- $\gamma$  en agissant en tant qu'antioxydant et en atténuant l'activation du facteur de régulation de l'interféron-1 (IRF-1) (Wu et *al.*, 2002). De plus, l'étude antérieure menée dans notre laboratoire par Aribi et collaborateurs sur des macrophages péritonéaux co-cultivés avec *S. aureus*, a démontré que le sélénium, un autre antioxydant, induisait une diminution significative de la production de NO et une augmentation significative de l'activité de l'arginase (Aribi et *al.*, 2015b). Aussi, la quantité produite de NO pourrait être affectée par *S. aureus*, sachant qu'il possède la capacité de produire de l'arginase, ce qui pourrait moduler le système immunitaire en consommant l'arginine de l'hôte, et conduire par la suite à la diminution des niveaux de NO (Lahiri et *al.*, 2010). Cependant, dans notre étude, les niveaux de NO et ceux de l'arginase ne semblent pas être affectés par l'infection à *S. aureus* bien que des différences mineures ont été détectées mais qui n'ont pas atteints le seuil de significativité. A cet égard, Il serait opportun de réaliser des investigations *in vitro* pour étudier spécifiquement les activités enzymatiques de NOS et celles de l'arginase et leurs affinités à la L-arginine dans le modèle HUVEC- *S. aureus*, et

## **Chapitre 2. Le traitement à la vitamine C/L-Thréo acide ascorbique stimule la survie et le fonctionnement des cellules endothéliales infectées par *S. aureus*, ainsi que la bactéricidie intracellulaire, et immunomodule la sécrétion de l'IL-1 $\beta$ et l'ICAM-1 soluble**

d'étudier le lien entre l'Asch2, le NO, l'eNOS, l'arginase et les cofacteurs indispensables tels que Ca<sup>2+</sup>/calmoduline (CaM), et BH4.

### **2.3.2. Effet de la vitamine C/Asch2 sur la sécrétion de sICAM-1 et de sE-sélectine par les HUVECs au cours de l'infection à *S. aureus***

Les formes solubles des molécules d'adhésion, y compris la sICAM-1 et la sE-sélectine, sont considérées comme des biomarqueurs puissants de l'inflammation et de l'activation de CEs (Koh and Park, 2018; Pigott et al., 1992). Dans notre étude, les niveaux de sICAM-1 et de sE-sélectine étaient élevés dans les HUVECs infectées par *S. aureus*, ce qui corrobore diverses études *in vitro* et *in vivo* montrant que *S. aureus* pourrait induire l'expression de l'ICAM-1 et de l'E-sélectine (Nymo et al., 2016; Woodfin et al., 2016). Il est bien admis que l'augmentation des molécules d'adhésion induit le recrutement des leucocytes circulants y compris, les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) et les monocytes, vers le foyer inflammatoire (Gerhardt and Ley, 2015; Lee et al., 2018), ainsi que leurs adhésions aux CEs, au cours de la réaction inflammatoire aiguë, leur permettant la transmigration et le trafic à travers la paroi du vaisseau après leur roulement (Carlos and Harlan, 1994). Il a déjà été rapporté que les HUVECs cultivées n'expriment pas l'E-sélectine à la surface cellulaire que lorsqu'elles sont exposées à des cytokines inflammatoires, ce qui démontre que l'activation et la translocation de NF- $\kappa$ B est une condition préalable à l'expression de E-sélectine et d'autres médiateurs pro-inflammatoires (Schreiber et al., 2019). Par conséquent, nos résultats complètent des résultats précédents qui rapportent l'augmentation des niveaux de cytokines pro-inflammatoires. Enfin, contrairement aux études montrant que la supplémentation en vitamine C chez des sujets normaux réduit les niveaux d'expression de ICAM-1 et de E-sélectine constitutifs et circulants (Hernofialdi et al., 2013; Mikirova et al., 2016; Rayment et al., 2003), nos résultats ne semblent pas montrer d'effet significatif du traitement par Asch2 sur le relâchement de sICAM-1 et de sE-sélectine par les HUVECs. La divergence de ces résultats pourrait être due à la différence dans le type cellulaire, le modèle et la conception de l'étude, de même que les conditions expérimentales.

### **2.3.3. Effet de l'Asch2 sur la nécrose cellulaire et la protection cellulaire basée sur les biomarqueurs de la signalisation redox chez les HUVECs au cours de l'infection à *S. aureus***

Le relâchement des composants cytosoliques cellulaires, y compris l'enzyme LDH, qui est présente dans la majorité des cellules de l'organisme, est considéré comme un marqueur clé des cellules nécrotiques, révélant la perméabilisation de la membrane plasmique (Chan et al., 2013; Franke et al., 2010). Nos résultats sont cohérents avec ceux montrant que l'infection par *S. aureus* peut entraîner la mort de la cellule hôte, notamment les phagocytes professionnels et non professionnels tels que les CEs (Giese et al., 2011; Haslinger-Loffler et al., 2005; Kobayashi et al., 2015). De plus, il a été rapporté que les antioxydants, comme la vitamine C, peuvent empêcher l'induction de l'apoptose chez les CEs humaines et d'autres cellules immunitaires (Haendeler et al., 1996; Perez-Cruz et al., 2003). Ainsi, il

## **Chapitre 2. Le traitement à la vitamine C/L-Thréo acide ascorbique stimule la survie et le fonctionnement des cellules endothéliales infectées par *S. aureus*, ainsi que la bactéricidie intracellulaire, et immunomodule la sécrétion de l'IL-1 $\beta$ et l'ICAM-1 soluble**

est connu que la vitamine C peut inhiber l'accumulation de ROS cellulaires (Zhong et al., 2017) grâce à son pouvoir antioxydant, ce qui concorde avec nos résultats qui ont mis en évidence l'induction de l'activité redox protectrice cellulaire, via l'augmentation de l'activité de la SOD et de la catalase, bien que cette dernière n'était que légèrement augmentée dans les HUVECs infectées par *S. aureus* et traitées par Asch2. De plus, une étude menée sur les cellules souches mésenchymateuses a rapporté l'effet de L- acide ascorbique sur l'inhibition de la sénescence via la régulation négative de la production des ROS et la voie AKT (/mTOR (Yang et al., 2018). Il serait donc de grand intérêt de vérifier si la protection des HUVECs par Asch2 est liée à son éventuelle inhibition de la voie de mammalian target of rapamycin (mTOR). Ce processus a été décrit dans la maladie des artères coronaires (Tarantino and Capone, 2013). Il est à noter que mTOR est une sérine/ thréonine kinase qui existe dans deux complexes protéiques fonctionnellement distincts nommés la cible du complexe de rapamycine chez les mammifères 1 (mTORC1) et 2 (mTORC2). mTORC1 régule la croissance et le métabolisme des cellules, et mTORC2 fonctionne principalement comme effecteur en aval de la phosphorylation Akt (et kinases associés à l'Akt), lequel Akt agit comme régulateur du cytosquelette d'actine et rétro régulateur négatif de mTORC1 (Kawata et al., 2018; Oh and Jacinto, 2011; Schreiber et al., 2019). La protection des CEs dans de telles pathologies pourrait être due à une inhibition sélective de mTORC1, entraînant l'activation de la signalisation de phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Akt, qui entretient la survie et la prolifération des CEs (Tarantino and Capone, 2013), ainsi, elle inhibait leurs apoptose (Wei et al., 2012).

### **2.3.4. Effet de la vitamine C/Asch2 sur les taux de bCa<sup>2+</sup> par les HUVECs au cours de l'infection à *S. aureus***

Au niveau cellulaire, le cation bivalent de Calcium (Ca<sup>2+</sup>) joue un rôle important comme deuxième messenger (transduction du signal), pour assurer non seulement la transmission du signal extracellulaire et son expression à l'intérieur de la cellule mais également l'amplification et la modulation du signal, ou son rétrocontrôle chez les HUVECs. Le Ca<sup>2+</sup> est ainsi le deuxième messenger omniprésent au niveau des CEs et est notamment essentiel dans leurs fonctions physiologiques et immunologiques (Filippini et al., 2019; Mumtaz et al., 2011). Il peut être considéré comme un facteur de signalisation important lors de l'internalisation de plusieurs pathogènes bactériens, dont *S. aureus* (Asmat et al., 2014; Eichstaedt et al., 2009). Une augmentation du Ca<sup>2+</sup> libre peut activer un certain nombre de voies de signalisation dans les conditions physiologiques et pathologiques (Dalal et al., 2020). Les voies de signalisation et d'activation cellulaires dépendantes de Ca<sup>2+</sup> se produisent après sa liaison avec la calmoduline (CaM) (Swulius and Waxham, 2008). Dans notre étude, nous avons constaté que bCa<sup>2+</sup> a diminué dans les cellules infectées, traitées ou non traitées par Asch2. À noter, l'infection à *S. aureus* induit une augmentation de la concentration d'ions calcium libres et sa libération dans les CEs (Stelzner et al., 2020), les phagocytes professionnels, et les monocytes (Zheng et al., 1992), ce qui entraînerait la mort cellulaire (Bhosale et al., 2015). Comme nous l'avons démontré par

## **Chapitre 2. Le traitement à la vitamine C/L-Thréo acide ascorbique stimule la survie et le fonctionnement des cellules endothéliales infectées par *S. aureus*, ainsi que la bactéricidie intracellulaire, et immunomodule la sécrétion de l'IL-1 $\beta$ et l'ICAM-1 soluble**

l'augmentation de la cytotoxicité liée à la LDH, nos résultats suggèrent que la plupart des ions calciques sont sous forme libre dans les HUVECs infectées par *S. aureus*. En outre, nous avons démontré que le traitement par Asch2 a augmenté le  $Ca^{2+}$  dans les HUVECs infectées, parallèlement à la diminution de la nécrose cellulaire. Par conséquent, il est important de vérifier si les ions calcium sous forme liée peuvent protéger ou non contre la mort des CEs et si le traitement à la vitamine C pourrait être l'une des approches thérapeutiques à explorer pour assurer l'homéostasie des ions calciques intracellulaires dans les CEs humaines pendant l'infection par *S. aureus*.

### **2.3.5. Effet de la vitamine C/l'Asch2 sur les taux de $^{tcc}$ CHOL pendant l'infection des HUVECs à *S. aureus***

Des études récentes ont indiqué que la teneur en cholestérol et son métabolisme intracellulaire dans les cellules immunitaires sont considérés comme des facteurs déterminants, modulant l'immunité innée et adaptative (Aguilar-Ballester et al., 2020). Dans notre étude, nous avons observé que l'infection des HUVECs par *S. aureus* induit une augmentation significative de la teneur en cholestérol total. A ce sujet, il a été rapporté que les lipoprotéines de basse densité oxydées (oxLDL) et l'augmentation du cholestérol induisent une mémoire immunitaire innée, un processus dans lequel les cellules immunitaires innées myéloïdes et leurs progéniteurs interviennent dans l'épigénétique, le remodelage de la chromatine et la reprogrammation fonctionnelle pour créer une réponse à un stimulus précédemment reconnu, permettant une protection contre les infections hétérologues (Aguilar-Ballester et al., 2020; Netea et al., 2020). De plus, l'accumulation de cholestérol dans les cellules immunitaires innées favorise l'activation de l'inflammasome et la signalisation des TLR, qui boostent les réponses inflammatoires (Tall and Yvan-Charvet, 2015). Par conséquent, l'infection des CEs humains par *S. aureus* pourrait être un facteur d'activation important du processus de mémoire de l'immunité innée "trained immunity". Enfin, nous avons remarqué que le traitement des HUVECs avec Asch2 induisait une baisse significative du taux de cholestérol cellulaire total, mais qui reste encore élevé par rapport aux cellules témoins. Il serait donc très intéressant de démontrer si le traitement à la vitamine C pourrait agir comme un modulateur modéré de toute modification épigénétique dans les CEs au cours d'une infection à *S. aureus*.

### **2.3.6. Effet de la vitamine C/Asch2 sur les taux d'iGLU au cours de l'infection des HUVECs par *S. aureus***

L'iGLU est synthétisé de diverses manières, notamment à travers la néoglucogenèse à partir des substrats non sucrés, tels que le pyruvate, le lactate et les acides aminés glucoformateurs, ou la glycogénolyse. Il est consommé principalement par la glycolyse, la voie des pentoses-phosphates ou par la synthèse du glycogène (la glycogénogenèse). Son métabolisme constitue une source d'énergie chez tous les types de cellules. Dans les cellules immunitaires, la reprogrammation métabolique grâce à l'utilisation de la glycolyse et de l'oxydation des acides gras leur permet de s'activer et de s'engager



## **Chapitre 2. Le traitement à la vitamine C/L-Thréo acide ascorbique stimule la survie et le fonctionnement des cellules endothéliales infectées par *S. aureus*, ainsi que la bactéricidie intracellulaire, et immunomodule la sécrétion de l'IL-1 $\beta$ et l'ICAM-1 soluble**

dans une croissance et une prolifération robuste pour générer des cellules effectrices capables de développer des réponses immunitaires efficaces. Le métabolisme glucidique pourrait donc être ciblé par des approches immunothérapeutiques afin de lutter contre les infections intracellulaires, telles que les infections virales, ainsi que pour améliorer l'efficacité des vaccins (Shehata et al., 2017). Sur la base de nos résultats qui montrent une augmentation de l'iGLU dans les HUVECs infectées, nous pouvons déduire que pendant l'infection à *S. aureus*, les CEs peuvent développer des stratégies immunométaboliques pour contrecarrer l'infection, notamment en augmentant leurs niveaux de glucose en tant que substrat énergétique nécessaire à leurs activités immunitaires. Néanmoins, le glucose pourrait être une arme à double tranchant, sachant que *S. aureus* peut utiliser le glucose pour se développer dans des conditions non respiratoires imposées par le système immunitaire telles que l'anaérobiose, la production du NO et la chélation des ions ferriques, l'hypoxie suite à la consommation rapide de l'oxygène par les cellules immunitaires etc (Vitko et al., 2016). Ces résultats devraient ouvrir la voie à une étude mécanistique de cause à effet pour savoir si l'augmentation des niveaux d'iGLU est le résultat d'une rétroaction négative (un feedback négatif) pour contrecarrer l'infection à *S.aureus*-tout en augmentant la source d'énergie pour les HUVECs et *S. aureus*-ou, inversement, *S. aureus* pourrait synthétiser l'iGLU en utilisant la machinerie enzymatique et les substrats nécessaires de la cellule hôte en agissant comme un parasite. D'autre part, nous avons observé que le traitement par Asch2 a induit une augmentation de l'iGLU dans les HUVECs non infectées, en revanche, il a diminué l'iGLU dans les HUVECs infectées. Branch et ses collaborateurs ont rapporté que la supplémentation par la vitamine C à forte concentration peut augmenter les niveaux de glucose plasmatique (Branch, 1999). De plus, en raison de la similitude de la structure (Dakhale et al., 2011), elle peut interférer avec la mesure de la concentration de glucose. Cependant, la diminution des taux d'iGLU chez les cellules infectées pourrait être le résultat de l'effet stimulateur l'Asch2 de la consommation de glucose principalement par les HUVECs, étant donné que la croissance de *S. aureus* était diminuée dans ces conditions.

### **2.3.7. Effet de la vitamine C/Asch2 sur la croissance de *S. aureus*, son internalisation et sa lyse par les HUVECs**

*S. aureus* a été considéré traditionnellement comme un germe extracellulaire mais de nombreuses études ont montré son habilité à échapper à des cellules phagocytaires professionnelles telles que les neutrophiles (Kubica et al., 2008) et des cellules non professionnelles comme les fibroblastes, les cellules mésenchymateuses, les cellules épithéliales et endothéliales (Oviedo-Boyso et al., 2008; Seeberg et al., 2019). Cette position intracellulaire contribue au maintien de l'infection et protège la bactérie contre les réponses immunitaires et l'antibiothérapie, ce qui favorise la persistance et la propagation de l'infection. Plusieurs mécanismes moléculaires sont impliqués dans l'internalisation de *S. aureus* par les cellules hôtes. La liaison de la protéine de surface fibronectin binding protein (Fbp) aux intégrines joue un rôle important ainsi que la polymérisation du cytosquelette d'actine. Plus

## Chapitre 2. Le traitement à la vitamine C/L-Thréo acide ascorbique stimule la survie et le fonctionnement des cellules endothéliales infectées par *S. aureus*, ainsi que la bactéricidie intracellulaire, et immunomodule la sécrétion de l'IL-1 $\beta$ et l'ICAM-1 soluble

récemment, l'implication de la voie de signalisation PI3K a été démontrée. Le site de liaison de PI3K fait suite à l'autophosphorylation de la Focal adhesion kinase (FAK), induite par *S. aureus*. L'internalisation implique également la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B induite par TNF $\alpha$  (Oviedo-Boyso et al., 2011). Les cellules endothéliales, douées d'activité phagocytaire non professionnelle constituent une voie privilégiée pour la dissémination de *S. aureus* (Hamill et al., 1986; Oviedo-Boyso et al., 2011; Rollin et al., 2017). Les bactéries internalisées résident dans des vacuoles endosomales ou sont détournées de la voie endosomale vers des autophagosomes. Les multiples facteurs de virulence exprimés leur permettent de s'échapper dans le cytoplasme et éventuellement de tuer la cellule hôte en induisant son apoptose (Kubica et al., 2008). La persistance de *S. aureus* dans les phagocytes non professionnels, contrairement aux macrophages, dépend de l'expression du locus *agr* (the quorum-sensing accessory gene regulator) et du facteur alternatif sigma et est favorisée par la production de l'alpha toxine. Elle se distingue par l'induction de l'apoptose de la cellule hôte (Bayles et al., 1998; Painter et al., 2014). La vitamine C exerce de multiples effets sur les cellules endothéliales mais ses effets sur leur capacité à internaliser des bactéries ou à exercer des effets bactéricides ou bactériostatiques sont inconnus. Nos résultats ont démontré que le traitement à la vitamine C diminue la croissance de *S. aureus* et augmente à la fois l'internalisation / phagocytose et la capacité bactéricide. L'effet de la vitamine C sur l'activité phagocytaire cellulaire a été étudié pour les neutrophiles et les leucocytes (McCall et al., 1971; Shilotri and Bhat, 1977) (McCall et al., 1971; Shilotri and Bhat, 1977). De plus, Il a été rapporté que la vitamine C s'accumule dans les cellules phagocytaires et peut améliorer la chimiotaxie, la phagocytose, la génération de ROS et qu'elle augmente la destruction microbienne (Carr and Maggini, 2017).

L'activité bactéricide de la vitamine C a fait l'objet de nombreux travaux (Sagripanti et al., 1997; Zhang et al., 1997). Elle est surtout connue pour les bactéries intracellulaires comme le *Mycobacterium tuberculosis* contre lequel la vitamine C exerce une forte activité bactéricide *in vitro* seule et dans les macrophages (Vilchère et al., 2013; Wang et al., 2012). Les activités antimicrobiennes de la vitamine C, en particulier sous forme de DHA, ont été démontrées également sur des virus, y compris le virus de l'herpès simplex de type 1, le poliovirus de type 1 et le virus de la grippe de type A, et des parasites tels que le *Trypanosome cruzi* et *Plasmodium yoelii* 17XL (Mousavi et al., 2019). Dans notre étude, la vitamine C a montré un effet inhibiteur très significatif sur la croissance de *S. aureus*. Ceci va dans le sens des travaux de Kallio et al. qui ont montré pour la première fois en 2012 que la vitamine C seule inhibait la croissance de *S. aureus*. Ce travail avait démontré l'effet bactéricide de la vitamine C sur *S. aureus* indépendamment des cellules immunitaires. Une autre étude avait montré que la vitamine C à la dose de 100  $\mu$ M inhibait la réplication bactérienne dans les cellules endothéliales des micro vaisseaux du muscle squelettique de rats présentant une infection provoquée par ligature caecale et perforation (Armour et al., 2001).



## **Chapitre 2. Le traitement à la vitamine C/L-Thréo acide ascorbique stimule la survie et le fonctionnement des cellules endothéliales infectées par *S. aureus*, ainsi que la bactéricidie intracellulaire, et immunomodule la sécrétion de l'IL-1 $\beta$ et l'ICAM-1 soluble**

L'effet inhibiteur de la croissance intracellulaire par la vitamine C peut s'expliquer soit par le fait que le métabolisme de la vitamine C en présence d'oxygène expose la bactérie au stress oxydatif (Kallio et al., 2012; Li, 2016) ou bien par la production d'acide acétique et de lactate à partir de la vitamine C (Kallio et al., 2012). Ce mécanisme pourrait également s'appliquer à l'effet intracellulaire exercé par la vitamine C. Cependant, les effets de la vitamine C sur les HUVECs infectées par *S. aureus* doivent encore être explorés et des travaux supplémentaires sont nécessaires pour mieux préciser ce mécanisme au niveau moléculaire en caractérisant, d'une part, l'effet de la vitamine C sur l'expression du gène *agr* par *S.aureus*, lors du processus phagocytaire (adhésion, internalisation et bactéricidie) par les HUVECs, sachant que *Agr* est un système très impliquée dans l'expression de facteurs de virulence et le développement des infections invasives à *S.aureus* (Painter et al., 2014), et d'autres part, étudier l'effet de la vitamine C sur l'expression des voies de signalisation PI3K-Akt et NF-kB au cours de l'adhésion de *S.aureus* et son internalisation par les HUVECs.

### **2.3.8. Effet de la vitamine C/Asch2 sur l'activation du cycle cellulaire des HUVECs au cours de l'infection à *S. aureus***

Notre travail a montré pour la première fois l'effet de l'Asch2 sur la croissance et la survie des HUVECs lors d'une infection à *S. aureus*. Ici, nous avons démontré que le traitement par Asch2 active le cycle cellulaire, soit en présence ou en absence de *S. aureus*. Ce processus pourrait être lié à la capacité de la vitamine C à augmenter la synthèse du collagène de type IV (May and Harrison, 2013), mais aussi à l'activation de la voie de signalisation ERK1/2 (Ulrich-Merzenich et al., 2007). De plus, la protection et la régénération des HUVECs peuvent être expliqués par un effet inhibiteur de l'Asch2 sur la voie mTOR comme cité ci-dessus.

### **2.3.9. Effets de la vitamine C/Asch2 sur la production d'IL-1 $\beta$ et d'IL-6 par les HUVECs au cours de l'infection à *S. aureus***

La réponse inflammatoire contre les infections est caractérisée par la sécrétion d'une large gamme de cytokines proinflammatoires, comme l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6, et les protéines de la phase aiguë (APP) (Slaats et al., 2016), notamment la protéine C-réactive (CRP), la protéine sérique amyloïde A (SAA), le fibrinogène et l'hepcidine dans les hépatocytes, alors qu'il inhibe la production de l'albumine (Tanaka et al., 2014).

L'IL-1 $\beta$  est une cytokine typique produite par les macrophages et les monocytes, mais elle peut également être exprimée dans d'autres types de cellules, comme les cellules dendritiques, les neutrophiles, les mastocytes, les cellules épithéliales et les CEs. L'IL-1 $\beta$  intervient dans l'infiltration tissulaire des cellules inflammatoires et immunocompétentes en augmentant l'expression des chimiokines et de ICAM-1 par les CEs (Sims and Smith, 2010).

L'IL-6 est une cytokine pléiotrope généralement produite en réponse à des infections et des lésions tissulaires (Dinarello, 2009). La transduction de la voie de signalisation de l'IL-6 augmente l'expression

## **Chapitre 2. Le traitement à la vitamine C/L-Thréo acide ascorbique stimule la survie et le fonctionnement des cellules endothéliales infectées par *S. aureus*, ainsi que la bactéricidie intracellulaire, et immunomodule la sécrétion de l'IL-1 $\beta$ et l'ICAM-1 soluble**

des molécules d'adhésion des leucocytes endothéliales, y compris la molécule d'adhésion vasculaires 1 (VCAM-1 / CD106) et ICAM-1/CD54 et induit en outre l'accumulation des leucocytes (Hurst et *al.*, 2001; Kaplanski et *al.*, 2003). Il est bien connu que la production de cytokines par les CE humaines représente l'un des premiers événements déclenchés par une infection. Lors des réponses inflammatoires aiguës, la production cellulaire de plusieurs cytokines proinflammatoires est augmentée, en particulier, l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6, qui sont des biomarqueurs puissants de la réponse inflammatoire aiguë et sévère aux infections bactériennes (Slaats et *al.*, 2016). Nos résultats confirment ceux démontrant que l'internalisation de *S. aureus* par les HUVECs induisait l'expression de l'IL-6 (Yao et *al.*, 1995), mais n'ont montré aucun effet sur la production de l'IL-1 $\beta$  (Strindhall et *al.*, 2005). Dans notre étude, cependant, la différence des niveaux d'IL-6 étaient légèrement différents par rapport aux HUVECs non infectés, ce qui mérite des études complémentaires, investiguant la voie de signalisation et de la maturation de la caspase-1.

IL-1  $\beta$  et IL-6 ont des effets locaux et systémiques qui peuvent contribuer par la suite aux lésions tissulaires délétères et à la progression des maladies inflammatoires, causant ainsi un dysfonctionnement endothélial et peuvent finalement favoriser une inflammation permanente pathologique caractérisant le développement du sepsis (Molloy et *al.*, 1993; Tarantino et *al.*, 2020).

