

Etude de l'impact de Staphylococcus aureus sur la formation du tissu osseux

William Mouton

▶ **To cite this version:**

William Mouton. Etude de l'impact de Staphylococcus aureus sur la formation du tissu osseux. Bactériologie. 2018. hal-01973419

HAL Id: hal-01973419
https://ephe.hal.science/hal-01973419

Submitted on 8 Jan 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

Présenté par

William MOUTON

pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

TITRE : Etude de l'impact de *Staphylococcus aureus* sur la formation du tissu osseux

Soutenu le 04 Décembre 2018 devant le jury suivant :

Dr. Laurence Mathieu	- Présidente du jury
Pr Jean-Marie Exbrayat	- Tuteur pédagogique
Pr Frédéric Laurent	- Tuteur scientifique
Dr. Fany Reffuveille	- Rapporteur
Dr. Paul Verhoeven	- Examinateur

Mémoire préparé sous la direction de :

Pr Frédéric Laurent
Institut des Agents Infectieux, département de bactériologie, Centre National de Référence des Staphylocoques, 103 grande rue de la Croix Rousse, 69004 Lyon, INSERM U1111 – CNRS UMR 5308- ENS Lyon

Et de

Pr Jean-Marie Exbrayat
UMRS 449, Biologie générale – Reproduction et Développement comparé, UCLy, UDL ; EPHE, PSL, 10, Place des Archives, 69288 Lyon Cedex 02
EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)
Groupe de Recherche et d'Enseignement Thématiques de l'EPHE : CEDI

REMERCIEMENTS

Merci à toi, **Frédéric,** pour m'avoir fait intégrer l'équipe de recherche, pour le partage de tes connaissances et pour ton écoute. Je te remercie également de m'avoir fait confiance et de m'avoir motivé à reprendre mes études pour réaliser ce diplôme de l'EPHE. Merci pour ton dynamisme et pour tes nombreux encouragements durant ce diplôme ainsi que pour la poursuite de mon parcours professionnel.

Merci à toi, **Sophie,** pour ta grande disponibilité et pour m'avoir partagé l'ensemble de tes connaissances techniques et théoriques au début de mon diplôme.
Merci pour ton aide au quotidien malgré ton changement d'équipe et surtout un grand merci pour ta gentillesse et pour ta confiance renouvelée !

Un énorme merci à toi **Alan**, la réalisation de ce projet dans de bonnes conditions n'aurait pas été possible sans ton implication, ton suivi, ton soutien et tes conseils avisés. Travaillé avec toi durant ces années a été un réel plaisir et a été extrêmement bénéfique pour moi.

Un grand merci à vous **Daniel** et **Cédric,** collaboré avec vous sur ce projet a été un réel plaisir. Partager et discuter sur l'avancé de ces travaux a toujours été bénéfique pour le bon déroulement de cette étude et très instructif.

Un grand merci à **Mathilde Bouchet** de la plateforme AniRa-ImmOs de la SFR Biosciences de Gerland, pour son importante aide dans chacune des analyses d'os au microtomographe, notamment pour la réalisation de ces magnifiques images 3D.

Merci au **Pr François Vandenesch** et à l'ensemble de l'unité INSERM U1111, pour le partage de leurs connaissances scientifiques.

Merci à l'ensemble des membres du **Centre National de Référence des Staphylocoques**, en particulier à Michèle pour son aide et ses nombreux conseils, mais également à Caroline pour sa bonne humeur au quotidien et enfin à Emelyne qui m'a apporté son soutien depuis mon arrivée à la Croix Rousse.

Un grand merci à l'ensemble des Croix-Roussien ! Par ordre d'ancienneté à **Jason** de la Tasse mon compère masculin des débuts ; **Patricia** et sa bonne humeur légendaire ; **Yousef** avec un s ou deux on ne sait pas et **Virginie** « Tafa-Dyon » l'insociable, notamment pour leur magnifique formation en culture cellulaire ; **Andréa** « carapuce » ma compère de pause ; **Marine. B** la reine du *capitis* ; **Alice** « mini-pouce » ; **Marine** et **Sylvere** les empereurs du système binaire ; **Allison** ; **Lélia** et ses goûts musicaux douteux; **Marina** ma grande amie do Brazil et **Jerome** « le bucheron des Ardennes », sans oublier mon cher **Régis** ainsi que l'ensemble des 5AHU / étudiants master / internes passés dans l'équipe durant ces trois ans !

Un grand merci à mes amis et à ma famille pour leur soutien et encouragements.

Et pour finir, un énorme merci à **Gwladys** ma chérie, qui a réussi à me supporter durant ces trois années et qui m'a apporté un soutien sans faille. Tu as été d'un grand réconfort et tu as su m'épauler dans les périodes de doutes et de stress et m'a permis de mener à bien ce diplôme.

SOMMAIRE

SOMMAIRE **1**
TABLES DES FIGURES **4**
ABREVIATIONS **6**
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES **8**
I. Introduction : 9
A. Les Staphylocoques 9
a. Généralités 9
b. Colonisation et infection 10
B. L'os 13
a. Généralités 13
b. Les cellules osseuses 16
1. Les ostéocytes. 16
2. Les ostéoclastes 16
3. Les ostéoblastes 17
Généralités 17
La différenciation 17
La minéralisation de la matrice osseuse 19
c. Le remodelage osseux 21
C. Infections et remodelage osseux 24
a. Généralité 24
b. Les infections ostéoarticulaires 24
1. Généralité 24
2. Des IOA aiguës aux IOA chroniques. 25
II. Problématique 28
MATERIELS ET METHODES **30**
I. Les bactéries 31
A. Description, conservation et caractérisation des souches 31
B. Préparation des souches bactériennes fluorescentes 31
II. Culture cellulaire 32
A. Préparation des lignées cellulaires d'ostéoblaste OBβ_1 32
B. Paramètres de viabilité, différenciation et minéralisation étudiés 32
a. Viabilité cellulaire par la méthode MTT 32
b. Mesure de la phosphatase alcaline (PAL) 33
c. Quantification de la minéralisation osseuse 33

d. Expression de gènes cibles par qRTPCR 35
1. Extraction d'acide ribonucléique (ARN) eucaryote 35
2. Passage de l'ARN à l'ADNc par méthode transcription inverse 36
3. Analyse PCR quantitative 36
III. Modèle d'infection *in vitro,* méthode de protection à la gentamicine (GPA) 37
A. Notion de « Multiplicity of Infection » (MOI) 37
B. Préparation des ostéoblastes et des bactéries pour l'infection. 37
C. Infections des ostéoblastes 40
D. Détermination du nombre de bactéries adhérées 41
E. Détermination du nombre de bactéries internalisées 41
F. Inhibiteurs pharmacologiques 41
IV. Modèle d'infection *in vivo* 42
A. Modèle murin d'ostéomyélites 42
B. Analyses des os par microtomographie à rayons X 43
RESULTATS 44
I. Impact d'une infection à *S. aureus* sur modèle *in vivo* murin 45
II. Création et mise au point d'un modèle d'infection ostéoblastique *in vitro* 48
A. Création de lignées immortelles d'OB murins 48
B. Caractéristiques du couple isogénique de souches de *S. aureus* 48
C. Mise au point du modèle *in vitro* de minéralisation 50
III. Impact d'une infection à *S. aureus* sur les OB 52
A. Effet sur la différenciation cellulaire des OB de l'infection à *S. aureus* 52
a. Mesure du taux d'activité PAL par cellule viable 52
b. Analyse des marqueurs de la différenciation par qRTPCR 54
B. Effet de l'infection à *S. aureus* sur la minéralisation des OB 58
a. Coloration des dépôts calciques par méthode au rouge alizarine 58
b. Analyse des marqueurs de la minéralisation par qRTPCR 60
C. Effet de l'infection à *S. aureus* sur modèle *in vivo* murin 63
IV. Étude de la voie de l'internalisation de *S. aureus* dans les OB 66
A. Etude de la cavéoline 66
a. Mesure des taux d'adhésion et d'internalisation 69
b. Marquage fluorescent et analyse au microscope confocal 72
B. Lignées mutantes 74
a. Mesure des taux d'adhésion et d'internalisation 74
C. Inhibiteurs pharmacologiques de molécules de signalisation et du trafic membranaire 76
a. Effet bactéricide des inhibiteurs pharmacologiques 78

b. Effet des inhibiteurs seuls et en association sur les taux d'adhésion et d'internalisation 80
CONCLUSION / PERSPECTIVES 82
BIBLIOGRAPHIE 92

TABLES DES FIGURES

Figure 1 : *S. aureus* observé sous microscope optique après coloration de Gram 9
Figure 2 : Représentation schématique de la paroi des bactéries Gram-positives et Gram-négatives 10
Figure 3 : Taux de portage de *S. aureus* chez l'adulte par site corporel 11
Figure 4: Les différents mécanismes physiopathologiques de *S. aureus* 13
Figure 5 : Représentation de l'os cortical et de l'os trabéculaire 14
Figure 6 : Composition de l'os spongieux : Les trabécules 14
Figure 7 : Os trabéculaire normal et os trabéculaire ostéoporotique 15
Figure 8 : La résorption osseuse par les ostéoclastes. 17
Figure 9 : La différenciation ostéoblastique 19
Figure 10 : Chronologie de la minéralisation osseuse 20
Figure 11 : Composant de la matrice minérale osseuse 20
Figure 12 : Rôle des ostéoclastes et des ostéoblastes dans la régulation du tissu osseux 21
Figure 13 : Remodelage osseux et ses pathologies associées 22
Figure 14 : Mécanisme d''internalisation de *S. aureus* via la voie de l'intégrine α5β1 et de la fibronectine 26
Figure 15 : Internalisation de particules dans des ostéoblastes humains MG63 en présence de couches de cavéolines 27
Figure 16 : Préparation des cellules et bactéries pour l'infection 37
Figure 17 : Modèle d'infection Gentamycin Protection Aassay (GPA) 40
Figure 18 : Reconstruction en 3D d'un os contrôle et infecté 45
Figure 19 : Effet sur l'os trabéculaire de l'infection par *S. aureus* dans un modèle murin in vivo. 46
Figure 20 : Effet d'une infection à *S. aureus* sur modèle murin *in vivo* au niveau de l'os cortical 47
Figure 21 : Evaluation des taux d'internalisation pour la lignée murine $OB\beta_1^{+/+}$ 49
Figure 22 : Modèle *in vitro* de différenciation et de minéralisation d'OB murins. 50
Figure 23 : Mesure de l'activité PAL et coloration des dépôts calciques 51
Figure 24: Impact de l'infection sur le nombre de cellules et l'activité PAL à J5 53
Figure 25 : Evaluation de l'expression des gènes de la différenciation 56
Figure 26 : Analyse quantitative des dépôts calciques par coloration en rouge d'alizarine. 59
Figure 27 : Evaluation de l'expression des gènes de la minéralisation à J3 et J5 61
Figure 28 : Reconstruction en 3D d'os de fémurs à 7 jours post infection 63
Figure 29 : Effet sur l'os trabéculaire de l'infection par *S. aureus* dans un modèle murin *in vivo* à J7 64
Figure 30 : Représentation graphique de l'internalisation d'un virus par une cellule hôte 67
Figure 31 : La cavéoline, protéine de la membrane plasmique des ostéoblastes 68

Figure 32 : Adhésion et internalisation dans des lignées murines mutées ou non pour la cavéoline 70
Figure 33 : Analyse au microscope confocal des lignées mutées pour la cavéoline après infection 72
Figure 34 : Activation des protéines Src et Rac1 en aval de l'intégrine β1 73
Figure 35 : Adhésion et internalisation dans des lignées murines mutées pour les protéines Src et Rac1 75
Figure 36 : Transport de Rac1 à la membrane plasmique et activation de Pak1 induisant l'endocytose 77
Figure 37 : Analyse de l'effet bactéricide des inhibiteurs pharmacologiques 79
Figure 38 : Taux d'adhésion et d'internalisation en présence d'inhibiteurs seuls et en associations 80
Figure 39 : Composition des cavéoles et liens avec les fibres de stress et le cytosquelette d'actine 87

ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ATB : Antibiotique

ARN : Acide ribonucléique

BCC : Bouillon cœur cervelle

BMC : Bone mineral content (Contenu minéral de l'os)

BMD : Bone mineral density (Densité minérale de l'os)

CASFM : Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie

CNRS : Centre national de la recherche scientifique

COL1A : Collagène de Type I

COS : Columbia + 5%de sang de mouton

DMSO : Diméthylsulfoxide

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DRM : Detergent resistant membrane

DO : Densité optique

EDTA : Ethylène-diamine-tétra-acétique

FACS : Fluorescence activated cell sorting

FGF : Fibroblast growth factors

Fn : Fibronectin

FnBP : Fibronectin binding protein

GFP : Green fluorescent protein

GPA : Gentamicin protection assay

HK : Heat-killed

IGF : Insulin-like growth factors

IL: Interleukine

IOA : Infections ostéo-articulaires

MCC : Milieu de culture complet

M-CSF : Macrophage colony-stimulating factor

MOI : Multiplicity of infection (Nombre de bactéries par cellules)

OB : Ostéoblastes

OC : Ostéoclastes

OPG : Ostéoprotégérine

PAL : Phosphatase alcaline

PBS : Phosphate buffer saline

PCR : Polymerase chain reaction

PGE2 : Prostaglandine E2

PSM : Phenol soluble modulin

PVL : Panton-Valentine leucocidine

RT-PCR : Reverse transcriptase polymerase chain reaction

qRTPCR : Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction

RPM : Rotations par minute

Spa : Staphylococcal protein A

SVF : Sérum de veau fœtal

TGF-β : Transforming growth factors beta

TNF-α : Tumor necrosis factor α

TSA : Trypto-caséine soja

TSST : Toxine du choc toxique staphylococcique

UFC : Unité formant colonie

αMEM : Minimal essential medium alpha

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I. Introduction :

A. Les Staphylocoques

a. Généralités

Le terme *Staphylococcus* provient de l'association des mots grecs « *Staphyle* », qui signifie « grappe de raisin », et de « *Kokkos* » qui signifie « graine ». En effet, les staphylocoques ont été mis en évidence pour la première fois par Sir Alexander Ogston et Louis Pasteur, notamment lorsque ce dernier a observé après la mise en culture de pus de furoncle « un organisme unique, formé de petits points sphériques réunis en couple de 2 grains, rarement de 4 mais fréquemment associés en amas» (Ogston 1881).

Le genre *Staphylococcus*, de la famille des Staphylococcaceae, est un des genres bactériens le plus décrit et étudié, notamment avec l'espèce *S. aureus* car elle représente environ 30% des infections communautaires et 30% des infections nosocomiales.

Les bactéries de cette espèce sont des cocci d'environ 1 µm de diamètre, aéro-anaérobie facultatifs, asporulés, immobiles et habituellement disposés en amas ou en paires à l'examen microscopique, comme observé ci-dessous après coloration de Gram (figure 1).

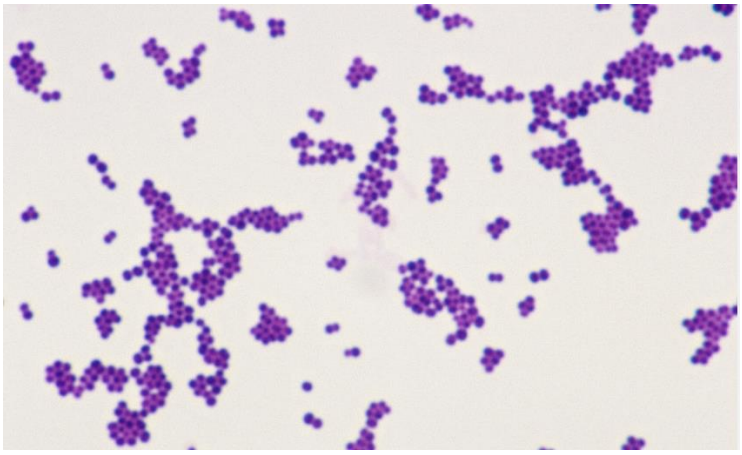


Figure 1 : S. aureus observé sous microscope optique après coloration de Gram
Source: Michael Abbey/Visuals Unlimited, Inc.

Cette technique marque les peptidoglycanes de la paroi. Lorsque celle-ci est très épaisse le cristal violet, même après un lavage en présence d'alcool, est retenu et les bactéries apparaissent alors violettes et sont dites à coloration de Gram positif, c'est le cas de *S. aureus*.

A l'inverse, les bactéries dites à coloration de Gram négatif possèdent une membrane externe et une paroi fine moins riche en peptidoglycanes (figure 2), qui ne fixe pas et ne retient pas le cristal violet sous l'effet du lavage à l'alcool, et se colorent en rose lors de l'ajout de la fuschine.

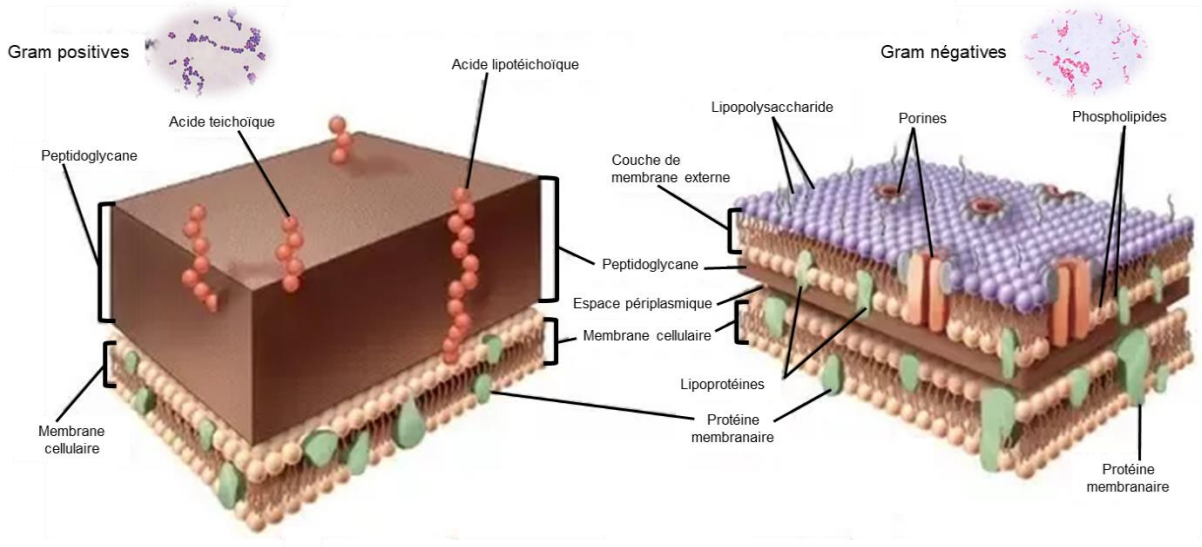


Figure 2 : Représentation schématique de la paroi des bactéries Gram-positives et Gram-négatives
Source: d'après "Copyright © The McGraw-hill companies, Inc."

Le genre *Staphylococcus* est défini comme étant neutrophile, halophile et mésophile, c'est-à-dire qu'il croît aussi bien en milieu présentant un pH neutre, une concentration forte en sel et à température modérée.
Comme l'ensemble des bactéries du genre *Staphylococcus*, *S. aureus* possède une catalase et une oxydase. Elles expriment en outre la protéine A, une coagulase et une nucléase thermostable qui permettent son identification, tout comme sa capacité à dégrader le mannitol sur gélose Chapman.

b. Colonisation et infection

S. aureus est un commensal de l'Homme et de nombreuses espèces animales (Sung, Lloyd, et Lindsay 2008). Chez l'Homme, elle colonise 25% des individus en dehors de tout contact hospitalier (2 milliards de personnes dans le monde), préférentiellement au niveau de la peau et des muqueuses, incluant sa niche préférentielle, la muqueuse nasale des narines antérieures.

Plusieurs autres sites de colonisation sont typiquement décrits pour cette espèce : le périnée et le pharynx et dans une moindre mesure le tractus gastro-intestinal, le vagin et les aisselles. Les différents sites de colonisation et la prévalence de positivité pour la population générale et pour les porteurs de *S. aureus* au niveau nasal sont représentés ci-dessous (figure 3).

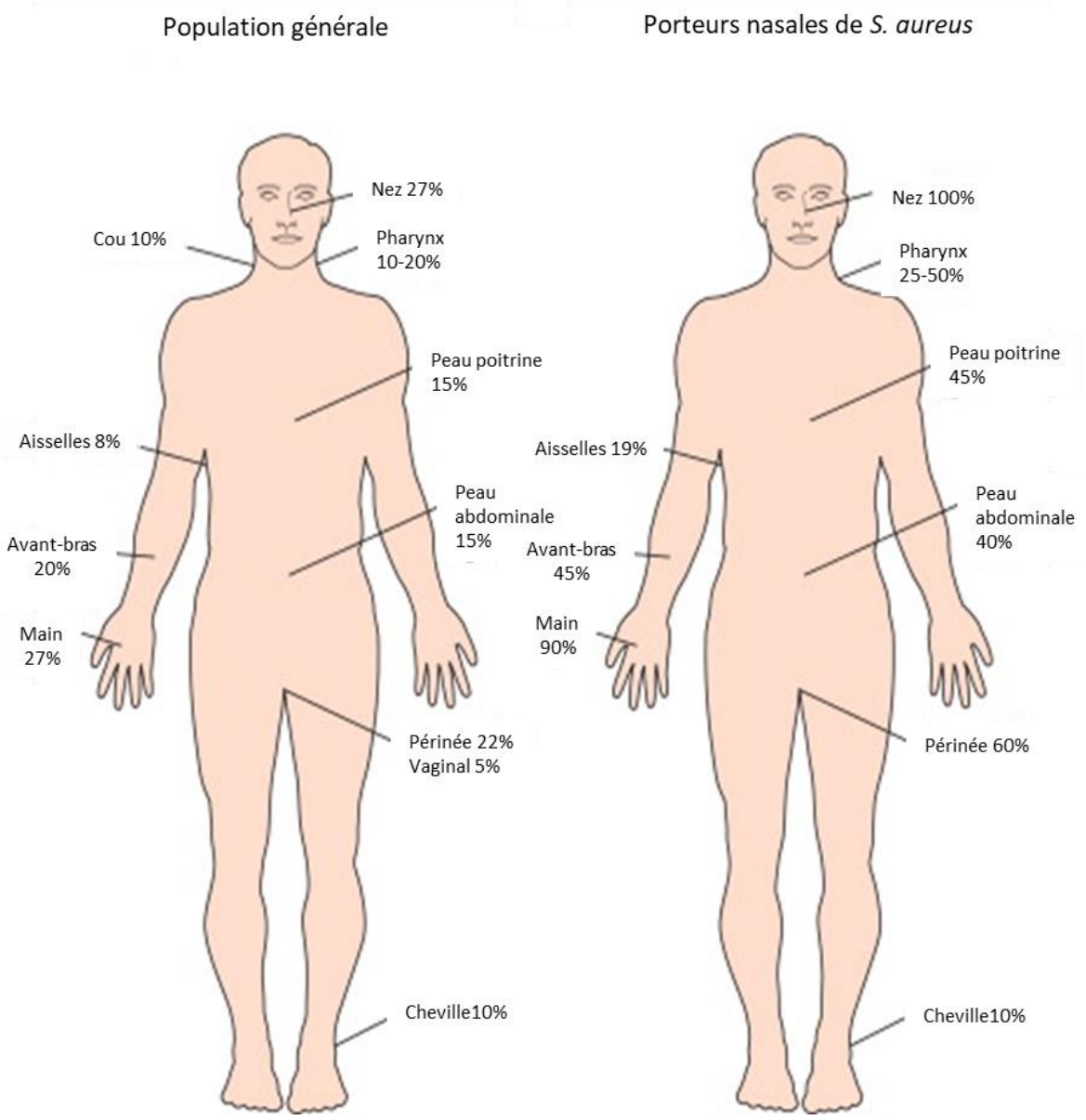


Figure 3 : Taux de portage de S. aureus chez l'adulte par site corporel
Source: d'après Dr Heiman FL Wertheim et al. "The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections"

La présence importante de *S. aureus* chez l'Homme est un facteur de risque important d'infections staphylococciques.

Parmi les nombreux mécanismes physiopathologiques de *S. aureus*, sa capacité à coloniser le matériel médical, notamment les cathéters ou les prothèses, est un facteur important (Tande et Patel 2014). Cette faculté favorise les infections et fait de cette bactérie l'un des principaux agents infectieux responsable d'infections nosocomiales. Elle est également décrite comme l'espèce la plus fréquemment incriminée dans les infections communautaires, provoquant chaque année dans les pays industrialisés plus de décès que le VIH et la tuberculose réunis.

S. aureus est à l'origine de deux types de syndrome : les infections suppuratives et les toxémies staphylococciques (figure 4).
Les toxémies staphylococciques (figure 4A) sont liées à la libération de toxines, comme la leucocidine de Panton-Valentine (PVL) ou la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1), ou encore les entérotoxines retrouvées dans certains aliments contaminés qui ont un effet local et/ou général sur le système immunitaire dont elles induisent la destruction ou à l'inverse la sur-activation.
Les infections suppuratives (figure 4B), quant à elles, impliquent une prolifération bactérienne, avec invasion, une destruction des tissus de l'hôte, une réponse cellulaire et inflammatoire locale et/ou systémique. Ce sont principalement des infections de la peau et des muqueuses avec apparition d'abcès, de furoncles ou encore de folliculites qui peuvent se compliquer de septicémie. La sévérité de ces infections varie avec le pouvoir invasif de la souche de *S. aureus*, qui repose sur sa capacité à envahir l'hôte, à y proliférer et potentiellement à induire la destruction des tissus. Ces infections entrainent une réponse immunitaire avec afflux de polynucléaires et de macrophages constituant le « pus ». Ces infections peuvent également se compliquer et entraîner des infections profondes telles que des pneumopathies, des endocardites, ou des infections ostéo-articulaires (IOA). Notre sujet d'étude s'est spécifiquement intéressé à ces IOA à *S. aureus,* qui induisent une destruction du tissu osseux.

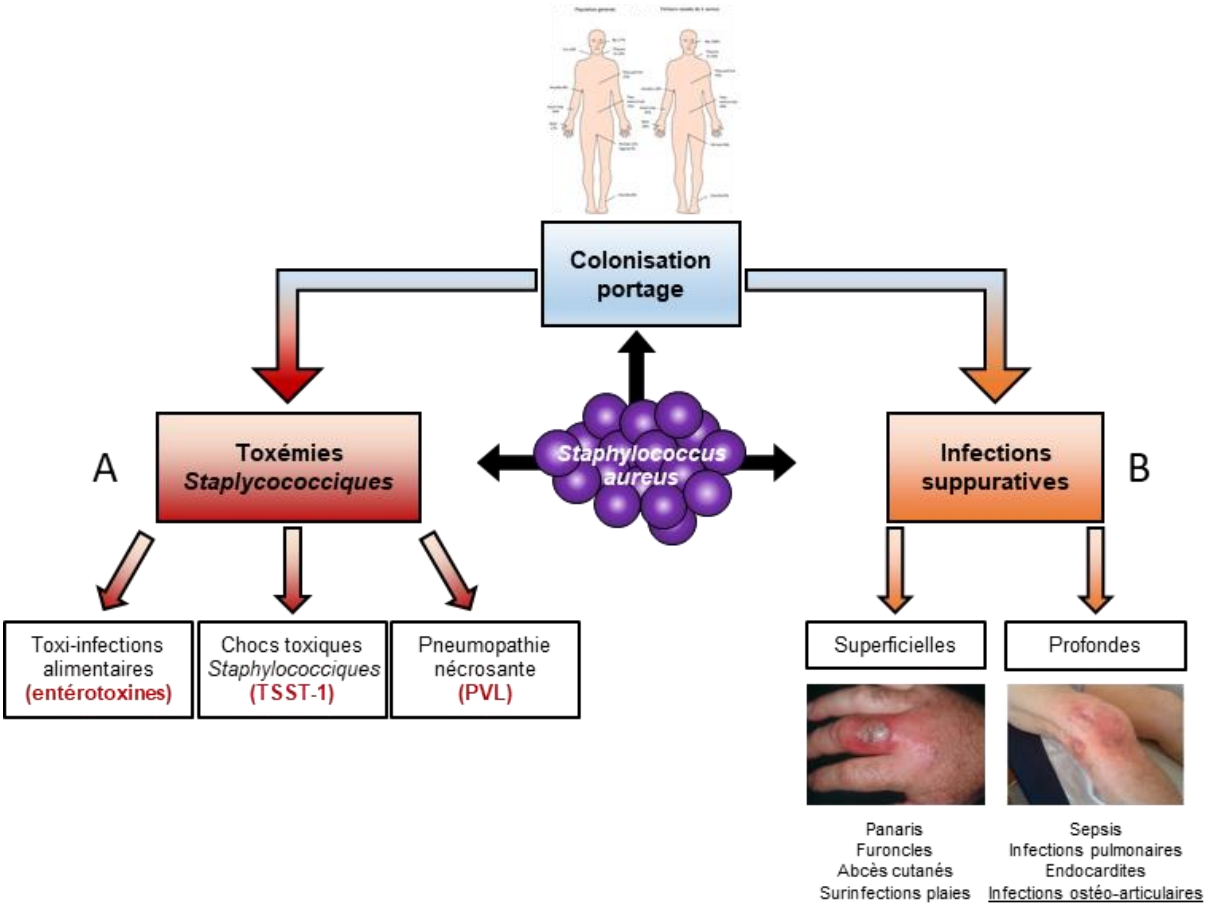


Figure 4: Les différents mécanismes physiopathologiques de S. aureus

Source : Equipe pathogénie des Staphylocoques – U1111

B. L'os

a. Généralités

Les os sont les composants du squelette humain. L'os est décrit comme un tissu conjonctif solidifié permettant d'assurer plusieurs fonctions : i) protection des organes vitaux (cage thoracique, boîte crânienne), ii) mécanique en tant que support du poids de l'organisme, iii) contenance de la moelle osseuse et iv) métabolique avec le stockage des minéraux en particulier du calcium et du phosphore.