La surproduction d'IL-6 induit l'expression excessive du VEGF, responsable du déséquilibre de la perméabilité vasculaire et de l'angiogénèse (Tanaka et *al.*, 2014). De plus, la surexpression d'IL-1 $\beta$  est principalement impliquée dans les changements physiopathologies cellulaires (Dinarello, 1996; Ren and Torres, 2009) au cours des inflammation systémique et du choc septique, tels que, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, l'activation du profil procoagulant et prothrombotique de l'endothélium et l'expression excessive de la sécrétion des molécules d'adhésion (Bevilacqua et *al.*, 1985; Kaneko et *al.*, 2019), ce qui a pour conséquence l'infiltration massive des neutrophiles. Néanmoins, l'immunomodulation de IL-1 $\beta$  et IL-6 peut jouer un rôle central dans le contrôle des infections bactériennes et de l'exacerbation du processus inflammatoire. Dans ce contexte, nos résultats ont illustré l'effet de l'Asch2 sur la diminution de la production d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6 dans les HUVECs infectées par *S. aureus* et qui sont en accord avec les données rapportant que le traitement à la vitamine C réduit la production intracytoplasmique de cytokines proinflammatoires (Härtel et *al.*, 2004). Des études supplémentaires sont nécessaires pour élucider la relation de cause à effet entre le traitement à la vitamine C, l'activation de la caspase-1 dépendante de l'inflammasome NLRP3 (nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat (NLR) family pyrin domain containing 3), et le facteur NF- $\kappa$ B dans les CE pendant l'infection par *S. aureus*, en particulier dans la physiopathologie du sepsis.

A noter que, dans la CE, la voie mTOR est étroitement liée à la voie de signalisation protectrice (PI3K)/Akt, qui est fortement activée par les facteurs de croissance, les cytokines et les TLRs (Pourrajab et *al.*, 2015; Weichhart et *al.*, 2015), afin d'assurer l'intégrité et les fonctions cellulaires

## **Chapitre 2. Le traitement à la vitamine C/L-Thréo acide ascorbique stimule la survie et le fonctionnement des cellules endothéliales infectées par *S. aureus*, ainsi que la bactéricidie intracellulaire, et immunomodule la sécrétion de l'IL-1 $\beta$ et l'ICAM-1 soluble**

(Contreras et *al.*, 2008), dont l'activité eNOS, la survie cellulaire, la prolifération et l'expression de la voie NF- $\kappa$ B. De plus, une étude originale a rapporté que le dysfonctionnement endothélial qui est dû principalement à une anomalie dans l'activité eNOS et une réponse proinflammatoire excessive via une surproduction d'IL-1 $\beta$  et IL-6 est le résultat de l'inhibition de la voie PI3K/Akt/mTOR (Duan et *al.*, 2014), qui est la cible dans le traitement des maladies cardiovasculaires (Kaur and Sharma, 2017; Tarantino and Capone, 2013), dans le présent travail, qui avait comme objectif d'étudier l'effet de la vitamine C/l'AsCH2 sur le fonctionnement des HUVECs au cours de l'infection à *S. aureus*, nous avons évalué les marqueurs physiopathologiques des CEs, y compris, la production du NO, et l'expression de l'activité de l'arginase. Nous avons également déterminé la sécrétion des médiateurs proinflammatoires tels que l'expression de molécules d'adhésion (sICAM-1, sE-sélectine), et l'expression de cytokines proinflammatoires (IL-1 $\beta$  et IL-6) et investigué la voie métabolique cellulaire dépendante de l' $\beta$ -GLU, l'immunométabolisme cellulaire du t<sub>cc</sub>CHOL et l'activation éventuelle de l'immunité mémoire et l'activation cellulaire Ca<sup>2+</sup> dépendante. Enfin, l'activité bactéricide cellulaire qui consiste à l'internalisation et la lyse bactérienne, et notamment la nécrose et le cycle cellulaire des CEs et leurs survie durant l'infection à *S. aureus* ont été évaluées, donc, il serait de grand intérêt d'investiguer la voie mTOR/PI3K-Akt dans notre modèle d'étude.

Notre travail ouvre la voie à de nouveaux questionnements tels que l'étude des effets mécanistiques du traitement par l'AsCH2 sur d'autres interleukines ou facteurs de croissance hématopoïétiques, dont, le facteur de croissance des cellules souches bêta (SCGF- $\beta$ ), une protéine nouvellement identifiée et un membre de la superfamille de lectine de type C, qui fonctionne comme un facteur de croissance pour les cellules progénitrices hématopoïétiques primitives (Sukowati et *al.*, 2018). SCGF est impliqué dans des conditions inflammatoires, comme l'inflammation associée à l'obésité et a un rôle immunomodulateur sur la commutation phénotypique cellulaire, en fonction de sa combinaison avec différents facteurs de croissance (Tarantino et *al.*, 2020). Il faudrait également rechercher si SCGF- $\beta$  peut avoir un effet *ex vivo* sur l'immunomodulation des médiateurs inflammatoires en agissant sur la polarisation des progéniteurs de cellules immunitaires circulantes, co-cultivées avec les HUVECs traitées par AsCH2 et infectées par *S. aureus*.

# CHAPITRE 3

### CHAPITRE 3

#### 3. Conclusions et perspectives

La pathogénèse de *S. aureus* est principalement due à sa capacité à survivre et à persister à l'intérieur des cellules infectées grâce à l'expression des facteurs de virulences appropriés, qui lui permet ainsi d'induire la mort cellulaire d'une variété de cellules hôtes, y compris les CEs. Le dysfonctionnement des CEs causé par l'infection à *S. aureus* peut entraîner la dissémination bactérienne dans les tissus et les organes, ce qui favorise le développement des infections chroniques persistantes. Les CEs non contrôlées se comportent donc comme un véhicule pour l'invasion des pathogènes. Le danger de l'infection à *S. aureus* est bien la progression de l'infection d'une bactériémie vers un sepsis et le choc septique dans les cas extrêmes. D'un point de vue thérapeutique, la supplémentation en vitamine C a été largement proposée comme traitement adjuvant dans les maladies inflammatoires associées au dysfonctionnement endothélial. En outre, la vitamine C, antioxydant puissant, exerce de multiples effets sur les cellules endothéliales et améliore leurs fonctions physiologiques. Cependant, l'effet de la vitamine C/Asch2 sur la réponse immunitaire et inflammatoire des cellules endothéliales reste inexploitable. Dans notre étude, nous avons pu démontrer pour que le traitement à la vitamine C (Asch2/L-Thréo acide ascorbique) pourrait favoriser la survie et améliorer les fonctions des CEs humaines, et prévenir l'exacerbation de la réponse inflammatoire, tout en induisant son activité bactéricide au cours de l'infection à *S. aureus*. Notre travail rapporte pour la première fois les effets de la vitamine C sur la réponse immunitaire/inflammatoire des CEs primaires durant l'infection à *S. aureus*, en démontrant en particulier que le traitement par la vitamine C/Asch2 :

- ✓ induit une régulation négative de la production du NO, contrairement, à l'activité arginase, sur laquelle la vitamine C induit une légère augmentation,
- ✓ pourrait exercer un effet préventif sur le dysfonctionnement des cellules endothéliales, grâce à son pouvoir inhibiteur de la nécrose des CEs, et sa capacité stimulatrice de la voie redox protectrice cellulaire au cours de l'infection,
- ✓ pourrait réduire la propagation de l'infection à *S. aureus* et atténuer l'exacerbation de l'inflammation, responsable du développement d'une bactériémie ou d'un sepsis en augmentant la capacité bactéricide des CEs,
- ✓ favorise la survie des CEs en induisant la réparation cellulaire endothéliale et en stimulant l'activation du cycle cellulaire,
- ✓ augmente massivement le bCa<sup>2+</sup>,
- ✓ pourrait contre-réguler la voie de signalisation cellulaire énergétique cellulaire dépendante du glucose induite lors de l'infection,

### Chapitre 3. Conclusions et perspectives

- ✓ a un effet modulateur sur le métabolisme du CHOL, un activateur potentiel de la mémoire immunitaire innée,
- ✓ pourrait contre-réguler la sécrétion de la sICAM-1 induite lors de l'infection à *S.aureus*,
- ✓ régule négativement la production l'IL- $\beta$  par les CEs,

Nos résultats nous permettent de conclure que la vitamine C/Asch2 exerce des effets divers sur les activités fonctionnelles immunitaires/inflammatoires de la CE au cours de l'infection, en jouant un rôle protecteur sur le dysfonctionnement endothélial sans pour autant contre réguler l'infection. La vitamine C agit ainsi comme une molécule immunomodulatrice par excellence de la réponse immunitaire/inflammatoire de la CE au cours de l'infection à *S. aureus*. En augmentant l'activité bactéricide de la CE, le vecteur principal de propagation de l'infection, la vitamine C/Asch2 pourrait participer au contrôle de la progression de l'infection localisée vers un sepsis ou un choc septique.

Cependant, pour mieux comprendre l'effet de la vitamine C sur les infections invasives à *S.aureus*, le sepsis et le choc toxique, il est indispensable d'étudier l'infection à l'échelle tissulaire ou d'un organe afin d'analyser les caractéristiques du sepsis (inflammation systémique et facteurs de l'exacerbation inflammatoire) et celles du choc toxique (la pression artérielle, et les facteurs impliquées dans la vasodilatation et la perméabilité vasculaire). Le modèle murin offrirait certainement cette opportunité, en permettant de mieux comprendre le rôle protecteur de la vitamine C contre les effets délétères de l'infection à *S. aureus* sur les tissus et la défaillance d'organe.

Notre travail mérite d'être suivi par d'autres études qui auront pour objectifs :

- (i) La détermination des affinités respectives pour la L-arginine de NOS au sein des CE et de l'arginase au niveau des CEs et de *S.aureus*,
- (ii) L'étude de la relation de cause à effet entre la vitamine C et le Ca<sup>2+</sup> sous forme liée et la survie des CE pendant l'infection à *S.aureus*,
- (iii) L'étude de l'effet de *S. aureus* sur l'immunité innée mémoire (trained immunity) et l'action de la vitamine C sur la modulation de la modification épigénétique dans les CE infectées par *S. aureus*,
- (iv) L'étude des voies métaboliques énergétiques des CEs dans le contexte de l'immunité contre l'infection à *S.aureus*. A cet égard, il serait opportun de conduire une étude mécanistique de cause à effet afin de déterminer si l'augmentation des niveaux d'iGLU est le résultat d'un feedback négatif pour contrecarrer l'infection à *S.aureus* tout en augmentant la source d'énergie pour les HUVECs et *S. aureus*, ou inversement. *S. aureus* pourrait donc à contrario synthétiser l'iGLU en utilisant la machinerie enzymatique et les substrats nécessaires de la cellule hôte en agissant comme un parasite.

### Chapitre 3. Conclusions et perspectives

- (v) L'étude de l'effet de la vitamine C sur l'expression du gène *agr* par *S. aureus*, lors du processus phagocytaire par les CEs.

Nos résultats soulèvent aussi d'autres interrogations. En effet, il serait intéressant, à travers d'autres études de comprendre les mécanismes moléculaires qui préparent aux effets de l'Asch2 et son efficacité sur la réponse immunitaire/inflammatoire des CEs à l'infection staphylococcique, dont la voie des PI3K/Akt/mTOR, la voie NF- $\kappa$ B et l'activation de la caspase-1 dépendante de l'inflammasome NLRP3.

Ainsi, cette étude ouvre un nouveau volet de perspective sur la caractérisation de l'interaction leucocytes-endothélium dans la physiopathologie des maladies inflammatoires et infectieuses visant la transmigration des cellules immunitaires, y compris les PMNs, sur l'endothélium vasculaire lors de l'inflammation, donc il est souhaitable d'étudier le phénomène de la diapédèse (l'infiltration leucocytaire au foyer inflammatoire), aussi, Il est intéressant d'étudier la nérose de neutrophiles et son implication dans la physiopathologie des maladies inflammatoires et infectieuses.



# **Bibliographie**

## Chapitre4. Bibliographie

### A

- Abbaspour, N., Hurrell, R., and Kelishadi, R. (2014). Review on iron and its importance for human health. *J. Res. Med. Sci. Off. J. Isfahan Univ. Med. Sci.* 19, 164–174.
- Aguilar-Ballester, M., Herrero-Cervera, A., Vinué, Á., Martínez-Hervás, S., and González-Navarro, H. (2020). Impact of Cholesterol Metabolism in Immune Cell Function and Atherosclerosis. *Nutrients* 12, 2021. <https://doi.org/10.3390/nu12072021>.
- Aird, W.C. (2007). Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium. *Circ. Res.* 100, 158–173. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a>.
- Aird, W.C. (2012). Endothelial Cell Heterogeneity. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006429–a006429. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006429>.
- Alexander, E.H., and Hudson, M.C. (2001). Factors influencing the internalization of *Staphylococcus aureus* and impacts on the course of infections in humans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 361–366.
- Alonzo, F., and Torres, V.J. (2014). The Bicomponent Pore-Forming Leucocidins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 78, 199–230. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00055-13>.
- Alitalo, K., and Carmeliet, P. (2002). Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell* 1, 219–227. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00051-X](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00051-X).
- Arciniegas, E., Ponce, L., Hartt, Y., Graterol, A., and Carlini, R.G. (2000). Intimal thickening involves transdifferentiation of embryonic endothelial cells. *Anat. Rec.* 258, 47–57. .
- Aribi, M. (2018). Macrophage Bactericidal Assays. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1784, 135–149. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7837-3\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7837-3_14).
- Aribi, M., Meziane, W., Habi, S., Boulatika, Y., Marchandin, H., and Aymeric, J.-L. (2015). Macrophage Bactericidal Activities against *Staphylococcus aureus* Are Enhanced In Vivo by Selenium Supplementation in a Dose-Dependent Manner. *PLOS ONE* 10, e0135515. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135515>.
- Armour, J., Tyml, K., Lidington, D., and Wilson, J.X. (2001). Ascorbate prevents microvascular dysfunction in the skeletal muscle of the septic rat. *J. Appl. Physiol.* 90, 795–803. <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.90.3.795>.
- Ashor, A.W., Lara, J., Mathers, J.C., and Siervo, M. (2014). Effect of vitamin C on endothelial function in health and disease: A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Atherosclerosis* 235, 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.04.004>.
- Askarian, F., Wagner, T., Johannessen, M., and Nizet, V. (2018). *Staphylococcus aureus* modulation of innate immune responses through Toll-like (TLR), (NOD)-like (NLR) and C-type lectin (CLR) receptors. *FEMS Microbiol. Rev.* 42, 656–671. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy025>.

## Chapitre4. Bibliographie

Athanasopoulos, A.N., Economopoulou, M., Orlova, V.V., Sobke, A., Schneider, D., Weber, H., Augustin, H.G., Eming, S.A., Schubert, U., Linn, T., et al. (2006). The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* inhibits wound healing by interfering with host defense and repair mechanisms. *Blood* 107, 2720–2727. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3140>.

### B

Bachetti, T. (2004). Arginase pathway in human endothelial cells in pathophysiological conditions. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 37, 515–523. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2004.05.004>.

Baudin, B., Bruneel, A., Bosselut, N., and Vaubourdoles, M. (2007). A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat. Protoc.* 2, 481–485. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.54>.

Bayles, K.W., Wesson, C.A., Liou, L.E., Fox, L.K., Bohach, G.A., and Trumble, W.R. (1998). Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect. Immun.* 66, 336–342. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.1.336-342.1998>.

Bekeredjian-Ding, I., Stein, C., and Uebele, J. (2017). The Innate Immune Response Against *Staphylococcus aureus*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 409, 385–418. [https://doi.org/10.1007/82\\_2015\\_5004](https://doi.org/10.1007/82_2015_5004).

Belhassena, I., Nouari, W., Messaoud, A., Nouar, M., Brahimi, M., Lamara, S.-A.C., and Aribi, M. (2020). Aspirin enhances regulatory functional activities of monocytes and downregulates CD16 and CD40 expression in myocardial infarction autoinflammatory disease. *Int. Immunopharmacol.* 83, 106349. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106349>.

Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Wheeler, M.E., Cotran, R.S., and Gimbrone, M.A. (1985). Interleukin-1 activation of vascular endothelium. Effects on procoagulant activity and leukocyte adhesion. *Am. J. Pathol.* 121, 394–403. .

Bhosale, G., Sharpe, J.A., Sundier, S.Y., and Duchon, M.R. (2015). Calcium signaling as a mediator of cell energy demand and a trigger to cell death. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1350, 107–116. <https://doi.org/10.1111/nyas.12885>.

Blättner, S., Das, S., Paprotka, K., Eilers, U., Krischke, M., Kretschmer, D., Remmele, C.W., Dittrich, M., Müller, T., Schuelein-Voelk, C., et al. (2016). *Staphylococcus aureus* Exploits a Non-ribosomal Cyclic Dipeptide to Modulate Survival within Epithelial Cells and Phagocytes. *PLoS Pathog.* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005857>.

Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* 2, 907–916. <https://doi.org/10.1038/ni1001-907>.

Bonar, E., Wójcik, I., and Wladyka, B. (2015). Proteomics in studies of *Staphylococcus aureus* virulence. *Acta Biochim. Pol.* 62, 367–381. [https://doi.org/10.18388/abp.2015\\_1083](https://doi.org/10.18388/abp.2015_1083).

Boshoff, C., and Weiss, R. (2002). Aids-related malignancies. *Nat. Rev. Cancer* 2, 373–382. <https://doi.org/10.1038/nrc797>.

## Chapitre4. Bibliographie

Branch, D.R. (1999). High-dose vitamin C supplementation increases plasma glucose. *Diabetes Care* 22, 1218–1219. <https://doi.org/10.2337/diacare.22.7.1218>.

Brandt, S.L., Putnam, N.E., Cassat, J.E., and Serezani, C.H. (2018). Innate immunity to *S. aureus*: evolving paradigms in soft tissue and invasive infections. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 200, 3871–3880. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701574>.

Bröker, B.M., Mrochen, D., and Péton, V. (2016). The T Cell Response to *Staphylococcus aureus*. *Pathog. Basel Switz.* 5, E31. <https://doi.org/10.3390/pathogens5010031>.

Brown, A.F., Leech, J.M., Rogers, T.R., and McLoughlin, R.M. (2014). *Staphylococcus aureus* Colonization: Modulation of Host Immune Response and Impact on Human Vaccine Design. *Front. Immunol.* 4, 507. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00507>.

### C

Carlos, T.M., and Harlan, J.M. (1994). Leukocyte-Endothelial Adhesion Molecules. *Blood* 84, 2068–2101. <https://doi.org/10.1182/blood.V84.7.2068.2068>.

Carr, A., and Vissers, M. (2013). Synthetic or Food-Derived Vitamin C? Are They Equally Bioavailable? *Nutrients* 5, 4284–4304. <https://doi.org/10.3390/nu5114284>.

Carr, A.C., and Maggini, S. (2017). Vitamin C and Immune Function. *Nutrients* 9, 1211. <https://doi.org/10.3390/nu9111211>.

Cepinskas, G., and Wilson, J.X. (2008). Inflammatory Response in Microvascular Endothelium in Sepsis: Role of Oxidants. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 42, 175–184. <https://doi.org/10.3164/jcbrn.2008026>.

Chambial, S., Dwivedi, S., Shukla, K.K., John, P.J., and Sharma, P. (2013). Vitamin C in Disease Prevention and Cure: An Overview. *Indian J. Clin. Biochem.* 28, 314–328. <https://doi.org/10.1007/s12291-013-0375-3>.

Chan, F.K.-M., Moriwaki, K., and De Rosa, M.J. (2013). Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 979, 65–70. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-290-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-290-2_7).

Chavakis, T., Wiechmann, K., Preissner, K.T., and Herrmann, M. (2005). *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium. *Thromb. Haemost.* 94, 278–285. <https://doi.org/10.1160/TH05-05-0306>.

Cheung, A.L. (2007). Isolation and Culture of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC). *Curr. Protoc. Microbiol.* 4, A.4B.1-A.4B.8. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca04bs4>.

Chicoine, L.G., Paffett, M.L., Young, T.L., and Nelin, L.D. (2004). Arginase inhibition increases nitric oxide production in bovine pulmonary arterial endothelial cells. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 287, L60–L68. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00194.2003>.

Choi, J., Enis, D.R., Koh, K.P., Shiao, S.L., and Pober, J.S. (2004). T lymphocyte-endothelial cell interactions. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 683–709.

## Chapitre4. Bibliographie

<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104639>.

Choi, J.H., Seo, H.S., Lim, S.Y., and Park, K. (2014). Cutaneous Immune Defenses Against *Staphylococcus aureus* Infections. *J. Lifestyle Med.* 4, 39–46.

<https://doi.org/10.15280/jlm.2014.4.1.39>.

Choi, K., Kennedy, M., Kazarov, A., Papadimitriou, J.C., and Keller, G. (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Dev. Camb. Engl.* 125, 725–732. .

Chutipongtanate, S., and Thongboonkerd, V. (2010). Establishment of a novel colorimetric assay for high-throughput analysis of calcium oxalate crystal growth modulation. *Analyst* 135, 1309–1314. <https://doi.org/10.1039/B927046A>.

Collins, L.V., Kristian, S.A., Weidenmaier, C., Faigle, M., Van Kessel, K.P.M., Van Strijp, J.A.G., Götz, F., Neumeister, B., and Peschel, A. (2002). *Staphylococcus aureus* strains lacking D-alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice. *J. Infect. Dis.* 186, 214–219. <https://doi.org/10.1086/341454>.

Contreras, A.G., Dormond, O., Edelbauer, M., Calzadilla, K., Hoerning, A., Pal, S., and Briscoe, D.M. (2008). mTOR—Understanding the Clinical Effects. *Transplant. Proc.* 40, S9–S12. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.10.011>.

Corpe, C.P., Tu, H., Eck, P., Wang, J., Faulhaber-Walter, R., Schnermann, J., Margolis, S., Padayatty, S., Sun, H., Wang, Y., et al. (2010). Vitamin C transporter Slc23a1 links renal reabsorption, vitamin C tissue accumulation, and perinatal survival in mice. *J. Clin. Invest.* 120, 1069–1083. <https://doi.org/10.1172/JCI39191>.

Covarrubias-Pinto, A., Acuña, A.I., Beltrán, F.A., Torres-Díaz, L., and Castro, M.A. (2015). Old Things New View: Ascorbic Acid Protects the Brain in Neurodegenerative Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 28194. <https://doi.org/10.3390/ijms161226095>.

Crampton, S.P., Davis, J., and Hughes, C.C.W. (2007). Isolation of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC). *J. Vis. Exp. JoVE* <https://doi.org/10.3791/183>.

Cristina de Assis, M., Cristina Plotkowski, M., Fierro, I.M., Barja-Fidalgo, C., and de Freitas, M.S. (2002). Expression of inducible nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells during primary culture. *Nitric Oxide Biol. Chem.* 7, 254–261.

### D

Dahmani, Z., Addou-Klouche, L., Gizard, F., Dahou, S., Messaoud, A., Chahinez Djebri, N., Benaissi, M.I., Mostefaoui, M., Terbeche, H., Nouari, W., et al. (2020). Metformin partially reverses the inhibitory effect of co-culture with ER-/PR-/HER2+ breast cancer cells on biomarkers of monocyte antitumor activity. *PLoS ONE* 15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240982>.

Dakhale, G.N., Chaudhari, H.V., and Shrivastava, M. (2011). Supplementation of Vitamin C Reduces Blood Glucose and Improves Glycosylated Hemoglobin in Type 2 Diabetes Mellitus:

## Chapitre4. Bibliographie

A Randomized, Double-Blind Study. *Adv. Pharmacol. Sci.* 2011, e195271. <https://doi.org/10.1155/2011/195271>.

Dalal, P.J., Muller, W.A., and Sullivan, D.P. (2020). Endothelial Cell Calcium Signaling during Barrier Function and Inflammation. *Am. J. Pathol.* 190, 535–542. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2019.11.004>.

Davey, M.P., Martin, T.M., Planck, S.R., Lee, J., Zamora, D., and Rosenbaum, J.T. (2006). Human endothelial cells express NOD2/CARD15 and increase IL-6 secretion in response to muramyl dipeptide. *Microvasc. Res.* 71, 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2005.11.010>.

Dharmashankar, K., and Widlansky, M.E. (2010). Vascular endothelial function and hypertension: insights and directions. *Curr. Hypertens. Rep.* 12, 448–455. <https://doi.org/10.1007/s11906-010-0150-2>.

Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., and Zeiher, A.M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399, 601–605. <https://doi.org/10.1038/21224>.

Dinarello, C.A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87, 2095–2147. .

Dinarello, C.A. (2009). Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 519–550. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612>.

Du, J., Cullen, J.J., and Buettner, G.R. (2012). Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1826, 443–457. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.06.003>.

Duan, J., Yu, Y., Yu, Y., Li, Y., Wang, J., Geng, W., Jiang, L., Li, Q., Zhou, X., and Sun, Z. (2014). Silica nanoparticles induce autophagy and endothelial dysfunction via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Int. J. Nanomedicine* 9, 5131–5141. <https://doi.org/10.2147/IJN.S71074>.

Durante, W., Johnson, F.K., and Johnson, R.A. (2007). Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34, 906–911. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04638.x>.