Il est constitué d'une phase minérale (60%), d'une matrice organique (35%) elle-même composée essentiellement de collagène de type I et enfin d'une structure minéralisée poreuse (5%) formée de vaisseaux, de cristaux de calcium (hydroxyapatite) et de cellules spécifiques. Selon le type d'os, sa localisation et sa fonctionnalité, la proportion des différents composants peut varier.

Les processus de différenciation des cellules osseuses sont régulés par l'expression de gènes, comme RUNX2, le principal régulateur, établissant dans un premier temps une structure squelettique en cartilage et mésenchyme, sous forme de bâtonnet ou de lame selon la nature de l'os (os long ou os plat). D'autres gènes, comme le « transforming growth factors » (TGF) ou « l'insulin-like growth factors » (IGF), sont ensuite exprimés pour induire la minéralisation de cette structure cartilagineuse afin de conduire à la formation de l'os mature composé d'os cortical dur et d'os trabéculaire spongieux (figures 5 et 6).

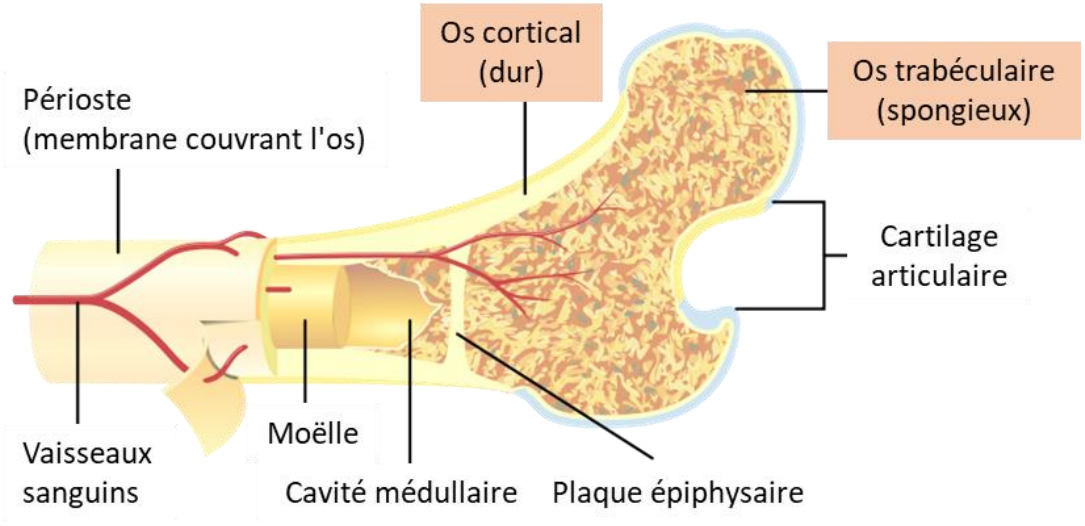


Figure 5 : Représentation de l'os cortical et de l'os trabéculaire

Source : adapté d'après « Bone cross-section » Biology Dictionary

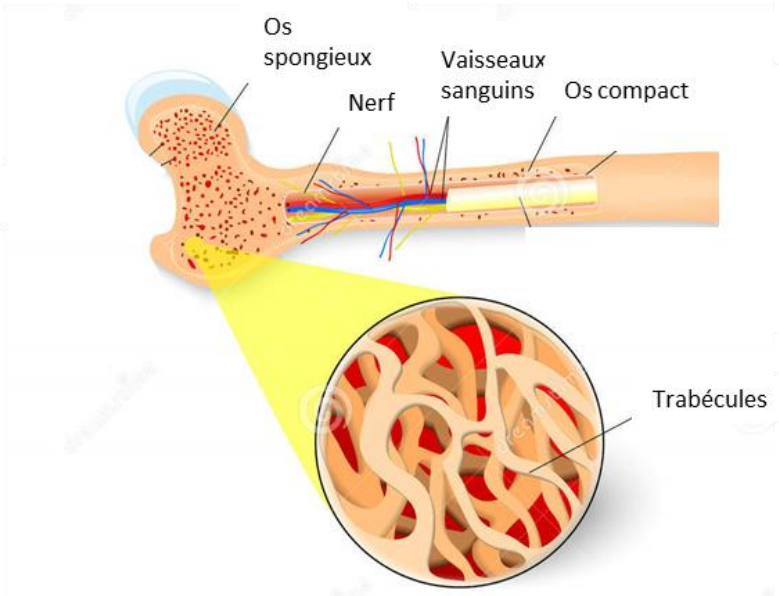


Figure 6 : Composition de l'os spongieux : Les trabécules

Source : adapté d'après « Bone anatomy » - Libre accès

L'os cortical représente 80% du tissu osseux humain et constitue la partie externe des structures squelettiques. Il est en grande partie calcifié donc dense, compact et avec un renouvellement lent. Ses fibres de collagène sont orientées de façon à lui conférer une résistance mécanique optimale à la flexion et à la torsion. Il a aussi une fonction de protection et peut participer aux réponses métaboliques, en particulier en cas de déficit minéral sévère ou prolongé.

L'os trabéculaire, lui, représente 20% de la masse squelettique. Il est spongieux et situé à l'extrémité des os longs (métaphyse) et dans la partie centrale des os plats et des os courts. L'os trabéculaire est plus élastique, moins dense et présente un taux de renouvellement plus élevé que l'os cortical. Il est constitué de lamelles osseuses irrégulières que l'on nomme les trabécules (figure 5). Cette organisation tridimensionnelle en structure alvéolaire (figure 6) lui confère une résistance mécanique qui contribue à la fonction de support, en particulier dans les os tels que les vertèbres. Il fournit également les réserves initiales de minéraux dans les états de carence aiguë. Par exemple dans les cas d'ostéoporose, l'os trabéculaire va être affecté, ce qui se traduit par une forte perte de la densité et des connections osseuses (figure 7).



Figure 7 : Os trabéculaire normal et os trabéculaire ostéoporotique
Source : Laboratoire Servier

Que ce soit pour les cas pathologiques comme l'ostéoporose ou pour la formation du tissu osseux, 3 types de cellules spécifiques de ce tissu osseux agissent de manière coordonnée : les ostéoblastes (OB), les ostéoclastes (OC) et les ostéocytes.

b. Les cellules osseuses

1. Les ostéocytes.

Ces cellules, les plus abondantes de l'os, sont incluses dans la matrice osseuse et sont reliées entre elles et avec les cellules de la surface osseuse par des extensions de la membrane cytoplasmique. Les ostéocytes sont les cellules qui orientent dans l'espace l'activité des ostéoblastes et ainsi adaptent l'architecture osseuse pour assurer une résistance maximale aux contraintes physiques. Ils sont espacés régulièrement et forment un réseau de communication. Ils sont sensibles aux stimuli mécaniques et détectent le besoin d'une augmentation ou d'une diminution de la formation osseuse dans le processus d'adaptation fonctionnelle ou en cas de micro-fractures (Bonewald 2011).

2. Les ostéoclastes

Ces cellules sont les principales cellules responsables de la résorption osseuse. Ce sont de grandes cellules multinucléées (de 50 à 100 µm de diamètre) issues de la différenciation des cellules de la lignée monocyte / macrophage induite par des facteurs tels que des cytokines (Trouillet-Assant et al. 2015). Cette différentiation est initiée et contrôlée par deux facteurs principaux, le macrophage stimulating factor (M-CSF) et le RANK-Ligand (Couret 2004) sécrétés par les cellules pré-ostéoblastiques.

Les ostéoclastes fonctionnent de manière cyclique, alternant i) des phases de migration le long de la surface osseuse, où la maturation des ostéoclastes va être induite par des contacts directs avec différents types cellulaires et par des molécules synthétisées par les cellules stromales ; et ii) des phases de résorption active grâce à la libération en grande quantité de phosphatase acide, résistante au tartrate, pour créer des lacunes osseuses (figure 8).

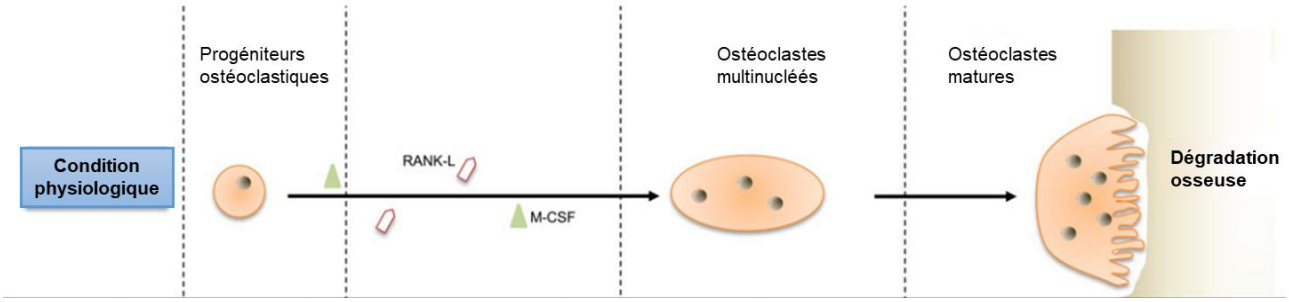


Figure 8 : La résorption osseuse par les ostéoclastes.
Source : adapté d'après Assant-Trouillet et al. 2014

3. Les ostéoblastes

Généralités

Les ostéoblastes prolifèrent le long de fines plaques osseuses arrangées en réseau de fils entrelacés et irréguliers, appelées travées osseuses (Hadjidakis et Androulakis 2006). Leur fonction principale est de synthétiser et de minéraliser la matrice osseuse au cours de la croissance du squelette, puis de renouveler ou réparer cette matrice chez l'adulte. Les ostéoblastes sont produits au niveau de l'os trabéculaire, où des clones de cellules souches pluripotentes, provenant de la moelle osseuse, prolifèrent pour donner des cellules ostéoprogénitrices. La différenciation en ostéoblastes s'opère après l'arrêt de cette prolifération initiale (Couret 2004).

La différenciation

La production des OB se fait en deux étapes : la prolifération des cellules ostéoprogénitrices puis la différenciation de ces cellules (figure 9). La différenciation se subdivise elle-même en trois étapes, caractérisées par l'expression de facteurs de transcription ou de marqueurs fonctionnels particuliers, le passage de la cellule indifférenciée en pré-OB, puis de pré-OB en OB (immature et mature) et enfin le devenir des OB matures. La première partie (stade précoce de la différenciation) voit la cellule indifférenciée devenir un pré-ostéoblaste. Cette maturation est caractérisée notamment par l'expression du facteur de transcription *RUNX2*, gène appartenant à la famille des facteurs de transcription *RUNX* et marqueur précoce de la différenciation ostéoblastique.

Ce facteur régule principalement l'expression des protéines majeures de la matrice osseuse et inhibe la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en chondrocytes et adipocytes. En fin de phase on note le début d'expression d'un facteur de transcription spécifique aux ostéoblastes, Osterix (*OSX*). Ce facteur est ensuite sécrété et exprimé tout le long de la différentiation par les progéniteurs ostéoblastiques et joue un rôle essentiel au niveau de la formation osseuse et de l'homéostasie osseuse au cours des phases tardives de la différenciation.
La seconde partie correspond au passage de pré-ostéoblastes à ostéoblastes immatures qui auront pour rôle de finaliser la synthèse de la matrice osseuse.

Enfin la maturation des OB se fait grâce à *OSX* et *RUNX2* qui forment un ensemble permettant de contrôler l'expression des marqueurs protéiques principaux. Il s'agit notamment du collagène de type I (*COL1A*) composant majoritaire de la matrice osseuse, et la phosphatase alcaline (*PAL*) enzyme ayant une activité majeure une fois la phase de prolifération enclenchée (Long 2012). La maturation des ostéoblastes permet de minéraliser cette matrice socle récemment produite, par le dépôt d'ions calcium et phosphate qui vont former des cristaux d'hydroxyapatite.

La troisième et dernière phase de la différenciation correspond au devenir des ostéoblastes matures, une fois le dépôt de la matrice minérale terminée. Trois destins sont alors possibles : i) soit ces OB meurent par apoptose, ii) soit ils sont emmurés dans la matrice minéralisée et évoluent alors en ostéocytes (10 à 20% des ostéoblastes), iii) soit ils se transforment en cellules bordantes (figure 9).

Ces dernières ont une activité métabolique très réduite et une forme plus aplatie et jouent le rôle de cellules de « secours » pouvant être activées et se différencier en ostéoblastes selon les processus expliqués auparavant.

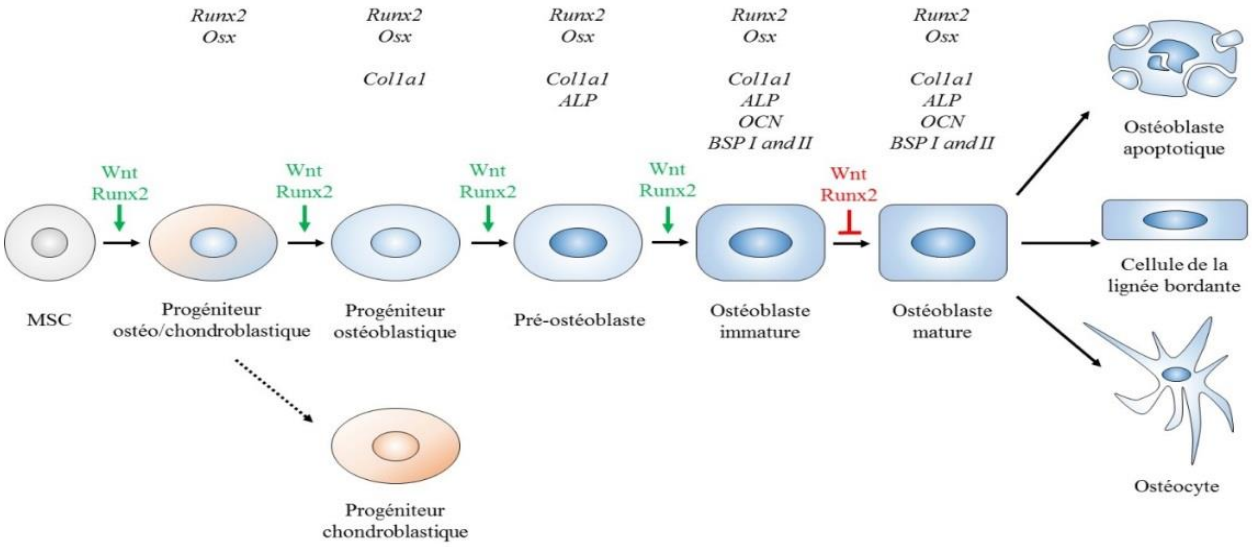


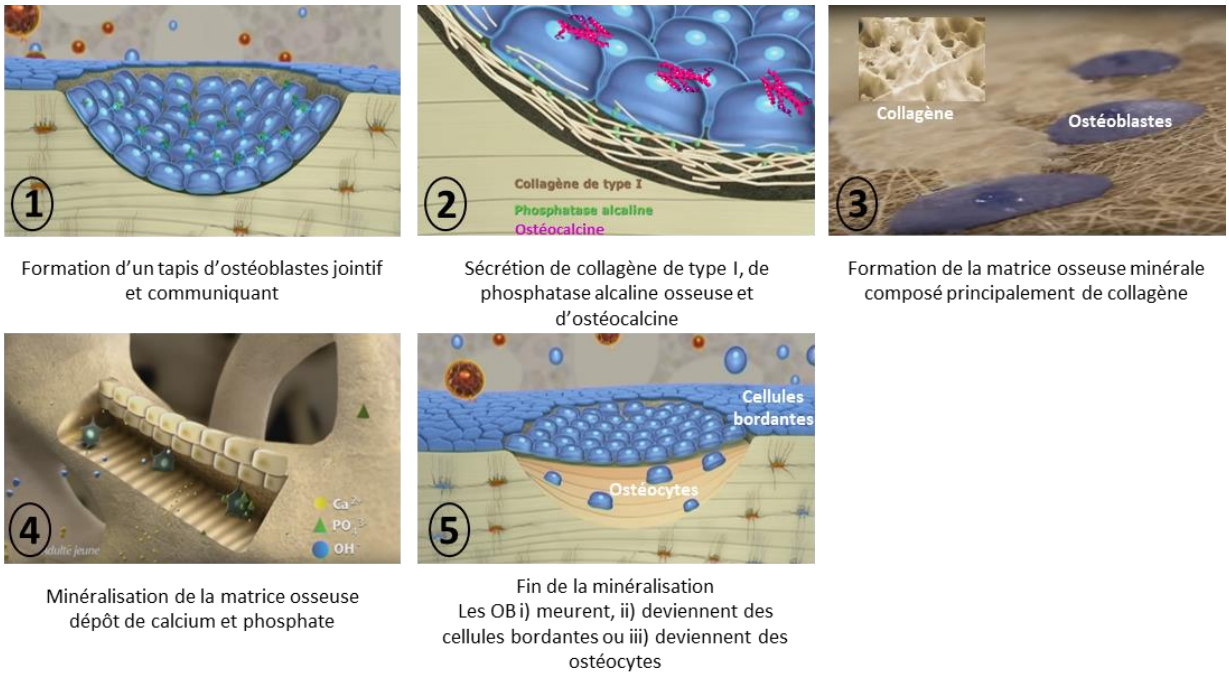
Figure 9 : La différenciation ostéoblastique

Source : Thèse de Jerôme Josse, « Impact de l'infection à Staphylococcus aureus sur le microenvironnement osseux ».

La minéralisation de la matrice osseuse

Une fois la différenciation de la lignée ostéoblastique achevée, les ostéoblastes matures nouvellement formés vont synthétiser et déposer une matrice osseuse organique qui va servir de socle à la minéralisation (figure 10). Comme décrit précédemment, la matrice organique est principalement composée de fibres de collagène de type I (figure 10-2 et Figure 11) sécrétées par les ostéoblastes organisés en tapis cellulaire jointif et communicant (figure 10-1). Ces fibres sont composées de fibrilles de collagène (figure 11-2) reliées entre-elles par des liaisons covalentes (appelées généralement « cross-link »). Ces fibrilles sont ensuite minéralisées grâce à la formation de cristaux d'hydroxyapatite (figure 11-3). Cette étape requiert la sécrétion de phosphatase alcaline (*PAL*) osseuse (figure 10-2), une enzyme normalement ancrée à la surface des ostéoblastes mais qui est libérée dans la matrice extracellulaire lors du bourgeonnement des vésicules de minéralisation. Cette enzyme hydrolyse les inhibiteurs de la déposition minérale et libère ainsi du phosphate inorganique. Ce phosphate, tout comme le calcium du milieu extracellulaire, est capté par les OB matures qui les concentrent dans des vésicules. Le relargage de ces ions permet la formation de cristaux d'hydroxyapatite (50 à 70 % du tissu osseux) au niveau des fibrilles de collagène. Les cristaux sont présents à la surface et à l'intérieur des fibrilles de collagène et vont augmenter en nombre, en taille et en répartition au cours de la minéralisation.

A maturité les ostéoblastes expriment et produisent également d'autres protéines ayant un rôle dans la régulation de la minéralisation (Blair et al. 2017). C'est le cas de l'ostéocalcine qui joue un rôle dans la minéralisation des ostéoblastes en contrôlant la synthèse de la matrice et en se liant aux ions calcium et à l'hydroxyapatite (figure 11-2). Etant synthétisée par des ostéoblastes différenciés, elle est classiquement utilisée comme un marqueur tardif de l'activité ostéoblastique (Fujisawa 2012).



Formation d'un tapis d'ostéoblastes jointif et communiquant

Sécrétion de collagène de type I, de phosphatase alcaline osseuse et d'ostéocalcine

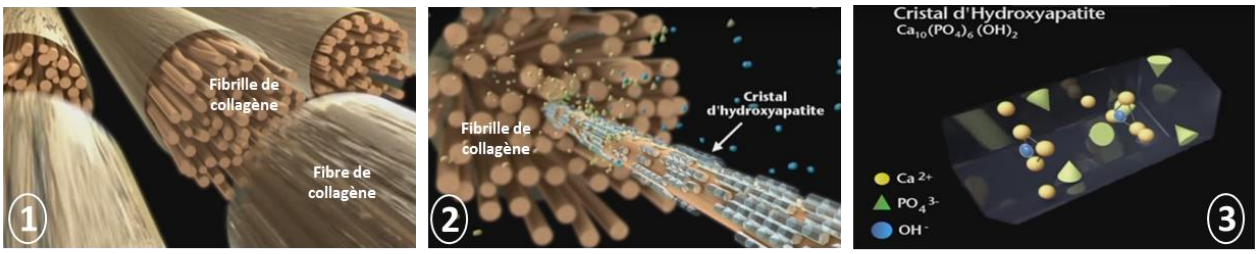
Formation de la matrice osseuse minérale composé principalement de collagène

Minéralisation de la matrice osseuse dépôt de calcium et phosphate

Fin de la minéralisation
Les OB i) meurent, ii) deviennent des cellules bordantes ou iii) deviennent des ostéocytes

Figure 10 : Chronologie de la minéralisation osseuse

Source : adapté d'après Servier Techblog « L'os un tissu vivant ».



Fibres et fibrilles de collagène :
Composants de la matrice osseuse

Cristallisation des fibrilles :
dépôt de calcium et phosphate
Formation d'hydroxyapatite

Cristal d'hydroxyapatite
Composé d'ion calcium et phosphate

Figure 11 : Composant de la matrice minérale osseuse

Source : adapté d'après Servier Techblog « L'os un tissu vivant ».

Au sein de l'os, les différents types cellulaires ont un rôle spécifique et unique à chacun. Néanmoins leurs activités sont étroitement liées, plus particulièrement en ce qui concerne la formation / minéralisation de la matrice osseuse et sa résorption, régulées respectivement par les ostéoblastes et les ostéoclastes. L'équilibre entre ces activités antagonistes permet le bon fonctionnement général du microenvironnement osseux, et est central au remodelage osseux physiologique.

c. Le remodelage osseux

L'os est un tissu dynamique qui, pour maintenir un squelette sain et exécuter efficacement et durablement ses fonctions principales, est constamment remodelé.
Ce remodelage nécessite un équilibre subtil entre l'activité de résorption osseuse assurée par les ostéoclastes et la minéralisation osseuse réalisée par les ostéoblastes (figure 12) (Feng et McDonald 2011).

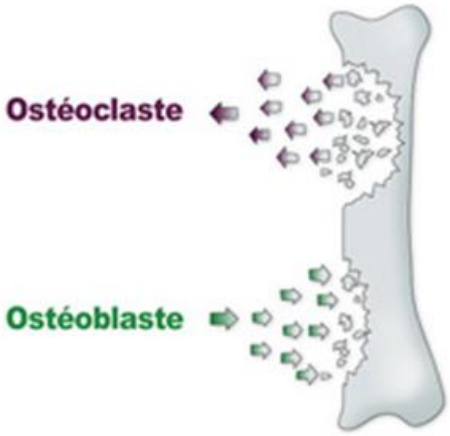


Figure 12 : Rôle des ostéoclastes et des ostéoblastes dans la régulation du tissu osseux
Source : http://www.astrazeneca.fr/sante/rectocolite/rectocolite_conseils_MICI_demineralisation.asp

En effet, un déséquilibre au niveau de l'activité de ces deux types cellulaires peut être responsable de pathologies du remodelage osseux. Par exemple, une activité ostéoclastique trop importante ou une activité ostéoblastique diminuée peuvent entrainer une perte de résistance des os, responsable de l'ostéoporose, pathologie fortement décrite et communément appelée « maladie des os de verre ».
A l'inverse, une activité ostéoblastique accrue et incontrôlée peut entrainer une augmentation anormale de la densité osseuse, responsable de pathologies telles que l'ostéoclérose ou l'ostéopétrose (figure 13).

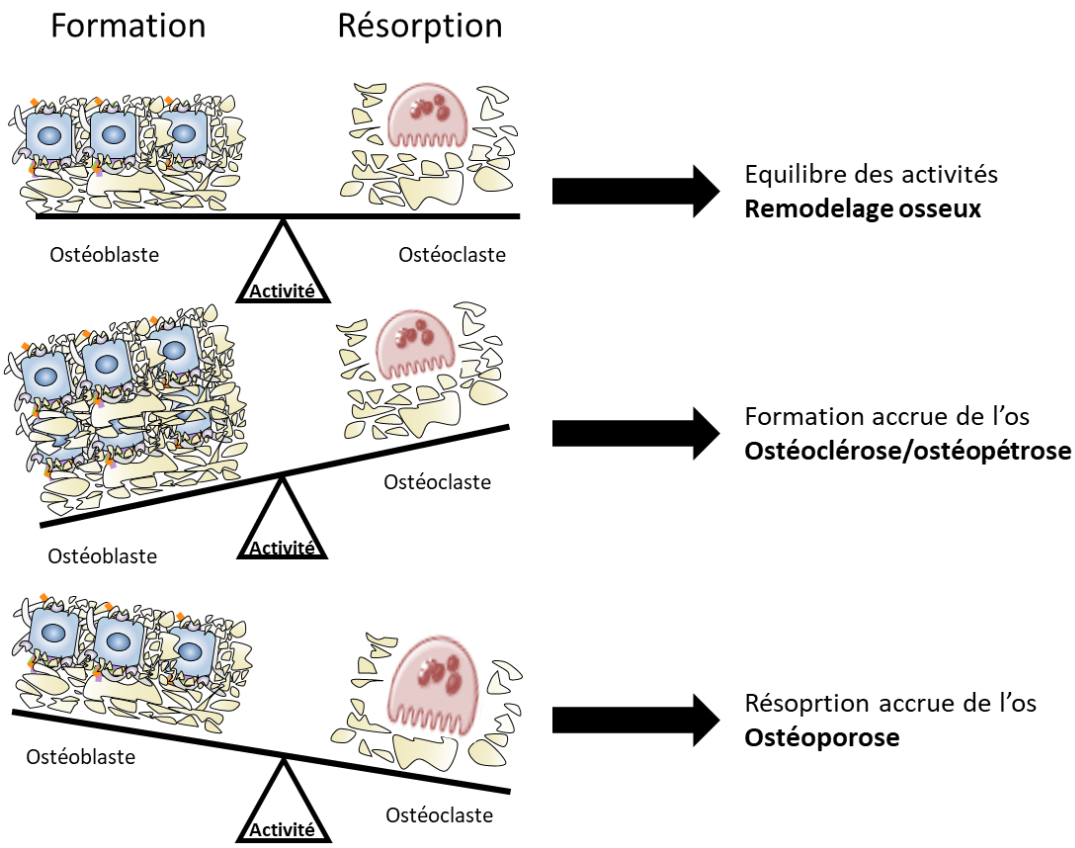


Figure 13 : Remodelage osseux et ses pathologies associées

Source : Equipe pathogénie des Staphylocoques –U1111

Les pathologies osseuses sont décrites comme étant issues d'une dérégulation de l'activité des ostéoclastes et donc de la résorption osseuse. Néanmoins comme décrit précédemment, les ostéoblastes sont les principaux régulateurs de l'activité des ostéoclastes. Indirectement ils jouent donc également un rôle majeur dans les pathologies osseuses. Tout dysfonctionnement du recrutement, de la différenciation ou du fonctionnement de l'ostéoblaste peut conduire à des anomalies de l'ostéogenèse et à une pathologie osseuse. C'est par exemple le cas dans les ostéogénèses imparfaites de type IV qui induisent un gain de fonction au niveau des ostéoblastes, conduisant à une hyperactivité de minéralisation tissulaire et à une diminution de l'expression de collagène de type I (Reich et al. 2015).

Au niveau d'un site osseux fissuré ou fracturé, la mort par apoptose des ostéocytes rompt la communication avec les ostéoblastes. Les pré-ostéoblastes vont alors sécréter de la prostaglandine E2 (PGE2) qui va permettre la rétraction des cellules bordantes, issues de la lignée ostéoblastique et recouvrant la majorité de la surface osseuse. Ceci a pour effet de donner accès à la surface osseuse fissurée/fracturée aux précurseurs ostéoclastiques, afin d'effectuer la résorption du site osseux endommagé. Pour ce faire, les cellules stromales se différencient en pré-ostéoblastes sécrétant notamment RANKL. Les pré-ostéoclastes présents dans l'environnement médullaire expriment RANK, le récepteur de RANKL, et la liaison RANKL-RANK permet leur recrutement par chimiotactisme. Entrainant ainsi la multiplication et la différenciation des ostéoclastes, ce qui aura pour effet d'activer et d'accroître leur activité de résorption osseuse au niveau du site à réparer (Vernejoul et Marie 1993; Boyce et Xing 2008).

Pendant cette phase de résorption, les ostéoclastes libèrent des facteurs de croissance *in situ* dans l'os profond, qui vont induire la différenciation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes matures. Une fois la résorption terminée, les ostéoblastes matures sont capables de limiter cette fonction des ostéoclastes en sécrétant de l'ostéoprotégérine (OPG) qui va se fixer sur le RANKL et ainsi bloquer la liaison RANK-RANKL (Simonet et al. 1997).