### E

Edwards, A.M., and Massey, R.C. (2011). Invasion of Human Cells by a Bacterial Pathogen. *J. Vis. Exp. JoVE* <https://doi.org/10.3791/2693>.

Eichstaedt, S., Gäbler, K., Below, S., Müller, C., Kohler, C., Engelmann, S., Hildebrandt, P., Völker, U., Hecker, M., and Hildebrandt, J.-P. (2009). Effects of Staphylococcus aureus-hemolysin A on calcium signalling in immortalized human airway epithelial cells. *Cell Calcium* 45, 165–176. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2008.09.001>.

### F

Fens, M.H.A.M., van Wijk, R., Andringa, G., van Rooijen, K.L., Dijkstra, H.M., Rasmussen, J.T., de Vooght, K.M.K., Schiffelers, R.M., Gaillard, C.A.J.M., and van Solinge, W.W. (2012).

## Chapitre4. Bibliographie

A role for activated endothelial cells in red blood cell clearance: implications for vasopathology. *Haematologica* 97, 500–508. <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.048694>.

Figueroa-Méndez, R., and Rivas-Arancibia, S. (2015). Vitamin C in Health and Disease: Its Role in the Metabolism of Cells and Redox State in the Brain. *Front. Physiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00397>.

Filippi, M.-D. (2016). Mechanism of Diapedesis: Importance of the Transcellular Route. *Adv. Immunol.* 129, 25–53. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2015.09.001>.

Filippini, A., D'Amore, A., and D'Alessio, A. (2019). Calcium Mobilization in Endothelial Cell Functions. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 4525. <https://doi.org/10.3390/ijms20184525>.

Foster, T.J. (2005). Immune evasion by staphylococci. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 948–958. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1289>.

Foster, T.J., Geoghegan, J.A., Ganesh, V.K., and Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 49–62. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3161>.

Fournier, B. (2013). The function of TLR2 during staphylococcal diseases. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00167>.

Fournier, B., and Philpott, D.J. (2005). Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 521–540. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.3.521-540.2005>.

Franke, R.-P., Fuhrmann, R., Mrowietz, C., Rickert, D., Hiebl, B., and Jung, F. (2010). Reduced diagnostic value of lactate dehydrogenase (LDH) in the presence of radiographic contrast media. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 45, 123–130. <https://doi.org/10.3233/CH-2010-1290>.

Frey, R.S., Ushio-Fukai, M., and Malik, A.B. (2009). NADPH Oxidase-Dependent Signaling in Endothelial Cells: Role in Physiology and Pathophysiology. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 791–810. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2220>.

### G

Gerhardt, T., and Ley, K. (2015). Monocyte trafficking across the vessel wall. *Cardiovasc. Res.* 107, 321–330. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv147>.

Ghesquière, B., Wong, B.W., Kuchnio, A., and Carmeliet, P. (2014). Metabolism of stromal and immune cells in health and disease. *Nature* 511, 167–176. <https://doi.org/10.1038/nature13312>.

Giese, B., Glowinski, F., Paprotka, K., Dittmann, S., Steiner, T., Sinha, B., and Fraunholz, M.J. (2011). Expression of  $\delta$ -toxin by *Staphylococcus aureus* mediates escape from phago-endosomes of human epithelial and endothelial cells in the presence of  $\beta$ -toxin. *Cell. Microbiol.* 13, 316–329. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01538.x>.

Gimbrone, M.A., and García-Cardena, G. (2016). Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ. Res.* 118, 620–636.



## Chapitre4. Bibliographie

<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306301>.

Gimbrone, M.A., Anderson, K.R., and Topper, J.N. (1999). Vascular Endothelium: An Integrator of Humoral and Biomechanical Stimuli in the Cardiovascular System. *J. Vasc. Interv. Radiol.* 10, 941–943. [https://doi.org/10.1016/S1051-0443\(99\)70143-0](https://doi.org/10.1016/S1051-0443(99)70143-0).

### H

Haas, P.-J., Haas, C.J.C. de, Kleibeuker, W., Poppelier, M.J.J.G., Kessel, K.P.M. van, Kruijtzter, J.A.W., Liskamp, R.M.J., and Strijp, J.A.G. van (2004). N-Terminal Residues of the Chemotaxis Inhibitory Protein of *Staphylococcus aureus* Are Essential for Blocking Formylated Peptide Receptor but Not C5a Receptor. *J. Immunol.* 173, 5704–5711. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.9.5704>.

Haendeler, J., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (1996). Vitamin C and E prevent lipopolysaccharide-induced apoptosis in human endothelial cells by modulation of Bcl-2 and Bax. *Eur. J. Pharmacol.* 317, 407–411. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(96\)00759-5](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(96)00759-5).

Haggar, A., Ehrnfelt, C., Holgersson, J., and Flock, J.-I. (2004). The Extracellular Adherence Protein from *Staphylococcus aureus* Inhibits Neutrophil Binding to Endothelial Cells. *Infect. Immun.* 72, 6164–6167. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.10.6164-6167.2004>.

Hamill, R.J., Vann, J.M., and Proctor, R.A. (1986). Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic endothelial cells: model for postadherence events in endovascular infections. *Infect. Immun.* 54, 833–836. .

Harrison, F.E., Bowman, G.L., and Polidori, M.C. (2014). Ascorbic Acid and the Brain: Rationale for the Use against Cognitive Decline. *Nutrients* 6, 1752–1781. <https://doi.org/10.3390/nu6041752>.

Härtel, C., Strunk, T., Bucsky, P., and Schultz, C. (2004). Effects of vitamin C on intracytoplasmic cytokine production in human whole blood monocytes and lymphocytes. *Cytokine* 27, 101–106. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2004.02.004>.

Haslinger-Löffler, B., Kahl, B.C., Grundmeier, M., Strangfeld, K., Wagner, B., Fischer, U., Cheung, A.L., Peters, G., Schulze-Osthoff, K., and Sinha, B. (2005). Multiple virulence factors are required for *Staphylococcus aureus*-induced apoptosis in endothelial cells. *Cell. Microbiol.* 7, 1087–1097. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00533.x>.

Heller, R., Unbehau, A., Schellenberg, B., Mayer, B., Werner-Felmayer, G., and Werner, E.R. (2001). L-Ascorbic Acid Potentiates Endothelial Nitric Oxide Synthesis via a Chemical Stabilization of Tetrahydrobiopterin \*. *J. Biol. Chem.* 276, 40–47. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004392200>.

Hemilä, H. (2017). Vitamin C and Infections. *Nutrients* 9. <https://doi.org/10.3390/nu9040339>.

Hernofaldi, Rini, E.A., and Machmud, R. (2013). The effect of vitamin c supplementation on intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) concentration on male adolescent obesity in Padang. *Int. J. Pediatr. Endocrinol.* 2013, P86. <https://doi.org/10.1186/1687-9856-2013-S1->

## Chapitre4. Bibliographie

P86.

Horn, J., Stelzner, K., Rudel, T., and Fraunholz, M. (2017). Inside job: *Staphylococcus aureus* host-pathogen interactions. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.11.009>.

Huang, P.L., Huang, Z., Mashimo, H., Bloch, K.D., Moskowitz, M.A., Bevan, J.A., and Fishman, M.C. (1995). Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* *377*, 239–242. <https://doi.org/10.1038/377239a0>.

Hurst, S.M., Wilkinson, T.S., McLoughlin, R.M., Jones, S., Horiuchi, S., Yamamoto, N., Rose-John, S., Fuller, G.M., Topley, N., and Jones, S.A. (2001). IL-6 and Its Soluble Receptor Orchestrate a Temporal Switch in the Pattern of Leukocyte Recruitment Seen during Acute Inflammation. *Immunity* *14*, 705–714. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00151-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00151-0).

### I

Ince, C., Mayeux, P.R., Nguyen, T., Gomez, H., Kellum, J.A., Ospina-Tascón, G.A., Hernandez, G., Murray, P., and De Backer, D. (2016). THE ENDOTHELIUM IN SEPSIS. *Shock* *Augusta Ga* *45*, 259–270. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000473>.

### J

Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G., and Minick, C.R. (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* *52*, 2745–2756. <https://doi.org/10.1172/JCI107470>.

Jersmann, H.P., Hii, C.S., Hodge, G.L., and Ferrante, A. (2001). Synthesis and surface expression of CD14 by human endothelial cells. *Infect. Immun.* *69*, 479–485. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.1.479-485.2001>.

Joanne M. Willey, Kathleen M. Sandman, and Dorothy H. Wood (2019). *Prescott's Microbiology*.

### K

Kallio, J., Jaakkola, M., Mäki, M., Kilpeläinen, P., and Virtanen, V. (2012). Vitamin C Inhibits *Staphylococcus aureus* Growth and Enhances the Inhibitory Effect of Quercetin on Growth of *Escherichia coli* In Vitro. *Planta Med.* *78*, 1824–1830. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1315388>.

Kaneko, N., Kurata, M., Yamamoto, T., Morikawa, S., and Masumoto, J. (2019). The role of interleukin-1 in general pathology. *Inflamm. Regen.* *39*, 12. <https://doi.org/10.1186/s41232-019-0101-5>.

Kang, K.-T. (2014). Endothelium-derived Relaxing Factors of Small Resistance Arteries in Hypertension. *Toxicol. Res.* *30*, 141–148. <https://doi.org/10.5487/TR.2014.30.3.141>.

Kaplanski, G., Marin, V., Montero-Julian, F., Mantovani, A., and Farnarier, C. (2003). IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol.* *24*, 25–29. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(02\)00013-3](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(02)00013-3).

Kaur, A., and Sharma, S. (2017). Mammalian target of rapamycin (mTOR) as a potential

## Chapitre4. Bibliographie

therapeutic target in various diseases. *Inflammopharmacology* 25, 293–312. <https://doi.org/10.1007/s10787-017-0336-1>.

Kawata, T., Tada, K., Kobayashi, M., Sakamoto, T., Takiuchi, Y., Iwai, F., Sakurada, M., Hishizawa, M., Shirakawa, K., Shindo, K., et al. (2018). Dual inhibition of the mTORC1 and mTORC2 signaling pathways is a promising therapeutic target for adult T-cell leukemia. *Cancer Sci.* 109, 103–111. <https://doi.org/10.1111/cas.13431>.

Kaźmierczak-Barańska, J., Boguszevska, K., Adamus-Grabicka, A., and Karwowski, B.T. (2020). Two Faces of Vitamin C—Antioxidative and Pro-Oxidative Agent. *Nutrients* 12, 1501. <https://doi.org/10.3390/nu12051501>.

Kebir, D.E., József, L., Pan, W., Wang, L., and Filep, J.G. (2009). Bacterial DNA Activates Endothelial Cells and Promotes Neutrophil Adherence through TLR9 Signaling. *J. Immunol.* 182, 4386–4394. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803044>.

Kim, B., Li, J., Jang, C., and Arany, Z. (2017). Glutamine fuels proliferation but not migration of endothelial cells. *EMBO J.* 36, 2321–2333. <https://doi.org/10.15252/emboj.201796436>.

Kim, J.H., Bugaj, L.J., Oh, Y.J., Bivalacqua, T.J., Ryoo, S., Soucy, K.G., Santhanam, L., Webb, A., Camara, A., Sikka, G., et al. (2009). Arginase inhibition restores NOS coupling and reverses endothelial dysfunction and vascular stiffness in old rats. *J. Appl. Physiol.* 107, 1249–1257. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.91393.2008>.

Knox, J., Uhlemann, A.-C., and Lowy, F.D. (2015). Staphylococcus aureus infections: transmission within households and the community. *Trends Microbiol.* 23, 437–444. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.03.007>.

Kobayashi, S.D., Malachowa, N., and DeLeo, F.R. (2015). Pathogenesis of Staphylococcus aureus Abscesses. *Am. J. Pathol.* 185, 1518–1527. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.11.030>.

Kofler, S., Nickel, T., and Weis, M. (2005). Role of cytokines in cardiovascular diseases: a focus on endothelial responses to inflammation. *Clin. Sci.* 108, 205–213. <https://doi.org/10.1042/CS20040174>.

Koh, Y., and Park, J. (2018). Cell adhesion molecules and exercise. *J. Inflamm. Res.* 11, 297–306. <https://doi.org/10.2147/JIR.S170262>.

Kozarov, E. (2012). Bacterial invasion of vascular cell types: vascular infectology and atherogenesis. *Future Cardiol.* 8, 123–138. <https://doi.org/10.2217/fca.11.75>.

Krüger-Genge, A., Hiebl, B., Franke, R.P., Lendlein, A., and Jung, F. (2017). Effects of Tacrolimus or Sirolimus on the adhesion of vascular wall cells: Controlled in-vitro comparison study. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 67, 309–318. <https://doi.org/10.3233/CH-179211>.

Kubica, M., Guzik, K., Koziel, J., Zarebski, M., Richter, W., Gajkowska, B., Golda, A., Maciag-Gudowska, A., Brix, K., Shaw, L., et al. (2008). A potential new pathway for Staphylococcus aureus dissemination: the silent survival of S. aureus phagocytosed by human monocyte-

## Chapitre4. Bibliographie

derived macrophages. *PloS One* 3, e1409. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001409>.

Kumar, N., David, M.Z., Boyle-Vavra, S., Sieth, J., and Daum, R.S. (2015). High *Staphylococcus aureus* colonization prevalence among patients with skin and soft tissue infections and controls in an urban emergency department. *J. Clin. Microbiol.* 53, 810–815. <https://doi.org/10.1128/JCM.03221-14>.

Kwiecinski, J., Jin, T., and Josefsson, E. (2014). Surface proteins of *Staphylococcus aureus* play an important role in experimental skin infection. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 122, 1240–1250. <https://doi.org/10.1111/apm.12295>.

### L

Lahiri, A., Das, P., and Chakravorty, D. (2010). New tricks new ways: Exploitation of a multifunctional enzyme arginase by pathogens. *Virulence* 1, 563–565. <https://doi.org/10.4161/viru.1.6.13623>.

Laupland, K.B., Lyytikäinen, O., Søgaaard, M., Kennedy, K.J., Knudsen, J.D., Ostergaard, C., Galbraith, J.C., Valiquette, L., Jacobsson, G., Collignon, P., et al. (2013). The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: a multinational population-based surveillance study. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19, 465–471. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03903.x>.

Lee, I.-T., Lin, C.-C., Yang, C.-C., Hsiao, L.-D., Wu, M.-Y., and Yang, C.-M. (2018). Resveratrol Attenuates *Staphylococcus Aureus*-Induced Monocyte Adhesion through Downregulating PDGFR/AP-1 Activation in Human Lung Epithelial Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 3058. <https://doi.org/10.3390/ijms19103058>.

Leeuwenberg, J.F., Smeets, E.F., Neefjes, J.J., Shaffer, M.A., Cinek, T., Jeunhomme, T.M., Ahern, T.J., and Buurman, W.A. (1992). E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro. *Immunology* 77, 543–549. .

Li, Y.R. (2016). Vitamin C, a Multi-Tasking Molecule, Finds a Molecular Target in Killing Cancer Cells. *React. Oxyg. Species* 1, 141-156-141–156. .

Licitra, G. (2013). Etymologia: *Staphylococcus*. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1553. <https://doi.org/10.3201/eid1909.ET1909>.

Lorenzon, P., Vecile, E., Nardon, E., Ferrero, E., Harlan, J.M., Tedesco, F., and Dobrina, A. (1998). Endothelial Cell E- and P-Selectin and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Function as Signaling Receptors. *J. Cell Biol.* 142, 1381–1391. .

Los, F.C.O., Randis, T.M., Aroian, R.V., and Ratner, A.J. (2013). Role of pore-forming toxins in bacterial infectious diseases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 77, 173–207. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00052-12>.

Lowy, F.D. (1998). *Staphylococcus aureus* Infections. *N. Engl. J. Med.* 339, 520–532. <https://doi.org/10.1056/NEJM199808203390806>.

Lowy, F.D., Fant, J., Higgins, L.L., Ogawa, S.K., and Hatcher, V.B. (1988). *Staphylococcus*

## Chapitre4. Bibliographie

aureus--human endothelial cell interactions. *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* 98, 137–146.

Loyaga-Rendon, R.Y., Sakamoto, S., Beppu, M., Aso, T., Ishizaka, M., Takahashi, R., and Azuma, H. (2005). Accumulated endogenous nitric oxide synthase inhibitors, enhanced arginase activity, attenuated dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity and intimal hyperplasia in premenopausal human uterine arteries. *Atherosclerosis* 178, 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.09.006>.

Luo, N., Liu, J., Chung, B.H., Yang, Q., Klein, R.L., Garvey, W.T., and Fu, Y. (2010). Macrophage Adiponectin Expression Improves Insulin Sensitivity and Protects Against Inflammation and Atherosclerosis. *Diabetes* 59, 791–799. <https://doi.org/10.2337/db09-1338>.

### M

Mai, J., Virtue, A., Shen, J., Wang, H., and Yang, X.-F. (2013). An evolving new paradigm: endothelial cells – conditional innate immune cells. *J. Hematol. Oncol.* *J Hematol Oncol* 6, 61. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-61>.

Mandl, J., Szarka, A., and B?nhegyi, G. (2009). Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *Br. J. Pharmacol.* 157, 1097–1110. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00282.x>.

Marcelo, K.L., Goldie, L.C., and Hirschi, K.K. (2013). Regulation of Endothelial Cell Differentiation and Specification. *Circ. Res.* 112, 1272–1287. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.300506>.

Marin, V., Kaplanski, G., Grès, S., Farnarier, C., and Bongrand, P. (2001). Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells. *J. Immunol. Methods* 254, 183–190. .

May, J.M., and Harrison, F.E. (2013). Role of Vitamin C in the Function of the Vascular Endothelium. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 2068–2083. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5205>.

May, J.M., and Qu, Z. (2009). Ascorbic acid efflux and re-uptake in endothelial cells: maintenance of intracellular ascorbate. *Mol. Cell. Biochem.* 325, 79–88. <https://doi.org/10.1007/s11010-008-0022-0>.

McAdow, M., Missiakas, D.M., and Schneewind, O. (2012). *Staphylococcus aureus* secretes coagulase and von Willebrand factor binding protein to modify the coagulation cascade and establish host infections. *J. Innate Immun.* 4, 141–148. <https://doi.org/10.1159/000333447>.

McBurney, R.N., and Neering, I.R. (1985). The measurement of changes in intracellular free calcium during action potentials in mammalian neurones. *J. Neurosci. Methods* 13, 65–76. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90044-5](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90044-5).

McGuinness, W.A., Kobayashi, S.D., and DeLeo, F.R. (2016). Evasion of Neutrophil Killing by *Staphylococcus aureus*. *Pathogens* 5, 32. <https://doi.org/10.3390/pathogens5010032>.

McKenna, S.M., and Davies, K.J. (1988). The inhibition of bacterial growth by hypochlorous acid. Possible role in the bactericidal activity of phagocytes. *Biochem. J.* 254, 685–692. .

## Chapitre4. Bibliographie

- Menzies, B.E., and Kourteva, I. (1998). Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis. *Infect. Immun.* 66, 5994–5998.
- Meredith, M.E., Harrison, F.E., and May, J.M. (2011). Differential regulation of the ascorbic acid transporter SVCT2 during development and in response to ascorbic acid depletion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 414, 737–742. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.146>.
- Michiels, C. (2003). Endothelial cell functions. *J. Cell. Physiol.* 196, 430–443. <https://doi.org/10.1002/jcp.10333>.
- Mikirova, N., Riordan, N., and Casciari, J. (2016). Modulation of Cytokines in Cancer Patients by Intravenous Ascorbate Therapy. *Med. Sci. Monit.* 22, 14–25. <https://doi.org/10.12659/MSM.895368>.
- Mikirova, N.A., Casciari, J.J., and Riordan, N.H. (2010). Ascorbate inhibition of angiogenesis in aortic rings ex vivo and subcutaneous Matrigel plugs in vivo. *J. Angiogenesis Res.* 2, 2. <https://doi.org/10.1186/2040-2384-2-2>.
- Miller, L.S., and Cho, J.S. (2011). Immunity against *Staphylococcus aureus* cutaneous infections. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 505–518. <https://doi.org/10.1038/nri3010>.
- Ming, X.-F., Barandier, C., Viswambharan, H., Kwak, B.R., Mach, F., Mazzolai, L., Hayoz, D., Ruffieux, J., Rusconi, S., Montani, J.-P., et al. (2004). Thrombin Stimulates Human Endothelial Arginase Enzymatic Activity via RhoA/ROCK Pathway. *Circulation* 110, 3708–3714. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000142867.26182.32>.
- Mittal, M., Siddiqui, M.R., Tran, K., Reddy, S.P., and Malik, A.B. (2014). Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 1126–1167. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5149>.
- Molloy, R.G., Mannick, J.A., and Rodrick, M.L. (1993). Cytokines, sepsis and immunomodulation. *BJS Br. J. Surg.* 80, 289–297. <https://doi.org/10.1002/bjs.1800800308>.
- Moncada, S., and Higgs, E.A. (2006). Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb. Exp. Pharmacol.* 213–254. [https://doi.org/10.1007/3-540-32967-6\\_7](https://doi.org/10.1007/3-540-32967-6_7).
- Muller, W.A. (2003). Leukocyte–endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol.* 24, 326–333. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(03\)00117-0](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(03)00117-0).
- Mumtaz, S., Burdyga, G., Borisova, L., Wray, S., and Burdyga, T. (2011). The mechanism of agonist induced Ca<sup>2+</sup> signalling in intact endothelial cells studied confocally in in situ arteries. *Cell Calcium* 49, 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.11.010>.
- Muñoz-Chápuli, R., and Pérez-Pomares, J.M. (2010). Chapter 8.1 - Origin of the Vertebrate Endothelial Cell Lineage: Ontogeny and Phylogeny. In *Heart Development and Regeneration*, N. Rosenthal, and R.P. Harvey, eds. (Boston: Academic Press), pp. 465–486.
- Muzykantov, V.R. (2001). Targeting of superoxide dismutase and catalase to vascular endothelium. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 71, 1–21.



## Chapitre4. Bibliographie

[https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(01\)00215-2](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(01)00215-2).

### N

Nagata, E., and Oho, T. (2017). Invasive *Streptococcus mutans* induces inflammatory cytokine production in human aortic endothelial cells via regulation of intracellular toll-like receptor 2 and nucleotide-binding oligomerization domain 2. *Mol. Oral Microbiol.* 32, 131–141. <https://doi.org/10.1111/omi.12159>.

Naidu, K.A. (2003). Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr. J.* 2. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-2-7>.

Nauseef, W.M. (2019). The Phagocyte NOX2 NADPH Oxidase in microbial killing and cell signaling. *Curr. Opin. Immunol.* 60, 130–140. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.05.006>.

Nerviani, A., and Mauro, D. (2018). Endothelial Dysfunction in Systemic Lupus Erythematosus: Pathogenesis, Assessment and Therapeutic Opportunities. *Rev. Recent Clin. Trials* <https://doi.org/10.2174/1574887113666180314091831>.

Netea, M.G., Domínguez-Andrés, J., Barreiro, L.B., Chavakis, T., Divangahi, M., Fuchs, E., Joosten, L.A.B., van der Meer, J.W.M., Mhlanga, M.M., Mulder, W.J.M., et al. (2020). Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 375–388. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0285-6>.

Nibbering, P.H., Broug-Holub, E., Bezemer, A.C., Jansen, R., van de Winkel, J.G., and Geertsma, M.F. (1996). Phagocytosis and intracellular killing of serum-opsonized *Staphylococcus aureus* by mouse fibroblasts expressing human Fcγ receptor type IIa (CD32). *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 1, a25-33. .

Nouari, W., Ysmail-Dahlouk, L., and Aribi, M. (2016). Vitamin D3 enhances bactericidal activity of macrophage against *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. Immunopharmacol.* 30, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.11.033>.

Nualart, F. (2014). Vitamin C Transporters, Recycling and the Bystander Effect in the Nervous System: SVCT2 versus Gluts. *J. Stem Cell Res. Ther.* 04. <https://doi.org/10.4172/2157-7633.1000209>.

Nymo, S., Gustavsen, A., Nilsson, P.H., Lau, C., Espevik, T., and Mollnes, T.E. (2016). Human Endothelial Cell Activation by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Is Mediated by TNF and IL-1β Secondly to Activation of C5 and CD14 in Whole Blood. *J. Immunol.* 196, 2293–2299. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502220>.

### O

Ogston, A. (1881). Report upon Micro-Organisms in Surgical Diseases. *Br. Med. J.* 1, 369.b2-375. .

Oh, H.-M., Lee, H.-J., Seo, G.-S., Choi, E.-Y., Kweon, S.-H., Chun, C.-H., Han, W.-C., Lee, K.-M., Lee, M.-S., Choi, S.-C., et al. (2005). Induction and localization of NOD2 protein in human endothelial cells. *Cell. Immunol.* 237, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2005.09.006>.



## Chapitre4. Bibliographie

Oh, W.J., and Jacinto, E. (2011). mTOR complex 2 signaling and functions. *Cell Cycle* 10, 2305–2316. <https://doi.org/10.4161/cc.10.14.16586>.

Okumura, C.Y.M., and Nizet, V. (2014). Subterfuge and sabotage: evasion of host innate defenses by invasive gram-positive bacterial pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* 68, 439–458. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155711>.

Opitz, B., Förster, S., Hocke, A.C., Maass, M., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Suttorp, N., and Krüll, M. (2005). Nod1-mediated endothelial cell activation by *Chlamydomphila pneumoniae*. *Circ. Res.* 96, 319–326. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000155721.83594.2c>.

Opitz, B., Püschel, A., Beermann, W., Hocke, A.C., Förster, S., Schmeck, B., van Laak, V., Chakraborty, T., Suttorp, N., and Hippenstiel, S. (2006). *Listeria monocytogenes* activated p38 MAPK and induced IL-8 secretion in a nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent manner in endothelial cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 484–490. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.1.484>.

Ospina-Tascón, G.A., Hernandez, G., Murray, P., and De Backer, D. (2016c). THE ENDOTHELIUM IN SEPSIS. *Shock Augusta Ga* 45, 259–270. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000473>.

Otto, M. (2014). *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr. Opin. Microbiol.* 17, 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.11.004>.

Oudemans-van Straaten, H.M., Man, A.M.S., and de Waard, M.C. (2014). Vitamin C revisited. *Crit. Care* 18. <https://doi.org/10.1186/s13054-014-0460-x>.

Oviedo-Boyso, J., Barriga-Rivera, J.G., Valdez-Alarcón, J.J., Bravo-Patiño, A., Cárabez-Trejo, A., Cajero-Juárez, M., and Baizabal-Aguirre, V.M. (2008). Internalization of *Staphylococcus aureus* by bovine endothelial cells is associated with the activity state of NF-kappaB and modulated by the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1beta. *Scand. J. Immunol.* 67, 169–176. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2007.02056.x>.

Oviedo-Boyso, J., Cortés-Vieyra, R., Huante-Mendoza, A., Yu, H.B., Valdez-Alarcón, J.J., Bravo-Patiño, A., Cajero-Juárez, M., Finlay, B.B., and Baizabal-Aguirre, V.M. (2011). The phosphoinositide-3-kinase-Akt signaling pathway is important for *Staphylococcus aureus* internalization by endothelial cells. *Infect. Immun.* 79, 4569–4577. <https://doi.org/10.1128/IAI.05303-11>.

### P

Painter, K.L., Krishna, A., Wigneshweraraj, S., and Edwards, A.M. (2014). What role does the quorum-sensing accessory gene regulator system play during *Staphylococcus aureus* bacteremia? *Trends Microbiol.* 22, 676–685. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.09.002>.

Perez-Cruz, I., Carcamo, J.M., and Golde, D.W. (2003). Vitamin C inhibits FAS-induced apoptosis in monocytes and U937 cells. *Blood* 102, 336–343. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-11-3559>.

## Chapitre4. Bibliographie

Pietrocola, G., Nobile, G., Rindi, S., and Speziale, P. (2017). Staphylococcus aureus Manipulates Innate Immunity through Own and Host-Expressed Proteases. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 166. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00166>.

Pigott, R., Dillon, L.P., Hemingway, I.H., and Gearing, A.J.H. (1992). Soluble forms of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 are present in the supernatants of cytokine activated cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 584–589. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(92\)91234-H](https://doi.org/10.1016/0006-291X(92)91234-H).

Pober, J.S., and Cotran, R.S. (1990). The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 50, 537–544. <https://doi.org/10.1097/00007890-199010000-00001>.

Pober, J.S., and Sessa, W.C. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 803–815. <https://doi.org/10.1038/nri2171>.

Pöhlmann-Dietze, P., Ulrich, M., Kiser, K.B., Döring, G., Lee, J.C., Fournier, J.M., Botzenhart, K., and Wolz, C. (2000). Adherence of Staphylococcus aureus to endothelial cells: influence of capsular polysaccharide, global regulator agr, and bacterial growth phase. *Infect. Immun.* 68, 4865–4871. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.9.4865-4871.2000>.

Pries, A.R., Secomb, T.W., and Gaehtgens, P. (2000). The endothelial surface layer. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* 440, 653–666. <https://doi.org/10.1007/s004240000307>.

Proft, T., and Fraser, J.D. (2003). Bacterial superantigens. *Clin. Exp. Immunol.* 133, 299–306. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2003.02203.x>.

PubChem Ascorbic acid.

Putchala, M.C., Ramani, P., Sherlin, H.J., Premkumar, P., and Natesan, A. (2013). Ascorbic acid and its pro-oxidant activity as a therapy for tumours of oral cavity -- a systematic review. *Arch. Oral Biol.* 58, 563–574. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.01.016>.

## R

Rabelo, L.A., Ferreira, F.O., Nunes-Souza, V., da Fonseca, L.J.S., and Goulart, M.O.F. (2015). Arginase as a Critical Prooxidant Mediator in the Binomial Endothelial Dysfunction-Atherosclerosis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/924860>.

Rakocevic, J., Orlic, D., Mitrovic-Ajtic, O., Tomasevic, M., Dobric, M., Zlatic, N., Milasinovic, D., Stankovic, G., Ostojic, M., and Labudovic-Borovic, M. (2017). Endothelial cell markers from clinician's perspective. *Exp. Mol. Pathol.* 102, 303–313. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2017.02.005>.

Rayment, S.J., Shaw, J., Woollard, K.J., Lunec, J., and Griffiths, H.R. (2003). Vitamin C supplementation in normal subjects reduces constitutive ICAM-1 expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308, 339–345. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)01383-4](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01383-4).

Ren, K., and Torres, R. (2009). Role of interleukin-1 $\beta$  during pain and inflammation. *Brain Res. Rev.* 60, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.12.020>.

Rita, M., and Young, I. (2012). Endothelial cells in the eyes of an immunologist. *Cancer*

## Chapitre4. Bibliographie

Immunol. Immunother. CII 61, 1609–1616. <https://doi.org/10.1007/s00262-012-1335-0>.

Rollin, G., Tan, X., Tros, F., Dupuis, M., Nassif, X., Charbit, A., and Coureuil, M. (2017). Intracellular Survival of *Staphylococcus aureus* in Endothelial Cells: A Matter of Growth or Persistence. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01354>.

Rosenbach, F.J. (1884). *Mikro-organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen* (Wiesbaden: J.F. Bergmann).

Schor, A.M., Schor, S.L., and Allen, T.D. (1983). Effects of culture conditions on the proliferation, morphology and migration of bovine aortic endothelial cells. *J. Cell Sci.* 62, 267–285.

### S

Sagripanti, J.L., Eklund, C.A., Trost, P.A., Jinneman, K.C., Abeyta, C., Kaysner, C.A., and Hill, W.E. (1997). Comparative sensitivity of 13 species of pathogenic bacteria to seven chemical germicides. *Am. J. Infect. Control* 25, 335–339. [https://doi.org/10.1016/s0196-6553\(97\)90026-2](https://doi.org/10.1016/s0196-6553(97)90026-2).

Schreiber, K.H., Apelo, S.I.A., Yu, D., Brinkman, J.A., Velarde, M.C., Syed, F.A., Liao, C.-Y., Baar, E.L., Carbajal, K.A., Sherman, D.S., et al. (2019). A novel rapamycin analog is highly selective for mTORC1 in vivo. *Nat. Commun.* 10, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11174-0>.

Seeberg, J.C., Loibl, M., Moser, F., Schwegler, M., Büttner-Herold, M., Daniel, C., Engel, F.B., Hartmann, A., Schlötzer-Schrehardt, U., Goppelt-Struebe, M., et al. (2019). Non-professional phagocytosis: a general feature of normal tissue cells. *Sci. Rep.* 9, 11875. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48370-3>.

Seidl, K., Solis, N.V., Bayer, A.S., Hady, W.A., Ellison, S., Klashman, M.C., Xiong, Y.Q., and Filler, S.G. (2012). Divergent Responses of Different Endothelial Cell Types to Infection with *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039633>.

Sena, C.M., Pereira, A.M., and Seça, R. (2013). Endothelial dysfunction — A major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1832, 2216–2231. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.08.006>.

Shao, Y., Cheng, Z., Li, X., Chernaya, V., Wang, H., and Yang, X. (2014). Immunosuppressive/anti-inflammatory cytokines directly and indirectly inhibit endothelial dysfunction—a novel mechanism for maintaining vascular function. *J. Hematol. Oncol.* 7, 80. <https://doi.org/10.1186/s13045-014-0080-6>.

Sharma, J.N., Al-Omran, A., and Parvathy, S.S. (2007). Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology* 15, 252–259. <https://doi.org/10.1007/s10787-007-0013-x>.

Shehata, H.M., Murphy, A.J., Lee, M. kit S., Gardiner, C.M., Crowe, S.M., Sanjabi, S., Finlay, D.K., and Palmer, C.S. (2017). Sugar or Fat?—Metabolic Requirements for Immunity to Viral

## Chapitre4. Bibliographie

Infections. *Front. Immunol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01311>.

Shekhonin, B.V., Domogatsky, S.P., Idelson, G.L., Koteliansky, V.E., and Rukosuev, V.S. (1987). Relative distribution of fibronectin and type I, III, IV, V collagens in normal and atherosclerotic intima of human arteries. *Atherosclerosis* 67, 9–16. .

Sims, J.E., and Smith, D.E. (2010). The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 89–102. <https://doi.org/10.1038/nri2691>.

Slaats, J., Oever, J. ten, Veerdonk, F.L. van de, and Netea, M.G. (2016). IL-1 $\beta$ /IL-6/CRP and IL-18/ferritin: Distinct Inflammatory Programs in Infections. *PLOS Pathog.* 12, e1005973. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005973>.

Song, Y., Zhang, L.-J., Li, H., Gu, Y., Li, F.-F., Jiang, L.-N., Liu, F., Ye, J., and Li, Q. (2013). Polyunsaturated fatty acid relatively decreases cholesterol content in THP-1 macrophage-derived foam cell: partly correlates with expression profile of CIDE and PAT members. *Lipids Health Dis.* 12, 111. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-12-111>.

Sorice, A., Guerriero, E., Capone, F., Colonna, G., Castello, G., and Costantini, S. (2014). Ascorbic acid: its role in immune system and chronic inflammation diseases. *Mini Rev. Med. Chem.* 14, 444–452. .

Speziale, P., and Pietrocola, G. (2021). *Staphylococcus aureus* induces neutrophil extracellular traps (NETs) and neutralizes their bactericidal potential. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 19, 3451–3457. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.06.012>.

Stelzner, K., Winkler, A.-C., Chunguang, L., Ade, C.P., Dandekar, T., Fraunholz, M.J., and Rudel, T. (2020). Intracellular *Staphylococcus aureus* perturbs the host cell Ca<sup>2+</sup>-homeostasis to promote cell death. *BioRxiv* 2020.08.20.260471. <https://doi.org/10.1101/2020.08.20.260471>.

Stone, O.A., Zhou, B., Red-Horse, K., and Stainier, D.Y.R. (2021). Endothelial ontogeny and the establishment of vascular heterogeneity. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 43, e2100036. <https://doi.org/10.1002/bies.202100036>.

Strindhall, J., Lindgren, P.-E., Löfgren, S., and Kihlström, E. (2005). Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* Vary in Ability to Stimulate Cytokine Expression in Human Endothelial Cells. *Scand. J. Immunol.* 61, 57–62. <https://doi.org/10.1111/j.0300-9475.2005.01526.x>.

Strobel, M., Pförtner, H., Tuchscher, L., Völker, U., Schmidt, F., Kramko, N., Schnittler, H.-J., Fraunholz, M.J., Löffler, B., Peters, G., et al. (2016). Post-invasion events after infection with *Staphylococcus aureus* are strongly dependent on both the host cell type and the infecting *S. aureus* strain. *Clin. Microbiol. Infect.* 22, 799–809. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.06.020>.

Strober, W. (2001). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. In *Current Protocols in Immunology*, (John Wiley & Sons, Inc.), p.

Sukowati, C.H.C., Patti, R., Pascut, D., Ladju, R.B., Tarchi, P., Zanotta, N., Comar, M., Tiribelli, C., and Crocè, L.S. (2018). Serum Stem Cell Growth Factor Beta for the Prediction of Therapy

## Chapitre4. Bibliographie

Response in Hepatocellular Carcinoma. *BioMed Res. Int.* 2018, e6435482. <https://doi.org/10.1155/2018/6435482>.

Sumpio, B.E., Riley, J.T., and Dardik, A. (2002). Cells in focus: endothelial cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 1508–1512. .

Swerlick, R.A., Lee, K.H., Wick, T.M., and Lawley, T.J. (1992). Human dermal microvascular endothelial but not human umbilical vein endothelial cells express CD36 in vivo and in vitro. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 148, 78–83. .

Swulius, M.T., and Waxham, M.N. (2008). Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent Protein Kinases. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2637. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8086-2>.

### T

Tajima, A., Iwase, T., Shinji, H., Seki, K., and Mizunoe, Y. (2009). Inhibition of Endothelial Interleukin-8 Production and Neutrophil Transmigration by Staphylococcus aureus Beta-Hemolysin. *Infect. Immun.* 77, 327–334. <https://doi.org/10.1128/IAI.00748-08>.

Tall, A.R., and Yvan-Charvet, L. (2015). Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 104–116. <https://doi.org/10.1038/nri3793>.

Tanaka, T., Narazaki, M., and Kishimoto, T. (2014). IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a016295. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>.

Tarantino, G., and Capone, D. (2013). Inhibition of the mTOR pathway: a possible protective role in coronary artery disease. *Ann. Med.* 45, 348–356. <https://doi.org/10.3109/07853890.2013.770333>.

Tarantino, G., Citro, V., Balsano, C., and Capone, D. (2020). Could SCGF-Beta Levels Be Associated with Inflammation Markers and Insulin Resistance in Male Patients Suffering from Obesity-Related NAFLD? *Diagnostics* 10. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10060395>.

Thammavongsa, V., Kim, H.K., Missiakas, D., and Schneewind, O. (2015). Staphylococcal manipulation of host immune responses. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 529–543. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3521>.

Theofilis, P., Sagris, M., Oikonomou, E., Antonopoulos, A.S., Siasos, G., Tsioufis, C., and Tousoulis, D. (2021). Inflammatory Mechanisms Contributing to Endothelial Dysfunction. *Biomedicines* 9, 781. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9070781>.

Thomer, L., Schneewind, O., and Missiakas, D. (2016). Pathogenesis of Staphylococcus aureus Bloodstream Infections. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 11, 343–364. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044351>.

Tissari, J., Sirén, J., Meri, S., Julkunen, I., and Matikainen, S. (2005). IFN-alpha enhances TLR3-mediated antiviral cytokine expression in human endothelial and epithelial cells by up-regulating TLR3 expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 4289–4294. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.7.4289>.

## Chapitre4. Bibliographie

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://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>.

### U

Ukeda, H., Kawana, D., Maeda, S., and Sawamura, M. (1999). Spectrophotometric Assay for Superoxide Dismutase Based on the Reduction of Highly Water-soluble Tetrazolium Salts by Xanthine-Xanthine Oxidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 485–488. <https://doi.org/10.1271/bbb.63.485>.

Ulrich-Merzenich, G., Zeitler, H., Panek, D., Bokemeyer, D., and Vetter, H. (2007). Vitamin C promotes human endothelial cell growth via the ERK-signaling pathway. *Eur. J. Nutr.* 46, 87–94. <https://doi.org/10.1007/s00394-006-0636-5>.

Uhlemann, A.-C., Otto, M., Lowy, F.D., and DeLeo, F.R. (2014). Evolution of community- and healthcare-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 21, 563–574. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.04.030>.

### V

Vadeboncoeur, N., Segura, M., Al-Numani, D., Vanier, G., and Gottschalk, M. (2003). Pro-inflammatory cytokine and chemokine release by human brain microvascular endothelial cells stimulated by Streptococcus suis serotype 2. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 35, 49–58. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2003.tb00648.x>.

Versari, D., Daghini, E., Viridis, A., Ghiadoni, L., and Taddei, S. (2009). Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension. *Br. J. Pharmacol.* 157, 527–536. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00240.x>.

Victor, V.V., Guayerbas, N., Puerto, M., Medina, S., and De la Fuente, M. (2000). Ascorbic acid modulates in vitro the function of macrophages from mice with endotoxic shock. *Immunopharmacology* 46, 89–101. .

Videm, V., and Albrigtsen, M. (2008). Soluble ICAM-1 and VCAM-1 as Markers of Endothelial Activation. *Scand. J. Immunol.* 67, 523–531. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2008.02029.x>.

Vilchèze, C., Hartman, T., Weinrick, B., and Jacobs, W.R. (2013). Mycobacterium tuberculosis is extraordinarily sensitive to killing by a vitamin C-induced Fenton reaction. *Nat. Commun.* 4, 1881. <https://doi.org/10.1038/ncomms2898>.

Vitko, N.P., Grosser, M.R., Khatri, D., Lance, T.R., and Richardson, A.R. (2016). Expanded Glucose Import Capability Affords Staphylococcus aureus Optimized Glycolytic Flux during Infection. *MBio* 7, e00296-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00296-16>.

### W

Walton, P.A., and Pizzitelli, M. (2012). Effects of Peroxisomal Catalase Inhibition on



## Chapitre4. Bibliographie

- Mitochondrial Function. *Front. Physiol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00108>.
- Wang, J., Zhou, X., Zhang, Z., Xu, L., Yin, X., Yang, L., and Zhao, D. (2012). Effect of interaction of vitamin C on macrophage immune response to infection with *Mycobacterium bovis*. *Cell. Mol. Biol. Noisy--Gd. Fr.* 58 *Suppl*, OL1688-1694. .
- Wei, L., Zhu, S., Wang, J., and Liu, J. (2012). Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathway during Porcine Circovirus Type 2 Infection Facilitates Cell Survival and Viral Replication. *J. Virol.* 86, 13589–13597. <https://doi.org/10.1128/JVI.01697-12>.
- Wertheim, H.F.L., Melles, D.C., Vos, M.C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H.A., and Nouwen, J.L. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect. Dis.* 5, 751–762. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70295-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70295-4).
- Wilson, J.X. (2005). Regulation of vitamin C transport. *Annu. Rev. Nutr.* 25, 105–125. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.25.050304.092647>.
- Wilson, J.X. (2009). Mechanism of action of vitamin C in sepsis: Ascorbate modulates redox signaling in endothelium. *BioFactors Oxf. Engl.* 35, 5–13. <https://doi.org/10.1002/biof.7>.
- Wilson, J.X. (2009). Mechanism of action of vitamin C in sepsis: Ascorbate modulates redox signaling in endothelium. *BioFactors* 35, 5–13. <https://doi.org/10.1002/biof.7>.
- Wong, B.W., Marsch, E., Treps, L., Baes, M., and Carmeliet, P. (2017). Endothelial cell metabolism in health and disease: impact of hypoxia. *EMBO J.* 36, 2187–2203. <https://doi.org/10.15252/embj.201696150>.
- Woodfin, A., Beyrau, M., Voisin, M.-B., Ma, B., Whiteford, J.R., Hordijk, P.L., Hogg, N., and Nourshargh, S. (2016). ICAM-1–expressing neutrophils exhibit enhanced effector functions in murine models of endotoxemia. *Blood* 127, 898–907. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-08-664995>.
- Wu, F., Tyml, K., and Wilson, J.X. (2002). Ascorbate inhibits iNOS expression in endotoxin- and IFN $\gamma$ -stimulated rat skeletal muscle endothelial cells. *FEBS Lett.* 520, 122–126. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02804-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02804-1).
- Y**
- Yamaoka, J., Kabashima, K., Kawanishi, M., Toda, K.-I., and Miyachi, Y. (2002). Cytotoxicity of IFN-gamma and TNF-alpha for vascular endothelial cell is mediated by nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 780–786. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6487>.
- Yang, M., Teng, S., Ma, C., Yu, Y., Wang, P., and Yi, C. (2018). Ascorbic acid inhibits senescence in mesenchymal stem cells through ROS and AKT/mTOR signaling. *Cytotechnology* 70, 1301–1313. <https://doi.org/10.1007/s10616-018-0220-x>.
- Yang, Y.-M., Huang, A., Kaley, G., and Sun, D. (2009). eNOS uncoupling and endothelial dysfunction in aged vessels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297, H1829-1836. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00230.2009>.



## Chapitre4. Bibliographie

Yao, L., Bengualid, V., Lowy, F.D., Gibbons, J.J., Hatcher, V.B., and Berman, J.W. (1995). Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces cytokine gene expression. *Infect. Immun.* 63, 1835–1839. <https://doi.org/10.1128/iai.63.5.1835-1839.1995>.

Ysmail-Dahlouk, L., Nouari, W., and Aribi, M. (2016). 1,25-dihydroxyvitamin D3 down-modulates the production of proinflammatory cytokines and nitric oxide and enhances the phosphorylation of monocyte-expressed STAT6 at the recent-onset type 1 diabetes. *Immunol. Lett.* 179, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.10.002>.

Zhang, C. (2008). The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. *Basic Res. Cardiol.* 103, 398–406. <https://doi.org/10.1007/s00395-008-0733-0>.

### Z

Zhang, C. (2008). The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. *Basic Res. Cardiol.* 103, 398–406. <https://doi.org/10.1007/s00395-008-0733-0>.

Zhang, H.M., Wakisaka, N., Maeda, O., and Yamamoto, T. (1997). Vitamin C inhibits the growth of a bacterial risk factor for gastric carcinoma: *Helicobacter pylori*. *Cancer* 80, 1897–1903. .

Zheng, L., Nibbering, P.H., and van Furth, R. (1992). Cytosolic free calcium is essential for immunoglobulin G-stimulated intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by human monocytes. *Infect. Immun.* 60, 3092–3097. <https://doi.org/10.1128/iai.60.8.3092-3097.1992>.

Zhong, X., Zeng, M., Bian, H., Zhong, C., and Xiao, F. (2017). An evaluation of the protective role of vitamin C in reactive oxygen species-induced hepatotoxicity due to hexavalent chromium in vitro and in vivo. *J. Occup. Med. Toxicol.* 12, 15. <https://doi.org/10.1186/s12995-017-0161-x>.

Zhou, L., Sun, C.-B., Liu, C., Fan, Y., Zhu, H.-Y., Wu, X.-W., Hu, L., and Li, Q.-P. (2015). Upregulation of arginase activity contributes to intracellular ROS production induced by high glucose in H9c2 cells. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 2728–2736.

# **Annexe**



## L-Threoascorbic acid treatment promotes *S. aureus*-infected primary human endothelial cells survival and function, as well as intracellular bacterial killing, and immunomodulates the release of IL-1 $\beta$ and soluble ICAM-1

Sara Dahou<sup>a</sup>, Mohammed Chems-Eddine Smahi<sup>a,b,1</sup>, Wafa Nouari<sup>a</sup>, Zoheir Dahmani<sup>a</sup>, Souheila Benmansour<sup>a,b</sup>, Lamia Ysmail-Dahlouk<sup>a</sup>, Maroua Miliani<sup>a</sup>, Fadela Yebdri<sup>a</sup>, Nassima Fakir<sup>a</sup>, Mohammed Yassine Laoufi<sup>a,b</sup>, Mouad Chaib-Draa<sup>a</sup>, Amina Tourabi<sup>a</sup>, Mourad Aribi<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, W0414100, University of Tlemcen, 13000 Tlemcen, Algeria

<sup>b</sup> Neonatal Department of Specialized Maternal and Child Hospital of Tlemcen, 13000, Tlemcen, Algeria

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

AsCH2  
Bactericidal activity  
Primary human umbilical vein endothelial cells  
HUVEC survival and function  
Immunomodulatory effect  
*S. aureus* infection

### ABSTRACT

**Background:** Vitamin C (ascorbic acid, AsCH2) has been shown to enhance immunity. Here, we studied its immunomodulatory effect on human endothelial cells (ECs) during *S. aureus* infection.

**Materials and methods:** The *ex vivo* effects of AsCH2 were performed on primary human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) infected or not with *S. aureus*.

**Results:** AsCH2 treatment induced a marked downregulation of nitric oxide (NO) production and a moderate upregulation of arginase activity in *S. aureus*-infected HUVECs (respectively,  $p < 0.05$  and  $p > 0.05$ ). Although the upregulated release levels of soluble intercellular adhesion molecular 1 (sICAM-1/sCD54) and sE-selectin (sCD62E) molecules were not significantly different between treated and untreated *S. aureus*-infected HUVECs, AsCH2 treatment induced reversing effect on sICAM-1 release when comparing to uninfected control HUVECs. Moreover, AsCH2 treatment appears to have a significant effect on preventing HUVEC necrosis induced by *S. aureus* infection ( $p < 0.05$ ). Furthermore, AsCH2 treatment induced a significant upregulation of cell protective redox biomarker in *S. aureus*-infected, as shown by superoxide dismutase (SOD) activity ( $p < 0.05$ ), but not by catalase activity ( $p > 0.05$ ). Additionally, *S. aureus* infection markedly downregulated total bound calcium ions ( ${}^b\text{Ca}^{2+}$ ) levels as compared to control HUVECs, whereas, AsCH2 treatment induced a slight upregulation of  ${}^b\text{Ca}^{2+}$  levels in infected HUVECs as compared to infected and untreated HUVECs ( $p > 0.05$ ). On the other hand, AsCH2 treatment downregulated increased total cellular cholesterol content ( ${}_{\text{tcc}}\text{CHOL}$ ) levels in HUVECs induced by *S. aureus* infection ( $p < 0.05$ ). In addition, AsCH2 treatment markedly reversed *S. aureus* effect on upregulation of intracellular glucose ( ${}^i\text{GLU}$ ) levels within infected HUVECs ( $p < 0.05$ ). Moreover, AsCH2 treatment significantly downregulated *S. aureus* growth ( $p < 0.05$ ), and significantly upregulated bacterial internalization and intracellular killing by HUVECs ( $p < 0.05$ ), as well as their cell cycle activation ( $p < 0.01$ ). Finally, AsCH2 treatment has a slight effect on the production of interleukin 6 (IL-6), but induced a marked downregulation of that of IL-1 $\beta$  in *S. aureus*-infected HUVECs (respectively,  $p > 0.05$ , and  $p < 0.05$ ).