Dans un contexte inflammatoire, les ostéoblastes contrôlent également le remodelage osseux en sécrétant des cytokines. Notamment, l'interleukine-1 (IL-1) qui régule à la fois la résorption et la formation osseuse et l'IL-6 qui joue un rôle crucial pour la régulation du métabolisme osseux et est particulièrement impliquée dans un remodelage osseux accru. Enfin, le « facteur de nécrose tumorale α » (TNF-α) joue également un rôle essentiel dans la physiopathologie osseuse en stimulant la résorption et en inhibant la formation osseuse (Hughes et al. 2006). La formation osseuse peut également être affectée par des facteurs de croissance qui vont influencer les fonctions critiques des ostéoblastes, telles que la synthèse de la matrice ou encore la différenciation. C'est notamment le cas des « fibroblasts growth factors » (FGFs), des « insulin-like growth factors » (IGFs), ou encore des membres de la famille des « transforming growth factors beta » (TGF-β) (Hughes et al. 2006).

En résumé, la formation physiologique de l'os et le remodelage osseux dépendent de l'équilibre entre la formation par les ostéoblastes et la résorption par les ostéoclastes de la matrice osseuse.

Cet équilibre subtil repose sur un système de régulation à la fois des activités cellulaires et chimiques très complexes, au sein duquel les ostéoblastes jouent un rôle majeur.

C. Infections et remodelage osseux

a. Généralité

Dans des conditions pathologiques, l'activité des ostéoblastes et/ou des ostéoclastes peut être affectée, entrainant une altération de l'homéostasie osseuse.

Ainsi, lors d'une infection bactérienne, on parle alors d'ostéomyélite, on observe une réponse inflammatoire avec de nombreux médiateurs chimiques dont on a présenté l'importance. On observe également un haut taux de mortalité des ostéoblastes infectés qui va avoir un impact fort sur le tissu osseux et se traduire par un plus faible taux de formation/minéralisation de la matrice osseuse.

De même, une infection peut également induire une augmentation de l'activité des ostéoclastes, traduite par une résorption accrue de la matrice osseuse (Trouillet-Assant et al. 2015). Dans ces deux cas, l'équilibre synthèse/résorption osseuse est perdu, avec comme conséquence une fragilisation et une forte perte osseuse (Rasigade et al. 2013). Les *staphylocoques*, et notamment *S. aureus*, sont une des espèces les plus prévalentes dans les infections ostéoarticulaires (IOA) et entrainent une perte de l'homéostasie osseuse.

b. Les infections ostéoarticulaires

1. Généralité

En France, la prévalence des IOA est d'environ 70 patients pour 100000 habitants par an. Elles sont associées à un taux assez faible de mortalité, de l'ordre de 5% soit environ 2000 décès/an, mais présentent un taux de morbidité important d'environ 40% faisant de ces infections un problème majeur de santé publique (Laurent et al. 2018). Le genre *Staphylococcus,* et plus précisément l'espèce *S. aureus,* est impliquée dans 30% à 75% de ces IOA et en représente la première étiologie.

Les IOA à *S. aureus* sont responsables de formes cliniques sévères, avec un taux important de rechute estimé en moyenne à 10 à 20 % mais qui peut atteindre 80 % dans les cas les plus graves. Les IOA surviennent majoritairement au niveau des membres inférieurs, avec en premier lieu la hanche puis le genou (respectivement 135000 et 85000 par an en France). Les personnes âgées de plus de 65 ans sont les plus touchés avec un taux d'infection de 1 à 3%.

Avec le vieillissement de la population, une augmentation continue du nombre de poses de prothèses articulaires est attendue, entrainant une augmentation mécanique du nombre d'IOA associées. L'un des problèmes majeurs associé à ces infections est leur chronicisation chez de nombreux patients. Les IOA chroniques sont des pathologies graves, difficiles à diagnostiquer et à soigner de manière efficace, nécessitant des interventions chirurgicales, des hospitalisations et des antibiothérapies de longue durée, qui peuvent engager le pronostic fonctionnel et vital du patient.

2. Des IOA aiguës aux IOA chroniques.

Les IOA caractérisées par une impotence et/ou une douleur brutale, évoluant sur quelques jours sont classiquement décrites sous l'appellation « aiguës » (Waldvogel et al. 1970). Par opposition, les IOA chroniques peuvent persister des mois ou des années après l'épisode initial, avec parfois des phases asymptomatiques longues, avant une rechute. Elles sont généralement caractérisées par une inflammation de bas grade accompagnée d'une destruction progressive du tissu osseux et cartilagineux (Trouillet-Assant et al. 2016; Bosse et al. 2005).

Trois facteurs principaux ont été proposés comme contribuant au développement de la chronicité des IOA à *S. aureus* : i) la faible diffusion des agents antimicrobiens dans le tissu osseux et l'acquisition de résistance aux antibiotiques empêchant l'éradication du réservoir bactérien (Landersdorfer 2009), ii) la formation de biofilms qui est un mode de croissance « sous protection » permettant à l'organisme de persister chez l'hôte, de se protéger du système immunitaire et limitant fortement la diffusion des agents antimicrobiens (Sanchez et al. 2013), et iii) l'internalisation des bactéries par les cellules présentes dans le tissu osseux, en particulier les ostéoblastes (John K. Ellington et al. 1999).

Cette internalisation intra-ostéoblastique de *S. aureus* est un facteur clé dans la physiopathologie des IOA chroniques, et a été étayée par des données cliniques et par des travaux expérimentaux *in vitro* et *in vivo* (J. K. Ellington et al. 2003; Josse, Velard, et Gangloff 2015). Les bactéries intracellulaires sont protégées des antibiotiques qui agissent en extracellulaire et échappent aux cellules du système immunitaire. Le compartiment intracellulaire agit comme une niche pour les bactéries, qui peuvent ainsi continuer à survivre et à se multiplier sans induire une forte réponse inflammatoire. La mort et la lyse de la cellule peut conduire à la libération des bactéries en dehors des cellules et de nouveau à des symptômes infectieux correspondant à une rechute bruyante de l'infection. Les principaux acteurs du processus d'internalisation de *S. aureus* par les ostéoblastes sont i) les intégrines β1 présentes à la surface de la cellule hôte, ii) la fibronectine (Fn) qui est un composant de la matrice extracellulaire (sécrétée notamment par les ostéoblastes) et iii) les protéines de liaison à la fibronectine « Fibronectin binding protein » ($FnBP_a$ et $FnBP_{b)}$ de liaison à la fibronectine présentes à la surface de *S. aureus* (figure 14) (Josse et al. 2017).

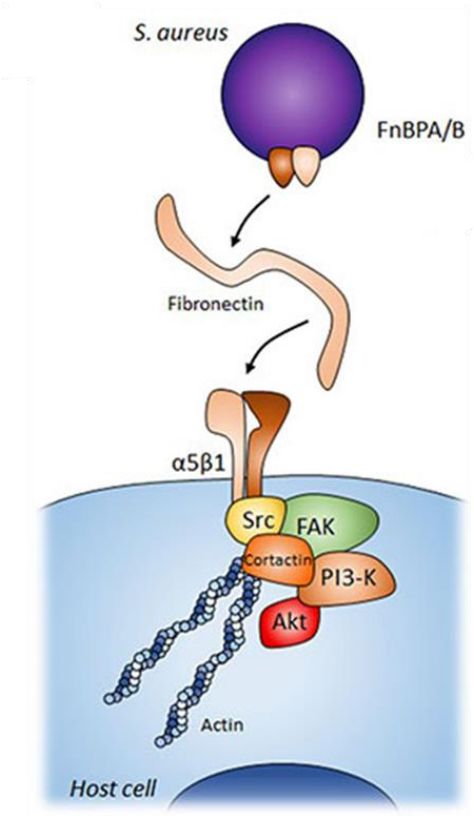


Figure 14 : Mécanisme d"internalisation de S. aureus via la voie de l'intégrine α5β1 et de la fibronectine

Source : adapté d'après Josse et al. 2017

Cependant, la voie de signalisation dépendante de l'intégrine α5β1 et le mécanisme d'internalisation par les ostéoblastes ont été peu étudiés. Il a été montré que le contact bactéries-cellules stimule l'intégrine qui active ses protéines kinases associées, notamment FAK et Src (figure 14). Cette dernière a été décrite *in vitro* pour avoir un rôle majeur dans le mécanisme d'internalisation des bactéries dans des fibroblastes (Fowler et al. 2003). La signalisation associée à cette étape précoce d'internalisation permet les réarrangements du cytosquelette d'actine nécessaires à l'endocytose. Ces réarrangements sont contrôlés par la cortactine qui est activée par la petite GTPase Rac1 à la périphérie de la cellule (Head et al. 2003). Cette dernière est transférée du cytoplasme vers la membrane de la cellule grâce au transport vésiculaire intracellulaire. De plus, il a été décrit que les souches de *S. aureus* exprimant la FnBP (FnBP+) déclenchent la réorganisation des composants des microdomaines membranaires. Notamment la cavéoline, qui joue un rôle crucial dans la régulation de la mobilité des microdomaines membranaires et module l'endocytose des bactéries par la voie de l'intégrine (Hoffmann et al. 2010) (figure 15).

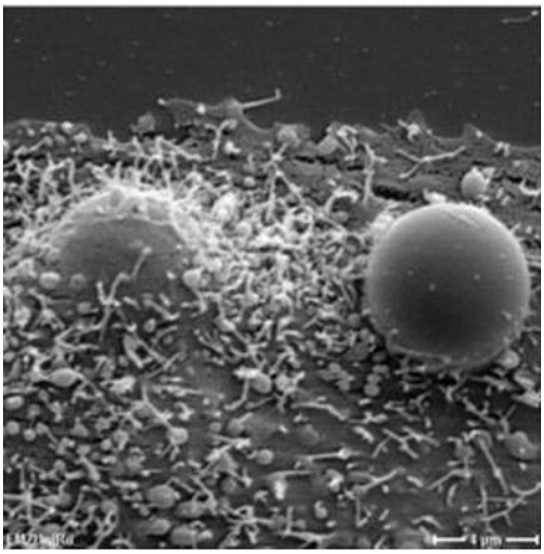


Figure 15 : Internalisation de particules dans des ostéoblastes humains MG63 en présence de couches de cavéoline
Image de microscopie électronique (SEM images 5000× magnification, bar 4 µm). D'après « Attempted caveolae-mediated phagocytosis of surface-fixed micro-pillars by human osteoblasts », Moerke et al. 2016.

On sait donc que l'interaction $\alpha_5\beta_1$/Fn/FnBP entraine la réorganisation de microdomaines membranaires et l'activation de Src et de Rac, permettant le réarrangement du cytosquelette d'actine.

Il apparait donc que des études plus approfondies sont nécessaires afin de comprendre l'ensemble des acteurs de la signalisation et du mécanisme moléculaire aboutissant à l'internalisation de *S. aureus.*

C'est dans ce contexte que nous avons développé des modèles *in vitro* et *in vivo* d'IOA, afin de mieux comprendre et d'analyser la physiopathologie associée aux infections staphylococciques intracellulaires ainsi que les mécanismes associés.

II. Problématique

Compte tenu du coût individuel (hospitalisation prolongée, qualité de vie altérée) et sociétal élevé (arrêt de travail, invalidités partielles ou totales, temporaires ou définitives) des IOA à *S. aureus* et leur augmentation constante, l'objectif principal de nos travaux de recherche a été d'améliorer la compréhension des mécanismes de chronicisation des IOA et des effets sur le remodelage osseux. Notre étude s'est donc concentrée sur 2 axes principaux de recherche : le premier concerne l'étude de la voie de signalisation impliqué dans l'internalisation de *S. aureus* dans les OB ; le second s'est intéressé aux effets de cette internalisation sur l'activité de minéralisation des ostéoblastes. Les travaux précédents réalisés au sein du laboratoire avaient mis en évidence que l'internalisation de *S. aureus* dans les ostéoblastes contribue à la perte osseuse. Deux mécanismes ont été décrits comme étant les acteurs principaux de cette perte osseuse :

- la réponse immunitaire délétère des ostéoblastes infectés qui conduit à la libération de signaux paracrines activant la résorption osseuse des ostéoclastes
- l'inhibition des fonctions de synthèse de la matrice extracellulaire osseuse et de minéralisation des ostéoblastes infectés.

Si les mécanismes ont été identifiés, les supports cellulaires et moléculaires de ces mécanismes n'ont pas été étudiés de façon systématique notamment en raison de l'absence d'une méthode d'étude robuste.

Notre équipe a donc mis en place un projet de recherche en collaboration avec l'équipe « Chromatine & Epigénétique » de l'institut Albert Bonniot de Grenoble et notamment avec Daniel Bouvard, financé par la fondation FINOVI sous le nom de IMBCISa : « **I**ntegrin-**M**ediated **B**one **C**ell **I**nvasion by ***S**taphylococcus **a**ureus* during chronic osteomyelitis: exploration of mechanisms, impact of osteoblastic responses and innovative therapeutic approaches ».

Ce projet avait pour but d'étudier *in vitro* et *in vivo* les mécanismes et les conséquences sur l'activité de formation osseuse de l'internalisation de *S. aureus* dans les ostéoblastes. L'aspect innovant de notre modèle d'infection a été sa capacité à discriminer les effets de *S. aureus* intracellulaires de ceux relatifs aux interactions extracellulaires initiales entre *S. aureus* et la cellule hôte.

Ceci a été rendu possible par l'utilisation de bactéries et de cellules inactivées pour les facteurs permettant l'internalisation : les FnBPs sur le versant des *S. aureus* et l'intégrine β_1 sur le versant des ostéoblastes.

Ce travail permet *in fine* d'ouvrir des perspectives sur les avantages potentiels d'une thérapie ciblant la signalisation intégrine-dépendante pour empêcher l'adhésion et l'internalisation de *S. aureus*, lors de la chronicisation des IOA.

Dans ce mémoire, je présenterai,

i) l'effet sur le remodelage osseux d'une infection à *S. aureus* dans un modèle *in vivo* (en collaboration avec l'équipe EA3826 « Laboratoire de Thérapeutique Expérimentale et Clinique des Infections » de l'UFR de Médecine de Nantes),

ii) la mise en place du modèle d'étude sur la formation et la minéralisation de la matrice extracellulaire osseuse par les ostéoblastes,

iii) l'effet d'une infection à *S. aureus* dans ce modèle *in vitro*,

iv) l'étude de la voie de l'internalisation de *S. aureus* au sein des ostéoblastes.

MATERIELS ET METHODES

I. Les bactéries

A. Description, conservation et caractérisation des souches

Les souches de *S. aureus* 8325-4 et DU5883 qui appartiennent au même fond génétique ont été utilisées dans ce modèle. Ces 2 souches diffèrent par l'expression des protéines appelées Fibronectin Binding protein (FnBP A et B) nécessaires à l'internalisation via l'intégrine β_1. La souche DU5883 a été invalidée pour les gènes FnBPA et FnBPB et n'est plus capable d'envahir les cellules phagocytaires non professionnelles.

La souche 8325-4, est une souche de *S. aureus* issue de la lignée NCTC8325 (isolée d'un ulcère cornéen en 1960) utilisée en routine au laboratoire et largement décrite dans la bibliographie. Elle a été traitée par ultraviolet pour éliminer les prophages Φ11, Φ12, et Φ13 (Herbert et al. 2010). Elle a pour caractéristique d'être peu cytotoxique, peu persistante et capable d'être internalisée dans les cellules par la voie intégrine $\alpha_5\beta_1$/Fn/FnBPs.

Les souches de *S. aureus* ont été conservées à -20°C dans des cryotubes contenant un cryoprotectant (Glycérol) et des billes. Pour une remise en culture sur gélose, une bille a été prélevée du tube et utilisée pour réaliser un ensemencement sur gélose par la méthode des cadrans. Afin de connaître le profil de résistance aux antibiotiques (ATB) des deux souches, des antibiogrammes en boîte par la méthode de diffusion en disque selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CASFM) ont été réalisé. Les deux souches avaient un profil multi sensible.

B. Préparation des souches bactériennes fluorescentes

Le couple de souches 8325-4 / DU5883 avec les plasmides exprimant les fluorophores green fluorescent protein (GFP, PCN47) et DsRed (pDsRed) a été transformé par électroporation (2000V, 100 Ω et 25µF). Ces plasmides contiennent un gène de résistance au chloramphénicol ce qui permet de sélectionner les colonies ayant acquis le plasmide. Après l'électroporation, les bactéries ont été reprises dans 900 µL de milieu BHI et laissées 1H à 37°C, le temps de l'expression phénotypique du gène de résistance. Pour chaque type de bactérie (8325-4, DU5883) le bouillon a été ensuite étalé (10% et 90%) sur des géloses tryptic soy agar (TSA) supplémentées avec 10 µg/mL de chloramphénicol.

Seules les colonies ayant acquis le plasmide exprimant la GFP ou DsRed sont capables de pousser sur ces géloses. Avec cette technique quatre types de souches ont été obtenus : 8325-4 GFP, DU5883 GFP, 8325-4 DsRed et DU5883 DsRed.

II. Culture cellulaire

A. Préparation des lignées cellulaires d'ostéoblaste OBβ1

Pour cette étude deux lignées cellulaires d'ostéoblastes murins, appelées $OB\beta_1^{+/+}$ et $OB\beta_1^{-/-}$ ont été utilisées. Ces lignées sont issues de cellules primaires de souris C57BL6/Sv129 exprimant ou non une intégrine β_1 et immortalisées par introduction de l'oncogène viral T de SV40.

Ces lignées cellulaires ont été cultivées dans un milieu de culture complet (MCC) composé de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contenant du D-glucose, de la L-glutamine, du pyruvate et 10 % de sérum de veau fœtal (SVF).

Pour certaines étapes expérimentales, le milieu MCC a été complémenté avec une solution d'ATB composée d'un mélange de pénicilline (100 µg/mL) et de streptomycine (100 µg/mL) (Gibco®). Ces cellules ont été cultivées en flasques de 75 cm² (T75, BD Falcon™) à 37°C sous 5 % de CO_2 et 100 % d'humidité. Les lignées ont été entretenues par trypsination à raison d'un passage par semaine jusqu'au 25ème passage après décongélation. Toutes les opérations sur les cellules ont été réalisées sous un poste de sécurité microbiologique (pour éviter toute contamination extérieure), et avec du matériel décontaminé avant utilisation (détergent et alcool). Pour limiter le risque de dédifférenciation au cours du temps, un stock de cellules a été constitué et conservé dans l'azote liquide pour permettre des remises en culture régulières après décongélation de cellules à un passage précoce.

B. Paramètres de viabilité, différenciation et minéralisation étudiés

a. Viabilité cellulaire par la méthode MTT

La méthode MTT est une méthode colorimétrique reposant sur la réduction par des cellules vivantes du sel de térazolium en formazan qui est un composé insoluble de couleur violette. La quantité de formazan produite mesurée par densité optique à 450 nm étant proportionnelle à l'activité métabolique des cellules, ce test nous a permis de déterminer la viabilité cellulaire dans un puits de culture cellulaire.

La solution stock de MTT a été préparée à 5 mg/mL par dissolution dans de l'eau stérile et a été filtrée sur une membrane de 0,2 µm avant d'être stockée à +4°C. Elle a été ensuite diluée extemporanément au 1/10 (0,5 mg/mL) dans du Minimal Essential Medium alpha (αMEM) afin de constituer la solution de travail.
Parallèlement une solution d'isopropanol acide en ajoutant 0,04 M final d'acide chlorydrique (HCl) dans de l'isopropanol 100% a été préparé, afin de solubiliser le formazan insoluble formé lors de la réaction, et pour permettre son dosage spectrophotométrique à 450nm.
Le protocole consistait à laver très délicatement deux fois les cellules présentes dans les puits avec 700 µL de αMEM, puis à ajouter 400 µL de solution MTT de travail par puits et incuber 1h à 37°C. Après incubation le surnageant était éliminé et 200 µL d'isopropanol étaient ajoutés dans chaque puits afin de solubiliser la coloration violette produite par les cellules. Après aspiration refoulement le mélange a été transféré dans une nouvelle plaque 96 puits à fond rond. Il ne restait plus qu'à effectuer une mesure de DO à 450 nm en veillant à ne pas oublier de déposer le blanc composé seulement d'isopropanol acide. Plus la viabilité des cellules est importante plus la DO sera élevée.

b. Mesure de la phosphatase alcaline (PAL)

La phosphatase alcaline osseuse est une enzyme importante pour la minéralisation par les ostéoblastes. Les mesures de la concentration de la phosphatase alcaline (PAL) à différents temps après infection ont été réalisées sur un automate Vista® 3000 (Siemens, Health care, France) présent sur le plateau de biochimie de l'hôpital de la Croix-Rousse. Les résultats étaient exprimés en UA/L (Unité arbitraire).
Pour cela les cellules sont rincées deux fois en PBS, puis lysées également deux fois avec 1 mL de PBS + 0.1% Triton. Le lysat obtenu est alors passé au sonicateur pendant 3 minutes, puis après homogénéisation au vortex le lysat est centrifugé à 14 000 rpm pendant 3 minutes. Les surnageants sont ensuite récupérés pour être analysés dans l'appareil Vista® 3000.

c. Quantification de la minéralisation osseuse

Les OB une fois différenciés vont induire de la minéralisation par dépôt d'ion calcium et phosphate. Afin d'étudier l'impact de l'infection et de l'internalisation de *S. aureus* sur les capacités des OB à minéraliser, nous avons réalisé une quantification des dépôts calcique par la méthode de coloration en rouge d'Alizarine.

Pour cela, les OB$\beta_1^{+/+}$ et OB$\beta_1^{-/-}$ ont été mises en culture dans une plaque 24 puits à 50 000 cellules/puits et cultivées pendant 3 jours à 37°C en présence de 5% de CO_2 pour atteindre 100% de confluence.

Le milieu de culture (MCC + ATB) a été ensuite remplacé par un milieu favorisant la différentiation des pré-OB en OB (figure 16), composé de αMEM supplémenté avec de la vitamine C (acide ascorbique) pour la matrice extracellulaire et de β-Glycérophosphate pour favoriser la production d'ions calcium et phosphate. Il était également supplémenté en gentamicine et lysostaphine à faibles concentrations afin d'éliminer les bactéries non internalisées et de tuer les bactéries qui ressortent du compartiment intracellulaire.

La minéralisation a été suivie au cours du temps (J5, J10 et J21) par coloration au rouge d'Alizarine des dépôts calciques. Après deux étapes de lavage en PBS, les cellules étaient fixées pendant 15 min à température ambiante avec 10% de formaldéhyde, puis rincées trois fois avec du PBS et mises en contact avec une solution de rouge d'alizarine à 40 mM à pH compris entre 4,1 et 4,5 (les variations de pH en dehors de ces valeurs induisant une modification de la coloration du rouge d'alizarine). Après une incubation de 20 minutes à température ambiante permettant la coloration des dépôts calciques, les cellules ont été lavées à 4 reprises avec de l'eau distillée pour enlever le rouge d'Alizarine non incorporé. Après élimination du surnageant la quantification pouvait être réalisée ou la plaque conservée à -20°C pour une quantification ultérieure.

Pour la quantification, 800 µL par puits d'une solution d'acide acétique à 10% ont été ajoutés. Après 30 minutes d'incubation sous agitation à température ambiante, la couche de cellules a été détachée à l'aide d'un grattoir cellulaire (*cell scraper*) puis la suspension a été transférée dans un tube stérile de 1,5mL avec une pipette à large ouverture en raison des agrégats de cellules formés. Après agitation, la suspension a été chauffée à 85°C pendant 10 min puis transférée dans la glace pendant 5 min. Le choc thermique permet de dissoudre les dépôts calciques colorés au rouge d'Alizarine. La suspension a alors été centrifugée à 20 000 g pendant 15 minutes et 500 µL du surnageant ont été transférés dans un nouveau tube de 1.5mL stérile. 200 µL d'une solution d'hydroxyde d'ammonium à 10% ont été ajoutés pour neutraliser l'acide et obtenir un pH compris entre 4,1 et 4,5, qui est vérifié avec un pH-mètre et ajusté si besoin par ajout d'acide chlorhydrique ou d'hydroxyde d'ammonium.

Des mesures en triplicats à 405nm (spectrophotomètre ELx808 BioTek®) ont alors été réalisées dans des plaques 96 puits à fonds plats et transparents.
La quantification était réalisée grâce à une gamme sériée de rouge d'Alizarine diluée avec un ratio ½.

d. Expression de gènes cibles par qRTPCR

1. Extraction d'acide ribonucléique (ARN) eucaryote

L'objectif de cette méthode était de pouvoir analyser l'impact sur nos cellules de l'infection à *Staphylococcus aureus* en se focalisant sur les gènes spécifiques de la différenciation ostéoblastique et sur les gènes spécifiques de l'induction de la minéralisation. L'expression des gènes *RUNX2*, *PAL*, ostéocalcine (*OCN*) et collagène de type I (*COL1A*) a été analysée par méthode qRTPCR (quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction).
Après 3 et 5 jours d'infection, l'ARN des cellules infectées par les souches 8325-4 et DU5883 a été extrait. Pour chaque temps de mesure, des conditions sans infection ont été utilisées comme contrôles (à J0 avant infection, à J3 et J5).
Le protocole d'extraction d'ARN cellulaire a été réalisé d'après les recommandations délivrées par le fournisseur pour le kit RNeasy minikit de QIAGEN (détails du protocole en annexe n°2).
Une fois l'extraction terminée, 50 µL d'ARN cellulaire ont été obtenu puis dosé avec un nanodrop (Nanodrop 8000, Thermo Scientific®) afin d'obtenir la concentration et les ratios DO 260/280 et DO 260/230 des extraits. Les valeurs comprises entre 1,8 et 2 pour le ratio 260/280 et au-dessus de 2 pour le ratio 260/230 étaient considérés comme reflétant une bonne qualité d'ARN extrait.
A partir des extraits d'ARN, une transcription inverse (RT) a été réalisée afin d'obtenir des ADNc (complémentaires) nécessaires à la réalisation de la qPCR pour l'analyse de l'expression des gènes.

2. Passage de l'ARN à l'ADNc par méthode transcription inverse

La transcriptase inverse, ou reverse transcriptase (RT), est une enzyme permettant de convertir l'ARN en ADN simple brin appelé ADNc. La RT est utilisée en biologie moléculaire afin de réaliser une expérience de RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction ou amplification en chaîne par polymérase après transcription inverse). Cette méthode a pour objectif de produire et amplifier un ADNc à partir d'une molécule d'ARN.

La première étape de cette technique consiste à rétrotranscrire l'ARN en ADNc, qui sera ensuite utilisé pour la PCR. Dans notre cas, l'analyse portait sur les gènes spécifiques de la différenciation ostéoblastiques et les gènes spécifiques de l'induction de la minéralisation à savoir *RUNX2, PAL, OCN et COL1A.*

Le protocole utilisé pour effectuer cette RT a été adapté à partir du kit « Reverse Transcription System » de Promega (détail du protocole en annexe n°2).

3. Analyse PCR quantitative

Les analyses d'expression de gènes par méthode qRTPCR ont été réalisées en utilisant un kit LC FAST START DNA SYBR.GREEN Kit (Roche diagnostic®) et un appareil LightCycler Real-Time PCR System (Roche Diagnostic®).

Les amorces spécifiques utilisées pour ces analyses sont les suivantes :

Name	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
GAPDH	GGTGAAGGTCGGTGTGAACG	CTCGCTCCTGGAAGATGGTG
PAL	GCCCTCTCCAAGACATATA	CCATGATCACGTCGATATCC
RUNX2	CCGCACGACAACCGCACCAT	CGCTCCGGCCCACAAATCTC
COL1A	CCTGGTAAAGATGGGCC	CACCAGGTTCACCTTTCGCACC
OCN	AAGCAGGAGGGCAATAAGGT	AGCTGCTGTGACATCCATAC

L'expression de chaque gène a été normalisée sur GAPDH et représentée comme un ratio d'expression relative ($2^{-\Delta Ct}$, $\Delta Ct = Ct_{target} - Ct_{GAPDH}$).

III. Modèle d'infection *in vitro*, méthode de protection à la gentamicine (GPA)

A. Notion de « Multiplicity of Infection » (MOI)

Dans notre modèle d'infection *in vitro*, afin de normaliser à la fois l'inoculum bactérien et le nombre de cellules, la notion de MOI a été utilisée. La MOI correspond au ratio défini par le nombre de bactéries déposées dans un puits, divisé par le nombre de cellules présentes dans ce puits. Ainsi l'écriture « MOI 1:1 » signifie que l'infection a été réalisée à raison d'un staphylocoque pour un ostéoblaste. Lors de chaque essai, afin d'obtenir la MOI souhaitée, il était nécessaire de connaître le nombre de bactéries présentes dans la suspension avant l'ajout dans les cultures cellulaires.

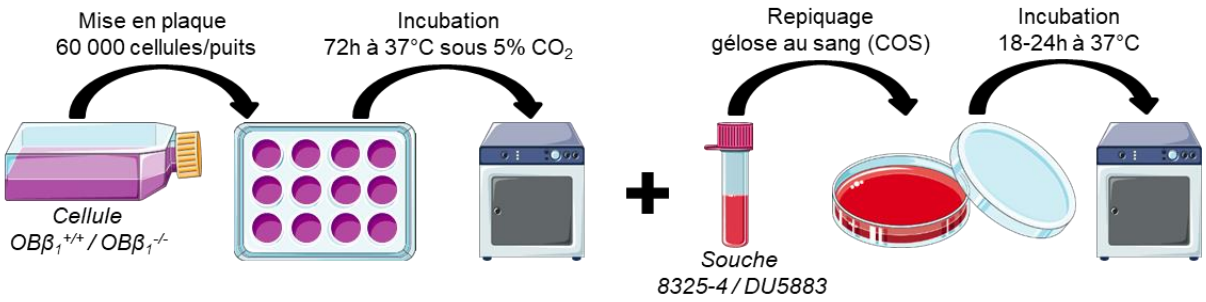
Cependant, des expériences d'infection menées par le laboratoire ont mis en évidence une variabilité inter-souches importante: pour deux souches de *S. aureus*, une même densité optique (DO) mesurée dans un bouillon cœur cervelle (BCC) ne correspondait pas à la même concentration bactérienne, c'est-à-dire au même nombre de bactéries viables par mL de BCC. Le protocole du laboratoire reposant sur des mesures de DO a donc été modifié pour pallier à cette variabilité inter-souches, il est décrit ci-dessous dans la partie *« Préparation des ostéoblastes et des bactéries pour l'infection. »*

B. Préparation des ostéoblastes et des bactéries pour l'infection.

L'ensemble des étapes pour la préparation de l'infection ont été représentées ci-dessous (figure 16).

Figure 16: Préparation des cellules et bactéries pour l'infection

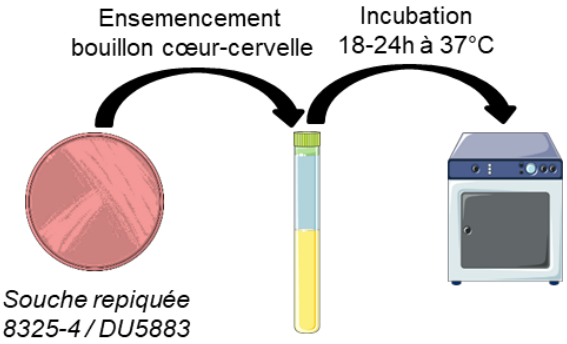
(A)



72 heures avant l'infection (figure 16A) les $OB\beta_1^{+/+}$ et/ou $OB\beta_1^{-/-}$ ont été ensemencées à raison de 60 000 cellules par puits dans des plaques 24 puits, en MCC+ATB, puis incubées 72 h à l'étuve à 37°C en présence de 5 % CO_2 afin d'obtenir une confluence d'au moins 80%.

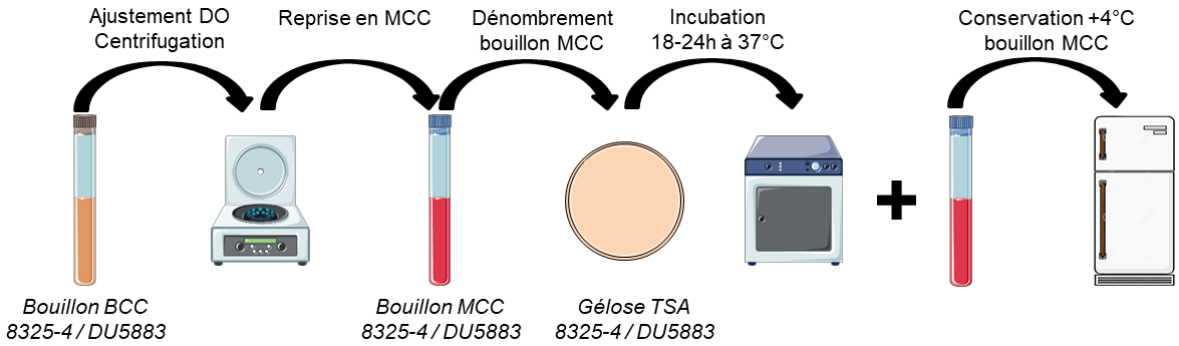
Les souches bactériennes 8325-4 et DU5883 ont été repiquées sur gélose au sang (Columbia + 5% de sang de mouton (COS), bioMérieux, Marcy-L'Etoile, France) et incubé 18-24h à 37°C.

(B)



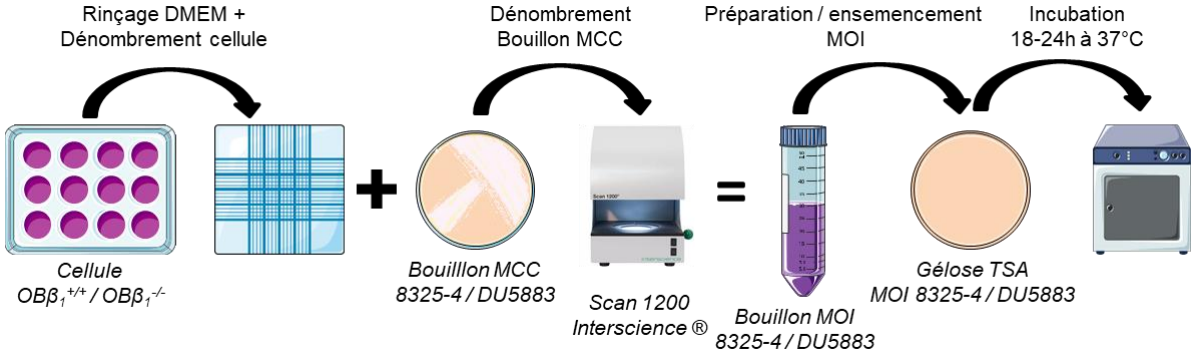
48 heures avant infection (figure 16B) des colonies isolées des souches 8325-4 et DU5883 issues des géloses COS ont été prélevées pour ensemencer un bouillon cœur-cervelle, (BCC, bioMérieux) incubé 18h à 24h à 37°C.

(C)



24 heures avant infection (figure 16C) la DO_{600} des bouillons bactériens réalisés la veille a été ajustée entre 0,1 et 2 avant centrifugation à 3000 rpm pendant 5min. Les culots ont été repris en MCC, et la concentration bactérienne de l'inoculum obtenu a été calculée par dénombrements de dilutions sériées réalisés sur milieu TSA (bioMérieux). Les inocula ont ensuite été conservés 24 heures à +4°C.

(D)



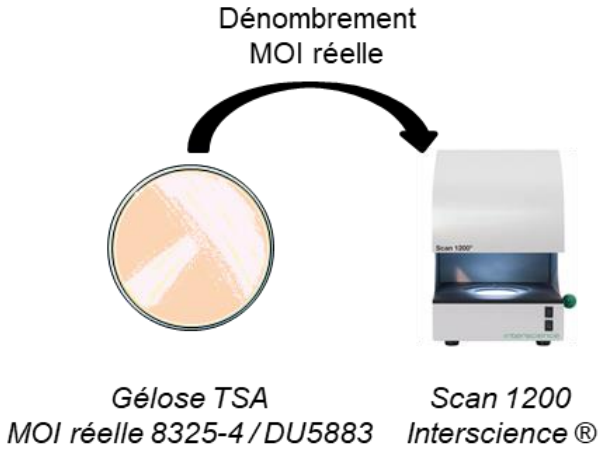
Le jour de l'infection (figure 16D) : les cellules préparées en plaque 24 puits ont été lavées deux fois avec 1 mL de DMEM afin d'enlever toute trace d'antibiotiques avant l'ajout des bactéries sur les cellules. Les MOI ont alors été préparées en réalisant :

i) une numération précise par exclusion au bleu de Trypan sur deux puits afin de déterminer le nombre moyen de cellules par puits

ii) des dénombrements à partir des ensemencements en dilutions sériées réalisés la veille à partir des bouillons MCC.

Un nouvel étalement des bouillons MOI ayant servi à infecter les cellules a été réalisé sur géloses TSA, et incubé 18-24h à 37°C.

(E)



Vingt-quatre heures après infection (figure 16E) : les étalements des bouillons MOI ayant servi à infecter les cellules ont été dénombrés grâce au compteur automatique EasyCount® 2 afin de vérifier que la MOI utilisée (nombre de bactéries/nombre de cellules) était la bonne.

C. Infections des ostéoblastes

Une fois la préparation des cellules et des bouillons bactériens effectuée, une infection selon le modèle suivant a été réalisée (figure 17) :

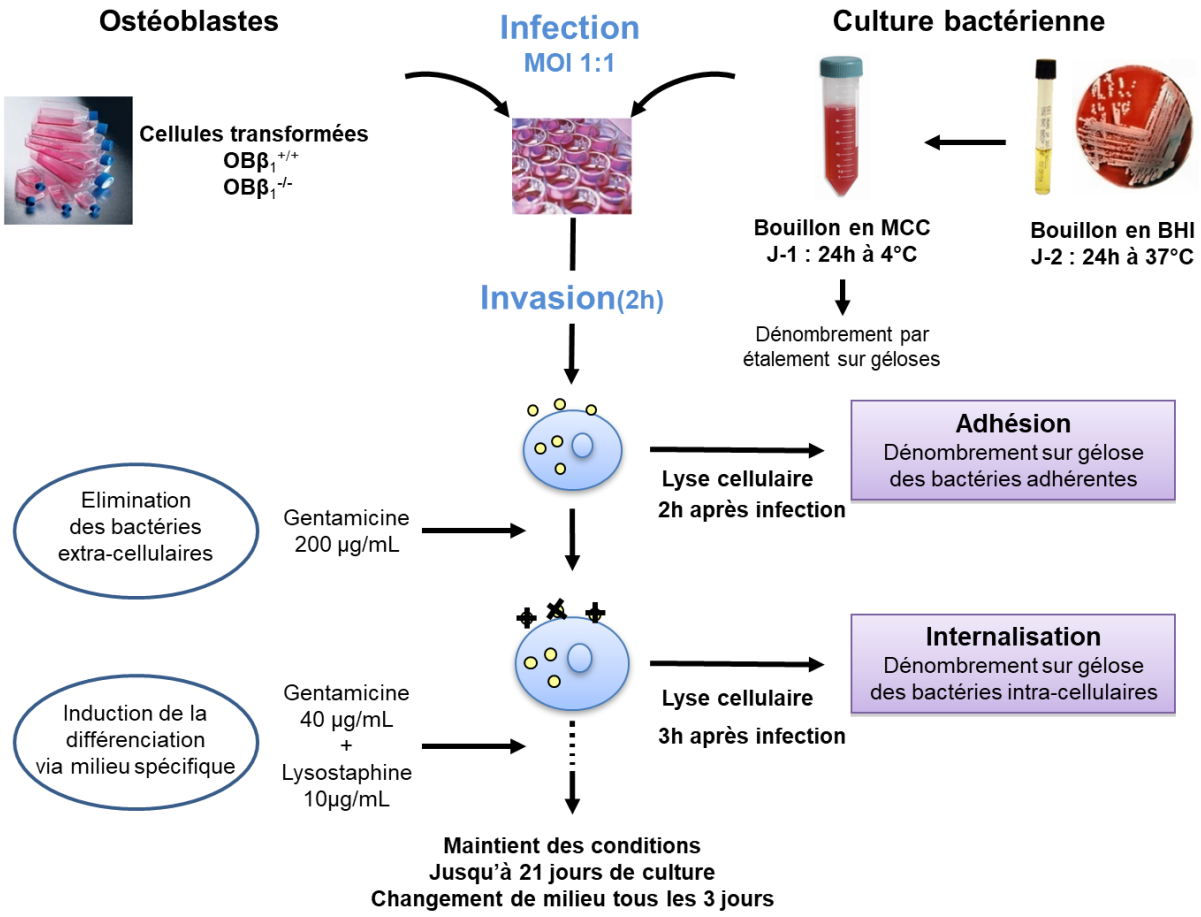


Figure 17 : Modèle d'infection Gentamycin Protection Aassay (GPA)

Source: Equipe pathogénie des Staphylocoques CIRI–INSERM-U1111

Abréviations : ***MOI*** *= Multiplicity of infection (Nombre de bactéries / cellule),* ***OB*** *= Ostéoblastes,* ***MCC*** *= Milieu de culture complet (composé de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), L-glutamine et penicilline-streptomycine),* ***PI*** *= Post infection.*

Le milieu spécifique utilisé pour induire la différenciation est composé de αMEM supplémenté avec : i) de la L-Glutamine qui est un acide aminé ayant pour rôle d'améliorer la viabilité des ostéoblastes ainsi que la minéralisation (Brown et al. 2011)*. ii) de la vitamine C (acide ascorbique) qui est un cofacteur essentiel impliqué notamment dans la synthèse de la matrice extracellulaire et collagénique mais également dans la différenciation cellulaire* (Hadzir et al. 2014)*. iii) du β-Glycérophosphate pour favoriser la minéralisation in vitro en modulant l'activité métabolique des cellules osseuses et / ou en servant de source locale d'ion phosphate inorganiques pour favoriser la production d'ions calcium et phosphate* (Chung et al. 1992)*.*

D. Détermination du nombre de bactéries adhérées

Afin de déterminer le taux d'adhésion des bactéries, après 2h de contact bactéries/cellules les puits ont été lavés deux fois avec du tampon PBS (Phosphate buffer saline) pour éliminer les bactéries non adhérées. Les cellules présentes dans le puits ont ensuite été lysées par choc osmotique avec deux fois 1mL d'eau pure et les lysats cellulaires ensemencés avec l'automate easy Spiral® (Interscience) sur gélose TSA par technique de dilution en série (ratio$^{1/10}$). La numération des unités formant colonies obtenues (UFC) après 18-24h d'incubation à 37°C a ensuite été réalisée à l'aide du logiciel Easycount 2® (Interscience) après capture des images des boites avec l'automate Easyscan 1200® (Interscience).

E. Détermination du nombre de bactéries internalisées

Pour déterminer le taux d'internalisation des bactéries, après deux heures de contact bactéries/cellules les puits ont été rincés deux fois avec du tampon PBS pour éliminer les bactéries non adhérées. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 1 heure dans un MCC contenant de la gentamicine à une concentration de 200 µg/mL. Cette étape a été réalisée afin d'éliminer les bactéries adhérées mais non internalisées, sans altérer les bactéries intracellulaires, et supprimer les bactéries sortant du compartiment intracellulaire afin qu'elles ne réinfectent pas les cellules. Après cette heure de contact, comme pour la mesure de l'adhésion, les cellules ont été de nouveau rincées avec deux fois 1mL de PBS et lysées par choc osmotique avec deux fois 1mL d'eau pure. Les lysats cellulaires ont été ensemencés avec l'automate easy Spiral® (Interscience) sur gélose TSA par technique de dilutions en série et dénombrés à l'aide du logiciel Easycount 2 (Biomérieux) après 18-24h d'incubation à 37°C*.*

F. Inhibiteurs pharmacologiques

Nous avons utilisé dans notre modèle d'infection plusieurs inhibiteurs pharmacologiques, qui ciblent différentes voies de signalisation ou de trafic vésiculaire :

- Src Inhibitor No.5 (Proteinkinase), qui cible la protéine Src, utilisé à 10 µM.
- p21-Activated Kinase Inhibitor III, IPA-3 (Sigma-Aldrich), qui cible la protéine PaK1, utilisé à 5 µM.

- Primaquine bisphosphate (Sigma-Aldrich), qui cible le trafic vésiculaire contenant des « detergent-resistant membranes », utilisé à 5 µM.
- EHT 1864 (Sigma-Aldrich), qui cible la protéine Rac1, utilisé à 5 µM.

Ces inhibiteurs ont été mis en contact avec les cellules une heure avant infection en les diluant dans du MCC sans ATB, puis pendant les deux heures de contact bactéries/cellules en les diluant directement dans les bouillons bactériens. Le reste de l'expérimentation était identique à ce qui a été décrit au d) et e).

IV. Modèle d'infection *in vivo*

A. Modèle murin d'ostéomyélites

Ce modèle a été adapté d'après un protocole publié par (Cassat et al. 2013). Les inocula bactériens ont été préparés à partir d'une culture incubée 18h-24h à 37°C dans du BCC, suivie d'une croissance à 37°C sous agitation pendant 3 heures. Les bactéries ont alors été recueillies par centrifugation, lavées deux fois avec du PBS et remises en suspension à une concentration de 1.10^9 UFC dans 1 ml de PBS.

Avant l'inoculation, des souris femelles RjOrl:SWISS âgées de 6 semaines ont reçu 0,1 mg/kg de buprénorphine par injection sous-cutanée pour effectuer une pré-anesthésie. L'anesthésie a été réalisée avec un mélange kétamine/xylazine (80 et 10 mg/kg, respectivement, administration en intrapéritonéal). Le membre postérieur droit a été rasé et désinfecté, et une petite incision a été réalisée permettant l'accès au fémur droit. Un défaut osseux unicortical de 1 mm de diamètre a été créé au milieu de l'os par trépanation avec une aiguille de calibre 20G. Les inocula bactériens ont ensuite été inoculés à l'aide d'une seringue en verre Hamilton à travers le défaut osseux dans le canal intramédullaire. Les fascias musculaires et la peau ont ensuite été fermés par suture, et les souris laissées au « repos » pour récupérer de l'anesthésie. La buprénorphine a été administrée toutes les 12 heures pendant 72 heures après l'opération. L'infection a été suivie pendant 7 ou 14 jours, après quoi les souris ont été euthanasiées, leur fémur droit prélevé et soumis soit à une analyse par microtomographe permettant la quantification de différents paramètres osseux (c.f matériel et méthode : *Analyses des os par microtomographie à rayons X*) soit au protocole de dénombrement de la charge bactérienne (UFC/mL).

Pour ce dernier, les fémurs entiers ont été séparés des tissus mous environnants et homogénéisés dans un mélangeur MM400 (Retsch).

Les échantillons d'os homogénéisés, remis en suspension dans 1 ml de PBS, ont été dilués et étalés sur des géloses d'agar Chapman.

B. Analyses des os par microtomographie à rayons X

Radiographie des os

Pour réaliser la radiographie des os, nous avons utilisé un scanner à rayons X « Phoenix nanotom S » (GE). Les os ont été placés par deux dans un tube Eppendorf contenant de l'éthanol à 70% et un morceau d'hydroxyapatite servant de calibrateur pour l'analyse quantitative. Les os ont alors été passés au scanner à rayons X pendant environ 2 heures à un voltage de 100 kV, un courant de 70 µA, 3000 images ont été prises avec une résolution spatiale de 5 µm (voxel).

Reconstruction en 3D des os

A partir des données brutes recueillies la reconstruction des os en 3D a été réalisée sur le logiciel « Phoenix datosx rec ». De façon simplifiée, elle consiste à récupérer les 3000 images réalisées pendant l'acquisition et à les réassembler par superposition pour obtenir une image en trois dimensions de l'os à analyser.

Analyse quantitative des os

La quantification des paramètres des parties corticales et trabéculaires des os reconstruits en 3D a été réalisée avec le logiciel « Microview » renseigné avec les paramètres d'acquisition. Ce logiciel permet d'obtenir des informations sur différents paramètres osseux tels que la densité minérale osseuse (BMD), le contenu minéral de l'os (BMC) le nombre de trabécules de l'os (Tb.N), l'espace entre les trabécules de l'os (Tb.Sp), l'épaisseur de l'os trabéculaire (Tb.Th), l'épaisseur de l'os cortical (Ct.Th) et des ratios comme par exemple le volume de l'os sur le volume du trabéculaire (BV/TV). Le nombre d'os analysés ainsi que les souches bactériennes utilisées pour l'infection ont été spécifiées dans les sections résultats correspondantes.

RESULTATS

I. Impact d'une infection à *S. aureus* sur modèle *in vivo* murin

Afin d'étudier l'impact d'une infection à *S. aureus* sur modèle murin *in vivo*, nous avons réalisé en collaboration avec l'équipe EA3826 « Laboratoire de Thérapeutique Expérimentale et Clinique des Infections » de l'UFR de Médecine de Nantes, une infection à *S. aureus* sur le fémur droit de souris. Deux souches cliniques de *S. aureus* isolées au cours d'IOA (souche 1 et souche 2) et déjà caractérisées au laboratoire (Trouillet-Assant et al. 2016) ont été utilisées pour infecter des souris femelles RjOrl:SWISS de 6 semaines, selon le protocole publié par Cassat et al (Cassat et al. 2013). Une injection de PBS a été utilisée comme condition « contrôle ».

Après 14 jours d'infection, les souris ont été sacrifiées et les fémurs analysés par microtomographie à rayons X suivie d'une reconstruction 3D (figure 18). Les paramètres osseux suivants ont été mesurés : l'épaisseur de l'os, le contenu minéral osseux et la densité minérale osseuse (figure 19).

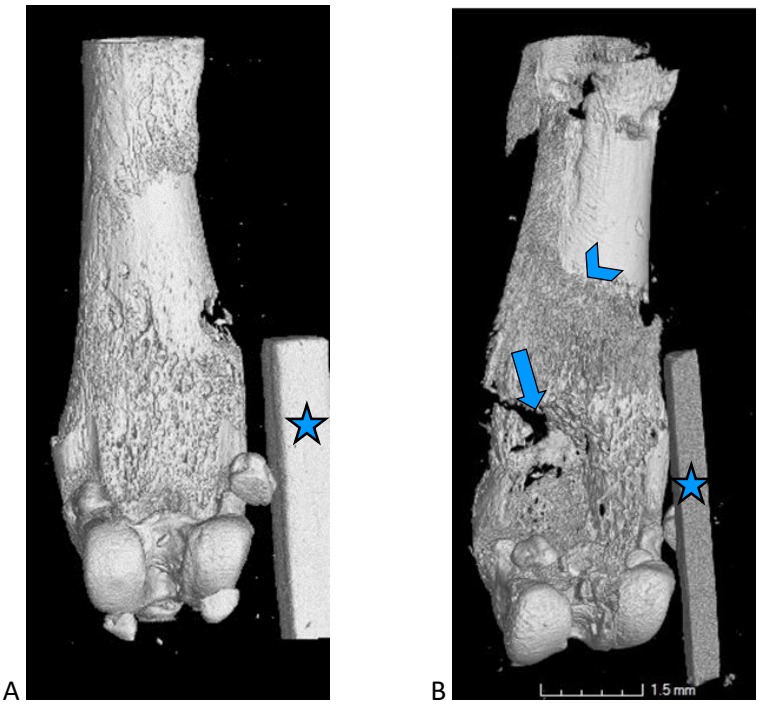


Figure 18 : Reconstruction en 3D d'un os contrôle et infecté
L'os contrôle (A) a reçu une injection de PBS, l'os infecté (B) a reçu une injection d'un inoculum de S. aureus. La reconstruction a été effectuée après scan à rayons X sur un microtomographe Phoenix nanotom S (General Electric).
L'analyse quantitative est réalisée en utilisant comme calibrateur un morceau d'hydroxyapatite (étoile bleue).
L'infection par S. aureus induit une perte osseuse à l'intérieur de l'os (flèche bleue). Une excroissance osseuse poreuse est également observée en surface (tête de flèche bleue).

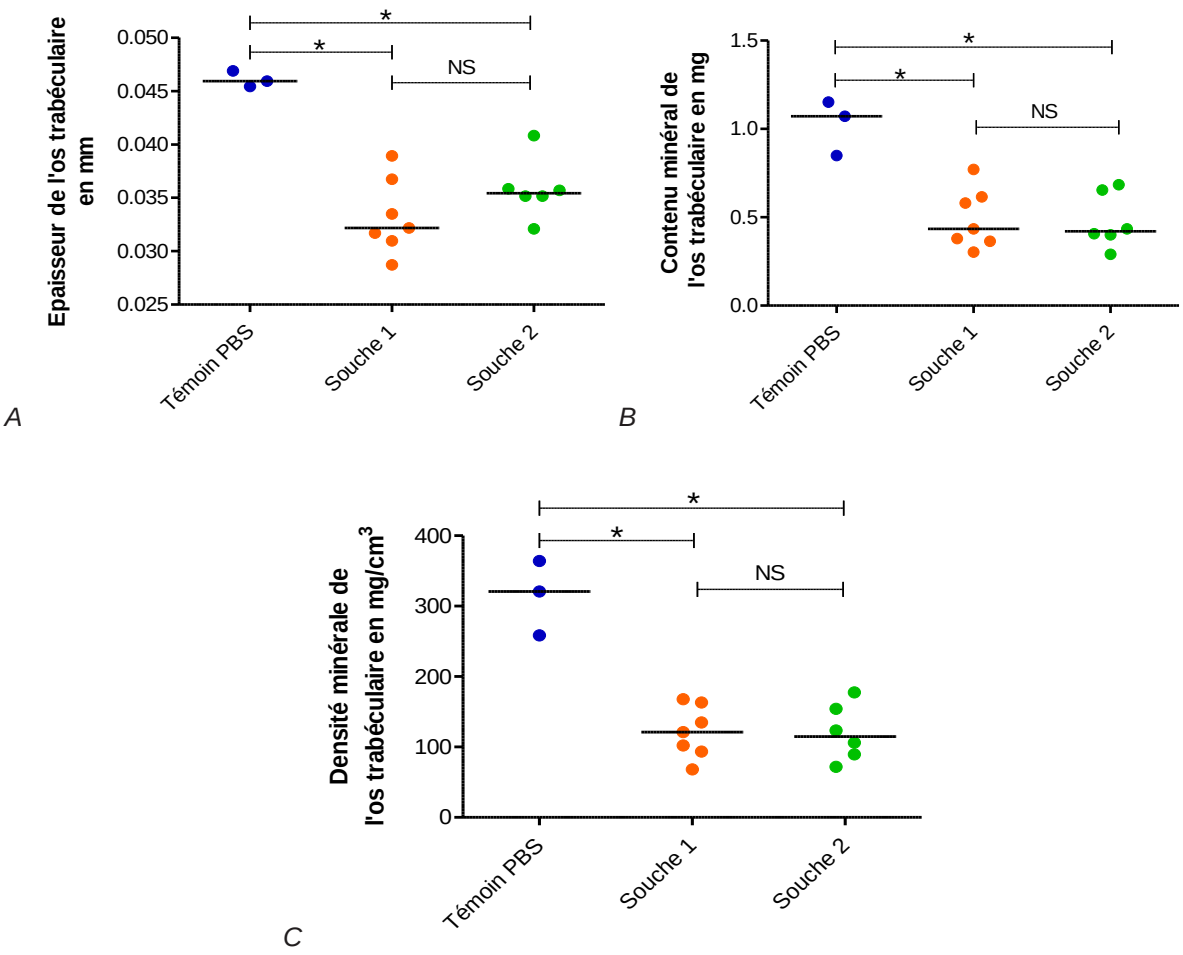


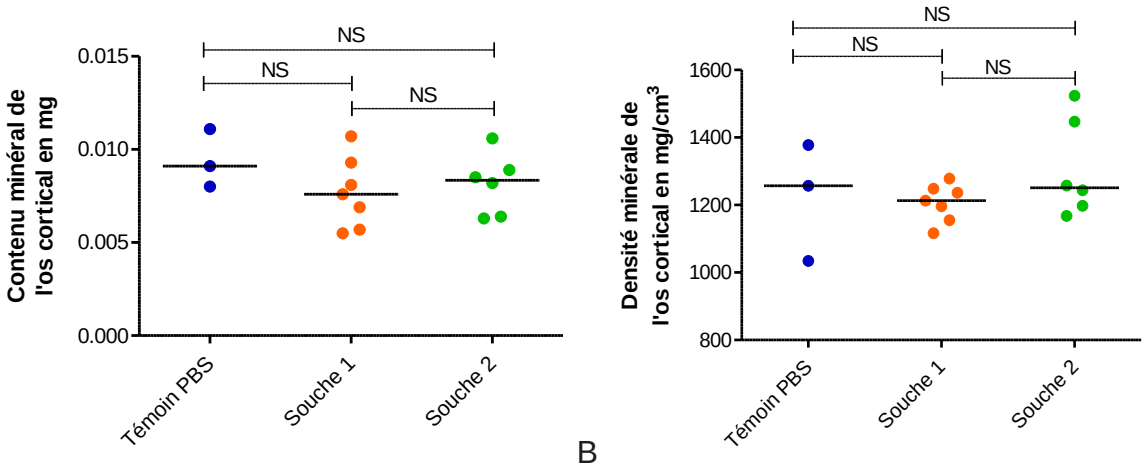
Figure 19 : Effet sur l'os trabéculaire de l'infection par S. aureus dans un modèle murin in vivo. 12 souris ont reçu une injection de PBS (en bleu, n=3) ou des inocula bactériens avec la souche clinique n°1 (en orange, n=7) ou avec la souche clinique n°2 (en vert, n=6).
L'épaisseur de l'os (A) est exprimée en mm, le contenu minéral de l'os en mg (B) et enfin la densité minérale de l'os en mg par cm ^{3} (C).
L'analyse statistique a été réalisée en comparant les groupes d'os infectés par S. aureus avec le groupe d'os témoins ayant reçu une injection de PBS (Test de Mann-whitney).

Par rapport au groupe témoin (injection de PBS stérile), l'infection des fémurs de souris par les deux souches de *S. aureus* a conduit à une diminution significativement plus importante de l'épaisseur de l'os (figure 19A ; 12,9 µm et 10,3 µm de perte respectivement pour la souche 1 et 2 ; $p<0,05$).

Pour le contenu minéral de l'os (figure 19B), une diminution significative pour les souches 1 et 2 a été observée par rapport au groupe témoin (0,493 mg et 0,478 mg respectivement vs 1,024 mg ; $p<0,05$).

Enfin, la densité minérale de l'os (figure 19C) est apparue significativement diminuée par rapport au groupe témoin pour ces deux mêmes souches (193 mg/cc et 194 mg/cc de perte respective ; $p<0,05$).

Aucun effet significatif n'a été observé au niveau de l'os cortical pour le contenu minéral (figure 20A) et la densité minérale osseuse (figure 20B). Ceci peut s'expliquer par la méthode d'injection qui se fait directement au niveau de l'os trabéculaire. Par ailleurs l'os cortical est beaucoup plus compact et dur que l'os trabéculaire et donc moins sensible aux effets de l'infection.