**Conclusions:** Our outcomes demonstrated that, during *S. aureus* infection, AsCH2 treatment promotes human ECs survival and function, as well as prevents inflammatory response exacerbation, while inducing bactericidal activity.

\* Corresponding author at: Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, W0414100, Imama-Mansourah, Rocade # 2, PB 262, Department of Biology, University of Tlemcen, 13000 Tlemcen, Algeria.

E-mail addresses: [mourad.aribi@univ-tlemcen.dz](mailto:mourad.aribi@univ-tlemcen.dz), [m\\_aribi@outlook.fr](mailto:m_aribi@outlook.fr), [m\\_aribi@yahoo.fr](mailto:m_aribi@yahoo.fr) (M. Aribi).

<sup>1</sup> Senior author.

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107476>

Received 9 November 2020; Received in revised form 2 February 2021; Accepted 3 February 2021

Available online 4 March 2021

1567-5769/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is an ubiquitous opportunistic invasive pathogen, which causes a range types of hospital and community infections [1–4]. *S. aureus* can survive, proliferate and induce cell death within a variety of both professional and nonprofessional phagocytes, including ECs [5–8].

ECs are highly plastic and heterogeneous cells of innate immunity that modulate the immune and inflammatory responses, besides their physiological functions [9–11]. In fact, ECs may interact with pathogens, leading to the secretion of proinflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$  and IL-6 [12], and the expression of adhesion molecules, like E-selectin (CD62E) and ICAM-1 (CD54). Nevertheless, several studies have reported that uncontrolled ECs are involved in the progression of inflammatory diseases and sepsis [12,13], as well as in the pathogenesis of many types of human infections, in particular *S. aureus* bloodstream infections [14,15]. So, ECs may serve as a vehicle for the pathogen invasion and dissemination into organ tissues, leading to persistent chronic infections, known to be associated with EC dysfunction. Such a process is a result of dominant and persistent expression of proinflammatory cytokines by uncontrolled activation of EC or their impaired expression of regulatory/anti-inflammatory cytokines [16], and endothelial NO synthase (eNOS) uncoupling, which results in dysfunction of antibacterial host defense mediated by EC's NO production [17].

Many recent therapeutic strategies have been target ECs dysfunction in order to prevent the progression of sepsis in its early stages [10,16,18,19]. Hence, clinical trials on AsCH2 administration have been widely recommended to undertaken as an adjunct therapy in sepsis [18,20].

AsCH2 is an essential water-soluble micronutrient that is endogenously synthesized by most mammals in the liver, whereas humans and other primates lack the enzyme gulonolactone oxidase necessary for ascorbate biosynthesis and rely on their dietary diet as exogenous source for vitamin C [21,22]. Both forms of vitamin C, AsCH2 (reduced form) and dehydroascorbic acid (DHAA, oxidized form) [23], are transported to ECs by their own transporter. So ascorbate monoanion/AsCH<sup>-</sup> enters EC mainly through sodium-dependent vitamin C transporter 2 (SVCT2), while DHAA is taken up through facilitative glucose transporters (GLUT), and then rapidly reduced to ascorbate in the cell [24].

AsCH2 has been reported to be primarily involved in immune protection against chronic inflammation, whereby it plays an immunostimulant, anti-inflammatory and antibacterial roles [20]. Additionally, vitamin C deficiency has been shown to impair immunity and exacerbate inflammation, as well as to increase the risk of several diseases development and higher susceptibility to infections [25,26].

On the basis of the aforementioned findings, we have evaluated the *ex vivo* effect of AsCH2 on the immune functional activities of primary HUVECs co-cultured with *S. aureus*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study design

This study shows the *ex vivo* effects of AsCH2 on primary human ECs, using HUVEC model, infected or not with *S. aureus*. Assays were performed on isolated cells, cell culture supernatants and whole cell lysates.

The effect of AsCH2 treatment on the levels of NO production, lactate dehydrogenase (LDH) leakage (LDH-based cytotoxicity/cell necrosis), IL-1 $\beta$  and IL-6, as well as the expression of sICAM-1 and sE-selectin were carried out on cell culture supernatants, while that on arginase activity, cell protective redox activity (catalase and SOD activities), total bound/complexed calcium ions ( ${}_{b}Ca^{2+}$ ),  ${}_{tc}CHOL$  and  ${}_{i}Glu$  were determined on cell lysates. Bromodeoxyuridine [5-bromo-2'-deoxyuridine] (BrdU) cell cycle activation assay was performed on adherent HUVECs infected or not with *S. aureus*. Bacterial growth, internalization and killing assays were performed on AsCH2 treated- or untreated-HUVECs, cultured with

*S. aureus*. Each experiment was repeated at least three times. The rationale and study design are summarized in Fig. 1.

### 2.2. Ethics statement and samples collection

Informed and written consents for umbilical cords collection were obtained from healthy women receiving care at Obstetrics Unit of Tlemcen Specialized Mother & Child Hospital Establishment (*Etablissement Hospitalier Spécialisé [EHS] Mere-Enfant*). To reduce biases, exclusion criteria were mainly smoking, ischemia, vascular occlusion disease, peripheral artery disease, cardiovascular diseases, hypertension, obesity, pregestational or gestational diabetes, pre-eclampsia, metabolic diseases, infection, inflammation, autoimmune diseases, complicated pregnancies, and traumatized cords. Inclusion criteria were mainly informed and written consent, similar age-range (25–35 aged years) and cord of full-term labor. Cords were collected aseptically soon after birth and preserved in sterile transport buffer at 4 °C until processing.

### 2.3. ECs preparation, infection and treatment

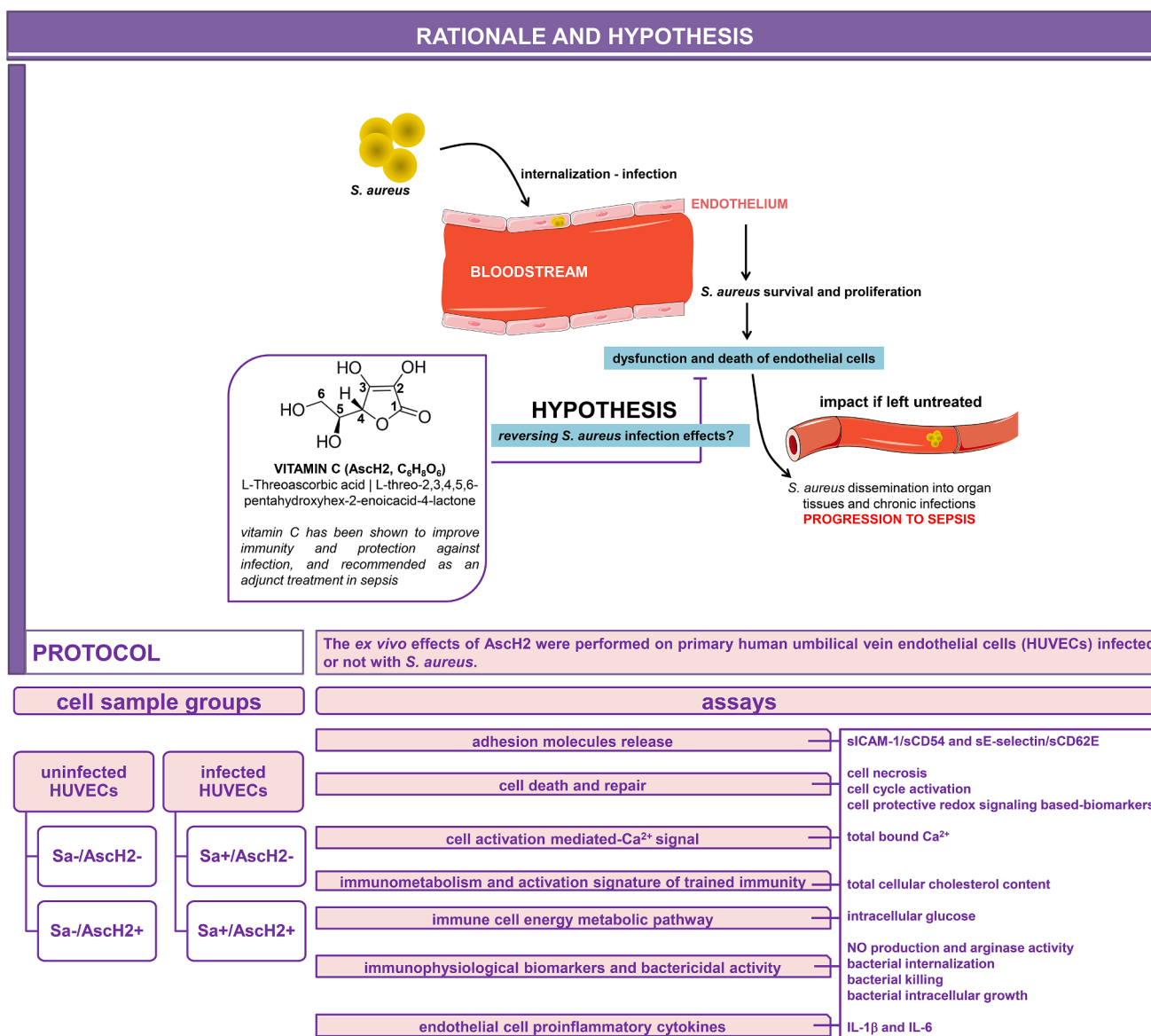
Briefly, ECs were isolated from umbilical cord vein by collagenase digestion, cultivated until reaching confluence, and passaged with trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) to the fourth passage, and then HUVECs were infected or not with *S. aureus*, and treated with 1 mM AsCH2 for 24 h.

#### 2.3.1. HUVEC isolation and cultivation

HUVECs were isolated from freshly obtained human umbilical cords by collagenase digestion of the interior of the umbilical vein as previously described [27] with some modifications. Briefly, excess blood was eliminated and sections of umbilical cord were cut at both ends with a sterile scalpel. A 21G needle was cannulated and clamped at one end of the cord vein, which was then perfused with Hank's balanced salt solution (HBSS) (Sigma Chemical Co., St, Louis, USA) using a 20 cc syringe for washout red blood cells. After further washing, collagenase solution (0.1% w/v in HBSS, Gibco) was then injected into the vein with moderate pressure using 10 cc syringe. The filled cord was resealed in either ends with sterile clamps, and then gently squeezed to facilitate ECs detachment. The clamped cord containing the collagenase solution was incubated in Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS, Sigma Chemical Co., St, Louis, USA) at 37 °C water bath for 15 min. After incubation, the collagenase solution containing ECs was flushed from the vein by perfusing 20 mL of HBSS. Effluent was then collected in a sterile 50 mL tube containing 10 mL of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with 2 mM L-glutamine (Sigma Chemical Co., St, Louis, USA) [28] supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS, Sigma Chemical Co., St, Louis, USA), 100 UI/mL Penicillin (Sigma) and 100  $\mu$ g/mL Streptomycin (Sigma) [29,30]. After centrifugation at 250g for 10 min [31], the supernatant was discarded and the pellet was washed twice and then resuspended in 5 mL of fresh culture medium. ECs were then incubated in a T25 cell culture flask (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), coated with gelatin 1% (Sigma), at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> [30]. Culture medium was replaced after 24 h to remove non-adherent cells, and then every two days until achieving approximately 80–90% of confluence as verified by inverted microscopy [29,30] (Supplementary Material 1). After reaching confluence, HUVECs were subcultivated at a split ratio 1:3 using 0.05% trypsin–0.02% EDTA detachment method [30]. HUVECs were used on the fourth passage for the experiments as described [32]. The viability of HUVECs was assessed using Trypan Blue Exclusion Test (TBET) throughout all experiments [33].

#### 2.3.2. Bacterial strain and growth conditions

*S. aureus* (American Type Culture Collection [ATCC] 25923) was used as a reference strain in the current study. Bacterial cells were inoculated from stocks into 10 mL brain heart infusion broth (BHIB)



**Fig. 1. Rationale and study design flowchart.** Given that *S. aureus* infection induces dysfunction of endothelial cells, resulting in dissemination into organ tissues and persistent chronic infections, as well as progression to sepsis if left untreated, and that vitamin C treatment has been shown to promote immunity and protection against infection, and recommended as an adjunct treatment in sepsis, the current study was focused on the determination of its *ex vivo* effects on the immune functional activities of primary HUVECs infected with *S. aureus*. AsCH<sub>2</sub>: ascorbic acid/L-threo-2,3,4,5,6-pentahydroxyhex-2-enoic acid-4-lactone, sE-selectin: soluble E-selectin, HUVECs: human umbilical vein endothelial cells, sICAM-1: soluble intercellular adhesion molecular 1,  $\gamma$ GLU: intracellular glucose, IL: interleukin,  $_{\text{TC}}\text{CHOL}$ : total cellular cholesterol content, Sa-/AsCH<sub>2</sub>-: *S. aureus*-uninfected and AsCH<sub>2</sub>-untreated HUVECs, Sa-/AsCH<sub>2</sub>+: *S. aureus*-uninfected and AsCH<sub>2</sub>-treated HUVECs, Sa+/AsCH<sub>2</sub>-: *S. aureus*-infected and AsCH<sub>2</sub>-untreated HUVECs, Sa+/AsCH<sub>2</sub>+: *S. aureus*-infected and AsCH<sub>2</sub>-treated HUVECs. Main illustrations were freely provided from Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>).

(Sigma), and grown overnight to exponential growth phase (logarithmic phase) at 37 °C [34]. Thereafter, they were collected by centrifugation (3000g, 10 min) at room temperature [35], washed twice with PBS, and then resuspended in DMEM supplemented with L-glutamine (2 mM) and 20% FBS to the optical density (OD<sub>600</sub>) of 1.0, which corresponds to  $\sim 10^9$  colony forming units (CFUs) mL<sup>-1</sup> [36], as confirmed by bacterial count.

### 2.3.3. HUVEC infection and AsCH<sub>2</sub> treatment

$10^6$  confluent HUVECs/well grown on gelatin-coated flat bottom 24-well plate (Sigma) in DMEM supplemented with L-glutamine, 20% FBS and Penicillin/Streptomycin (100 UI/mL, 100  $\mu$ g/mL, respectively) were gently washed three times with PBS and then co-cultured or not with *S. aureus* with a multiplicity of infection (MOI) of 50 by adding a

suspension of *S. aureus* in DMEM with L-glutamine, 20% FBS, without antibiotic, to the final amount of  $5 \times 10^7$  CFU/well, and then incubated for 2 h at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. After incubation, infected and uninfected cells were gently washed three times with PBS, and then treated with a final concentration of 1 mM L-ascorbic acid [37,38] (Sigma Chemical Co., St, Louis, USA) in DMEM with L-glutamine, 20% FBS and Penicillin/Streptomycin (100 UI/mL, 100  $\mu$ g/mL, respectively) for 24 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere.

### 2.4. HUVEC culture supernatants harvesting and cell lysis assay

After incubation, cell free supernatants were aspirated delicately from each well, and cells washed three times with PBS and lysed by

treatment for 30 min with 500  $\mu$ L of 0.1% Triton X-100 (TX100). Reaction was stopped by the addition of an equal volume of a mixture containing Tris-HCl and  $MnCl_2$ . Cell lysates were then aspirated for required analyses [39,40].

## 2.5. Protein assay

Protein concentration was measured on cell culture lysates at 540 nm using a commercial kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Middletown, USA).

## 2.6. NO production assay

NO production levels were carried out on supernatants using the sensitive colorimetric Griess method as described in detail [41]. Briefly, after deproteinization with trichloroacetic acid (TCA), supernatants were incubated with Vanadium (III) chloride and Griess reagent (v/v; 1/2) for 30 min at 37 °C, and then absorbance were read at 540 nm using a microplate ELISA reader (Biochrom Anthos 2020, Cambridge, UK). The concentrations of NO were determined from linear standard curve established by 0–150  $\mu$ mol/L sodium nitrite.

## 2.7. Arginase activity assay

The activity of arginase (EC 3.5.3.1) was determined spectrophotometrically on cell lysates based on the measurement of urea formation after incubation with L-arginine as described [39,42]. The arginase activity was expressed as nmol urea per mg proteins per 1 h.

## 2.8. sICAM-1 and sE-selectin assays

The levels of sICAM-1 and sE-selectin were quantified on cell culture supernatants with respective human ELISA kits (Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA), and the absorbance measured at 450 nm with an ELISA plate reader (Biochrom Anthos 2020, Cambridge, UK). The limits of detection (LOD) were 150 pg/mL for sICAM-1 and 30 pg/mL for sE-selectin.

## 2.9. Cell necrosis assay

Cell necrosis assay was determined on cell culture supernatants by LDH-based cytotoxicity method [43], using LDH Colorimetric Assay Kit (Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA), according to the manufacturer's instructions. Relative amounts of LDH release were measured at 490 nm using a microplate ELISA reader. Cell necrosis was expressed as the percentage of LDH-based cytotoxicity as described [44].

## 2.10. Cell protective redox assays

Both catalase and SOD activities were measured as cell protective redox signaling based-biomarkers [45].

### 2.10.1. Catalase activity assay

Catalase (EC 1.11.1.6) activity was determined on cell culture lysates by a spectrophotometric method, based on the measurement of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) decomposition as described with some modifications [46]. 10  $\mu$ L volumes of cell lysates were incubated with an equal volume of reaction mixture containing  $H_2O_2$  for 5 min at room temperature, then the reaction was stopped using saturated Titanium (IV) oxysulfate ( $TiOSO_4$ ) in 1 M  $H_2SO_4$ , which reacts with the remaining  $H_2O_2$  to produce a yellow peroxotitanium complex (PTC). Absorbance was measured at 410 nm against a blank. Catalase activity was reported as U/min/mL.

### 2.10.2. SOD activity assay

SOD (EC 1.15.1.1) activity was assessed on cell culture lysates using

a colorimetric SOD Assay Kit-WST (19160, Sigma Aldrich). Assays were based on the reduction of Highly Water-soluble Tetrazolium Salt (WST-1) by Xanthine-Xanthine Oxidase (XO) [47]. Absorbance was read at 450 nm using a microplate ELISA reader. The SOD activity (percentage of WST-1 inhibition [ $IC_{50}$ ]) was related to that of XO and expressed as 50% XO activity.

## 2.11. ${}_bCa^{2+}$ assay

The levels of  ${}_bCa^{2+}$  were spectrophotometrically determined on cell culture lysates, after removing supernatants, using the highly sensitive and specific Arsenazo III (AS III- $Ca^{2+}$ )-based assay [48,49]. The levels of  ${}_bCa^{2+}$  were expressed as  $\mu$ Eq/mg proteins.

## 2.12. ${}_{tcc}CHOL$ assay

${}_{tcc}CHOL$  levels were determined spectrophotometrically on cell culture lysates based on enzymatic method [50,51], using commercial reagents (SPINREACT, S.A./S.A.U. Ctra. Santa Coloma, Spain), and expressed as  $\mu$ g per mg proteins.

## 2.13. ${}_iGLU$ assay

The levels of  ${}_iGLU$  were determined on HUVEC lysates based on the oxidation of glucose to gluconate by the glucose oxidase enzyme (GOD), and the  $H_2O_2$  produced was detected at 505 nm with chromogenic oxygen acceptor, phenol, 4-aminophenazone (4-AP) in the presence of peroxidase (POD) [52].  ${}_iGLU$  levels were expressed as nmol per mg proteins.

## 2.14. Bacterial internalization and killing assays

A suspension of *S. aureus* in DMEM supplemented with 2 mM L-glutamine, 20% FBS and 1 mM Asch2 was added to  $10^6$  HUVEC per well cultured in gelatin-coated 24-well culture plate to the final amount of  $5 \times 10^7$  CFU per well (the ratio of bacteria:HUVEC was 50:1), corresponding to a MOI of 50, and cultivated alone as a control [39]. The mixtures and bacteria alone were incubated for 2 h in a 5%  $CO_2$  humidified atmosphere at 37 °C [44], then supernatants were recuperated and serial dilutions were plated on mannitol salt agar. Following incubation for 24 h, extracellular bacteria were determined by counting bacterial CFUs. Assays were performed at 0 ( $t_0$ ) and 1 h ( $t_1$ ), and the percentage of bacterial internalization were expressed as the percentage decrease of viable extracellular bacteria as reported in detail [41,42,53]. The HUVEC's monolayers were then washed gently three times with PBS, and then cultured in media supplemented with 50  $\mu$ g/mL gentamicin to kill any remaining bacteria for 1 h. Thereafter, the half of wells were lysed using 1% TX100 in PBS at  $t_0$ , while, the others were reincubated for 1 h ( $t_1$ ) in antibiotic free media, then lysed using 1% TX100 in PBS. Cell lysates were recuperated and serial dilutions were plated on mannitol salt agar overnight at 37 °C. The number of viable intracellular bacteria (CFUs) at  $t_0$  and  $t_1$  was determined as described [41]. The percentage of bacterial killing capacity was expressed as the percentage decrease of intracellular bacteria. Controls including wells containing uninfected HUVECs or bacteria alone were required throughout all experiments.

## 2.15. Bacterial intracellular growth assay

The effect of Asch2 treatment added to the media on bacterial growth was assessed as described [42].

## 2.16. Cell cycle activation assay

Cell cycle activation was determined based on BrdU incorporation assay (ab126556-BrdU Cell Proliferation kit, Abcam, Germany),



according to the manufacturer's instructions. In brief, HUVECs were seeded in 96-well flat bottom plate at a density of  $2 \times 10^4$  cells/well, and allowed to attach for 24 h at 37 °C in a humidified atmosphere and 5% CO<sub>2</sub>. Cells were infected or not for 2 h with *S. aureus*, and then washed twice with PBS. Infected and uninfected cells were treated or not with AscH2 for 24 h. Thereafter, cells were incubated overnight with 1x BrdU label, then, incorporated BrdU was detected using anti-BrdU monoclonal Detector Antibody for 1 h at room temperature before incubation with peroxidase goat anti-mouse IgG conjugate as secondary antibody. Color was developed using tetramethylbenzidine (TMB) as a peroxidase substrate. Optical densities (ODs) were measured at 450 nm using a Biochrom Anthos 2020 ELISA plate reader (Cambridge, UK), and absorbance of cells without BrdU (control) was subtracted from each reading.

### 2.17. Cytokines assay

Levels of IL-1 $\beta$  and IL-6 were determined on cell culture supernatants by a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), with respective commercial kits using human ELISA sets (BD OptEIA, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. ODs were measured at 450 nm using a Biochrom Anthos 2020 ELISA plate reader (Cambridge, UK). The LOD were 4 pg/mL for the two cytokines.

### 2.18. Statistical analyses

Statistical analyses were carried out using SPSS software version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). All data were presented as the mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). The assumption of normality was checked prior to statistical procedures. Since the distribution of the outcomes was not assumed to be approximately normally distributed, the comparisons were performed with the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney *U* nonparametric tests to search differences among all groups and between two groups, respectively. *P*-value less than 0.05 was considered as significant.

## 3. Results

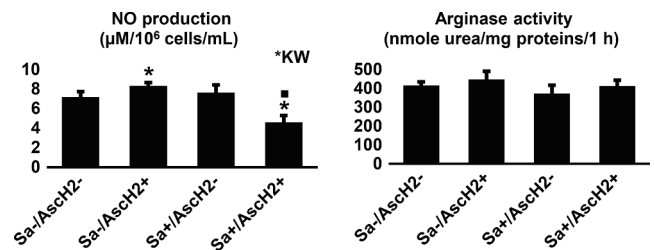
In the current study, we examined the *ex vivo* immunomodulatory effects of AscH2 treatment on the functional activities of *S. aureus* infected-HUVECs.

### 3.1. AscH2 treatment induces downregulation of NO production and moderate upregulation of arginase activity in *S. aureus*-infected HUVECs

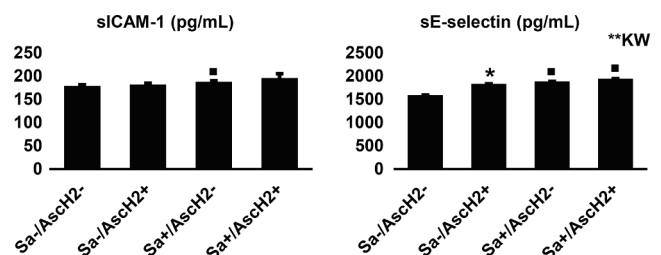
As depicted in Fig. 2, AscH2 treatment induced a marked upregulation of NO production and a slight upregulation of arginase activity in uninfected HUVECs as compared to *S. aureus*-uninfected and AscH2-untreated control cells, and, conversely, a significant downregulation of NO production and a weak upregulation of arginase activity in infected HUVECs as compared to infected and untreated HUVECs. Nevertheless, differences for the two comparisons were significant only for NO production, but not for arginase activity (respectively,  $p < 0.05$  and  $p > 0.05$  by Mann-Whitney *U* test). For multiple comparisons by Kruskal-Wallis test,  $p < 0.05$  for NO production and  $p > 0.05$  for arginase activity.

### 3.2. AscH2 treatment may have a reversing effect of *S. aureus* on the release of sICAM-1/sCD54 by infected HUVECs, but not on that of sE-selectin/sCD62E

As observed in Fig. 3, AscH2 treatment has no significant effect on the release levels of sICAM-1 by HUVECs, either infected or not with *S. aureus*. AscH2-untreated but *S. aureus*-infected HUVECs have been shown to significantly release sICAM-1 as compared to AscH2-untreated



**Fig. 2.** Effects of AscH2 on NO production and arginase activity during *S. aureus*-infected HUVECs. NO levels were measured by a sensitive Griess method. Arginase activity was spectrophotometrically determined by measurement of urea concentration. Values are presented as the mean with standard error of mean. AscH2: ascorbic acid/L-threo-2,3,4,5,6-pentahydroxyhex-2-enoic acid-4-lactone, HUVECs: human umbilical vein endothelial cells, NO: nitric oxide, Sa-/AscH2-: *S. aureus*-uninfected and AscH2-untreated HUVECs, Sa-/AscH2+: *S. aureus*-uninfected and AscH2-treated HUVECs, Sa+/AscH2-: *S. aureus*-infected and AscH2-untreated HUVECs, Sa+/AscH2+: *S. aureus*-infected and AscH2-treated HUVECs. Asterisks indicate significant differences highlighted between uninfected or infected cell groups using Mann-Whitney *U* test ( $*p < 0.05$ ). Black boxes indicate significant differences highlighted against *S. aureus*-uninfected and AscH2-untreated HUVEC controls using Mann-Whitney *U* test ( $\blacksquare p < 0.05$ ). \*KM: significant differences highlighted between all groups by Kruskal-Wallis test ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 3.** Effect of AscH2 on the sICAM-1 and sE-selectin release by HUVECs during *S. aureus* infection. sICAM-1 and sE-selectin levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Values are presented as the mean with standard error of mean. AscH2: ascorbic acid/L-threo-2,3,4,5,6-pentahydroxyhex-2-enoic acid-4-lactone, HUVECs: human umbilical vein endothelial cells, sICAM-1: soluble intercellular adhesion molecular 1 (cluster of differentiation 54 [CD54]), sE-selectin: soluble E-selectin (cluster of differentiation 62 [CD62E]), Sa-/AscH2-: *S. aureus*-uninfected and AscH2-untreated HUVECs, Sa-/AscH2+: *S. aureus*-uninfected and AscH2-treated HUVECs, Sa+/AscH2-: *S. aureus*-infected and AscH2-untreated HUVECs, Sa+/AscH2+: *S. aureus*-infected and AscH2-treated HUVECs. Asterisk indicates significant differences highlighted between uninfected cell groups using Mann-Whitney *U* test ( $*p < 0.05$ ). Black boxes indicate significant differences highlighted against *S. aureus*-uninfected and AscH2-untreated HUVEC controls using Mann-Whitney *U* test ( $\blacksquare p < 0.05$ ). \*\*KM: significant differences highlighted between all groups by Kruskal-Wallis test ( $p < 0.01$ ).

and *S. aureus*-uninfected HUVECs ( $p < 0.05$ ); whereas, AscH2 treatment reversed the infection effect on sICAM-1 release as observed by comparison with control cells ( $p > 0.05$ ). Additionally, there are no marked differences in the release levels of sE-selectin by infected and AscH2-treated HUVECs than in infected and AscH2-untreated HUVECs. Conversely, AscH2 treatment induced a significant upregulation of sE-selectin release levels in uninfected HUVECs ( $p < 0.05$ ). Moreover, *S. aureus*-infected and treated or untreated HUVECs have a marked upregulation in the sE-selectin levels when comparing with *S. aureus*-uninfected and AscH2-untreated control cells (for both comparisons,  $p < 0.05$ ). For all comparisons using Kruskal-Wallis test, *p*-value was less than 0.05 for sICAM-1 and less than 0.01 for sE-selectin.

### 3.3. AscH2 treatment protects against HUVEC necrosis induced by *S. aureus* infection

As shown in Fig. 4, infection by *S. aureus* induced a significant upregulation of HUVECs necrosis ( $p < 0.05$ ). Additionally, AscH2 treatment induced a significant downregulation of HUVECs necrosis in both *S. aureus*-infected or *S. aureus*-uninfected HUVECs ( $p < 0.05$ ). Moreover, AscH2 treatment induced a significant downregulation of SOD activity in uninfected HUVECs as compared to untreated control HUVECs ( $p < 0.05$ ), and, conversely, a significant upregulation of SOD activity in *S. aureus*-infected when comparing with *S. aureus*-infected and AscH2-untreated HUVECs ( $p < 0.05$ ). Nevertheless, AscH2 treatment induced a slight change in catalase activity levels in *S. aureus*-infected and AscH2-treated HUVECs, but the difference against

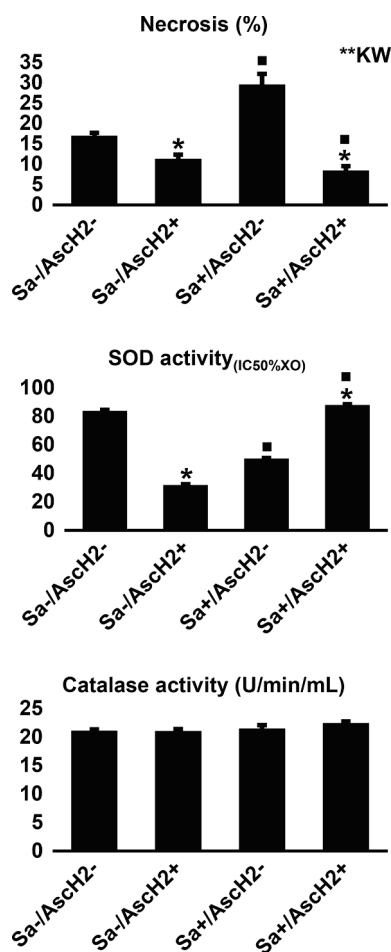


Fig. 4. Effect of AscH2 on LDH-based cytotoxicity and cell protective redox signaling based-biomarkers during *S. aureus*-infected HUVECs. Cell necrosis levels were measured spectrophotometrically through the determination of LDH release levels. Catalase and SOD activities were spectrophotometrically measured as cell protective redox signaling based-biomarkers. Values are presented as the mean with standard error of mean. AscH2: ascorbic acid/L-threo-2,3,4,5,6-pentahydroxyhex-2-enoic acid-4-lactone, HUVECs: human umbilical vein endothelial cells, LDH: lactate dehydrogenase, SOD: superoxide dismutase, Sa-/AscH2-: *S. aureus*-uninfected and AscH2-untreated HUVECs, Sa-/AscH2+: *S. aureus*-uninfected and AscH2-treated HUVECs, Sa+/AscH2-: *S. aureus*-infected and AscH2-untreated HUVECs, Sa+/AscH2+: *S. aureus*-infected and AscH2-treated HUVECs. Asterisks indicate significant differences highlighted between uninfected or infected cell groups using Mann-Whitney *U* test ( $*p < 0.05$ ). Black boxes indicate significant differences highlighted against *S. aureus*-uninfected and AscH2-untreated HUVEC controls using Mann-Whitney *U* test ( $\blacksquare p < 0.05$ ). \*\*KM: significant differences highlighted between all groups by Kruskal-Wallis test ( $p < 0.01$ ).

untreated and infected cells was statistically insignificant ( $p > 0.05$ ). *P*-value was less than 0.01 by Kruskal-Wallis test for cell necrosis and greater than 0.05 for both SOD and catalase activities.

### 3.4. AscH2 treatment induces a slight upregulation of $\text{bCa}^{2+}$ levels in *S. aureus*-infected HUVECs

As shown in Fig. 5, there are no significant differences in  $\text{bCa}^{2+}$  levels when comparing AscH2-treated cells with AscH2-untreated cells, either infected or uninfected (for all comparisons,  $p > 0.05$ ). However, infected and AscH2-treated or untreated cells have shown a significant decreased  $\text{bCa}^{2+}$  levels than in *S. aureus*-uninfected and AscH2-untreated control cells ( $p < 0.05$ ). Finally, AscH2 treatment induced upregulation of  $\text{bCa}^{2+}$  levels in infected HUVECs, but the difference did not reach a significant level ( $p > 0.05$ ). For all comparisons, *p*-value was less than 0.05 by Kruskal-Wallis test.

### 3.5. AscH2 treatment modulates increased $\text{tccCHOL}$ levels in HUVECs induced by *S. aureus* infection

We see in Fig. 6 that AscH2 treatment induced a significant upregulation of  $\text{tccCHOL}$  levels in uninfected cells when compared to uninfected and untreated cell controls, and, conversely, a significant downregulation of  $\text{tccCHOL}$  levels in infected HUVECs (for the two comparisons,  $p < 0.05$ ). Additionally, infected and AscH2-treated or AscH2-untreated HUVECs have significant increased levels of  $\text{tccCHOL}$  than in AscH2-untreated and *S. aureus*-uninfected and AscH2-untreated control cells ( $p < 0.05$ ). For multiple comparisons by Kruskal-Wallis test, *p*-value was less than 0.01.

### 3.6. AscH2 treatment reverses effect of *S. aureus* on upregulation of $\text{iGLU}$ levels within HUVECs

The results of Fig. 7 show that both uninfected and AscH2-treated HUVECs and infected and AscH2-untreated HUVECs have significant increased levels of  $\text{iGLU}$  than in AscH2-untreated and uninfected control cells (for the two comparisons,  $p < 0.05$ ). However, AscH2 treatment induced decreased  $\text{iGLU}$  levels in *S. aureus*-infected HUVECs when compared to *S. aureus*-infected and AscH2-untreated HUVECs or *S. aureus*-uninfected and AscH2-untreated control cells (for both comparisons,  $p < 0.05$ ). For all comparisons by Kruskal-Wallis test, *p*-value was less than 0.01.

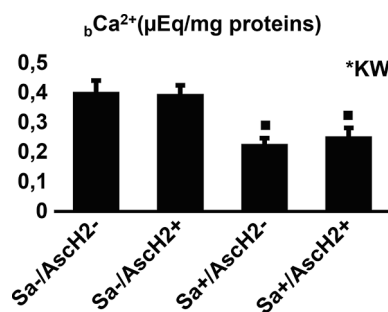
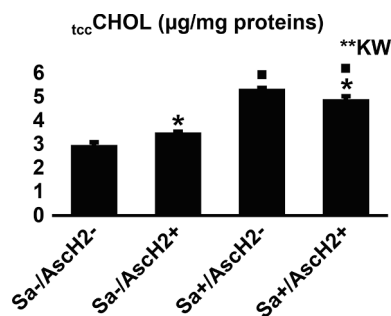
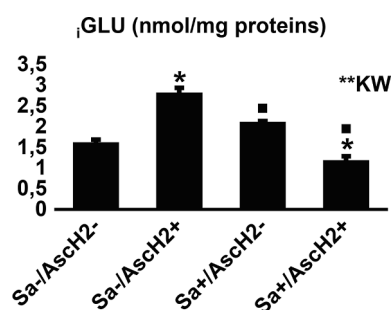


Fig. 5. Effect of AscH2 on  $\text{bCa}^{2+}$  levels during *S. aureus*-infected HUVECs.  $\text{bCa}^{2+}$  levels were measured using a highly sensitive and specific Arsenazo III (AS III- $\text{Ca}^{2+}$ )-based assay. Values are presented as the mean with standard error of mean. AscH2: ascorbic acid/L-threo-2,3,4,5,6-pentahydroxyhex-2-enoic acid-4-lactone, HUVECs: human umbilical vein endothelial cells,  $\text{bCa}^{2+}$ : total bound/complexed calcium ions, Sa-/AscH2-: *S. aureus*-uninfected and AscH2-untreated HUVECs, Sa-/AscH2+: *S. aureus*-uninfected and AscH2-treated HUVECs, Sa+/AscH2-: *S. aureus*-infected and AscH2-untreated HUVECs, Sa+/AscH2+: *S. aureus*-infected and AscH2-treated HUVECs. Black boxes indicate significant differences highlighted against *S. aureus*-uninfected and AscH2-untreated HUVEC controls using Mann-Whitney *U* test ( $\blacksquare p < 0.05$ ). \*KM: significant differences highlighted between all groups by Kruskal-Wallis test ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 6.** Effect of AsCH2 on  $t_{cc}CHOL$  levels during *S. aureus*-infected HUVECs. The levels of  $t_{cc}CHOL$  were spectrophotometrically determined as activation signature of trained immunity. Values are presented as the mean with standard error of mean. AsCH2: ascorbic acid/L-threo-2,3,4,5,6-pentahydroxyhex-2-enoic acid-4-lactone, HUVECs: human umbilical vein endothelial cells,  $t_{cc}CHOL$ : total cellular cholesterol content, Sa-/AsCH2-: *S. aureus*-uninfected and AsCH2-untreated HUVECs, Sa-/AsCH2+: *S. aureus*-uninfected and AsCH2-treated HUVECs, Sa+/AsCH2-: *S. aureus*-infected and AsCH2-untreated HUVECs, Sa+/AsCH2+: *S. aureus*-infected and AsCH2-treated HUVECs. Asterisks indicate significant differences highlighted between uninfected or infected cell groups using Mann-Whitney *U* test ( $*p < 0.05$ ). Black boxes indicate significant differences highlighted against *S. aureus*-uninfected and AsCH2-untreated HUVEC controls using Mann-Whitney *U* test ( $\blacksquare p < 0.05$ ). \*\*KM: significant differences highlighted between all groups by Kruskal-Wallis test ( $p < 0.01$ ).



**Fig. 7.** Effect of AsCH2 on  $iGLU$  levels during *S. aureus*-infected HUVECs.  $iGLU$  levels were measured by a spectrophotometric method as cell energy source. Values are presented as the mean with standard error of mean. AsCH2: ascorbic acid/L-threo-2,3,4,5,6-pentahydroxyhex-2-enoic acid-4-lactone, HUVECs: human umbilical vein endothelial cells,  $iGLU$ : intracellular glucose, Sa-/AsCH2-: *S. aureus*-uninfected and AsCH2-untreated HUVECs, Sa-/AsCH2+: *S. aureus*-uninfected and AsCH2-treated HUVECs, Sa+/AsCH2-: *S. aureus*-infected and AsCH2-untreated HUVECs, Sa+/AsCH2+: *S. aureus*-infected and AsCH2-treated HUVECs. Asterisks indicate significant differences highlighted between uninfected or infected cell groups using Mann-Whitney *U* test ( $*p < 0.05$ ). Black boxes indicate significant differences highlighted against *S. aureus*-uninfected and AsCH2-untreated HUVEC controls using Mann-Whitney *U* test ( $\blacksquare p < 0.05$ ). \*\*KM: significant differences highlighted between all groups by Kruskal-Wallis test ( $p < 0.01$ ).

### 3.7. AsCH2 treatment downregulates *S. aureus* growth, and upregulates bacterial internalization and intracellular killing by HUVECs

As depicted in Fig. 8, AsCH2 treatment markedly downregulated *S. aureus* growth, and markedly upregulated both bacterial internalization and killing (for all comparisons,  $p < 0.05$  by Mann-Whitney *U* test).

### 3.8. AsCH2 treatment ameliorates cell cycle activation in *S. aureus*-infected and uninfected HUVECs

The results in Fig. 9 show that AsCH2 treatment has significantly increased cell cycle activation of both *S. aureus*-uninfected and infected HUVECs (for both comparisons,  $p$ -value was less 0.01). For multiple

comparisons using Kruskal-Wallis test,  $p$ -value was less than 0.01.

### 3.9. AsCH2 treatment has a slight effect on the production of IL-6, but induces a marked downregulation of that of IL-1 $\beta$ in *S. aureus*-infected HUVECs

As shown in Fig. 10, no significant changes were noticed in the levels of IL-1 $\beta$  and IL-6 production, except for IL-1 $\beta$  when comparing between *S. aureus*-infected and AsCH2-treated HUVECs and *S. aureus*-infected and AsCH2-untreated HUVECs (IL-6;  $p > 0.05$ , IL-1 $\beta$ ;  $p < 0.05$  by Mann-Whitney *U* test). For multiple comparisons by Kruskal-Wallis test,  $p$ -value was greater than 0.05 for both IL-1 $\beta$  and IL-6.

## 4. Discussion

Although considered to be a passive barrier coating the inside of blood vessels, ECs are defined as unique multifunctional cells that fulfill a variety of vital basal and inducible, metabolic and synthetic functions, including the control of homeostasis, vasomotor tone, vasculogenesis and angiogenesis, as well as the regulation of immune and inflammatory responses [9,54]. Additionally, ECs were recently considered as conditional innate immune cells that have a crucial role in inflammatory and immune pathologies [11]. In fact, ECs are among the first innate immune cells that patrol the circulation due to their location in the interface between the blood and the surrounding tissues, which allow them to detect pathogens, upregulate the production of broad range of proinflammatory cytokines [12], and further-express adhesion molecules, including E-selectin and ICAM-1, and subsequently recruit other immune cells to the site of infection. It has been also reported that the proinflammatory responses of ECs increase oxidative stress [12,55,56], which can lead to their apoptosis and downregulation of eNOS activity [12,55].

Of note, an alteration in immune functions of ECs can promote uncontrolled trafficking of infectious agents, including pathogenic bacteria invasion, which lead to fatal conditions, like sepsis and acute respiratory distress syndrome (ARDS). *S. aureus* invasion can be due to its ability to adhere and penetrate inside ECs in greater numbers than other bacterial species [57]. From a therapeutic point of view, we evaluated the *ex vivo* immunomodulatory effects of AsCH2 treatment on primary HUVECs infected with *S. aureus*, based on its pivotal role in immunity as immunostimulant, anti-inflammatory, and antibacterial molecule.

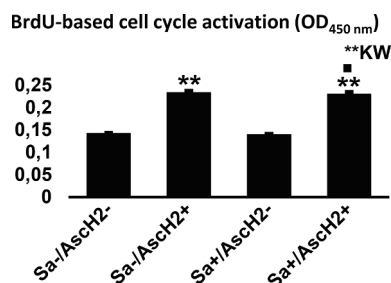
### 4.1. Effects of AsCH2 on NO production and arginase activity in *S. aureus*-infected HUVECs

NO is an important signaling molecule produced from the amino acid L-arginine by the enzyme NOS. Endothelium-derived NO, synthesized principally by endothelial NOS, contributes to the regulation of angiogenesis, vascular remodeling and systemic blood pressure, and inhibits leukocyte adhesion and platelet aggregation [58,59]. In addition, it has been demonstrated that HUVECs express the second isoform of NOS, *i.e.*, inducible NOS (iNOS) [60]. This enzyme produces high amounts of NO, which plays an important role in antimicrobial defense [61].

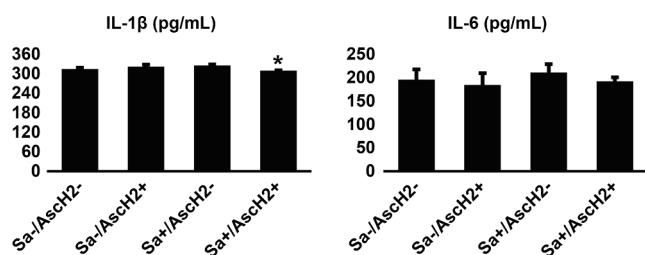
In our study, we observed that AsCH2 treatment induced upregulation of NO production by uninfected HUVECs. Accordingly, previous studies carried out in HUVEC model have demonstrated that AsCH2 treatment for 24 h at the dose of 1  $\mu$ M to 1 mM may prevent endothelial dysfunction by increasing the bioavailability of endothelial NO via increased levels of intracellular tetrahydrobiopterin (BH4) cofactor needed for the conversion of L-arginine to NO by endothelial NOS, suggesting that saturated AsCH2 levels in ECs are necessary to provide optimal conditions for cellular NO synthesis by protecting BH4 from oxidation [62,63]. However, the amount of NO could be compromised in some conditions by the increase in arginase activity. In fact, the L-arginine can also be used by another metabolic pathway, in which the enzyme arginase catalyzes its hydrolysis to ornithine and urea. Therefore,



**Fig. 8.** Effect of AsCH2 on *S. aureus* growth, internalization and killing by HUVECs. After HUVECs infection at MOI of 50, the percentage of internalization, corresponding to the percentage of decrease in the number of extracellular bacteria after 1 h of incubation with *S. aureus*, and intracellular live bacteria were quantified by the CFU method at two time points after infection, i.e., at 0 ( $t_0$ ) and 1 h ( $t_1$ ). The HUVECs's bactericidal activity was assessed using the gentamicin protection method. Values are presented as the mean with standard error of mean. AsCH2: ascorbic acid/L-threo-2,3,4,5,6-pentahydroxyhex-2-enoic acid-4-lactone, HUVECs: human umbilical vein endothelial cells, CFU: colony forming unit, MOI: multiplicity of infection, Sa+/Asch2-: *S. aureus*-infected and AsCH2-untreated HUVECs, Sa+/Asch2+: *S. aureus*-infected and AsCH2-treated HUVECs. Asterisks indicate significant differences highlighted between AsCH2-treated and untreated *S. aureus*-infected HUVECs using Mann-Whitney *U* test ( $*p < 0.05$ ).



**Fig. 9.** Effect of AsCH2 on cell cycle activation of *S. aureus*-infected HUVECs. Cell cycle activation levels were measured based on BrdU incorporation assay. Values are presented as the mean with standard error of mean. AsCH2: ascorbic acid/L-threo-2,3,4,5,6-pentahydroxyhex-2-enoic acid-4-lactone, HUVECs: human umbilical vein endothelial cells, BrdU: bromodeoxyuridine [5-bromo-2'-deoxyuridine], Sa-/Asch2-: *S. aureus*-uninfected and AsCH2-untreated HUVECs, Sa-/Asch2+: *S. aureus*-uninfected and AsCH2-treated HUVECs, Sa+/Asch2-: *S. aureus*-infected and AsCH2-untreated HUVECs, Sa+/Asch2+: *S. aureus*-infected and AsCH2-treated HUVECs. Asterisks indicate significant differences highlighted between uninfected or infected cell groups using Mann-Whitney *U* test ( $**p < 0.01$ ). Black box indicates significant differences highlighted against *S. aureus*-uninfected and AsCH2-untreated HUVEC controls using Mann-Whitney *U* test ( $\blacksquare p < 0.05$ ). \*\*KW: significant differences highlighted between all groups by Kruskal-Wallis test ( $p < 0.01$ ).



**Fig. 10.** Effects of AsCH2 on IL-1 $\beta$  and IL-6 production by *S. aureus*-infected HUVECs. The levels of cytokines IL-1 $\beta$  and IL-6 production were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Values are presented as the mean with standard error of mean. AsCH2: ascorbic acid/L-threo-2,3,4,5,6-pentahydroxyhex-2-enoic acid-4-lactone, HUVECs: human umbilical vein endothelial cells, IL: interleukin, Sa-/Asch2-: *S. aureus*-uninfected and AsCH2-untreated HUVECs, Sa-/Asch2+: *S. aureus*-uninfected and AsCH2-treated HUVECs, Sa+/Asch2-: *S. aureus*-infected and AsCH2-untreated HUVECs, Sa+/Asch2+: *S. aureus*-infected and AsCH2-treated HUVECs. Asterisk indicates a significant difference highlighted between *S. aureus*-infected HUVECs using Mann-Whitney *U* test ( $*p < 0.05$ ).

an increase in the arginase pathway is considered as an essential mechanism of decreased arginine availability to be converted to NO [64,65]. Of note, two distinct isoforms of arginase have been identified: arginase 1, which is abundant and localized in macrophages and liver, and arginase II, which is especially expressed in the kidney. Also of note, both isoforms of arginase are present in ECs [66]. Additionally, some reports have shown that there is a causal link between NO production, endothelial arginase activity and vascular dysfunction [67,68].

To the best of our knowledge, this is the first study evaluating the arginase activity and NO responses to AsCH2 in *S. aureus*-infected HUVECs. So, we observed that AsCH2 treatment downregulated the NO production in *S. aureus*-infected HUVECs and induced a slight increase in arginase activity in both *S. aureus*-infected and uninfected HUVECs. Thereby, our results are in accordance with previous research showing the inhibitory effect of vitamin C on iNOS expression in endotoxin- and IFN- $\gamma$ -stimulated rat skeletal muscle ECs by an antioxidant mechanism depending on activation of interferon regulatory factor-1 (IRF-1) [69]. Additionally, our previous study, conducted on peritoneal macrophage co-cultured with *S. aureus*, have demonstrated that selenium, another antioxidant, induced a significant decrease in the concentration of NO production and a significant increase in arginase activity [41]. Importantly, the amount of NO production could be affected by *S. aureus* bacteria, knowing that it possesses the ability to produce arginase, which modulates the immune system by consuming the host arginine, which, therefore, leads to the decrease in NO levels [70]. In our study, however, the levels of NO or arginase did not appear to be affected by infection with *S. aureus*, although slight, but not significant, changes were observed. Our findings should lead to *in vitro* investigations oriented towards the search for the levels of enzymatic activities of NOS and arginase and their respective affinities to L-arginine at the level of ECs in the presence of *S. aureus*.