A B

Figure 20 : Effet d'une infection à S. aureus sur modèle murin in vivo au niveau de l'os cortical
Pour ce modèle 12 souris ont été utilisées, en tant que témoin avec injection de PBS (en bleu, n=3), infectées avec la souche clinique n°1 (en orange, n=7) et enfin infectées avec la souche clinique n°2 (en vert, n=6). Le contenu minéral de l'os (A) est exprimé en mg et la densité minérale de l'os (B) en mg par cm^3.

Aucune différence significative n'a été observée entre nos 2 souches cliniques ; elles ont entrainé une forte perte osseuse au niveau de l'os trabéculaire alors qu'elles ne semblent pas avoir d'effet sur l'os cortical. Les fortes pertes osseuses observées corrèlent avec celles généralement observées chez les patients lors d'IOA à *S. aureus* et entrainant notamment des descellements de prothèse et/ou des arthrites.

Afin de préciser les mécanismes à l'origine de cette perte osseuse, notamment pour savoir si en plus d'une activation des ostéoclastes (Trouillet-Assant et al. 2015), il existe une diminution d'activité des ostéoblastes lorsque *S. aureus* est en intracellulaire, cette approche macroscopique *in vivo* a été complétée par la mise en place d'un modèle *in vitro* permettant d'étudier l'impact spécifique de *S. aureus* en position intra-ostéoblastique.

Ce modèle cellulaire nous permettait notamment d'étudier l'effet d'une infection intracellulaire à *S. aureus* sur les ostéoblastes mais également de définir l'importance de la capacité d'internalisation par la voie intégrine α5β1/Fn/FnBPs de *S. aureus* dans la modulation de l'activité des OB.

II. Création et mise au point d'un modèle d'infection ostéoblastique *in vitro*

A. Création de lignées immortelles d'OB murins

Un modèle cellulaire permettant d'étudier l'impact de l'internalisation de *S. aureus* sur la différentiation et la capacité de minéralisation des OB a été mis au point.

Ce modèle établi en collaboration avec le Dr Daniel Bouvard (IAB, INSERM 1209, CNRS 5309, Grenoble), reposait sur une lignée de pré-ostéoblastes murins issue de calvaria de souriceaux. Brièvement, ces cellules nommées $OB\beta_1^{+/+}$, ont été isolées à partir de souris génétiquement modifiées sur le locus de l'intégrine β_1 (ITGB1) puis immortalisées par introduction de l'antigène large T du virus SV40.

La modification génétique consistait en l'insertion de part et d'autre du gène *ITGB1* de séquences *LoxP*, permettant d'introduire une délétion après l'expression transitoire de la recombinase Cre (Adeno-Cre) (Brunner, 2011). Ces cellules invalidées pour l'intégrine β_1 ont le même fond génétique que les cellules mères $OB\beta_1^{+/+}$ et ont été nommées $OB\beta_1^{-/-}$. La délétion de l'intégrine β_1 a été confirmée et vérifiée par nos collaborateurs de Grenoble par PCR, cytométrie en flux (FACS), immunofluorescence et Western Blot.

Cette intégrine a un rôle important dans la capacité des cellules à se différencier et à former un tapis cellulaire jointif et communiquant, nécessaire pour le dépôt calcique et donc pour la minéralisation. Elle est également le récepteur cellulaire du mécanisme tri-partite $\alpha_5\beta_1$/Fn/FnBP de l'internalisation de *S. aureus* (voir introduction). Ces cellules $OB\beta_1^{-/-}$ sont donc incapables de minéraliser et ne permettent également pas l'internalisation de *S. aureus*, elles ont donc été utilisées comme contrôle négatif tout au long de ce projet.

B. Caractéristiques du couple isogénique de souches de *S. aureus*

Nous avons analysé l'internalisation des souches 8325-4 et DU5883 respectivement $FnBP^+$ et $FnBP^-$ dans les cellules $OB\beta_1^{+/+}$ (figure 21) et $OB\beta_1^{-/-}$ (possédant et ne possédant pas l'intégrine β_1), ces deux composants étant nécessaires au mécanisme tri-partite de l'internalisation $\alpha_5\beta_1$/Fn/FnBP

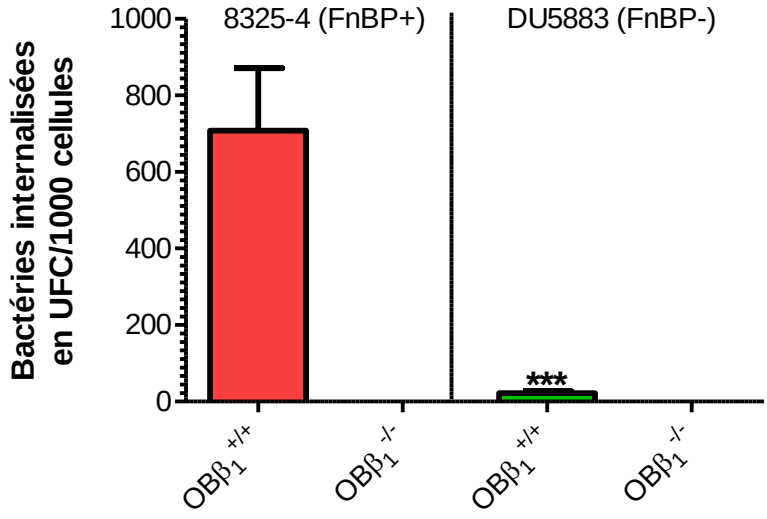


Figure 21 : Evaluation des taux d'internalisation pour la lignée murine OBβ$_1^{+/+}$
Les OBβ$_1^{+/+}$ ont été infectées avec la souche 8325-4 (en rouge) et DU5883 (en vert) à des MOI de 50 :1.
Analyse effectuée après 2h d'infection et 1h de traitement après infection à la gentamicine forte concentration. Les résultats sont exprimés en UFC pour 1000 cellules et les barres d'erreurs correspondent aux SEM (n=3 manipulations en triplicat).
L'analyse statistique a été effectuée en comparant les résultats obtenus avec la souche 8325-4 et ceux obtenus avec la souche DU5883 (Test de Mann-Whitney).

La lignée OBβ$_1^{-/-}$ n'a présenté aucune internalisation des deux souches de *S. aureus*. Avec la lignée OBβ$_1^{+/+}$ le taux d'internalisation était significativement diminué pour la souche FnBP$^-$ (en vert) par rapport à la souche FnBP$^+$ (en rouge), passant à 22 contre 708 bactéries en moyenne pour 1000 cellules, respectivement ($p<0.05$).
Comme pour d'autres modèles cellulaires (Kintarak et al. 2004; Jett et Gilmore 2002), nos résultats confirment que la présence à la fois de l'intégrine β_1 et de la FnBP est indispensable à l'internalisation. Il faut cependant noter qu'en l'absence de FnBP, des *S. aureus* sont retrouvés dans les cellules ce qui suggère d'autres mécanismes et voies d'internalisation.
Afin de pouvoir évaluer l'impact de l'infection et de l'internalisation de *S. aureus* sur la différenciation des OB en culture et sur la minéralisation, nous avons mis au point un modèle *in vitro* basé sur la différenciation des OB.

C. Mise au point du modèle *in vitro* de minéralisation

Pour cela, nous avons optimisé les conditions de culture permettant de suivre la cinétique de différentiation des pré-OB en OB matures fonctionnels capables de i) synthétiser une matrice de collagène, ii) de produire des ions calcium et phosphate permettant à cette matrice d'être minéralisée.

Les cellules OB$\beta_1^{+/+}$ et OB$\beta_1^{-/-}$ ont été mises en plaque en MCC+ATB pendant 5 jours avant l'induction de la différentiation pour atteindre 100% de confluence. Le jour de l'induction, le MCC avec ATB a été remplacé par le milieu spécifique αMEM supplémenté en vitamine C et β-glycerophosphate et contenant de la gentamicine et de la lysostaphine à faibles concentrations (voir matériel et méthode page 39). Le milieu a été renouvelé tous les 3 jours pendant 21 jours, jusqu'à la formation d'un dépôt calcique marqué (minéralisation des ostéoblastes, figure 22).

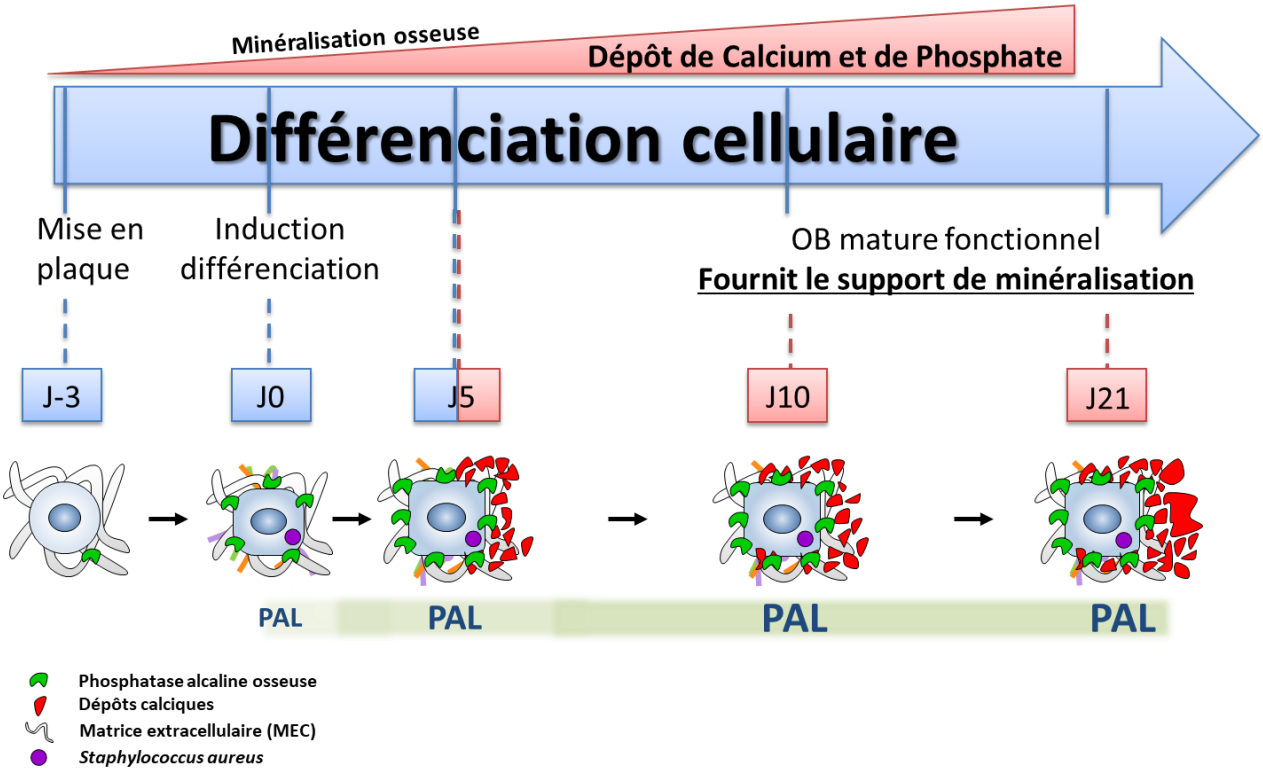


Figure 22 : Modèle in vitro de différenciation et de minéralisation d'OB murins.
La Phosphatase Alcaline osseuse (PAL) augmente de manière croissante au cours de la différenciation. La mesure de ce paramètre à J0 / J5 nous permet de vérifier le bon déroulement de la différenciation des OB.

Pendant les 21 jours de culture nous avons mesuré i) la viabilité des OB par mesure des MTT à J0 / J5 / J10 et J21, ii) l'induction de la différenciation par l'activité de la PAL à J0 / J5 et J10 et iii) la minéralisation par coloration en rouge d'Alizarine à J5 / J10 et J21. Les taux de PAL ont été combinés aux valeurs de MTT et normalisés sur la condition non infectée afin d'exprimer les résultats en pourcentage d'activité PAL par cellule viable.

Afin de vérifier la faisabilité et la robustesse de ce modèle nous avons dans un premier temps analysé l'activité de la PAL et les dépôts calciques sur les deux lignées cellulaires sans infection (figure 23).

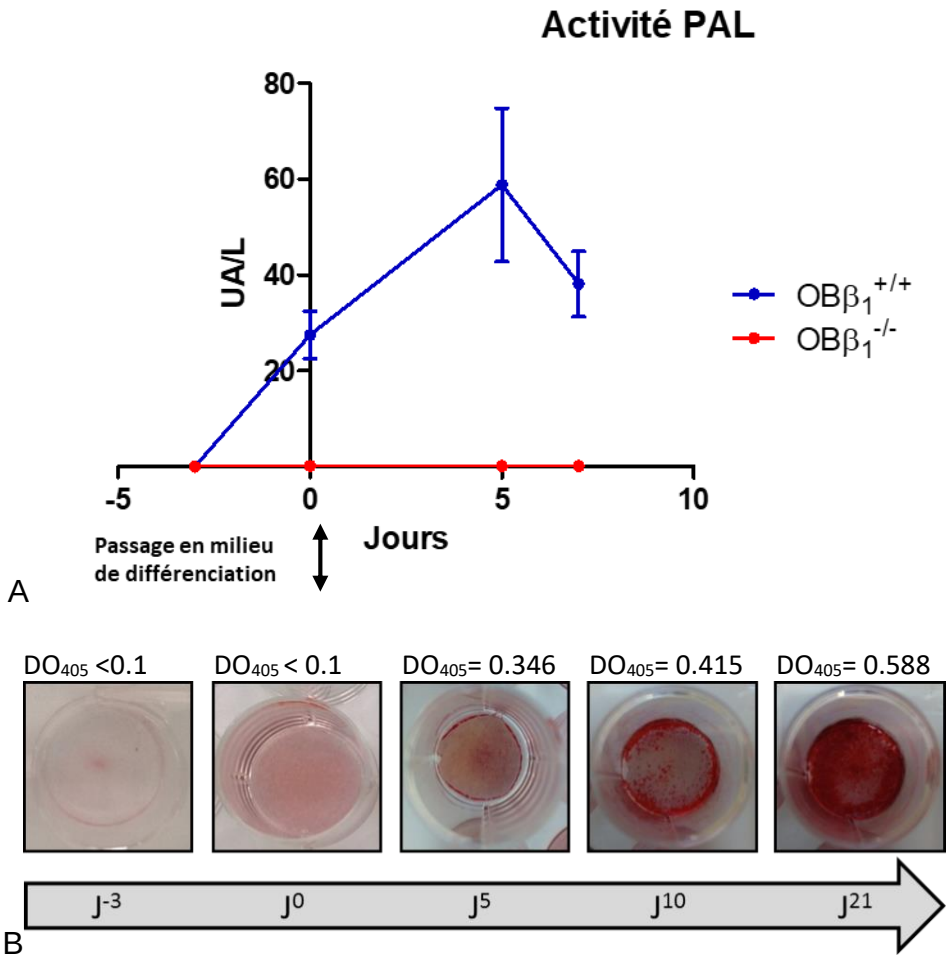


Figure 23 : Mesure de l'activité PAL et coloration des dépôts calciques
Activité PAL mesuré sur les surnageants de culture des OBβ1+/+ (bleu) et OBβ$_1^{-/-}$ (rouge) non infectées (A).
L'activité est exprimée en unité arbitraire UA/L et la mesure est effectuée sur un Vista® 3000 (Siemens, Health care, France).
Coloration en rouge d'Alizarine des dépôts calciques (B) à différents temps de différentiation (-3 ; 0 ; 5 ; 10 et 21 jours) de la lignée OBβ$_1^{+/+}$.

Pour la lignée OB$\beta_1^{+/+}$ (bleu), une augmentation croissante de l'activité de la PAL (figure 23A) entre le moment de la mise en plaque (J^{-3} ; 0 UA/L) et 5 jours après induction de la différenciation (J5 ; 58,8 UA/L) a été observé.
La baisse observée entre J5 et J7 est probablement due à la formation de nodules de minéralisation à 7 jours, retenant la PAL qui n'était donc pas totalement libérée, rendant une mesure précise impossible à des temps plus tardifs que cinq jours. Parallèlement, les dépôts calciques colorés par le rouge alizarine ont présenté une augmentation jusqu'à avoir une coloration forte à 21 jours (figure 23B), confirmant la capacité de minéralisation des cellules OB$\beta_1^{+/+}$ dans ce modèle.
De son côté la lignée OB$\beta_1^{-/-}$ (rouge) n'a montré aucune activité PAL (figure 23A) et ne formait pas de dépôts calciques (aucune coloration de rouge Alizarine visible), validant comme attendu son incapacité à se différencier et à minéraliser dans le modèle. L'absence de l'intégrine β_1 bloquait en effet la différenciation et empêche la formation d'un tapis jointif et communiquant, nécessaire au dépôt calcique.
Ces résultats valident notre protocole de différenciation et de minéralisation de pré-ostéoblastes murins *in vitro*.

III. Impact d'une infection à *S. aureus* sur les OB

En combinant ce protocole de différenciation et de minéralisation *in vitro* (figure 22) avec un modèle d'infection par protection à la gentamicine (décrit en matériel et méthode), nous avons cherché à étudier l'effet des seuls *S. aureus* intracellulaires sur la différenciation des OB et sur leur capacité de minéralisation.

A. Effet sur la différenciation cellulaire des OB de l'infection à *S. aureus*

a. Mesure du taux d'activité PAL par cellule viable

Nous nous étions intéressés à l'effet d'une infection à *S. aureus* sur i) le processus de différentiation, en analysant l'impact sur l'activité de la PAL à J5 après infection et sur l'expression de facteurs de différentiation *RUNX2* et *PAL* à J3 et J5 après infection, et ii) la minéralisation par mesure du dépôt calcique par coloration au rouge d'Alizarine à J5, J10 et J21 après infection et sur l'expression de facteurs de la minéralisation *COL1A* et *OCN* à J3 et J5 après infection.

L'activité de la PAL et la viabilité obtenue par la méthode MTT, ont été mesurées à J5. La réalisation d'une gamme étalon nombre de cellules / activité MTT nous a permis d'estimer la quantité de cellules vivantes et ainsi d'exprimer le pourcentage d'activité enzymatique par cellule viable de façon indépendante de l'effet cytotoxique de l'infection (figure 24).

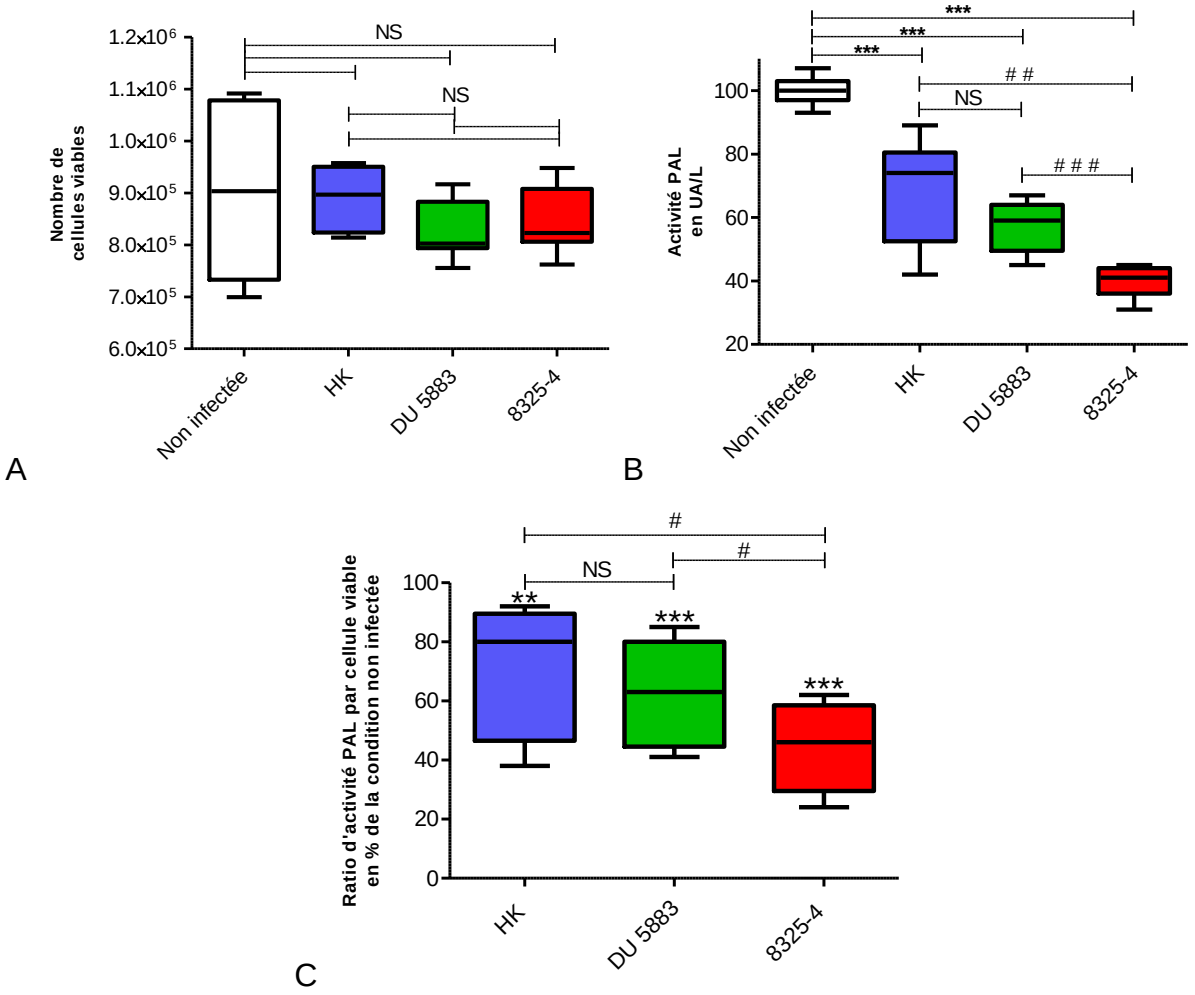


Figure 24: Impact de l'infection sur le nombre de cellules et l'activité PAL à J5
Représentation graphique après 5 jours d'infection du nombre de cellules viables (A), de l'activité PAL en UA/L (B) et du ratio d'activité PAL par cellules viables en % de la condition non infectée (C).
Conditions : contrôle sans infection (blanc), infection par la souche 8325-4 FnBP+ inactivée par la chaleur (HK, bleu), la souche DU5883 FnBP- (vert) et la souche 8325-4 FnBP+ (rouge) à une MOI de 50 :1 (n=3 manipulations en triplicats).
Les statistiques représentées par une étoile correspondent à une comparaison des conditions infectées vis-à-vis de la condition contrôle non infectée, celles représentées par des dièses correspondent à une comparaison entre conditions infectées (Test de Mann-Whitney).

La condition « Heat-killed » (HK, en bleu) correspondant à la souche 8325-4 inactivée par la chaleur (95°C pendant 20 minutes) a permis de savoir si le contact et l'internalisation d'une souche de *S. aureus* non viable pouvait avoir un impact sur la différenciation et la minéralisation des ostéoblastes.

Les résultats ont montré qu'il n'y avait pas d'effet significatif de l'infection sur le nombre de cellules observé 5 jours après infection, quelle que soit la souche utilisée (figure 24A).

L'activité PAL, témoignant de la différenciation des ostéoblastes (figure 24B) était diminuée significativement à 5 jours après infection, passant de 100 UA/L en moyenne pour la condition « non infecté » à respectivement 69, 57 et 40 UA/L pour les conditions HK, DU5883 et 8325-4 ($p<0.05$ pour les trois conditions infectées).

Le ratio d'activité PAL (figure 24C) après l'infection par 8325-4 et DU5883 était diminué de 56% et 36% respectivement par rapport à la condition non infecté (44% et 64% d'activité résiduelle, $p<0.05$).

La différence entre la souche de *S. aureus* capable d'être internalisée (8325-4) et celle sans capacité d'internalisation (DU5883) était significative (44% vs 64% $p<0.05$). Ceci suggérait que l'internalisation de la souche avait un effet plus important sur la différenciation des OB que le simple contact bactérie/ostéoblaste. Enfin avec la souche capable d'être internalisée mais inactivée par la chaleur (HK en bleu), une diminution d'activité PAL (71% d'activité résiduelle, $p<0.05$) a été observée, indiquant que l'interaction avec une souche de *S. aureus* non viable mais capable d'être internalisée conservait un effet sur l'activité des cellules.

L'infection par *S. aureus* entrainait donc une diminution de la différenciation des ostéoblastes, reflétée par une baisse de l'activité PAL. Cet effet était d'autant plus important avec la souche capable d'être internalisée viable.

b. Analyse des marqueurs de la différenciation par qRTPCR

Afin de confirmer les résultats obtenus tout en étudiant de manière plus précise et à des temps plus précoces l'effet de l'infection sur la différenciation des ostéoblastes nous avons analysé l'expression par qRTPCR, à J3 et J5 post infection (figure 25) :

i) du gène *RUNX2* qui régule l'expression des protéines majeures de la matrice osseuse,

ii) du gène de la *PAL* qui permet le dépôt de cristaux d'hydroxyapatite.

Pour effectuer cette analyse, nous avions dans un premier temps extrait les ARNm puis, préparé des ADNc et réalisé à différents temps une qPCR d'un gène de référence (exprimé de manière stable par les OB murins quelles que soient les conditions) adapté pour les analyses sur ostéoblastes murins ; notre choix s'est porté sur le GAPDH, à différents temps.
La quantité du produit de PCR généré était directement proportionnelle à la quantité de départ d'ADNc et donc d'ARN issu du même gène, la quantité d'ARN global avant RT ayant elle-même été standardisée pour l'ensemble des conditions.
La réalisation de cette qPCR a permis d'effectuer des comparaisons d'expressions des gènes cibles en utilisant une méthode de normalisation, classiquement appelée « fold change » décrite ci-dessous en trois grandes étapes :

Etape 1 : Normalisation des Ct (pour "Cycle Threshold" correspondant au cycle pour lequel le seuil de fluorescence est dépassé) obtenus par rapport au gène de référence

$$Ct\ gène\ cible - Ct\ gène\ de\ référence = \Delta Ct\ échantillon$$

Etape 2 : Normalisation par rapport au « calibrateur ».
Le calibrateur correspond à la condition contrôle non infectée.
Ce calcul était réalisé pour chaque échantillon : la valeur du calibrateur est soustraite à la valeur de l'échantillon

$$\Delta Ct\ échantillon - \Delta Ct\ calibrateur = \Delta\Delta Ct$$

Le ΔΔCt était donc égal à 0 pour le calibrateur.

Etape 3 : Détermination de la variation du nombre de copies du gène cible selon la méthode

$$2^{-\Delta\Delta Ct}\ ou\ Fold\ change.$$

Cette méthode permettait donc d'étudier les variations d'expressions des gènes cibles à analyser entre chaque condition.

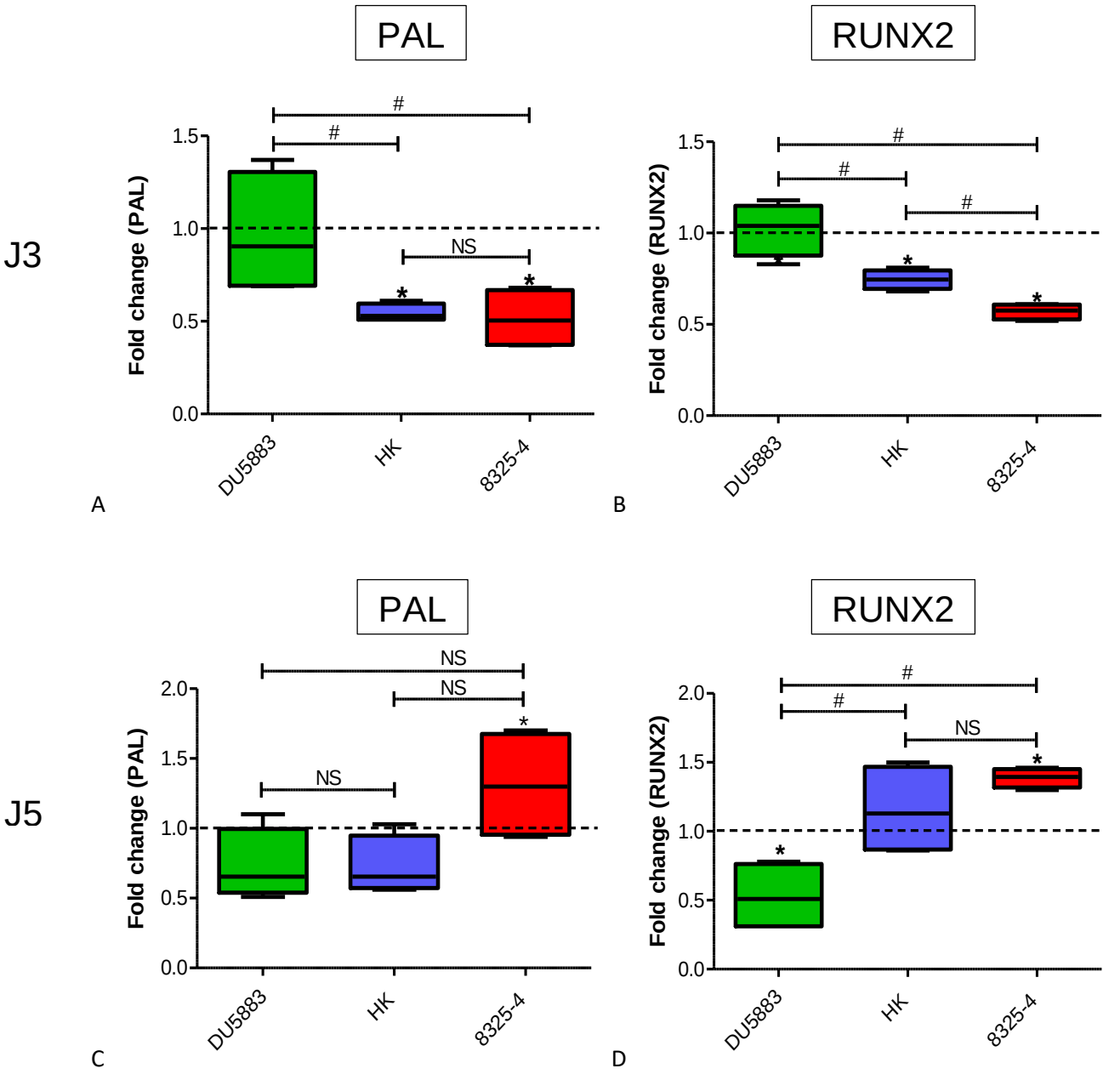


Figure 25 : Evaluation de l'expression des gènes de la différenciation
Après 3 (A, B) et 5 jours (C, D) d'infection en présence des souches DU5883, 8325-4 tué à la chaleur ou 8325-4 viable.
Evaluation de l'expression des gènes de la phosphatase alcaline (A, C) et de RUNX2 (B, D) par méthode qRTPCR à partir d'ARN cellulaires après 3 jours et 5 jours d'infection à une MOI de 50 :1 avec la souche 8325-4 FnBP$^+$ inactivée par la chaleur (HK, Bleu) ou viable (rouge) et la souche DU5883 FnBP$^-$ (vert). Les résultats sont exprimés en fold change (n=2 manipulations en duplicats). Test de Mann-Whitney, contrôle vs conditions infectées représenté par une étoile, comparaison des conditions infectées entre elles représenté par un dièse.

Par rapport à la condition contrôle cellules non infectées d'infections, les deux marqueurs de la différenciation ostéoblastique *RUNX2* et *PAL* ont été significativement affectés après 3 jours pour la souche 8325-4 FnBP$^+$ capable d'être internalisée, que ce soit sous la forme inactivée (HK en bleu) ou sous la forme viable (en rouge) (figure 25 A, B). Pour l'expression de la *PAL,* pour ces deux conditions deux fois moins d'expression (-0,5) a été observée. Pour le gène *RUNX2* l'effet semblait plus important lorsque la souche utilisée était viable et capable d'être internalisée (rouge) avec également deux fois moins d'expression (-0,5). Il faut noter cependant une baisse significative (-0,25) lorsque cette souche était sous sa forme inactive (HK en bleu).
Cette diminution d'expression pour ces deux gènes semblait être transitoire car elle n'était plus observée après 5 jours d'infection (figure 25 C, D).
Au contraire la souche incompétente pour l'internalisation FnBP$^-$ DU5883 (vert) ne semblait pas affecter l'expression de ces deux gènes de la différenciation ostéoblastique 3 jours après infection.
A 5 jours après infection (figure 25 C, D), on observe de manière intéressante que la souche 8325-4 viable et compétente pour l'internalisation (rouge) induisait une augmentation de l'expression de la *PAL* et de *RUNX2* avec +25% et +50% d'expression respectivement.
Un résultat également intéressant a été observé à 5 jours après infection avec la souche DU5883 (vert) FnBP$^-$ qui induisait une baisse d'un facteur 2 du niveau d'expression pour le gène *RUNX2* (figure 25 D), alors qu'à 3 jours après infection (figure 25 B) elle ne semblait avoir aucun effet. Des travaux complémentaires sont en cours pour savoir si ce résultat était dû à un biais technique (difficulté d'extraction à 5 jours liée à la minéralisation), ou si l'effet était avéré.
En comparant l'ensemble des résultats obtenus pour l'étude de l'impact d'une infection sur les ostéoblastes, on a constaté une apparente dichotomie entre ce qui était observé au niveau phénotypique (étude de l'activité PAL dans les surnageant de culture après infection) et ce qui était observé au niveau transcriptomique (expression de gènes cibles après infection par méthode qRTPCR). Cependant ces analyses ne nous permettaient pas d'exclure de potentielles régulations post-transcriptionnelles.
En effet au niveau protéique dans les surnageants de culture, la souche capable d'être internalisée 8325-4 FnBP$^+$ viable (rouge) semblait induire à J5 une diminution plus significative de l'activité PAL que la souche DU5883 FnBP$^-$ (vert), qui induisait elle-même plus d'effet que la souche HK FnBP$^+$ inactivée par la chaleur (bleu).

Or au niveau transcriptomique la souche capable d'être internalisée, que ce soit sous la forme viable ou inactivée semblait affecter plus fortement l'expression des gènes de la différenciation après 3 jours d'infection. Cependant les mesures phénotypiques ont été faites à J5 après infection, pouvant expliquer les différences observées.

A la suite de ces résultats, nous avons cherché à savoir si ce « retard » de différenciation des ostéoblastes pouvait avoir un effet sur leur capacité à former une matrice minérale osseuse. Nous avons donc analysé l'expression de gènes spécifiques de la minéralisation à des temps précoces (3 et 5 jours après infection), et quantifié les dépôts calciques par coloration en rouge d'Alizarine à des temps précoces et tardifs (5, 10 et 21 jours après infection).

B. Effet de l'infection à *S. aureus* sur la minéralisation des OB

a. Coloration des dépôts calciques par méthode au rouge alizarine

Afin d'étudier l'effet de l'infection à *S. aureus* sur la minéralisation des OB nous avons réalisé une analyse phénotypique tardive des taux de dépôts calciques, grâce à une méthode de coloration en rouge d'Alizarine. Néanmoins cette méthode de coloration présente une limite technique, puisque elle ne permet pas de mesurer les dépôts à des temps inférieur à 5 jours d'infection. Nous nous sommes donc intéressé à l'impact d'une infection à une MOI de 50 :1 à J5, J10 et J21 après infection (figure 26).

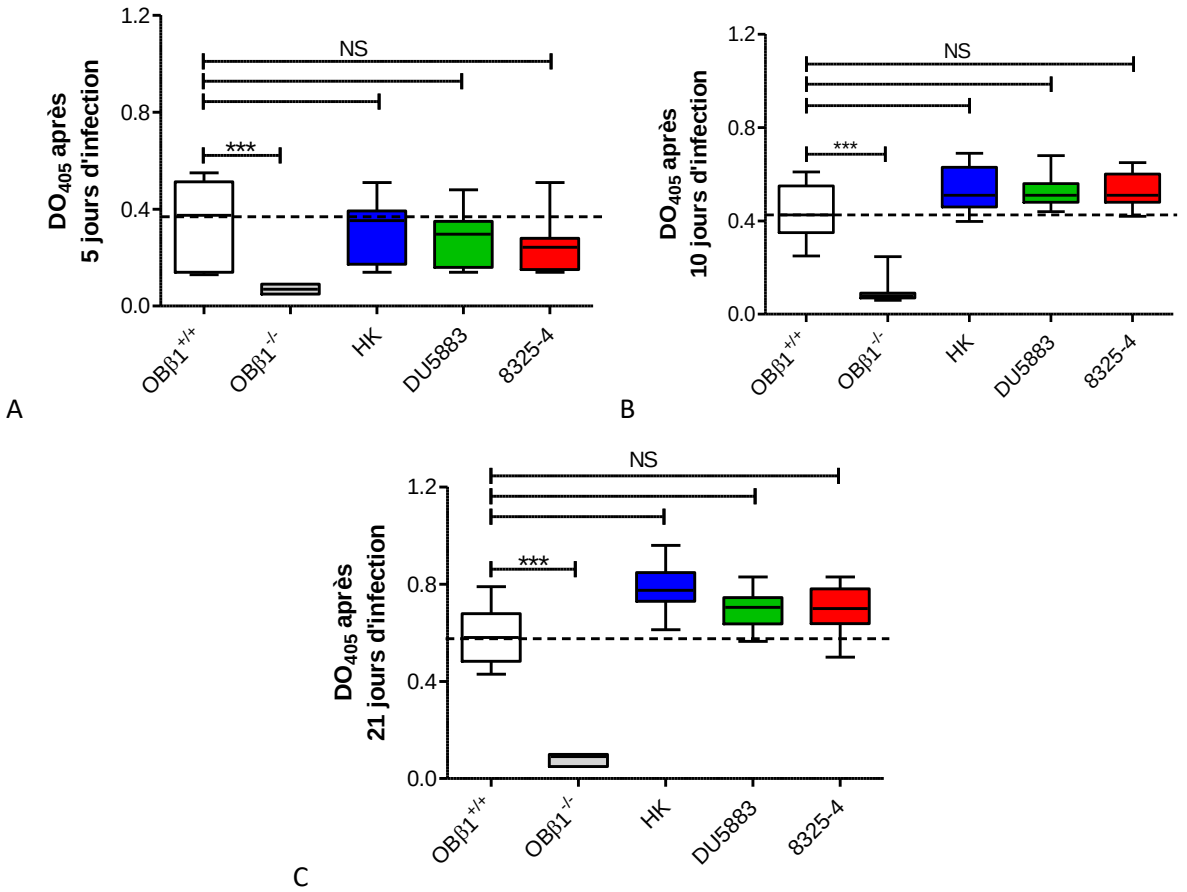


Figure 26 : Analyse quantitative des dépôts calciques par coloration en rouge d'alizarine. Après 5 jours (A), 10 jours (B) et 21 jours (C) d'infection.
Conditions utilisées : contrôle sans infection ($OB\beta_1^{+/+}$, blanc), souche 8325-4 FnBP+ (rouge) et inactivée par la chaleur (HK, bleu) et la souche DU5883 FnBP- (vert).
Infection réalisée avec des MOI de 50 :1 selon le protocole de protection à la gentamycine.
Les cellules $OB\beta_1^{-/-}$ (en gris) incapables de minéraliser sont utilisées en tant que témoin négatif.
n=3 manipulations en triplicats, test Mann-Whitney $OB\beta_1^{+/+}$ non infectée vs conditions infectées.

En comparant avec la condition non infectée, nous avons pu observer de faibles variations non significatives avec cette méthode, aux trois temps étudiés et pour l'ensemble des souches utilisées (figure 26 A, B, C).

A 5 jours après infection (figure 26A) une tendance à la baisse pour l'ensemble des conditions infectées était observée. Cette tendance à la baisse semblait légèrement plus importante avec la souche 8325-4 $FnBP^+$ capable d'être internalisée par comparaison aux DO obtenues pour les deux autres souches (moyenne de 0,262 pour 8325-4 contre 0,285 et 0.317 pour DU5883 et HK respectivement) sans être significative au niveau statistique. Ces résultats n'exprimant qu'une tendance puisque les différences n'étaient pas significatives.

A 10 et 21 jours après infection (figure 26 B, C), *S. aureus* ne semblait plus avoir d'effet sur les dépôts calciques, quelle que soit la souche utilisée. Le faible ralentissement de la minéralisation observé à 5 jours semblait être rattrapé au cours du temps. La moyenne pour chaque condition infectée étant même légèrement supérieure à la moyenne de la condition non infectée après 10 et 21 jours (effet rebond compensatoire).

b. Analyse des marqueurs de la minéralisation par qRTPCR

Afin de compléter cette étude sur l'effet de l'infection à *S. aureus* sur la minéralisation des OB, et pour pallier au biais de la technique de coloration en rouge Alizarine qui ne nous permet pas d'étudier l'effet de l'infection à des temps précoces. A partir des mêmes conditions d'infection et des mêmes extraits d'ADNc utilisés dans l'étude sur la différenciation des OB, nous avons réalisé une analyse de l'expression de marqueurs spécifiques de la phase de minéralisation : l'ostéocalcine (*OCN*, qui est une protéine synthétisée par les ostéoblastes différenciés et capable de se lier aux ions calcium et à l'hydroxyapatite, et est classiquement utilisée comme un marqueur tardif de l'activité ostéoblastique, et le collagène de type I (*COL1A,* qui est le composant majoritaire de la matrice osseuse et est un des marqueurs protéiques précoces principaux de la formation osseuse) (figure 27).

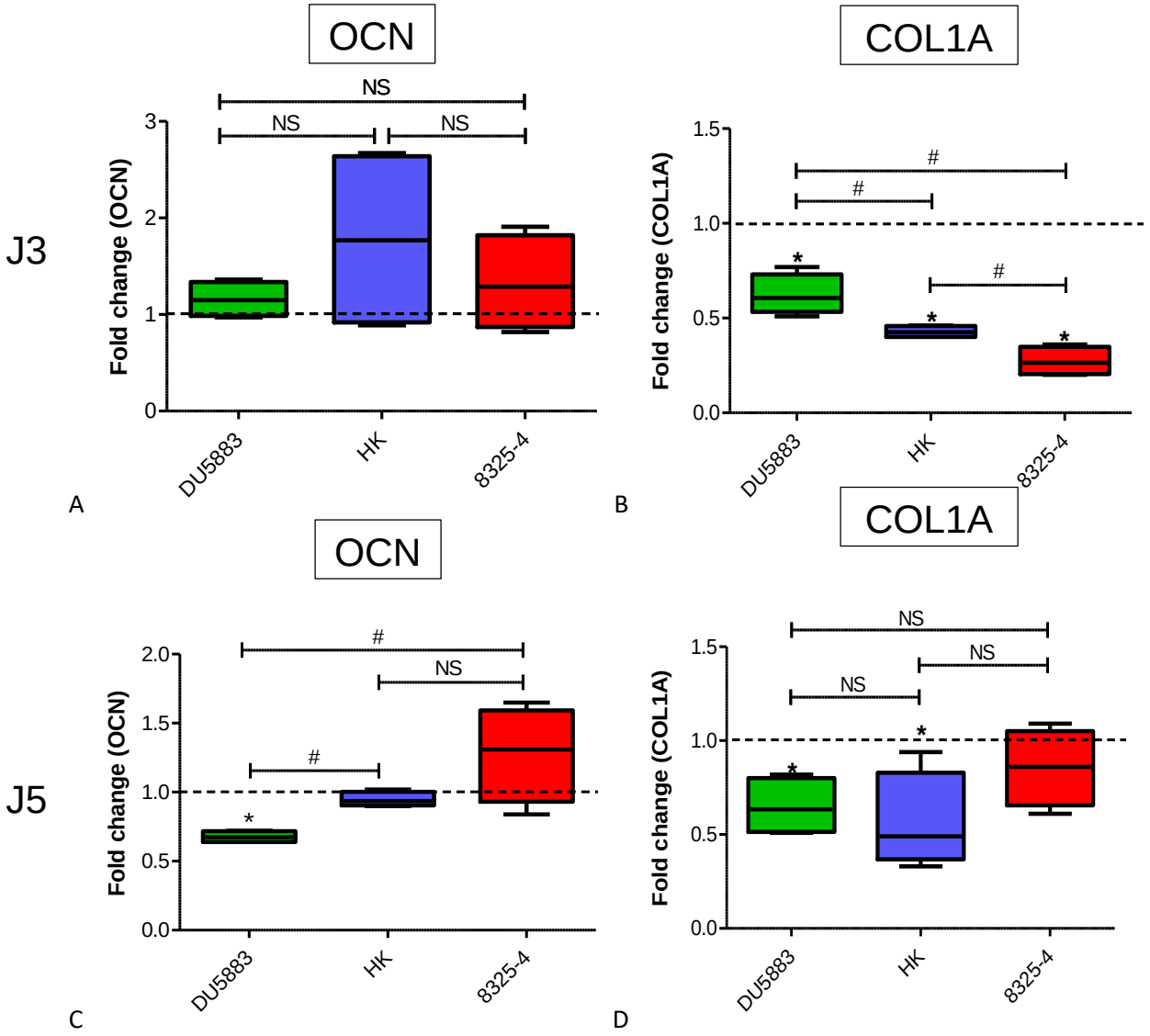


Figure 27 : Evaluation de l'expression des gènes de la minéralisation à J3 et J5
L'expression des gènes ostéocalcine (OCN, A, C) et collagène de type I (COL1A, B, D) a été analysée par qRTPCR à partir d'ARN cellulaires après 3 jours (A, B) et 5 jours (C, D) d'infection à une MOI de 50 :1, avec la souche 8325-4 FnBP$^+$ inactivée par la chaleur (HK, Bleu) ou viable (rouge) et la souche DU5883 FnBP$^-$ (vert). Les résultats sont exprimés en fold change (n=2 manipulations en duplicats). Test de Mann-Whitney, contrôle vs conditions infectées représenté par une étoile, comparaison des conditions infectées entre elles représenté par un dièse.

On observait à 3 jours (figure 27A) que l'infection n'affectait pas le niveau d'expression de l'ostéocalcine (*OCN*), quelle que soit la souche utilisée. Après 5 jours d'infection (figure 27C) la souche DU5883 FnBP$^-$ (en vert) induisait une perte significative d'expression du gène *OCN* alors que les souches 8325-4 et HK avaient un effet neutre. Pour le collagène de type I (*COL1A)* à trois jours après infection (figure 27B) une baisse significative du taux d'expression pour l'ensemble des souches a été observée.

Cet effet semblait être une nouvelle fois plus important lorsque la souche de *S. aureus* était capable d'être internalisée dans les cellules ($FnBP^+$), que ce soit sous sa forme viable (rouge) ou inactive (bleu), puisqu'on observait deux fois moins d'expression du gène ($p<0,05$). Cet effet observé à trois jours restait significatif à cinq jours après infection pour la souche compétente pour l'internalisation et inactivée par la chaleur (bleu), ainsi que pour la souche $FnBP^-$ (vert) ($p<0,05$) (figure 27D). Pour la souche 8325-4 (rouge) le retard d'expression du gène *COL1A* impliqué dans la minéralisation, accumulé à des temps précoces semblait être rattrapé à partir de J5 pour se rapprocher du niveau d'expression de la condition non infectée.

Comme pour l'étude sur la différenciation avec le gène codant la *PAL*, la souche capable d'être internalisée et viable 8325-4 $FnBP^+$ (rouge) induisait après 3 jours d'infection la diminution d'expression la plus significative d'un des gènes principaux de la minéralisation qu'est le gène codant le collagène de type I.
Néanmoins de manière systématique, l'effet observé suite à l'infection par 8325-4 était comblé après 5 jours d'infection, et l'expression des gènes devenait équivalente ou supérieure à la condition contrôle sans infection.
Il semble donc que les baisses d'activités protéiques et d'expression de gènes cibles de la différenciation et de la minéralisation, observées après infection n'induisent qu'un effet limité sur les capacités de minéralisation *in vitro* des ostéoblastes après des temps long.

Dans cette première partie de projet nous avons mis au point un modèle *in vitro* d'infection des OB par *S. aureus* qui nous a permis de montrer un effet de l'infection sur la maturation des OB à des temps précoces. Cet effet semblait être accru lorsque *S. aureus* était capable d'être internalisé dans les cellules.
Nous avons ensuite cherché à confirmer ces résultats *in vitro* dans le modèle d'infection *in vivo* présenté précédemment (cf. 1ère partie de résultats).

C. Effet de l'infection à *S. aureus* sur modèle *in vivo* murin

Les fémurs droits de 15 souris ont été infectés avec le couple de souches 8325-4 et DU5883 (figure 28 ; 3 contrôles PBS, 6 infections 8325-4 et 6 infections DU5883) pendant 7 jours.

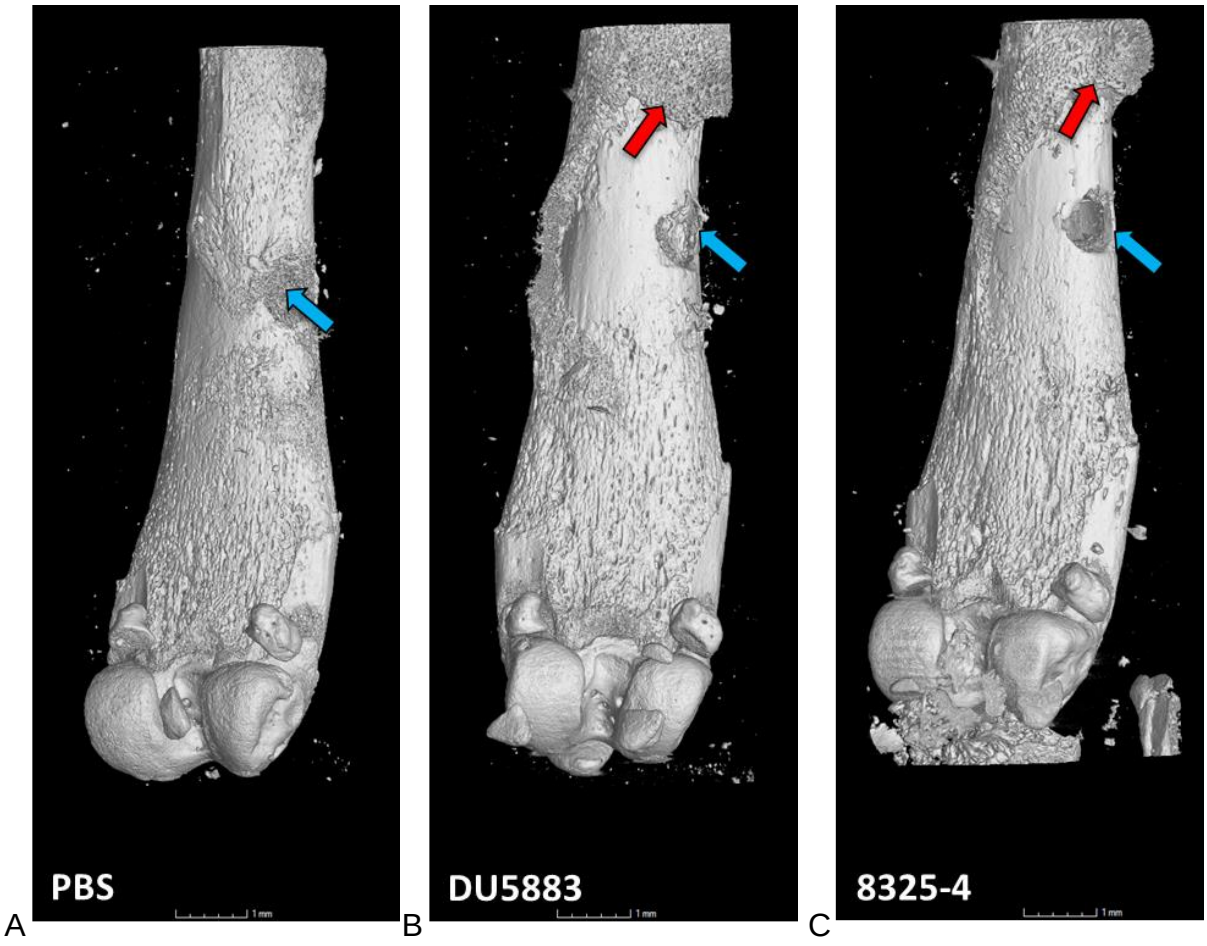


Figure 28 : Reconstruction en 3D d'os de fémurs à 7 jours post infection
La reconstruction a été réalisée après réalisation d'un scan à rayons X sur microtomographe Phoenix nanotom S (General Electric) sur des fémurs de:
souris contrôles après injection de PBS (A),
souris infectées après injection d'inoculum bactérien de la souche S. aureus DU5883 FnBP$^-$ incompétente pour l'internalisation (B)
souris infectées par la souche de S. aureus 8325-4 FnBP$^+$ capable d'être internalisée (C).
Les sites d'injection sont indiqués par les flèches bleues.
Une excroissance osseuse poreuse est observée à la surface des os infectés (flèche rouge).

Après réalisation du scan et reconstruction des os en 3D, nous avons analysé quantitativement les paramètres de l'os trabéculaire suivants : volume d'os, contenu minéral et densité minérale (figure 29).

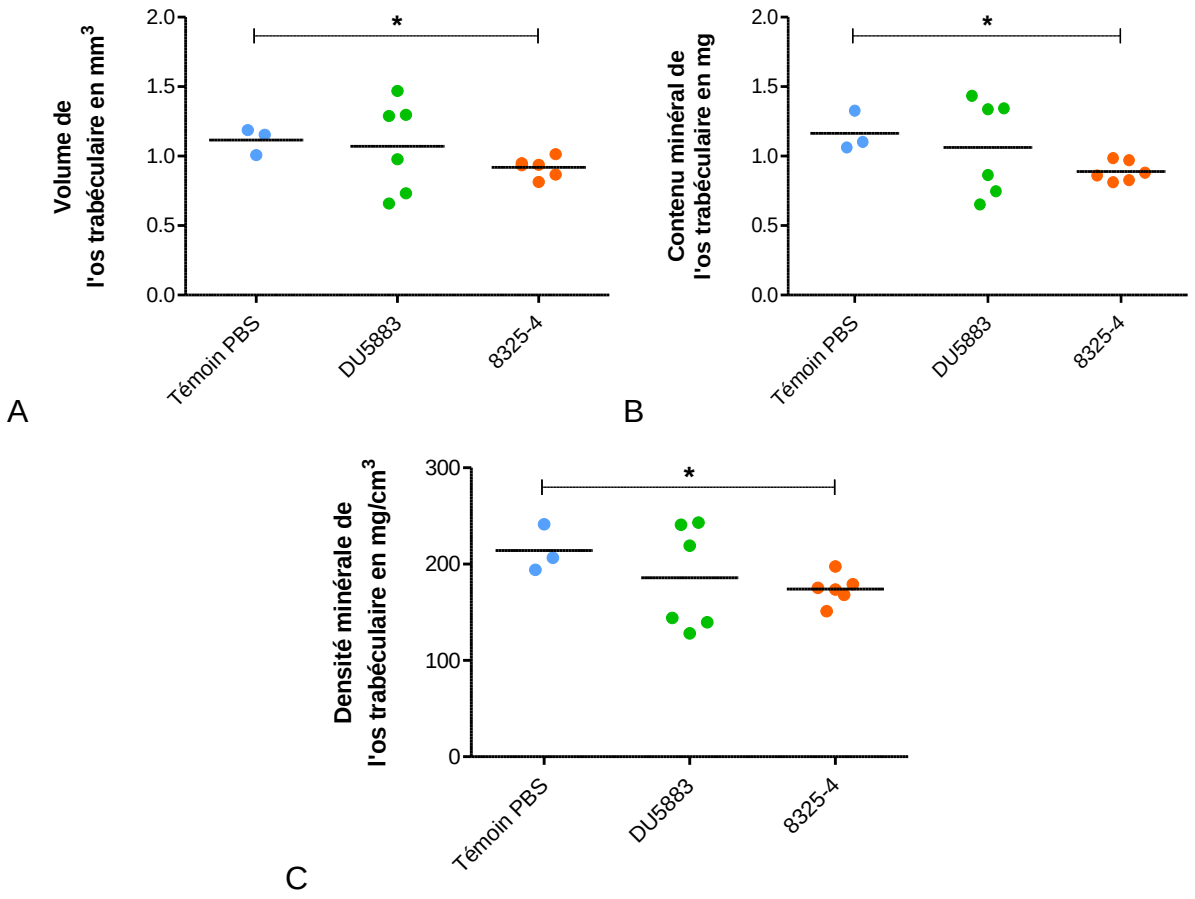


Figure 29 : Effet sur l'os trabéculaire de l'infection par S. aureus dans un modèle murin in vivo à J7
15 souris au total ont reçu soit une injection contrôle de PBS (bleu, n=3) soit une injection d'inocula de la souche DU5883 FnBP$^-$ (vert, n=6) ou de la souche 8325-4 FnBP$^+$ (orange, n=6). Le volume de l'os (A) est exprimée en mm^3, le contenu minéral de l'os (B) en mg et enfin la densité minérale de l'os (C) en mg par cm^3.
Test de Mann-whitney, groupe témoin PBS vs groupes infectés.

On observait que l'effet sur l'os suite à l'infection avec ces deux souches de *S. aureus* était nettement moins marqué par comparaison avec celui induit par les souches cliniques étudiées en partie I.

L'infection par la souche 8325-4 FnBP+ induisait une diminution significative du volume de l'os (figure 29A ; 1116 vs 920 µm^3 soit 196 µm^3 de perte, $p<0.05$) par rapport au groupe témoin. La souche DU5883 FnBP$^-$ incapable de s'internaliser n'entrainait pas cette perte (1116 vs 1071 µm^3, soit 46 µm^3 de différence, NS).

De même, le contenu minéral (figure 29B) et la densité minérale (figure 29C) de l'os étaient diminués suite à une infection par 8325-4 $FnBP^+$ (respectivement 1164 µg vs 890 µg soit 275 µg de perte du contenu minéral, $p<0.05$; 214 mg/cm^3 vs 174 mg/cm^3 soit 40 mg/cm^3 de perte de la densité minérale, $p<0.05$) par rapport au groupe témoin. Là encore la souche DU5883 $FnBP^-$ ne semblait pas avoir d'effet.
Cependant, on observait très clairement deux groupes d'os au sein du jeu de données pour la souche DU5883 $FnBP^-$, ce qui pouvait refléter un biais technique lors de la réalisation de l'infection. D'un point de vue statistique il était difficile de tirer des conclusions au vue de l'hétérogénéité des résultats obtenus avec la souche DU5883.
Comme observé dans la 1ère partie des résultats, l'infection avec ces deux souches de *S. aureus* n'avait pas d'effet significatif sur l'os cortical compact (non représenté).