#### 4.2. Effect of AsCH2 on the sICAM-1 and sE-selectin release by HUVECs during *S. aureus* infection

Soluble forms of the adhesion molecules, including sICAM-1 and sE-selectin, are considered as the strong biomarkers of inflammation and ECs activation [71,72]. In our study, both sICAM-1 and sE-selectin were elevated in *S. aureus*-infected HUVECs, which corroborate various *in vitro* and *in vivo* studies showing that *S. aureus* can induce expression of ICAM-1 and E-selectin [73,74]. It is well known that the upregulation of adhesion molecules causes the recruitment and adhesion to ECs of circulating leucocytes, i.e., polymorphonuclear neutrophilic leucocytes (PMN) and monocytes, to the areas of inflammatory tissue [75,76], which occur in early step of acute inflammatory reaction, allowing their transmigration and trafficking across the vessel wall after their rolling [77]. It has previously been reported that cultured HUVECs express E-selectin on the cell surface only when exposed to inflammatory



cytokines, demonstrating that the activation and subsequent translocation of NF- $\kappa$ B is a prerequisite for the expression of E-selectin and other proinflammatory mediators [78]. Therefore, our results complement the previous findings regarding increased levels of proinflammatory cytokines. Moreover, unlike studies showing that vitamin C supplementation in normal subjects reduces the expression levels of constitutive and circulating ICAM-1 and E-selectin [79–81], our results do not appear to show a significant effect of AsCH2 treatment on the release of sICAM-1 and sE-selectin by HUVECs. Nevertheless, vitamin C treatment appears to be able to reverse the effects of *S. aureus* infection on sICAM-1. Finally, the difference in the results should be related to the difference in the cell type, the study model and the experimental design and condition.

#### 4.3. Effect of AsCH2 on cell necrosis and cell protective redox signaling based-biomarkers in *S. aureus*-infected HUVECs

Increased release of cellular cytosolic components including the enzyme LDH, which is present almost in all cells of organism, is considered as a key signature for necrotic cells, revealing the plasma membrane permeabilization [43,82]. Our results are consistent with those showing that infection with *S. aureus* leads to the host cell death, including both professional and amateur phagocytes such as ECs [83–85]. Additionally, it has been reported that antioxidants, including vitamin C, can prevent induction of human ECs and other immune cells death [86,87]. So, vitamin C can inhibit cellular reactive oxygen species (ROS) accumulation [88], which corroborates our outcomes regarding induction of cell protective redox, as determined by SOD and catalase activities, although the latest was observed to be slightly increased in *S. aureus*-infected and AsCH2-treated HUVECs. Moreover, it would be of great interest to check if AsCH2-mediated protection on HUVECs would be related with its possible inhibition of the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway, such a process has been described in coronary artery disease [89]. Knowing that mTOR exists in two functionally distinct protein complexes named mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) and 2 (mTORC2), and that mTORC1 regulates cell growth and metabolism, and mTORC2 functions primarily as a downstream effector of Akt phosphorylation (and Akt-related kinases) and regulator of both the actin cytoskeleton and mTORC1-dependent negative feedback loop [90–92], ECs protection may be related to a selective inhibition of mTORC1, resulting in the activation of the phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Akt signaling pathway, thereby leading to cell survival and proliferation, as well as to the prevention of apoptosis [93].

#### 4.4. Effect of AsCH2 on ${}^b\text{Ca}^{2+}$ levels in *S. aureus*-infected HUVECs

The divalent cation calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) is an ubiquitous second messengers in HUVECs and a key for their physiological and immunological functions [94,95]. They can be considered as an important signaling event during internalization of several bacterial pathogens, including *S. aureus* [96,97]. An increase of free  $\text{Ca}^{2+}$  can activate a number of signaling pathways under physiological and pathological conditions [98]. Cell activation mediated- $\text{Ca}^{2+}$  signals occurs following its bonding with target intracellular ubiquitous  $\text{Ca}^{2+}$  sensing protein, *i.e.*, calmodulin (CaM) [99]. In our study, however, we found that  ${}^b\text{Ca}^{2+}$  were downregulated in infected cells, either treated or untreated by AsCH2. Of note, given that *S. aureus* infection enhances the concentration of free calcium ions and release within ECs [100] and professional phagocytes, like monocytes [101], which results in cell death [102] as we demonstrated through increased levels of LDH-based cytotoxicity, our outcomes suggest that the most calcium ions are in a free form in *S. aureus*-infected HUVECs. Also of note, we demonstrated that AsCH2 treatment upregulated  ${}^b\text{Ca}^{2+}$  in infected HUVECs, at the same time of cell necrosis downregulation. Therefore, it would be with warm interest to check whether calcium ions in bound form may protect or not against ECs

death, and whether vitamin C treatment may be one of the most therapeutic approaches to be explored for intracellular calcium ions homeostasis in human ECs during infection by *S. aureus*.

#### 4.5. Effect of AsCH2 on ${}_{\text{tcc}}\text{CHOL}$ levels during *S. aureus*-infected HUVECs

Recent evidence has indicated that cholesterol content and intracellular metabolism in immune cells are considered to be a determining and modulating factor of innate and adaptive immunity [103]. In our study, we observed that *S. aureus*-infected HUVECs showed a significant increase in total cholesterol content. So, it has been reported that both oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) and increased cholesterol induce trained immunity/innate immune memory, a process in which myeloid innate immune cells and their progenitors mediate epigenetic – remodel the chromatin – and functional reprogramming to create a response to a previously recognized stimulus, allowing protection against heterologous infections [103,104]. Additionally, cholesterol accumulation in innate immune cells promotes inflammasome activation and toll-like receptor (TLR) signalling, which lead to enhance inflammatory responses [105]. Therefore, infection of human ECs by *S. aureus* could be an important activating factor of trained immunity processes. Finally, we noticed that the HUVECs treatment with AsCH2 induced a significant drop in the level of  ${}_{\text{tcc}}\text{CHOL}$ , but which still remained high compared to control cells. Therefore, it would be of great interest to prove whether vitamin C treatment could act as a mild modulator of any epigenetic modification within ECs during *S. aureus* infection.

#### 4.6. Effect of AsCH2 on ${}^i\text{GLU}$ levels in *S. aureus*-infected HUVECs

${}^i\text{GLU}$  is synthesized from various ways, including non-sugar substrates, such as pyruvate and glucogenic amino acids, or from glycolysis, and consumed *via* glycolysis, the pentose shunt or glycogen synthesis [106]. Its metabolism provides energy to all cell types. In immune cells, metabolic reprogramming through the use of glycolysis and fatty-acid oxidation enable them to activate and engage in robust growth and proliferation to generate effector cells capable of developing efficient immune responses, and may therefore be a target of immunotherapeutic approach to fight intracellular infections, such as viral infections, as well as to improve the effectiveness of vaccines [107]. Based on our results regarding upregulated  ${}^i\text{GLU}$  within infected HUVECs, we hypothesize that during *S. aureus* infection, ECs may develop immunometabolic strategies to counter such infections, including increasing their levels of glucose as an energy substrate required for their immune activities. Nevertheless, glucose could be a double-edged sword when we know that *S. aureus* can use glucose to grow under respiration-limiting conditions imposed by the immune system [108]. These results should pave the way for a cause-effect mechanistic study to know if the increase in  ${}^i\text{GLU}$  levels might the result of a negative feedback to counteract *S. aureus* infection – while increasing the energy source for both HUVECs and *S. aureus* –, or, inversely, *S. aureus* might carry out the  ${}^i\text{GLU}$  synthesis by using the enzymatic machinery and the necessary host cell substrates by acting as parasites. On the other hand, we observed that AsCH2 treatment induced upregulation of  ${}^i\text{GLU}$  in uninfected HUVECs, and, conversely, downregulation in infected HUVECs. It has been reported that vitamin C can increase glucose levels when supplemented at high level [109], and that due of structure similarity [110], it can interfere with glucose concentration measurement, resulting in biased glucose levels. However, the decrease in  ${}^i\text{GLU}$  levels in infected cells would be the result of enhancing effect of AsCH2 treatment on glucose consumption mainly by HUVECs given that *S. aureus* growth was decreased in that condition as we discussed below.

#### 4.7. Effect of AsCH2 on *S. aureus* growth, internalization and killing by HUVECs

*S. aureus* has been traditionally considered as an extracellular bacterium, but many recent studies have shown its ability to survive within and escape from nonprofessional phagocytic cells such as fibroblast cells, mesenchymal cells, epithelial cells and ECs [111,112]. Intracellular bacteria may be protected against immune responses and promote persistence of infection. Importantly, ECs constitute a favorite way for the dissemination of internalized *S. aureus*, which can reside in endosomal vacuoles or diverted from the endosomal pathway to autophagosomes. The multiple expressed virulence factors allow them to escape into the cytoplasm and possibly kill the host cell by inducing its apoptosis [44].

Although vitamin C has been shown to have multiple effects on ECs, exact mechanisms about their effects on internalization of bacteria and bactericidal or bacteriostatic activity are unknown. Our results demonstrated that vitamin C treatment downregulates *S. aureus* growth, and upregulates both internalization/phagocytosis and killing. It has been reported that vitamin C accumulates in phagocytic cells and can enhance chemotaxis, phagocytosis, generation of ROS, and ultimately microbial killing [26]. Its ability to inhibit *S. aureus* growth observed in the current study is consistent with a well-documented report, which suggests that vitamin C can affect *S. aureus* metabolism resulting in bacterial growth inhibition [113]. This effect can also be explained by exposing bacteria to oxidative stress induced through vitamin C oxidation [114], or by the production of acetic acid and lactate generated from ascorbic acid [113].

The antimicrobial activities of vitamin C, especially in form of DHA, have been demonstrated not only on bacterial cells, but also on virus, including herpes simplex virus type 1, poliovirus type 1, and influenza virus type A, and parasite, such as *Trypanosoma cruzi* and *Plasmodium yoelii* 17XL [115], etc. Of note, numerous studies have shown a strong *in vitro* bactericidal activity of vitamin C against intracellular bacteria, such as *Mycobacterium tuberculosis* targeting macrophage cells [116,117]. Nevertheless, studies on the effects of vitamin C on *S. aureus*-infected HUVECs have yet to be explored.

#### 4.8. Effect of AsCH2 on cell cycle activation of *S. aureus*-infected HUVECs

Our report shows for the first time the effect of AsCH2 on HUVECs regeneration during *S. aureus* infection. Herein we demonstrated that AsCH2 treatment activates cell cycle, either in the presence or absence of *S. aureus*. So, in addition to the possible effect of AsCH2 on the inhibition of the mTOR pathway, as postulated above, both protection and regeneration of ECs may also be related to the capacity of vitamin C to increase type IV collagen synthesis [24], as well as to the activation of ERK1/2 signaling pathway [118].

#### 4.9. Effects of AsCH2 on IL-1 $\beta$ and IL-6 production by *S. aureus*-infected HUVECs

The inflammatory response against infections is characterized by the release of a broad range of proinflammatory cytokines, like IL-1 $\beta$  and IL-6, and acute-phase proteins (APPs) [119], including C-reactive protein (CRP), serum amyloid A (SAA), fibrinogen, and hepcidin in hepatocytes, whereas it inhibits production of albumin [120]. IL-1 $\beta$  is a typical cytokine produced by macrophages and monocytes, but it can also be expressed in other cell types, like dendritic cells, neutrophils, mast cells, epithelial cells and ECs [121]. It mediates the tissue infiltration of inflammatory and immunocompetent cells by increasing the expression of chemokines and ICAM-1 expression on ECs [122]. IL-6 is pleiotropic cytokine usually produced in response to infections and tissue injuries [123], IL-6 trans-signaling upregulates expression of endothelial leukocyte adhesion molecules, including vascular cell adhesion

molecule 1 (VCAM-1/CD106) and ICAM-1, and further inducing leukocyte accumulation [124,125].

The production of cytokines by human ECs has been reported to represent one of the early events triggered by infection. Usually, during acute inflammatory responses, cellular production of several proinflammatory cytokines is increased. Our findings corroborate those demonstrating that *S. aureus* internalization by HUVECs induced the expression of IL-6 [126], but showed no effect on IL-1 $\beta$  [127]. In our study, however, the increased levels of IL-6 were relatively mild compared to uninfected HUVECs, which deserves complementary studies. Moreover, our results regarding AsCH2 effect on downregulation of IL-1 $\beta$  and IL-6 production in *S. aureus*-infected HUVECs are in agreement with data reporting that vitamin C treatment reduces the intracytoplasmic production of proinflammatory cytokines [128]. Therefore, further studies are needed to elucidate the cause-effect relationship between vitamin C treatment and both nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat (NLR) family pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome-mediated caspase-1 activation, and nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (NF- $\kappa$ B) regulation within ECs during infection with *S. aureus*, particularly in sepsis pathophysiology. Finally, the study of the mechanistic effects of AsCH2 treatment on other specific interleukins or hematopoietic growth factors should be of utmost importance. Of note, stem cell growth factor-beta (SCGF- $\beta$ ), a newly found protein and a member of the C-type lectin superfamily that functions as a growth factor for primitive hematopoietic progenitor cells [129], has been reported to be involved in inflammatory conditions, like obesity-associated inflammation, and to have immunomodulatory role on cell phenotypic switching, depending on its combination with different growth factors [130]. It would therefore be judicious to show whether SCGF- $\beta$  could have an *ex vivo* effect on the polarization of circulating immune cell progenitors, co-cultured with AsCH2-treated and *S. aureus*-infected HUVECs, and, subsequently, on the immunomodulation of inflammatory mediators.

## 5. Conclusions and future prospects

*S. aureus* pathogenesis is mostly related to its ability to survive and grow inside infected cells, and even induce cell death of a variety of host cells, including ECs. Dysfunction of ECs caused by *S. aureus* infection can lead to bacterial dissemination into organ tissues, leading to persistent chronic infections, and thus behaving as a vehicle for the pathogen invasion. The potent danger of *S. aureus* infection is its progression to sepsis. From a therapeutic point of view, treatment with vitamin C has been proposed as an adjunct treatment in sepsis. For our part, we have shown for the first time that AsCH2/L-Threoascorbic acid treatment promotes human ECs survival and function, as well as prevents inflammatory response exacerbation, while inducing bactericidal activity. Our results deserve to be extended by further studies, and among others: (i) the determination of respective affinities for L-arginine of NOS within ECs and of arginase at the level of both ECs and *S. aureus*, (ii) the study of the cause-effect relationship between vitamin C and Ca<sup>2+</sup> in bound form and ECs survival during *S. aureus* infection, (iii) the *S. aureus* effect on trained immunity and vitamin C action on modulation of epigenetic modification within ECs infected with *S. aureus*, and, finally, (iv) the study of the energy metabolic pathways of ECs in the context of immunity against *S. aureus* infection.

## Declaration of Competing Interest

The authors have declared that no competing interests exist.

## Acknowledgements

The authors are deeply grateful to the staff of Obstetrics Unit of Tlemcen Specialized Mother & Child Hospital Establishment (*Etablissement Hospitalier Spécialisé [EHS] Mère-Enfant*) for umbilical cords



collection, and the Perinatal & Pediatric Immunity team of the Laboratory of Applied Molecular Biology & Immunology for their technical assistance. They also sincerely thank Dr. Zeyneb Hadjidj and MSc. Rabia Messali for their intellectual and technical support, as well as to the Directorate General of Scientific Research and Technological Development (DGRSDT, Direction Générale de la Recherche Scientifique et du Développement Technologique, MESRS, Algeria) for their financial support of the current study.

## Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107476>.

## References

- [1] J. Knox, A.-C. Uhlemann, F.D. Lowy, Staphylococcus aureus infections: transmission within households and the community, *Trends Microbiol.* 23 (2015) 437–444, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.03.007>.
- [2] F. Alonzo, V.J. Torres, The bicomponent pore-forming leucocidins of *Staphylococcus aureus*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 78 (2014) 199–230, <https://doi.org/10.1128/MMBR.00055-13>.
- [3] A.-C. Uhlemann, M. Otto, F.D. Lowy, F.R. DeLeo, Evolution of community- and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 21 (2014) 563–574, <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.04.030>.
- [4] S.Y.C. Tong, J.S. Davis, E. Eichenberger, T.L. Holland, V.G. Fowler, *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management, *Clin. Microbiol. Rev.* 28 (2015) 603–661, <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>.
- [5] G. Rollin, X. Tan, F. Tros, M. Dupuis, X. Nassif, A. Charbit, M. Coureuil, Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* in endothelial cells: A matter of growth or persistence, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 1354, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01354>.
- [6] J. Horn, K. Stelzner, T. Rudel, M. Fraunholz, Inside job: *Staphylococcus aureus* host-pathogen interactions, *Int. J. Med. Microbiol. IJMM.* 308 (2018) 607–624, <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.11.009>.
- [7] S. Blättner, S. Das, K. Paprotka, U. Eilers, M. Kruschke, D. Kretschmer, C. W. Remmele, M. Dittrich, T. Müller, C. Schuelein-Voelk, T. Hertlein, M. J. Mueller, B. Huettel, R. Reinhardt, K. Ohlsen, T. Rudel, M.J. Fraunholz, *Staphylococcus aureus* exploits a non-ribosomal cyclic dipeptide to modulate survival within epithelial cells and phagocytes, *PLoS Pathog.* 12 (2016) e1005857, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005857>.
- [8] M. Strobel, H. Pfortner, L. Tuscherr, U. Völker, F. Schmidt, N. Kramko, H.-J. Schnittler, M.J. Fraunholz, B. Löfler, G. Peters, S. Niemann, Post-invasion events after infection with *Staphylococcus aureus* are strongly dependent on both the host cell type and the infecting *S. aureus* strain, *Clin. Microbiol. Infect.* 22 (2016) 799–809, <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.06.020>.
- [9] B.E. Sumpio, J.T. Riley, A. Dardik, Cells in focus: endothelial cell, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34 (2002) 1508–1512.
- [10] J.S. Pober, W.C. Sessa, Evolving functions of endothelial cells in inflammation, *Nat. Rev. Immunol.* 7 (2007) 803–815, <https://doi.org/10.1038/nri2171>.
- [11] J. Mai, A. Virtue, J. Shen, H. Wang, X.-F. Yang, An evolving new paradigm: endothelial cells – conditional innate immune cells, *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol.* 6 (2013) 61, <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-61>.
- [12] S. Kofler, T. Nickel, M. Weis, Role of cytokines in cardiovascular diseases: a focus on endothelial responses to inflammation, *Clin. Sci.* 108 (2005) 205–213, <https://doi.org/10.1042/CS20040174>.
- [13] M.A. Gimbrone, G. García-Cardena, Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis, *Circ. Res.* 118 (2016) 620–636, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306301>.
- [14] K. Seidl, N.V. Solis, A.S. Bayer, W.A. Hady, S. Ellison, M.C. Klashman, Y.Q. Xiong, S.G. Filler, Divergent responses of different endothelial cell types to infection with *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*, *PLoS One* 7 (2012) e39633, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039633>.
- [15] L. Thomer, O. Schneewind, D. Missiakas, Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections, *Annu. Rev. Pathol.* 11 (2016) 343–364, <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044351>.
- [16] Y. Shao, Z. Cheng, X. Li, V. Chernaya, H. Wang, X. Yang, Immunosuppressive/anti-inflammatory cytokines directly and indirectly inhibit endothelial dysfunction – a novel mechanism for maintaining vascular function, *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol.* 7 (2014) 80, <https://doi.org/10.1186/s13045-014-0080-6>.
- [17] Y.-M. Yang, A. Huang, G. Kaley, D. Sun, eNOS uncoupling and endothelial dysfunction in aged vessels, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297 (2009) H1829–H1836, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00230.2009>.
- [18] G. Cepinskas, J.X. Wilson, Inflammatory response in microvascular endothelium in sepsis: Role of oxidants, *J. Clin. Biochem. Nutr.* 42 (2008) 175–184, <https://doi.org/10.3164/jcbn.2008026>.
- [19] A. Nerviani, D. Mauro, Endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus: pathogenesis, assessment and therapeutic opportunities, *Rev. Recent Clin. Trials.* (2018), <https://doi.org/10.2174/1574887113666180314091831>.
- [20] A. Sorice, E. Guerriero, F. Capone, G. Colonna, G. Castello, S. Costantini, Ascorbic acid: its role in immune system and chronic inflammation diseases, *Mini Rev. Med. Chem.* 14 (2014) 444–452.
- [21] J. Mandl, A. Szarka, G. Bánhegyi, Vitamin C: update on physiology and pharmacology, *Br. J. Pharmacol.* 157 (2009) 1097–1110, <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00282.x>.
- [22] C.P. Corpe, H. Tu, P. Eck, J. Wang, R. Faulhaber-Walter, J. Schnermann, S. Margolis, S. Padayatty, H. Sun, Y. Wang, R.L. Nussbaum, M.G. Espey, M. Levine, Vitamin C transporter Slc23a1 links renal reabsorption, vitamin C tissue accumulation, and perinatal survival in mice, *J. Clin. Invest.* 120 (2010) 1069–1083, <https://doi.org/10.1172/JCI39191>.
- [23] J.X. Wilson, Regulation of vitamin C transport, *Annu. Rev. Nutr.* 25 (2005) 105–125, <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.25.050304.092647>.
- [24] J.M. May, F.E. Harrison, Role of vitamin C in the function of the vascular endothelium, *Antioxid. Redox Signal.* 19 (2013) 2068–2083, <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5205>.
- [25] H. Hemilä, Vitamin C and infections, *Nutrients* 9 (2017), <https://doi.org/10.3390/nu9040339>.
- [26] A.C. Carr, S. Maggini, Vitamin C and immune function, *Nutrients* 9 (2017), <https://doi.org/10.3390/nu9111211>.
- [27] S.P. Crampton, J. Davis, C.C.W. Hughes, Isolation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), *J. Vis. Exp. JoVE* (2007), <https://doi.org/10.3791/183>.
- [28] A. Krüger-Genge, B. Hiebl, R.P. Franke, A. Lendlein, F. Jung, Effects of Tacrolimus or Sirolimus on the adhesion of vascular wall cells: Controlled in-vitro comparison study, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 67 (2017) 309–318, <https://doi.org/10.3233/CH-179211>.
- [29] B. Baudin, A. Bruneel, N. Bosselut, M. Vaubourdoles, A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 481–485, <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.54>.
- [30] V. Marin, G. Kaplanski, S. Grés, C. Farnarier, P. Bongrand, Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells, *J. Immunol. Methods.* 254 (2001) 183–190.
- [31] E.A. Jaffe, R.L. Nachman, C.G. Becker, C.R. Minick, Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria, *J. Clin. Invest.* 52 (1973) 2745–2756, <https://doi.org/10.1172/JCI107470>.
- [32] M. Szczepański, M. Kamianowska, K. Wnuczko, M. Pietruczuk, S. Wolczyński, The influence of erythropoietin (Epo) on intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54) and platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) expression on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), *Wiadomosci Lek. Wars. Pol.* 1960 (60) (2007) 22–27.
- [33] W. Strober, Trypan blue exclusion test of cell viability, *Curr. Protoc. Immunol.* 111 (2015), <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>.
- [34] R.J. Hamill, J.M. Vann, R.A. Proctor, Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic endothelial cells: model for postadherence events in endovascular infections, *Infect. Immun.* 54 (1986) 833–836.
- [35] A.L. Cheung, K.W. Bayles, Tissue culture assays used to analyze invasion by *Staphylococcus aureus*, *Curr. Protoc. Microbiol.* Chapter 9 (2007) Unit 9C.4, <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc09c04s4>.
- [36] A.M. Edwards, R.C. Massey, Invasion of human cells by a bacterial pathogen, *J. Vis. Exp. JoVE* (2011), <https://doi.org/10.3791/2693>.
- [37] M.C. Vissers, W.G. Lee, M.B. Hampton, Regulation of apoptosis by vitamin C. Specific protection of the apoptotic machinery against exposure to chlorinated oxidants, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 46835–46840, <https://doi.org/10.1074/jbc.M107664200>.
- [38] S. Takamizawa, Effects of ascorbic acid and ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative, on the proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells, *Cell Biol. Int.* 28 (2004) 255–265, <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2004.01.010>.
- [39] W. Nouari, L. Ysmail-Dahlouk, M. Aribi, Vitamin D3 enhances bactericidal activity of macrophage against *Pseudomonas aeruginosa*, *Int. Immunopharmacol.* 30 (2016) 94–101, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.11.033>.
- [40] L. Ysmail-Dahlouk, W. Nouari, M. Aribi, 1,25-dihydroxyvitamin D3 down-modulates the production of proinflammatory cytokines and nitric oxide and enhances the phosphorylation of monocyte-expressed STAT6 at the recent-onset type 1 diabetes, *Immunol. Lett.* 179 (2016) 122–130, <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.10.002>.
- [41] M. Aribi, Macrophage bactericidal assays, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1784 (2018) 135–149, [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7837-3\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7837-3_14).
- [42] M. Aribi, W. Meziane, S. Habi, Y. Boulatikha, H. Marchandin, J.-L. Aymeric, Macrophage bactericidal activities against *Staphylococcus aureus* are enhanced in vivo by selenium supplementation in a dose-dependent manner, *PLoS ONE* 10 (2015) e0135515, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135515>.
- [43] F.K.-M. Chan, K. Moriwaki, M.J. De Rosa, Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* 979 (2013) 65–70, [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-290-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-290-2_7).
- [44] M. Kubica, K. Guzik, J. Koziel, M. Zarebski, W. Richter, B. Gajkowska, A. Golda, A. Maciag-Gudowska, K. Brix, L. Shaw, T. Foster, J. Potempa, A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages, *PLoS ONE* 3 (2008), e1409, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001409>.