L'ensemble de ces résultats *in vitro* et *in vivo* suggère un impact *in vitro* à des temps précoces d'une infection à *S. aureus* sur la différenciation et la capacité de minéralisation des OB. L'utilisation du modèle murin semblait confirmer ces résultats puisqu'une perte osseuse significative au niveau de l'os trabéculaire après 7 jours d'infection était observée *in vivo* avec la souche 8325-4 $FnBP^+$ capable d'être internalisée dans les OB.
Cet effet accru de l'infection lorsque la souche de *S. aureus* utilisée était capable d'être internalisée dans les OB était l'une des observations majeures issues de cette première partie d'étude. En effet, ceci rejoignait les observations réalisées en clinique, selon lesquelles les souches bactériennes capables d'être internalisées dans le compartiment intracellulaire induisent des infections chroniques entrainant notamment une perte osseuse sur le long terme et de nombreux descellements de prothèses.

Ces observations nous ont donc conduit à étudier le mécanisme d'internalisation de *S. aureus* au niveau cellulaire, notamment en analysant la voie de l'intégrine β1 qui est la voie d'entrée majoritaire pour les bactéries, et en analysant le rôle de protéines de signalisation présentes au niveau de la membrane cellulaire ou dans le compartiment intracellulaire.

IV. Étude de la voie de l'internalisation de *S. aureus* dans les OB

Comme décrit précédemment dans ce projet, la capacité d'internalisation des souches de *S. aureus* peut avoir un impact important sur la sévérité des infections ostéoarticulaires. En effet, après internalisation les bactéries se retrouvent protégées à la fois du système immunitaire mais également de l'effet des antibiotiques. Cette protection entraine une sanctuarisation des souches dans le compartiment intracellulaire à l'origine de la chronicisation des infections et conduisant à une éradication plus difficile. De plus, comme observé en première partie de résultats, une infection intracellulaire semble limiter de façon plus importante la différentiation et la minéralisation des OB qu'une infection extracellulaire, pouvant conduire au niveau clinique à une plus forte perte osseuse et un risque de descellement de prothèse.

L'objectif de cette seconde partie de notre travail, en plus d'approfondir nos connaissances sur les effets d'une infection à *S. aureus* sur les ostéoblastes, a été de trouver de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques pouvant permettre de limiter l'internalisation, et ainsi d'endiguer le phénomène de chronicisation, de réduire les risques de rechutes et de diminuer les dégâts causés par l'infection. Il a été bien décrit en début de projet que la présence des composants du mécanisme tri-partite $\alpha5\beta_1$/Fn/FnBP était nécessaire pour l'internalisation de *S. aureus*.

Dans cette seconde partie d'étude, nous nous sommes intéressés de manière plus approfondie à l'intégrine β_1 en tentant d'étudier et de comprendre les bases moléculaires requises pour le processus d'internalisation.

Pour cela nous avons analysé en détails la voie de signalisation menant à l'internalisation de *S. aureus* en ciblant différentes protéines membranaires et intracellulaires.

A. Etude de la cavéoline

Les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique constituées de deux familles de protéines, les cavins et les cavéolines. Le mécanisme d'internalisation via les cavéoles est activé par stimulation cellulaire, c'est-à-dire par des récepteurs cellulaires tels que les intégrines (figure 30).

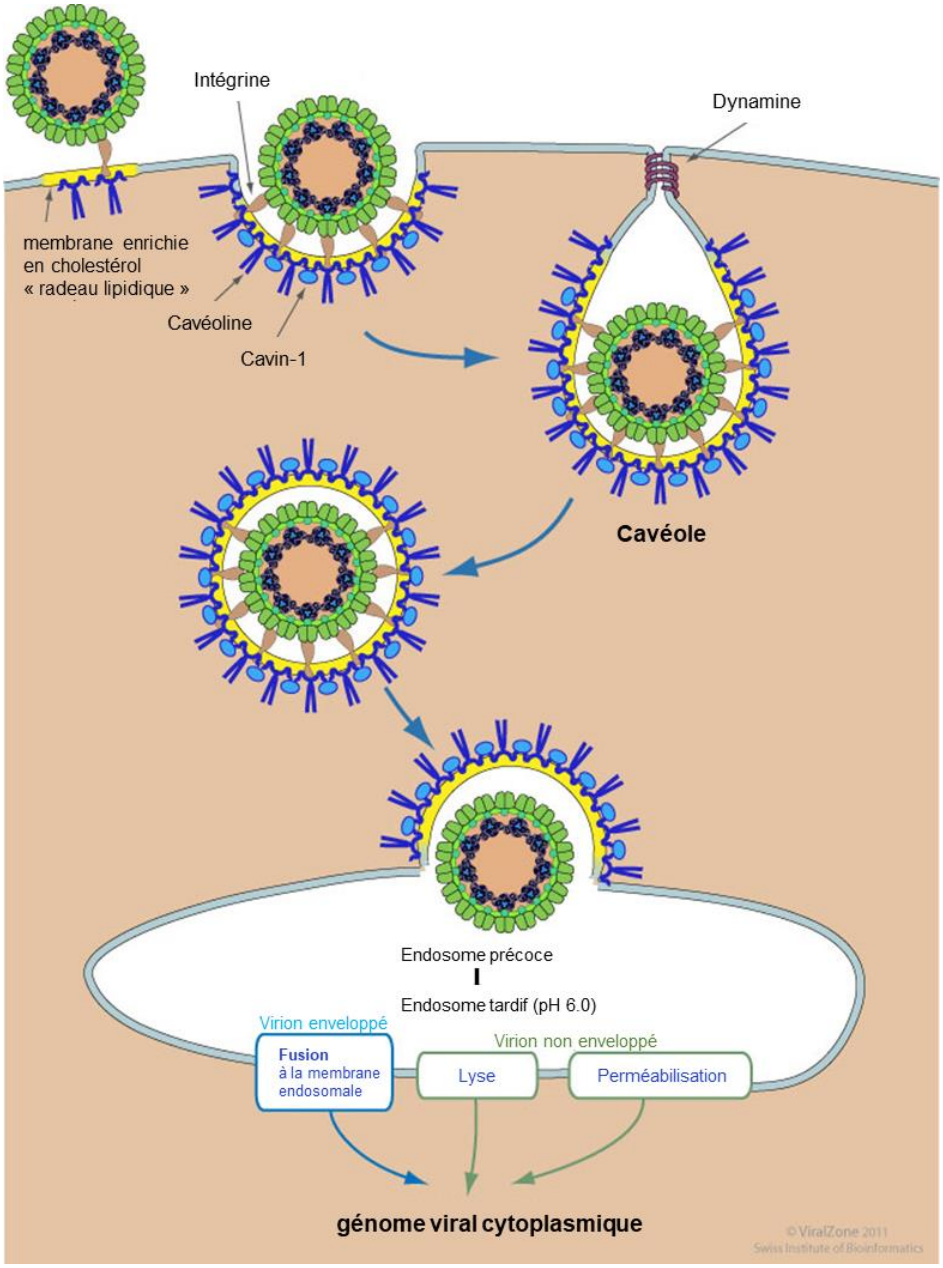


Figure 30 : Représentation graphique de l'internalisation d'un virus par une cellule hôte
La cellule utilise ses radeaux lipidiques et les cavéolines afin de créer une invagination de la membrane et d'enclencher l'endocytose du virus. Le mécanisme est relativement similaire pour l'internalisation des bactéries. (Source : viralzone.org).

La cavéoline-1 est la protéine principale pour la formation et l'ancrage au cytosquelette d'actine des cavéoles. Elle joue également différents rôles dans la modulation de l'interaction cellulaire avec la matrice extracellulaire, le trafic lipidique, notamment de microdomaines membranaires, ou encore la régulation des molécules de signalisation (Navarro, Anand-Apte, et Parat 2004), déjà décrite dans les fibroblastes (P. Liu, Rudick, et Anderson 2002; Hoffmann et al. 2010).

La cavéoline-1 apparait également comme un régulateur potentiellement clé de la différenciation et de la fonction de minéralisation des ostéoblastes (Sawada et al. 2007). Enfin, cette protéine présente au niveau de la membrane plasmique (figure 30, carré rouge) intervient dans le renouvellement de la fibronectine et l'endocytose via l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ (F. Shi et Sottile 2008) (figure 31).

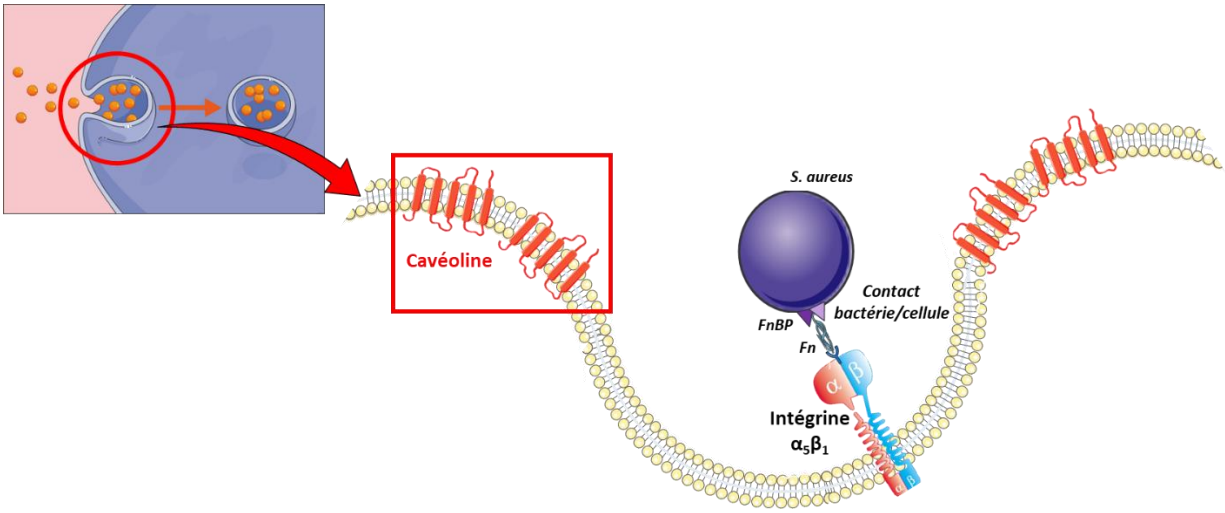


Figure 31 : La cavéoline, protéine de la membrane plasmique des ostéoblastes

Ainsi, du fait du rôle de la cavéoline dans la minéralisation ostéoblastique et dans l'endocytose des *Staphylocoques* via l'intégrine β_1, nous nous sommes efforcés de rechercher qui de la cavéoline ou de l'intégrine β_1, a le rôle le plus prépondérant dans ce mécanisme. Pour cela nos collaborateurs de Grenoble ont créé 6 lignées de cellules dont l'expression ou l'activité de la cavéoline-1 ont été modulées :

2 lignées avec maintien d'intégrité de l'intégrine β_1 (β_1^+) :

- B+C+ : pour OB$\beta_1^{+/+}$ Cavéoline-1 sauvage surexprimée (activable)
- B+C- : pour OB$\beta_1^{+/+}$ Cavéoline-1 invalidée

Et 4 lignées dans un contexte génétique β_1^- :

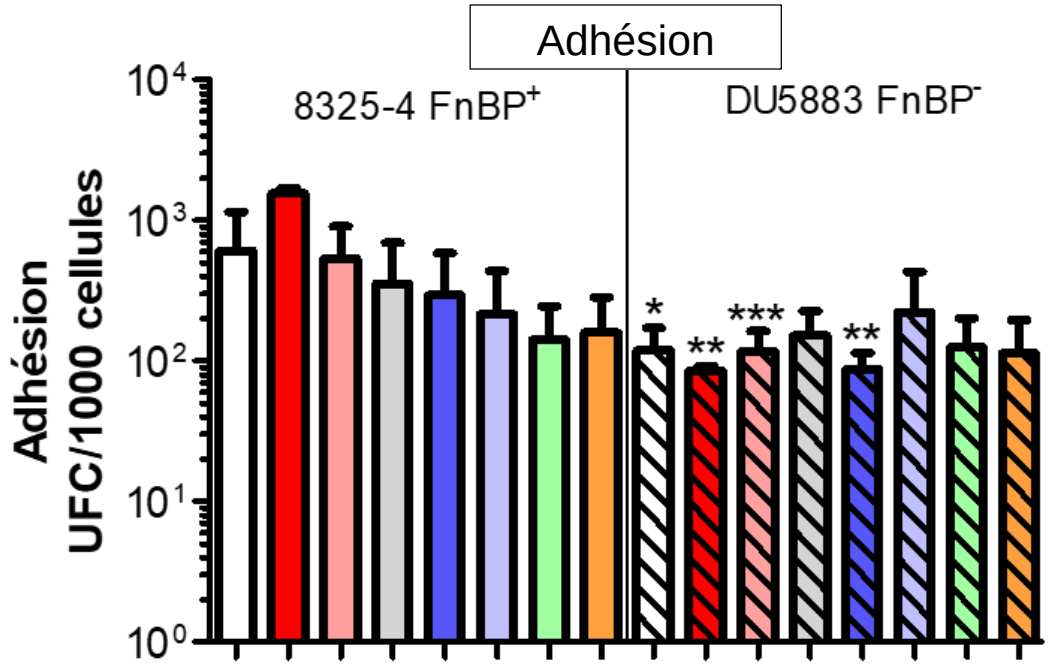
- B-C+ : pour OB$\beta_1^{-/-}$ Cavéoline-1 sauvage surexprimée (activable)
- B-C- : pour OB$\beta_1^{-/-}$ Cavéoline-1 invalidée
- B-CYF : pour OB$\beta_1^{-/-}$ Cavéoline-1 non activable (forme non phosphorylable)
- B-CYE : pour OB$\beta_1^{-/-}$ Cavéoline-1 activée constitutivement (phospho-mimétique)

Dans un premier temps nous avons étudié les taux d'adhésion et d'internalisation de ces lignées.

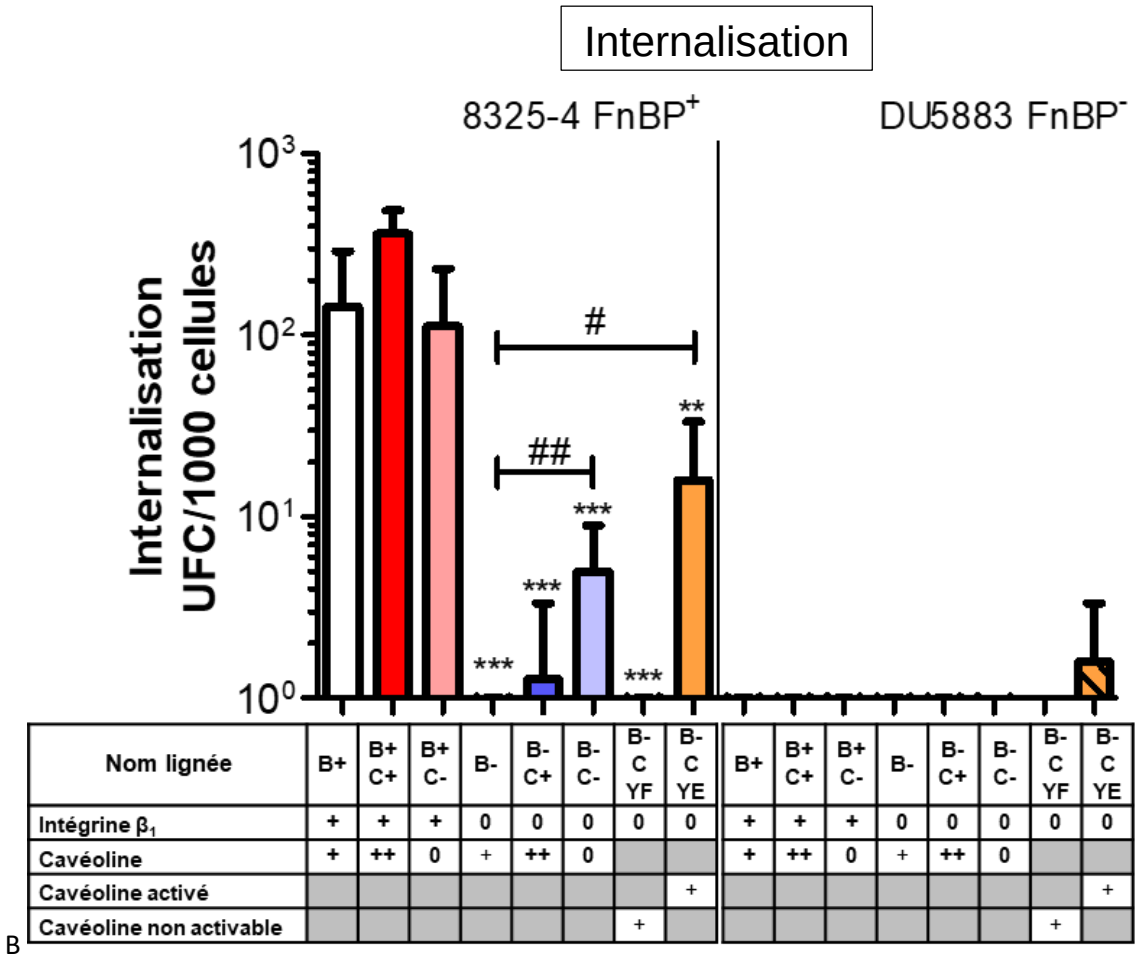
a. Mesure des taux d'adhésion et d'internalisation

Dans notre modèle d'infection, nous avons infecté l'ensemble de nos lignées avec le couple de souches $FnBP^+$ et $FnBP^-$ (8325-4 et DU5883) à des MOI de 1:1. Après 3 heures, les lysats ont été étalés sur gélose TSA pour effectuer le dénombrement (figure 32).

A



Nom lignée	B+	B+ C+	B+ C-	B-	B- C+	B- C-	B- C YF	B- C YE	B+	B+ C+	B+ C-	B-	B- C+	B- C-	B- C YF	B- C YE
Intégrine β_1	+	+	+	0	0	0	0	0	+	+	+	0	0	0	0	0
Cavéoline	+	++	0	+	++	0			+	++	0	+	++	0		
Cavéoline activé								+								+
Cavéoline non activable							+								+	



B

Nom lignée	B+	B+ C+	B+ C-	B-	B- C+	B- C-	B- C YF	B- C YE	B+	B+ C+	B+ C-	B-	B- C+	B- C-	B- C YF	B- C YE
Intégrine β_1	+	+	+	0	0	0	0	0	+	+	+	0	0	0	0	0
Cavéoline	+	++	0	+	++	0			+	++	0	+	++	0		
Cavéoline activé								+								+
Cavéoline non activable							+								+	

Figure 32 : Adhésion et internalisation dans des lignées murines mutées ou non pour la cavéoline

Les taux d'adhésion (A) et d'internalisation (B) ont été évalués à partir des lignées mutées :

<u>Dans un contexte génétique β_1^+ :</u>

$OB\beta_1^{+/+}$ (blanc), B^+C^+ (rouge) et B^+C^- (rose)

<u>Dans un contexte génétique β_1^- :</u>

$OB\beta_1^{-/-}$(gris), B^-C^+ (bleu foncé), B^-C^- (bleu clair), B^-C^{YF} (vert) et B^-C^{YE} (orange).

Les OB ont été infectés avec la souche 8325-4 (gauche) et DU5883 (droite) à des MOI de 1 :1. Analyse effectuée après 2h d'infection pour l'adhésion et après 1h de traitement après infection à la gentamicine en forte concentration pour l'internalisation. Les résultats sont exprimés en UFC pour 1000 cellules. n=3 manipulations en triplicats, Test statistique de Mann-Whitney, SD,

*Pour l'adhésion * = Comparaison entre deux mêmes lignées pour une infection avec ou sans FnBP. * <0,05 ; ** <0,001 ; *** <0,0005*

Pour l'internalisation = $OB\beta_1^{+/+}$ vs lignées mutées ; # = $OB\beta_1^{-/-}$ vs lignées mutées sans intégrine.*

Pour l'adhésion (figure 32A) aucune différence significative entre les différentes lignées testées pour les deux souches évaluées n'a été observée.
Cependant, une tendance à la baisse était observée lorsque les lignées étaient dépourvues de β_1 et également lorsque les infections étaient réalisées avec la souche $FnBP^-$; une diminution significative était observée pour les lignées B+ ; B+C+ ; B+C- et B-C+.
Par exemple, pour la lignée B+ le nombre moyen de bactéries adhérées passait de 608 UFC/1000 cellules avec la souche $FnBP^+$ à 119 UFC/1000 cellules avec la souche $FnBP^-$ ($p<0,05$).
En ce qui concerne l'internalisation (figure 32B), aucune différence significative n'a été observée pour les lignées possédant l'intégrine β_1 et infectées avec la souche $FnBP^+$, quel que soit le niveau d'expression de la cavéoline. Néanmoins, avec la souche $FnBP^+$ (en traits pleins), l'absence de l'intégrine β_1 entrainait la perte de l'internalisation de *S. aureus* (B- $p<0.0001$). Dans ce contexte, quelques bactéries étaient internalisées lorsque la cavéoline était surexprimée (B-C+ en bleu foncé, $p<0.0001$). De manière surprenante, l'expression d'un mutant constitutivement actif de la cavéoline (B^-CYE en orange, 15 UFC/10^3 cellules, $p<0.005$) ou invalidé pour la cavéoline (B-C- en bleu clair, 5 UFC/10^3 cellules $p<0.0005$) permettait de retrouver un niveau d'internalisation faible mais significatif. En revanche, exprimer un mutant non activable de la cavéoline ne permettait pas de retrouver un niveau d'internalisation sauvage (B-CYF en vert, $p<0.001$).
Si l'infection était réalisée avec la souche délétée pour la FnBP (en rayé) nous n'observions qu'une très faible internalisation pour la lignée exprimant une cavéoline constitutivement active et invalidée en intégrine (B-CYE en orange) de l'ordre de 1,6 bactéries internalisée pour 1000 cellules. Des chiffres de cet ordre représentaient un seuil de comptage extrêmement faible, difficilement interprétable et correspondant probablement à de l'internalisation non spécifique.

En résumé, l'adhésion des bactéries aux cellules n'est pas affectée par l'expression ou l'activité de la cavéoline. Comme attendu, le mécanisme d'internalisation est, lui, fortement dépendant de la FnBP et de la présence de l'intégrine β_1. Cependant une voie alternative est mise en évidence lorsque l'intégrine β_1 est absente, si la cavéoline est absente ou constitutivement active tout en restant dépendant de la FnBP.

b. Marquage fluorescent et analyse au microscope confocal

Afin de confirmer l'internalisation des bactéries observées par une voie différente de la voie $\alpha_5\beta_1$/Fn/FnBP, nous avons réalisé les infections sur lamelles rondes permettant des observations en microscopie confocale.

Lors de la création des lignées mutantes nos collaborateurs de Grenoble ont introduit la GFP (verte) dans les lignées invalidées pour la cavéoline et le mCherry (rouge) dans celles surexprimant les différentes formes de cavéoline. Nous avons également rendu fluorescentes les deux souches de *S. aureus* (8325-4 et DU5883) en les transformant par électroporation avec le plasmide exprimant la GFP ou le DsRed. Ainsi nous avons pu infecter les cellules fluorescentes « rouges » avec des bactéries « vertes » et inversement. (figure 33).

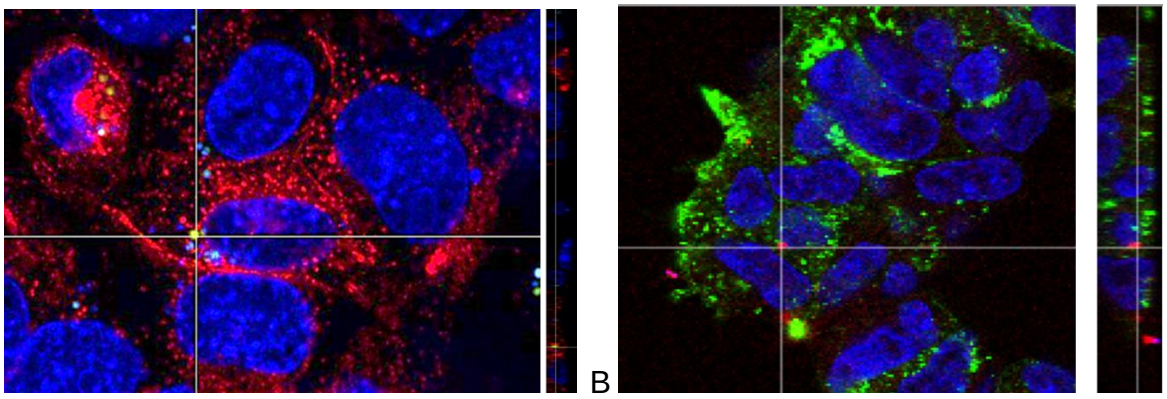


Figure 33 : Analyse au microscope confocal des lignées mutées pour la cavéoline après infection
Les lignées (B^+C^+, gauche, et B^-C^-, droite) ont été infectées par la souche de S. aureus 8325-4 marquées en vert ou en rouge (GFP ou Ds red).
Le noyau des cellules est marqué au DAPI (en bleu).

Suite à l'infection de cellules possédant l'intégrine et surexprimant la cavéoline, produisant la mCherry, par *S. aureus* 8325-4 exprimant la GFP, des bactéries ont été internalisées et ont été retrouvées proches du noyau de la cellule (figure 33A). Lorsque des cellules invalidées pour l'intégrine et pour la cavéoline (B-C-) exprimant la GFP ont été infectées par *S. aureus* 8325-4 exprimant le DsRed, des bactéries ont également été internalisées et retrouvées à proximité du noyau (figure 33B). Ces images confirment donc la présence de bactéries *S. aureus* 8325-4 internalisées au sein des lignées exprimant l'intégrine et la cavéoline (B+C+, à gauche), mais aussi dans les cellules n'exprimant ni l'intégrine ni la cavéoline (B-C- à droite).

Ceci confirme les résultats *in vitro* indiquant la présence éventuelle d'une voie alternative qui est mise en évidence lorsque l'intégrine β_1 est absente, et que la cavéoline est absente ou constitutivement active.

Cette première partie de l'étude a permis de confirmer l'importance de la présence de la FnBP et de l'intégrine β_1 à la surface des bactéries et des cellules respectivement pour observer de l'internalisation. Cependant l'absence d'intégrine peut être partiellement compensée par l'absence ou une activité constitutive de la cavéoline, influant sur la mobilité de la membrane plasmique, ce qui suggère un rôle potentiel de cette protéine dans ce mécanisme.

En plus des effets sur le déclenchement de l'endocytose au niveau de la membrane plasmique, nous nous sommes intéressés à la cascade de signalisation encore largement inconnue en aval de l'intégrine, qui se trouve activée après l'interaction tripartite $\alpha_5\beta_1$/Fn/FnBP.

Cette voie de signalisation implique la tyrosine kinase Src (figure 34, carré bleu), et potentiellement la petite protéine de signalisation Rac1 (figure 34, carré violet).

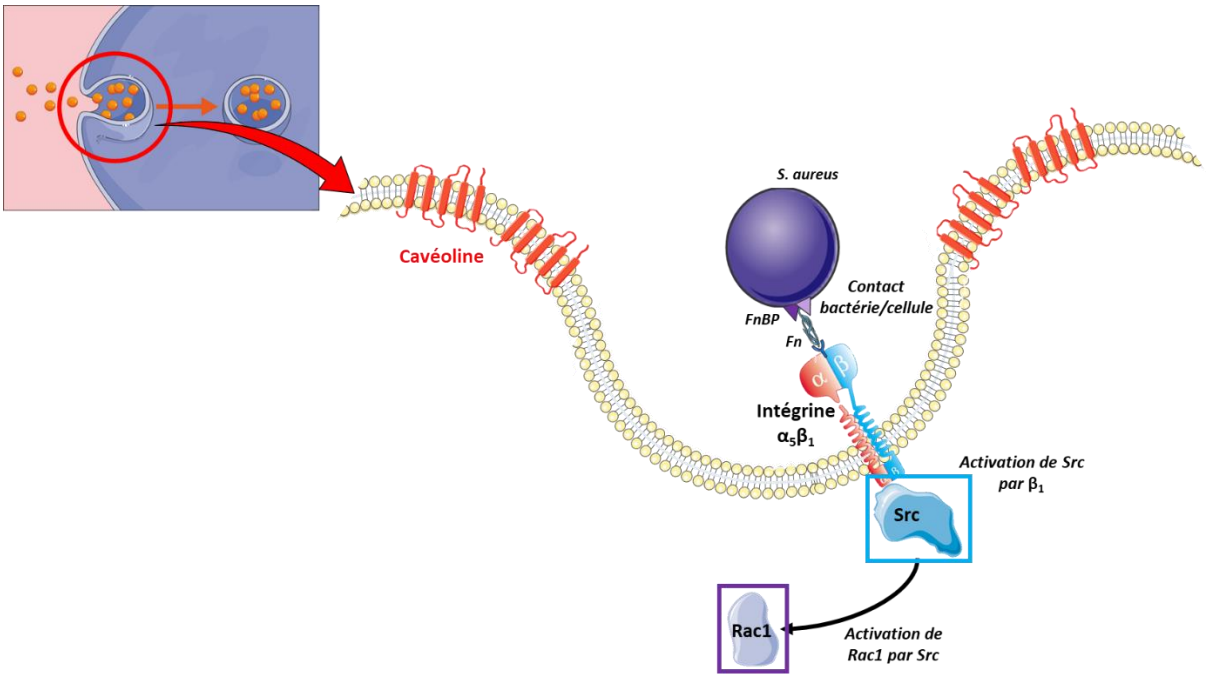


Figure 34 : Activation des protéines Src et Rac1 en aval de l'intégrine β1

La famille Src regroupe 10 tyrosine-kinases incluant Src qui contribue à de nombreux événements dans les cellules et participe à des voies de signalisation.