- [45] Z. Dahmani, L. Addou-Klouche, F. Gizard, S. Dahou, A. Messaoud, N. Chahinez Djebri, M.I. Benaissi, M. Mostefaoui, H. Terbeche, W. Nouari, M. Miliani, G. Lefranc, A. Fernandez, N.J. Lamb, M. Aribi, Metformin partially reverses the inhibitory effect of co-culture with ER-/PR-/HER2+ breast cancer cells on biomarkers of monocyte antitumor activity, *PLoS ONE* 15 (2020), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240982>.
- [46] P.A. Walton, M. Pizzitelli, Effects of peroxisomal catalase inhibition on mitochondrial function, *Front. Physiol.* 3 (2012), <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00108>.
- [47] H. Ukeda, D. Kawana, S. Maeda, M. Sawamura, Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on the reduction of highly water-soluble tetrazolium salts by xanthine-xanthine oxidase, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63 (1999) 485–488, <https://doi.org/10.1271/bbb.63.485>.
- [48] R.N. McBurney, I.R. Neering, The measurement of changes in intracellular free calcium during action potentials in mammalian neurones, *J. Neurosci. Methods* 13 (1985) 65–76, [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90044-5](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90044-5).
- [49] S. Chutipongtanate, V. Thongboonkerd, Establishment of a novel colorimetric assay for high-throughput analysis of calcium oxalate crystal growth modulation, *The Analyst* 135 (2010) 1309–1314, <https://doi.org/10.1039/b927046a>.
- [50] N. Luo, J. Liu, B.H. Chung, Q. Yang, R.L. Klein, W.T. Garvey, Y. Fu, Macrophage adiponectin expression improves insulin sensitivity and protects against inflammation and atherosclerosis, *Diabetes* 59 (2010) 791–799, <https://doi.org/10.2337/db09-1338>.
- [51] Y. Song, L.-J. Zhang, H. Li, Y. Gu, F.-F. Li, L.-N. Jiang, F. Liu, J. Ye, Q. Li, Polyunsaturated fatty acid relatively decreases cholesterol content in THP-1 macrophage-derived foam cell: partly correlates with expression profile of CIDE and PAT members, *Lipids Health Dis.* 12 (2013) 111, <https://doi.org/10.1186/1476-511X-12-111>.
- [52] I. Belhassena, W. Nouari, A. Messaoud, M. Nouar, M. Brahimi, S.-A.C. Lamara, M. Aribi, Aspirin enhances regulatory functional activities of monocytes and downregulates CD16 and CD40 expression in myocardial infarction aortic inflammatory disease, *Int. Immunopharmacol.* 83 (2020) 106349, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106349>.
- [53] P.H. Nibbering, E. Broug-Holub, A.C. Bezemer, R. Jansen, J.G. van de Winkel, M. F. Geertsma, Phagocytosis and intracellular killing of serum-opsonized *Staphylococcus aureus* by mouse fibroblasts expressing human Fcγ<sub>2</sub> receptor type IIa (CD32), *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 1 (1996) a25–a33.
- [54] C. Michiels, Endothelial cell functions, *J. Cell. Physiol.* 196 (2003) 430–443, <https://doi.org/10.1002/jcp.10333>.
- [55] C. Ince, P.R. Mayeux, T. Nguyen, H. Gomez, J.A. Kellum, G.A. Ospina-Tascón, G. Hernandez, P. Murray, D. De Backer, ADQI XIV Workgroup, The endothelium in sepsis, *Shock Augusta Ga* 45 (2016) 259–270, <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000473>.
- [56] C. Zhang, The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction, *Basic Res. Cardiol.* 103 (2008) 398–406, <https://doi.org/10.1007/s00395-008-0733-0>.
- [57] D.C. Tompkins, V.B. Hatcher, D. Patel, G.A. Orr, L.L. Higgins, F.D. Lowy, A human endothelial cell membrane protein that binds *Staphylococcus aureus* in vitro, *J. Clin. Invest.* 85 (1990) 1248–1254, <https://doi.org/10.1172/JCI114560>.
- [58] S. Dimmeler, I. Fleming, B. Fisslthaler, C. Hermann, R. Busse, A.M. Zeiher, Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation, *Nature* 399 (1999) 601–605, <https://doi.org/10.1038/21224>.
- [59] P.L. Huang, Z. Huang, H. Mashimo, K.D. Bloch, M.A. Moskowitz, J.A. Bevan, M. C. Fishman, Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase, *Nature* 377 (1995) 239–242, <https://doi.org/10.1038/377239a0>.
- [60] M. Cristina de Assis, M. Cristina Plotkowski, I.M. Fierro, C. Barja-Fidalgo, M.S. de Freitas, Expression of inducible nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells during primary culture, *Nitric Oxide, Biol. Chem.* 7 (2002) 254–261, [https://doi.org/10.1016/s1089-8603\(02\)00123-4](https://doi.org/10.1016/s1089-8603(02)00123-4).
- [61] C. Bogdan, Nitric oxide and the immune response, *Nat. Immunol.* 2 (2001) 907–916, <https://doi.org/10.1038/ni1001-907>.
- [62] B.S. Baker, B.J. Taylor, J.C. Hall, Are complex behaviors specified by dedicated regulatory genes? Reasoning from *Drosophila*, *Cell* 105 (2001) 13–24, [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00293-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00293-8).
- [63] R. Heller, A. Unbehaun, B. Schellenberg, B. Mayer, G. Werner-Felmayer, E. R. Werner, L-Ascorbic acid potentiates endothelial nitric oxide synthesis via a chemical stabilization of tetrahydrobiopterin, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 40–47, <https://doi.org/10.1074/jbc.M004392200>.
- [64] L. Zhou, C.-B. Sun, C. Liu, Y. Fan, H.-Y. Zhu, X.-W. Wu, L. Hu, Q.-P. Li, Upregulation of arginase activity contributes to intracellular ROS production induced by high glucose in H9c2 cells, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8 (2015) 2728–2736.
- [65] L.G. Chicoine, M.L. Paffett, T.L. Young, L.D. Nelin, Arginase inhibition increases nitric oxide production in bovine pulmonary arterial endothelial cells, *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 287 (2004) L60–L68, <https://doi.org/10.1152/ajplung.00194.2003>.
- [66] T. Bachetti, Arginase pathway in human endothelial cells in pathophysiological conditions, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 37 (2004) 515–523, <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2004.05.004>.
- [67] R.Y. Loyaga-Rendon, S. Sakamoto, M. Beppu, T. Aso, M. Ishizaka, R. Takahashi, H. Azuma, Accumulated endogenous nitric oxide synthase inhibitors, enhanced arginase activity, attenuated dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity and intimal hyperplasia in premenopausal human uterine arteries, *Atherosclerosis* 178 (2005) 231–239, <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.09.006>.
- [68] X.-F. Ming, C. Barandier, H. Viswambharan, B.R. Kwak, F. Mach, L. Mazzolai, D. Hayoz, J. Ruffieux, S. Rusconi, J.-P. Montani, Z. Yang, Thrombin stimulates human endothelial arginase enzymatic activity via RhoA/ROCK pathway: implications for atherosclerotic endothelial dysfunction, *Circulation* 110 (2004) 3708–3714, <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000142867.26182.32>.
- [69] F. Wu, K. Tysl, J.X. Wilson, Ascorbate inhibits iNOS expression in endotoxin- and IFN $\gamma$ -stimulated rat skeletal muscle endothelial cells, *FEBS Lett.* 520 (2002) 122–126, [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02804-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02804-1).
- [70] A. Lahiri, P. Das, D. Chakravorty, New tricks new ways: exploitation of a multifunctional enzyme arginase by pathogens, *Virulence* 1 (2010) 563–565, <https://doi.org/10.4161/viru.1.6.13623>.
- [71] R. Pigott, L.P. Dillon, I.H. Hemingway, A.J. Gearing, Soluble forms of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 are present in the supernatants of cytokine activated cultured endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187 (1992) 584–589, [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(92\)91234-h](https://doi.org/10.1016/0006-291x(92)91234-h).
- [72] Y. Koh, J. Park, Cell adhesion molecules and exercise, *J. Inflamm. Res.* 11 (2018) 297–306, <https://doi.org/10.2147/JIR.S170262>.
- [73] S. Nymo, A. Gustavsen, P.H. Nilsson, C. Lau, T. Espevik, T.E. Mollnes, Human Endothelial Cell Activation by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Is Mediated by TNF and IL-1 $\beta$  Secondly to Activation of C5 and CD14 in Whole Blood, *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 (196) (2016) 2293–2299, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502220>.
- [74] A. Woodfin, M. Beyrau, M.-B. Voisin, B. Ma, J.R. Whiteford, P.L. Hordijk, N. Hogg, S. Nourshargh, ICAM-1-expressing neutrophils exhibit enhanced effector functions in murine models of endotoxaemia, *Blood* 127 (2016) 898–907, <https://doi.org/10.1182/blood-2015-08-664995>.
- [75] I.-T. Lee, C.-C. Lin, C.-C. Yang, L.-D. Hsiao, M.-Y. Wu, C.-M. Yang, Resveratrol Attenuates *Staphylococcus aureus*-Induced Monocyte Adhesion through Downregulating PDGFR/AP-1 Activation in Human Lung Epithelial Cells, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018), <https://doi.org/10.3390/ijms19103058>.
- [76] T. Gerhardt, K. Ley, Monocyte trafficking across the vessel wall, *Cardiovasc. Res.* 107 (2015) 321–330, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv147>.
- [77] T.M. Carlos, J.M. Harlan, Leukocyte-endothelial adhesion molecules, *Blood* 84 (1994) 2068–2101.
- [78] U. Schindler, V.R. Baichwal, Three NF- $\kappa$ B binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression, *Mol. Cell. Biol.* 14 (1994) 5820–5831, <https://doi.org/10.1128/mcb.14.9.5820>.
- [79] S.J. Rayment, J. Shaw, K.J. Woollard, J. Lunec, H.R. Griffiths, Vitamin C supplementation in normal subjects reduces constitutive ICAM-1 expression, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308 (2003) 339–345, [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)01383-4](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)01383-4).
- [80] Hernoald, E.A. Rini, R. Machmud, The effect of vitamin c supplementation on intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) concentration on male adolescent obesity in Padang, *Int. J. Pediatr. Endocrinol.* 2013 (2013) P86, 1687-9856-2013-S1-P86, <https://doi.org/10.1186/1687-9856-2013-S1-P86>.
- [81] N. Mikirova, N. Riordan, J. Casciari, Modulation of cytokines in cancer patients by intravenous ascorbate therapy, *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 22 (2016) 14–25, <https://doi.org/10.12659/msm.895368>.
- [82] R.-P. Franke, R. Fuhrmann, C. Mrowietz, D. Rickert, B. Hiebl, F. Jung, Reduced diagnostic value of lactate dehydrogenase (LDH) in the presence of radiographic contrast media, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 45 (2010) 123–130, <https://doi.org/10.3233/CH-2010-1290>.
- [83] S.D. Kobayashi, K.R. Braughton, A.M. Palazzolo-Ballance, A.D. Kennedy, E. Sampaio, E. Kristosturyan, A.R. Whitney, D.E. Sturdevant, D.W. Dorward, S. M. Holland, B.N. Kreiswirth, J.M. Musser, F.R. DeLeo, Rapid neutrophil destruction following phagocytosis of *Staphylococcus aureus*, *J. Innate Immun.* 2 (2010) 560–575, <https://doi.org/10.1159/000317134>.
- [84] B. Giese, F. Glowinski, K. Paprotka, S. Dittmann, T. Steiner, B. Sinha, M. J. Fraunholz, Expression of  $\delta$ -toxin by *Staphylococcus aureus* mediates escape from phago-endosomes of human epithelial and endothelial cells in the presence of  $\beta$ -toxin, *Cell. Microbiol.* 13 (2011) 316–329, <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01538.x>.
- [85] B. Haslinger-Löffler, B.C. Kahl, M. Grundmeier, K. Strangfeld, B. Wagner, U. Fischer, A.L. Cheung, G. Peters, K. Schulze-Osthoff, B. Sinha, Multiple virulence factors are required for *Staphylococcus aureus*-induced apoptosis in endothelial cells, *Cell. Microbiol.* 7 (2005) 1087–1097, <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00533.x>.
- [86] J. Haendeler, A.M. Zeiher, S. Dimmeler, Vitamin C and E prevent lipopolysaccharide-induced apoptosis in human endothelial cells by modulation of Bcl-2 and Bax, *Eur. J. Pharmacol.* 317 (1996) 407–411, [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(96\)00759-5](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(96)00759-5).
- [87] I. Perez-Cruz, J.M. Carcamo, D.W. Golde, Vitamin C inhibits FAS-induced apoptosis in monocytes and U937 cells, *Blood* 102 (2003) 336–343, <https://doi.org/10.1182/blood-2002-11-3559>.
- [88] X. Zhong, M. Zeng, H. Bian, C. Zhong, F. Xiao, An evaluation of the protective role of vitamin C in reactive oxygen species-induced hepatotoxicity due to hexavalent chromium in vitro and in vivo, *J. Occup. Med. Toxicol. Lond. Engl.* 12 (2017) 15, <https://doi.org/10.1186/s12995-017-0161-x>.
- [89] G. Tarantino, D. Capone, Inhibition of the mTOR pathway: a possible protective role in coronary artery disease, *Ann. Med.* 45 (2013) 348–356, <https://doi.org/10.3109/07853890.2013.770333>.
- [90] K.H. Schreiber, S.I. Arriola Apelo, D. Yu, J.A. Brinkman, M.C. Velarde, F.A. Syed, C.-Y. Liao, E.L. Baar, K.A. Carbajal, D.S. Sherman, D. Ortiz, R. Brunauer, S. E. Yang, S.T. Zanniss, B.K. Kennedy, D.W. Lamming, A novel rapamycin analog is highly selective for mTORC1 in vivo, *Nat. Commun.* 10 (2019) 3194, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11174-0>.

- [91] W.J. Oh, E. Jacinto, mTOR complex 2 signaling and functions, *Cell Cycle Georget. Tex.* 10 (2011) 2305–2316, <https://doi.org/10.4161/cc.10.14.16586>.
- [92] T. Kawata, K. Tada, M. Kobayashi, T. Sakamoto, Y. Takiuchi, F. Iwai, M. Sakurada, M. Hishizawa, K. Shirakawa, K. Shindo, H. Sato, A. Takaori-Kondo, Dual inhibition of the mTORC1 and mTORC2 signaling pathways is a promising therapeutic target for adult T-cell leukemia, *Cancer Sci.* 109 (2018) 103–111, <https://doi.org/10.1111/cas.13431>.
- [93] L. Wei, S. Zhu, J. Wang, J. Liu, Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway during porcine circovirus type 2 infection facilitates cell survival and viral replication, *J. Virol.* 86 (2012) 13589–13597, <https://doi.org/10.1128/JVI.01697-12>.
- [94] A. Filippini, A. D'Amore, A. D'Alessio, Calcium mobilization in endothelial cell functions, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019), <https://doi.org/10.3390/ijms20184525>.
- [95] S. Mumtaz, G. Burdya, L. Borisova, S. Wray, T. Burdya, The mechanism of agonist induced Ca<sup>2+</sup> signalling in intact endothelial cells studied confocally in situ arteries, *Cell Calcium.* 49 (2011) 66–77, <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.11.010>.
- [96] T.M. Asmat, T. Tenenbaum, A.-B. Jonsson, C. Schwerk, H. Schroten, Impact of calcium signaling during infection of *Neisseria meningitidis* to human brain microvascular endothelial cells, *PLoS ONE* 9 (2014) e114474, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114474>.
- [97] S. Eichstaedt, K. Gäbler, S. Below, C. Müller, C. Kohler, S. Engelmann, P. Hildebrandt, U. Völker, M. Hecker, J.-P. Hildebrandt, Effects of *Staphylococcus aureus*-hemolysin A on calcium signalling in immortalized human airway epithelial cells, *Cell Calcium.* 45 (2009) 165–176, <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2008.09.001>.
- [98] P.J. Dalal, W.A. Muller, D.P. Sullivan, Endothelial cell calcium signaling during barrier function and inflammation, *Am. J. Pathol.* 190 (2020) 535–542, <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2019.11.004>.
- [99] M.T. Swilius, M.N. Waxham, Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinases, *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 65 (2008) 2637–2657, <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8086-2>.
- [100] K. Stelzner, A.-C. Winkler, L. Chunguang, C.P. Ade, T. Dandekar, M.J. Fraunholz, T. Rudel, Intracellular *Staphylococcus aureus* perturbs the host cell Ca<sup>2+</sup>-homeostasis to promote cell death, *Microbiology* (2020), <https://doi.org/10.1101/2020.08.20.260471>.
- [101] L. Zheng, P.H. Nibbering, R. van Furth, Cytosolic free calcium is essential for immunoglobulin G-stimulated intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by human monocytes, *Infect. Immun.* 60 (1992) 3092–3097, <https://doi.org/10.1128/IAI.60.8.3092-3097.1992>.
- [102] G. Bhosale, J.A. Sharpe, S.Y. Sundier, M.R. Duchon, Calcium signaling as a mediator of cell energy demand and a trigger to cell death, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1350 (2015) 107–116, <https://doi.org/10.1111/nyas.12885>.
- [103] M. Aguilar-Ballester, A. Herrero-Cervera, Á. Vinué, S. Martínez-Hervás, H. González-Navarro, Impact of cholesterol metabolism in immune cell function and atherosclerosis, *Nutrients* 12 (2020), <https://doi.org/10.3390/nu12072021>.
- [104] M.G. Netea, L.A.B. Joosten, Trained immunity and local innate immune memory in the lung, *Cell* 175 (2018) 1463–1465, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.007>.
- [105] A.R. Tall, L. Yvan-Charvet, Cholesterol, inflammation and innate immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 15 (2015) 104–116, <https://doi.org/10.1038/nri3793>.
- [106] S.A. John, M. Ottolia, J.N. Weiss, B. Ribalet, Dynamic modulation of intracellular glucose imaged in single cells using a FRET-based glucose nanosensor, *Pflugers Arch.* 456 (2008) 307–322, <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0395-z>.
- [107] H.M. Shehata, A.J. Murphy, M.K.S. Lee, C.M. Gardiner, S.M. Crowe, S. Sanjabi, D. K. Finlay, C.S. Palmer, Sugar or Fat?—Metabolic requirements for immunity to viral infections, *Front. Immunol.* 8 (2017) 1311, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01311>.
- [108] N.P. Vitko, M.R. Gresser, D. Khatri, T.R. Lance, A.R. Richardson, Expanded Glycose Import Capability Affords *Staphylococcus aureus* Optimized Glycolytic Flux during Infection, *MBio.* 7 (2016), <https://doi.org/10.1128/mBio.00296-16>.
- [109] D.R. Branch, High-dose vitamin C supplementation increases plasma glucose, *Diabetes Care* 22 (1999) 1218–1219, <https://doi.org/10.2337/diacare.22.7.1218>.
- [110] G.N. Dakhale, H.V. Chaudhari, M. Shrivastava, Supplementation of vitamin C reduces blood glucose and improves glycosylated hemoglobin in type 2 diabetes mellitus: a randomized, double-blind study, *Adv. Pharmacol. Sci.* 2011 (2011) 195271, <https://doi.org/10.1155/2011/195271>.
- [111] J.C. Seeberg, M. Loibl, F. Moser, M. Schwegler, M. Büttner-Herold, C. Daniel, F. B. Engel, A. Hartmann, U. Schlötzer-Schrehardt, M. Goppelt-Strube, V. Schellerer, E. Naschberger, I. Ganzleben, L. Heinzerling, R. Fietkau, L.V. Distel, Non-professional phagocytosis: a general feature of normal tissue cells, *Sci. Rep.* 9 (2019) 11875, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48370-3>.
- [112] J. Oviedo-Boyso, B.I. Cardoso-Correa, M. Cajero-Juárez, A. Bravo-Patiño, J. J. Valdez-Alarcón, V.M. Baizabal-Aguirre, The capacity of bovine endothelial cells to eliminate intracellular *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* is increased by the proinflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1beta, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 54 (2008) 53–59, <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00447.x>.
- [113] J. Kallio, M. Jaakkola, M. Mäki, P. Kilpeläinen, V. Virtanen, Vitamin C inhibits *Staphylococcus aureus* growth and enhances the inhibitory effect of quercetin on growth of *Escherichia coli* in vitro, *Planta Med.* 78 (2012) 1824–1830, <https://doi.org/10.1055/s-0032-1315388>.
- [114] R. Li, Vitamin C, a multi-tasking molecule, finds a molecular target in killing cancer cells, *React. Oxyg. Species Apex NC.* 1 (2016) 141–156, <https://doi.org/10.20455/ros.2016.829>.
- [115] S. Mousavi, S. Bereswill, M.M. Heimesaat, Immunomodulatory and Antimicrobial Effects of Vitamin C, *Eur. J. Microbiol. Immunol.* 9 (2019) 73–79, <https://doi.org/10.1556/1886.2019.00016>.
- [116] C. Vilchèze, T. Hartman, B. Weirnick, W.R. Jacobs, *Mycobacterium tuberculosis* is extraordinarily sensitive to killing by a vitamin C-induced Fenton reaction, *Nat. Commun.* 4 (2013) 1881, <https://doi.org/10.1038/ncomms2898>.
- [117] H. Wang, M. Edwards, J.O. Falkinham, A. Pruden, Molecular Survey of the Occurrence of *Legionella* spp., *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and *Amoeba* Hosts in Two Chloraminated Drinking Water Distribution Systems, *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (2012) 6285–6294, <https://doi.org/10.1128/AEM.01492-12>.
- [118] G. Ulrich-Merzenich, H. Zeitler, H. Vetter, R.R. Bionde, Protective effects of taurine on endothelial cells impaired by high glucose and oxidized low density lipoproteins, *Eur. J. Nutr.* 46 (2007) 431–438, <https://doi.org/10.1007/s00394-007-0682-7>.
- [119] J. Waag, J. Ten Oever, F.L. van de Veerdonk, M.G. Netea, IL-1β/IL-6/CRP and IL-18/ferritin: Distinct Inflammatory Programs in Infections, *PLoS Pathog.* 12 (2016) e1005973, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005973>.
- [120] T. Tanaka, M. Narazaki, T. Kishimoto, IL-6 in inflammation, immunity, and disease, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6 (2014) a016295, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>.
- [121] J.E. Sims, D.E. Smith, The IL-1 family: regulators of immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 10 (2010) 89–102, <https://doi.org/10.1038/nri2691>.
- [122] C.A. Dinarello, Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family, *Annu. Rev. Immunol.* 27 (2009) 519–550, <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612>.
- [123] C. Gabay, Interleukin-6 and chronic inflammation, *Arthritis Res. Ther.* 8 (2006) S3, <https://doi.org/10.1186/ar1917>.
- [124] S.M. Hurst, T.S. Wilkinson, R.M. McLoughlin, S. Jones, S. Horiuchi, N. Yamamoto, S. Rose-John, G.M. Fuller, N. Topley, S.A. Jones, IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation, *Immunity* 14 (2001) 705–714.
- [125] G. Kaplanski, V. Marin, F. Montero-Julian, A. Mantovani, C. Farnarier, IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation, *Trends Immunol.* 24 (2003) 25–29.
- [126] L. Yao, V. Bengualid, F.D. Lowy, J.J. Gibbons, V.B. Hatcher, J.W. Berman, Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces cytokine gene expression, *Infect. Immun.* 63 (1995) 1835–1839, <https://doi.org/10.1128/IAI.63.5.1835-1839.1995>.
- [127] J. Strindhall, P.-E. Lindgren, S. Löfgren, E. Kihlström, Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* vary in ability to stimulate cytokine expression in human endothelial cells, *Scand. J. Immunol.* 61 (2005) 57–62, <https://doi.org/10.1111/j.0300-9475.2005.01526.x>.
- [128] C. Härtel, T. Strunk, P. Bucsky, C. Schultz, Effects of vitamin C on intracytoplasmic cytokine production in human whole blood monocytes and lymphocytes, *Cytokine* 27 (2004) 101–106, <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2004.02.004>.
- [129] C.H.C. Sukowati, R. Patti, D. Pascut, R.B. Ladju, P. Tarchi, N. Zanotta, M. Comar, C. Tiribelli, L.S. Crocè, Serum stem cell growth factor beta for the prediction of therapy response in hepatocellular carcinoma, *BioMed Res. Int.* 2018 (2018) 6435482, <https://doi.org/10.1155/2018/6435482>.
- [130] G. Tarantino, V. Citro, C. Balsano, D. Capone, Could SCGF-Beta Levels Be Associated with Inflammation Markers and Insulin Resistance in Male Patients Suffering from Obesity-Related NAFLD? *Diagn. Basel Switz.* 10 (2020) <https://doi.org/10.3390/diagnostics10060395>.