Au niveau de l'endocytose, nous avons décrit précédemment en introduction que le contact bactéries-cellules stimule l'intégrine qui va activer ses protéines kinases associées, notamment Src.

Cette activation permet le réarrangement du cytosquelette d'actine nécessaire à l'endocytose grâce à une voie de signalisation passant par la petite GTPase Rac1, appartenant à la famille des GTPases Rho et située à la périphérie de la cellule. Les petites GTPases comme Rac1 ont été décrites comme régulant à la fois l'arrangement de la membrane, le transport endocytaire et le réarrangement d'actine (Powelka et al. 2004)

Nos collaborateurs de Grenoble ont donc construit plusieurs lignées mutantes à partir des deux lignées principales OB$\beta_1^{+/+}$ et OB$\beta_1^{-/-}$ pour nous permettre d'étudier le rôle de ces deux protéines cellulaires en aval de l'intégrine β_1.

B. Lignées mutantes

L'intérêt de la construction de ces lignées mutantes a été d'étudier l'impact potentiel d'une activation ou sur-activation de ces deux protéines directement impliquées dans le mécanisme d'endocytose, en présence ou non d'intégrine.

a. Mesure des taux d'adhésion et d'internalisation

Les lignées construites sont les suivantes :

- OB$\beta_1^{+/+}$Src : lignée avec présence d'intégrine β_1 et de Src activé de manière constitutive
- OB$\beta_1^{-/-}$Src : lignée invalidée pour l'intégrine β_1 et avec présence de Src activé de manière constitutive
- OB$\beta_1^{-/-}$Rac : lignée invalidée pour l'intégrine β_1 avec présence de Rac1 activé de manière constitutive.

Nous avons étudié les taux d'adhésion et d'internalisation (figure 35) sur ces lignées avec les souches 8325-4 (FnBP+) et DU5883 (FnBP-).

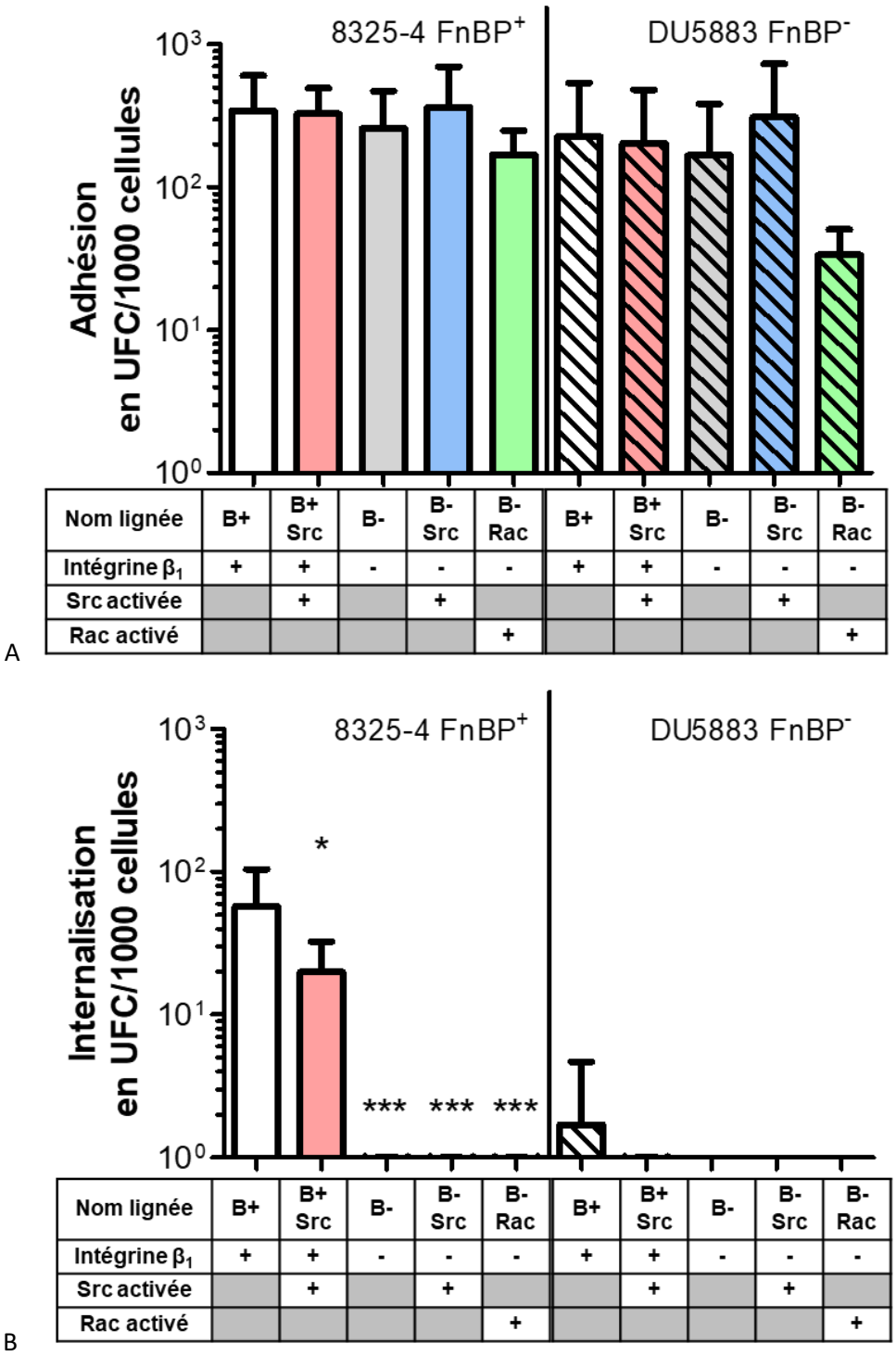


Figure 35 : Adhésion et internalisation dans des lignées murines mutées pour les protéines Src et Rac1

Taux d'adhésion (A) et d'internalisation (B) évalués sur les lignées murines $OB\beta_1^{+/+}$ (blanc) et $OB\beta_1^{-/-}$ (gris) et les lignées mutantes B^+Src (rouge), B^-Src (bleu) et B^-Rac (vert). Résultats exprimés en UFC/1000 cellules.

Les OB ont été infectés avec la souche 8325-4 $FnBP^+$ (gauche) et DU5883 $FnBP^-$ (droite) a une MOI de 1 :1 (n=4 manipulations en duplicat).

Tests statistiques de Mann-Whitney, SD, contrôle $OB\beta_1^{+/+}$ vs lignées mutées.

Les niveaux d'adhésion (figure 35A) ne montraient pas de différence significative pour l'ensemble des lignées infectées avec les souches $FnBP^+$ et $FnBP^-$. Une baisse non significative statistiquement du nombre de bactéries internalisées était néanmoins observée pour la lignée B-Rac par rapport à la lignée B+ après infection avec la souche DU5883 (FnBP-). Des analyses complémentaires vont être réalisées afin de confirmer cette observation.

Pour les infections avec la souche 8325-4 ($FnBP^+$), la surexpression de Rac1 ou Src constitutivement actives ne permettait pas de restaurer l'internalisation de *S. aureus* dans un contexte β_1^- (figure 35B, $OB\beta_1^{-/-}$ B^-Src et B^-Rac $p<0.05$). De façon surprenante l'activation constitutive de la protéine Src en présence d'intégrine β_1 (B^+Src) diminuait la capacité d'internalisation de *S. aureus,* entrainant une diminution significative du nombre de bactéries internalisées (57 vs 20 UFC/1000 cellules $p<0.05$).

Pour les infections avec la souche DU5883 ($FnBP^-$), un très faible taux de bactéries internalisées a été observé, correspondant probablement à une internalisation non spécifique de l'ordre de 1 à 2 bactéries pour 1000 cellules dans notre lignée contrôle $OB\beta_1^{+/+}$.

Cette étude utilisant des lignées mutantes nous a permis de montrer que la surexpression de formes constitutivement actives de Src ou de Rac1 ne permet pas de pallier l'absence de β_1 nécessaire à l'internalisation par l'interaction $\alpha_5\beta_1$/Fn/FnBP. Dans un contexte physiologique l'intégrine β_1 est nécessaire à l'internalisation. Cependant lorsque la cavéoline est absente ou constitutivement active, une voie alternative et indépendante de l'intégrine β_1 semble prendre en partie le relais.

Afin d'approfondir ces premiers résultats obtenus en jouant sur l'activation de protéines intracellulaires, nous avons décidé d'étudier cette fois-ci l'effet d'une inhibition pharmacologique de molécules de signalisation ou du trafic membranaire.

C. Inhibiteurs pharmacologiques de molécules de signalisation et du trafic membranaire

Comme décrit précédemment (partie résultats IV a) les protéines Src et Rac1 sont activées lors de la signalisation intégrine β_1-dépendante et permettent le réarrangement du cytosquelette d'actine nécessaire à l'endocytose (figure 36).

Le transfert de Rac1 du compartiment intracellulaire à la périphérie de la cellule, où elle agit, se fait en suivant le transport vésiculaire des « Detergent Resistant membrane » (DRMs).

Une fois arrivée à la périphérie de la cellule, Rac1 activée va réguler l'étalement et la prolifération cellulaire. Il est également décrit que Rac1 interagit avec un certain nombre de protéines effectrices.

Elle active notamment Pak1 qui est une protéine faisant partie de la famille des Pak sérine / thréonine kinases (figure 36, carré vert) (Price et al. 1998). Cette protéine a notamment été décrite pour son rôle dans la régulation du réarrangement du cytosquelette d'actine et de la mobilité membranaire en réponse à des signaux extracellulaires (Dharmawardhane et al. 1999). Or il est également bien décrit que l'internalisation de *S. aureus* dans les ostéoblastes nécessite l'implication d'éléments cytosquelettiques, notamment l'actine (S. Shi et Zhang 2012).

Dans notre contexte d'étude sur le mécanisme d'internalisation, nous avons cherché à savoir si cette protéine joue un rôle, puisqu'elle est une protéine effectrice importante dans la prolifération et l'endocytose (figure 36).

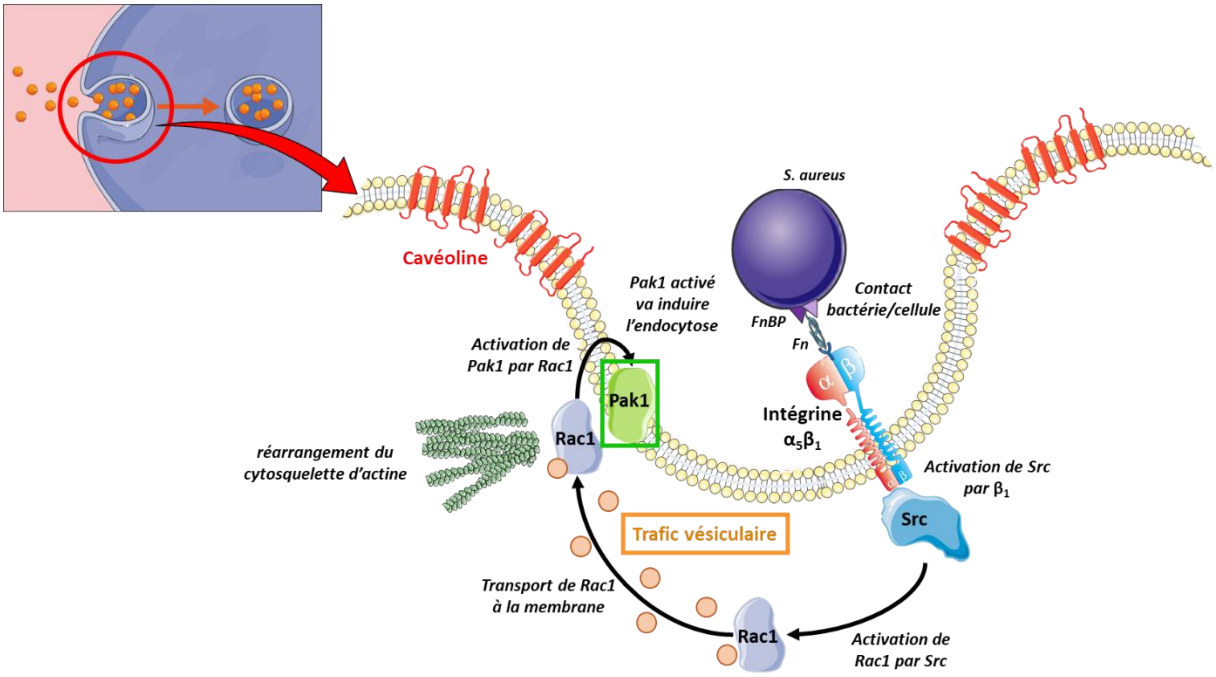


Figure 36 : Transport de Rac1 à la membrane plasmique et activation de Pak1 induisant l'endocytose

Nous avons utilisé quatre inhibiteurs pharmacologiques : le Src Inhibitor No.5, le p21-Activated Kinase Inhibitor III, l'EHT 1864 et enfin la Primaquine bisphosphate, respectivement responsables de l'inhibition de Src, Pak1, de Rac1 et du trafic vésiculaire et des DRM.

Ces inhibiteurs pharmacologiques ont donc été choisis du fait de l'implication des protéines qui leur sont associées dans la voie de l'intégrine β_1.

L'objectif étant de savoir si ces protéines sont impliquées dans la signalisation menant à l'internalisation puis, le cas échéant, de savoir si l'inhibition de chacune de ces protéines potentiellement impliquées dans la voie de signalisation de l'endocytose/du recyclage de l'intégrine bloquerait l'ensemble de l'internalisation, ou si ce mécanisme est dépendant de l'activité de l'une d'entre elles.

L'utilisation de la primaquine biphosphate, qui est un médicament antipaludéen, nous a permis d'étudier également l'importance du transport vésiculaire et notamment celui des DRMs, puisque cette molécule est capable de bloquer l'ensemble du trafic et donc potentiellement limiter l'activation de protéines intracellulaires nécessaires au mécanisme d'endocytose. Cette inhibition pourrait également avoir un impact sur l'organisation et la fluidité membranaire en impactant les rafts lipidiques (Murphy et al. 2007).

a. Effet bactéricide des inhibiteurs pharmacologiques

Avant d'utiliser ces différents inhibiteurs nous avons vérifié qu'ils n'avaient pas d'effets toxiques sur les lignées cellulaires ou sur les bactéries.

Nous avons donc mis en contact 10^5 cellules ou bactéries avec les inhibiteurs à des concentrations de :

- **10 µM** pour Src
- **5 µM** pour Pak1
- **5 µM** pour la primaquine
- **5 µM** pour Rac1

Pour l'inhibiteur de Src des manipulations préliminaires ont été réalisées afin de définir la concentration la plus efficace, c'est-à-dire permettant un blocage maximal sans induire de mort cellulaire. Pour les autres inhibiteurs, les concentrations utilisées étaient celles conseillées par le fournisseur ou décrites dans des publications.

Après deux heures de traitement (équivalent au temps de contact entre les inhibiteurs et les bactéries), les cellules viables ont été dénombrées et les lysats bactériens ont été étalés sur gélose TSA (figure 37).

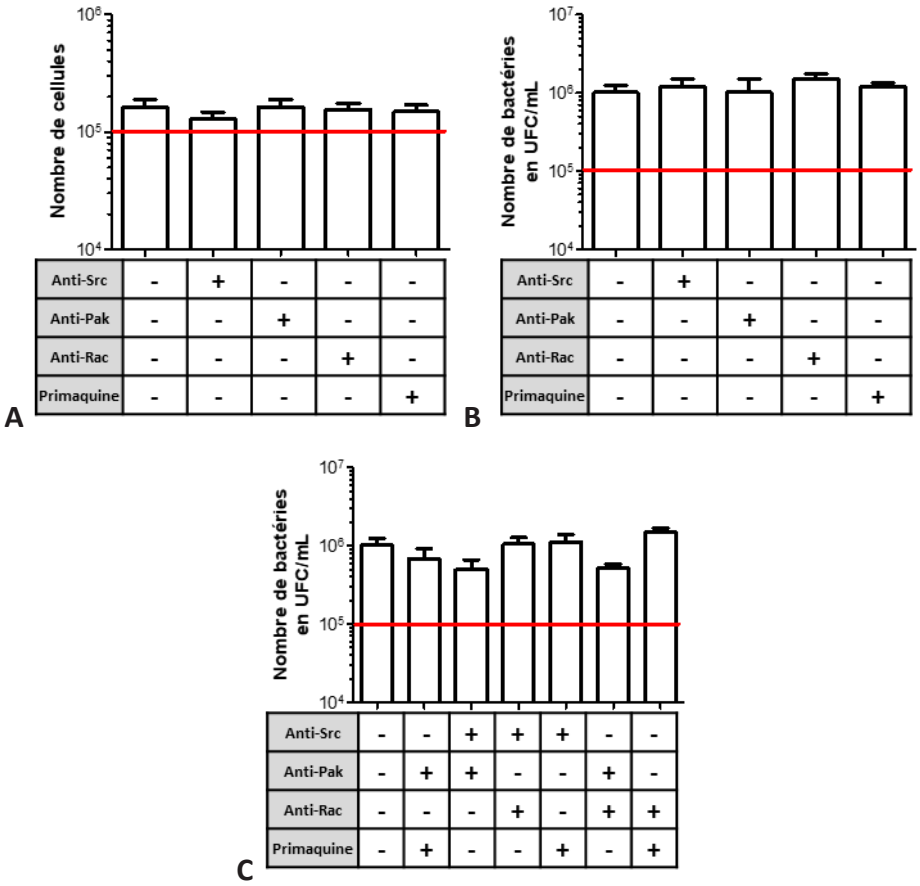


Figure 37 : Analyse de l'effet bactéricide des inhibiteurs pharmacologiques
Effet des molécules seules, analysé sur le nombre de cellule (A) et sur le nombre de bactéries (B) et effet bactéricide des molécules en associations sur le nombre de bactéries (C).
Analyse effectuée sur la lignée OB$\beta_1^{+/+}$ et la souche 8325-4 (FnBP$^+$).
Environ 100 000 cellules OB$\beta_1^{+/+}$ (ligne rouge) ont été mises en contact avec les différents inhibiteurs pendant deux heures puis dénombrées à l'aide du compteur Luna II ® (A).
Environ 100 000 S. aureus (ligne rouge) de la souche 8325-4 ont été mises en contact pendant deux heures avec les inhibiteurs seuls (B) ou en association (C) puis dénombrées au lecteur EasyScan® après étalement sur Easy Spiral count ® en gélose TSA.

Aucun effet significatif des inhibiteurs, seuls ou en association, sur les cellules n'a été observé (figure 37A). De même aucun impact significatif sur la croissance bactérienne n'a été observé : les bactéries ont présenté une croissance normale avec une augmentation d'environ 1 log en deux heures, pour une concentration finale d'environ 10^6 UFC/mL (figure 37B et C).

L'efficacité de chacun de ces inhibiteurs sur les taux d'adhésion et d'internalisation a donc pu être testée dans le modèle d'infection intracellulaire.

b. Effet des inhibiteurs seuls et en association sur les taux d'adhésion et d'internalisation

Nous avons adapté le modèle d'infection GPA pour inclure 3h d'incubation en présence des inhibiteurs : 1h de prétraitement avant infection et 2h de traitement pendant l'infection. Les taux d'adhésion et d'internalisation ont été déterminés par dénombrement sur géloses TSA (figure 38).

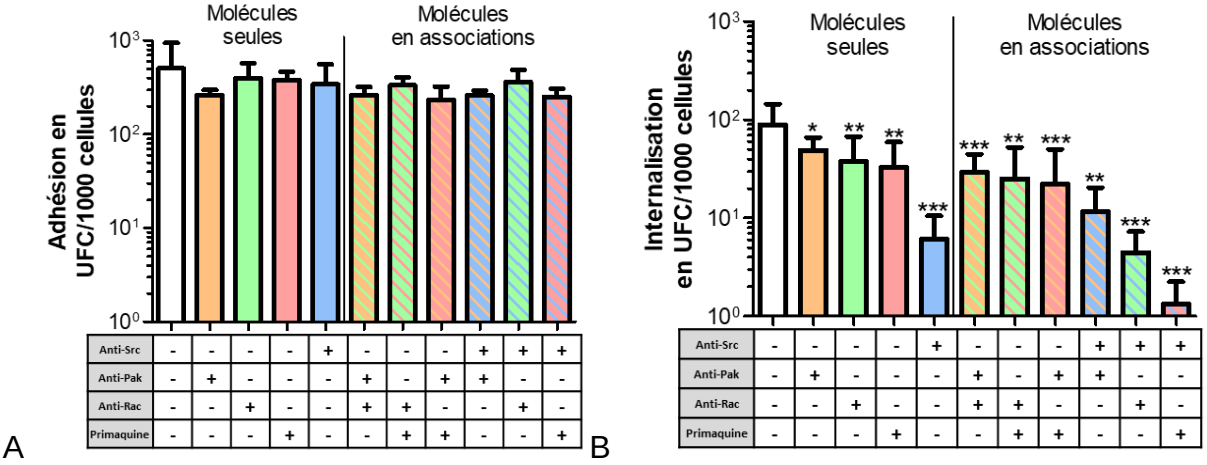


Figure 38 : Taux d'adhésion et d'internalisation en présence d'inhibiteurs seuls et en associations

Les OB ont été infectés avec la souche FnBP$^+$ 8325-4 à des MOI de 1:1 en présence des inhibiteurs seuls ou en association (tableau abscisses). n=3 manipulations en triplicats.

Tests statistiques de Mann-Whitney, SD, contrôle OB$\beta_1^{+/+}$ sans inhibiteurs vs inhibiteurs seuls ou en associations.

Les inhibiteurs, seuls ou en association, n'ont aucun effet significatif sur l'adhésion de la souche 8325-4 sur les OB (figure 38A).

Pour l'internalisation, après traitement, pour chaque inhibiteur une diminution significative du nombre de bactéries internalisées a été observée (figure 38B). Avec pour l'inhibiteur de Pak1 une diminution de l'internalisation de 45% (49 UFC/1000 cellules, $p<0.05$). Pour l'inhibiteur de Rac1 une diminution de l'internalisation de 58% (37 UFC/1000 cellules, $p<0.05$). Après le blocage du transport vésiculaire par la primaquine une diminution de l'internalisation de 63% (33 UFC/1000 cellules, $p<0.05$) et enfin avec l'inhibiteur de Src une diminution de l'internalisation de 93% (6 UFC/1000 cellules, $p<0.05$). Comme attendu, l'inhibiteur de Src était le plus efficace dans le blocage de l'internalisation, ce qui est en accord avec le rôle central de signalisation de cette protéine en aval de l'intégrine β_1.

L'inhibiteur de Rac1 et la primaquine avaient globalement le même effet démontrant la forte implication de Rac1 et du transport vésiculaire dans la voie de l'internalisation dépendante de l'intégrine β_1 de *S. aureus*. Certaines combinaisons de ces différents inhibiteurs ont montré une activité synergique sur la baisse de l'internalisation.
Notamment i) l'association des inhibiteurs de Rac1 et de Src qui induisait 95% de diminution de l'internalisation (5 UFC/1000 cellules, $p<0.05$) vs 58% et 93% pour chacun de ces inhibiteurs seuls ($p<0,05$), et ii) l'association de la Primaquine et de l'inhibiteur de Src qui entrainait 98% de diminution (1 UFC/1000 cellules, $p<0.05$) vs 63% et 93% lorsque ils étaient utilisés seuls.
Il faut noter que toutes les associations d'inhibiteurs ne semblaient pas plus efficaces qu'un inhibiteur seul. Ainsi avec la combinaison de l'inhibiteur de Pak1 et de l'inhibiteur de Src, aucune réduction additionnelle significative de l'internalisation n'a été observée par rapport à l'inhibiteur de Src seul (figure 38B). Cette observation suggère que dans la chronologie d'activation de la voie intégrine β_1 dépendante, Src est impliqué de manière plus précoce. Cette seconde sous-partie de l'étude du mécanisme de l'internalisation nous a donc permis de confirmer l'importance de la protéine Src dans la voie de signalisation. En effet, cette protéine est l'une des premières à être activée par l'intégrine et semble être primordiale au bon déroulement de la cascade de signalisation.

Cette partie nous a permis de mettre en avant i) l'importance du trafic vésiculaire des DRM, nécessaire au transport de composants intracellulaires, ii) de la protéine Rac1 qui, une fois arrivée à la membrane, va permettre l'activation de la protéine effectrice Pak1, nécessaire au mécanisme d'internalisation de *S. aureus* dans les ostéoblastes.

CONCLUSION / PERSPECTIVES

Au cours de ce projet d'étude, nous avons commencé par mesurer l'impact sur le tissu osseux d'une infection à *S. aureus*. Les analyses en microtomographie montrent qu'une infection osseuse par des souches cliniques de *S. aureus* entraine une perte osseuse forte, touchant l'épaisseur, la densité minérale et le contenu en os trabéculaire, ce qui est déjà connu et décrit dans la littérature (Cassat et al. 2013; Olson et Horswill 2013). Cette perte importante peut induire des fractures et des dommages irréversibles chez la souris. En effet, l'infection provoquant une fragilisation de l'os, la souris en se déplaçant induit des fractures qui auront du mal à être soignées en présence d'une infection à *S. aureus*. L'absence d'un effet significatif de l'infection sur l'os cortical peut s'expliquer par le protocole d'injection, qui cible particulièrement l'os trabéculaire. L'os cortical est, de plus, classiquement défini comme un os dur, ce qui pourrait limiter fortement la pénétration et l'effet de *S. aureus* sur cette partie du tissu osseux.

Afin de comprendre comment l'infection induisait cette forte perte osseuse, nous nous sommes intéressés à l'effet de *S. aureus* sur les ostéoblastes. L'homéostasie du tissu osseux sur l'équilibre des activités de minéralisation de l'os par les ostéoblastes et de résorption par les ostéoclastes. Il a été établit que l'infection par *S. aureus* entraine une augmentation de l'activité des ostéoclastes (Trouillet-Assant et al. 2015), pouvant alors expliquer pour une part cette perte osseuse. De plus la formation des ostéoclastes à partir de cellules précurseurs est principalement régulée par les cellules ostéoblastiques lors du remodelage osseux (Boyce, Yao, et Xing 2009). Ces ostéoblastes jouent donc un rôle central en étant impliqués à la fois dans la formation des cellules qui résorbent l'os mais également et surtout dans la production d'os par leur activité de minéralisation. L'impact de l'infection sur les ostéoblastes pourrait donc être en grande partie responsable des effets observés. Cet argument est étayé par la capacité active des ostéoblastes à internaliser les staphylocoques grâce au mécanisme tri-partite $\alpha_5\beta_1$/Fn/FnBP. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'une souche de *S. aureus* capable d'être internalisée dans les ostéoblastes pourrait entrainer un défaut de leur activité, de leur différenciation et de la minéralisation, qui sur le long terme (infection chronique) entrainerait une perte osseuse.
Pour tester cette hypothèse, nous avons mis au point un modèle d'infection *in vitro* basé sur des lignées cellulaires d'ostéoblastes murins exprimant ou non l'intégrine β_1 et un couple de souches isogéniques et mutées ou non sur les FnBPs.

Il a été possible d'évaluer l'impact de la sanctuarisation de *S. aureus* sur les fonctions des ostéoblastes en jouant à la fois sur les versants bactérien et cellulaire, impliqués dans le processus d'internalisation.

Nous avons pu observer que l'infection à *S. aureus* entrainait une diminution d'activité de la phosphatase alcaline reflétant un ralentissement de la différentiation des OB. L'effet était observé par le simple contact de *S. aureus* (que la bactérie soit viable ou pas) et quelle que soit sa capacité à être internalisée (FnBP+ ou FnBP-).

Ce résultat a été confirmé par l'analyse de l'expression des gènes de la *PAL* et de *RUNX2* par qRTPCR, mettant en évidence un défaut/retard d'expression de ces deux gènes à des temps précoces après infection (3 jours). L'effet était plus marqué pour la souche capable de s'internaliser. Pour cette dernière souche, les résultats observés à 5 jours après infection pourraient correspondre à un effet rebond/compensatoire.

Le défaut d'expression observé à 3 jours pourrait provenir de l'activation de voies de signalisation permettant l'internalisation et interférant avec le processus de différenciation. En effet, comme largement décrit précédemment, l'internalisation de *S. aureus* est majoritairement β_1 dépendante, or l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ joue un rôle crucial au niveau de la prolifération et de la différenciation cellulaire des ostéoblastes (Hamidouche et al. 2009). Ainsi la mobilisation de l'intégrine β_1 lors de l'internalisation de *S. aureus* pourrait la rendre moins disponible pour avoir un rôle actif dans la différenciation ce qui pourrait entrainer le retard observé. Une autre possibilité serait que de nouvelle(s) voie(s) de signalisation de l'immunité innée soi(en)t induite(s) par les ostéoblastes en réponse au contact et/ou à l'internalisation de *S. aureus* (Fournier et Philpott 2005). L'activation de ce(s)tte voie(s) de signalisation pourrait conduire à l'inhibition de la différenciation des ostéoblastes, régulant à la baisse l'activité de la PAL ainsi que la minéralisation de la matrice extracellulaire et en réduisant l'expression des marqueurs ostéogéniques tels que RUNX2 (Y. H. Liu et al. 2016).

Cette inhibition de la différentiation se traduit par une capacité limitée des ostéoblastes à minéraliser. En effet, l'expression du gène *COL1A*, élément important pour les ostéoblastes puisque le collagène de type I intervient dans la composition de la matrice socle nécessaire à la minéralisation, est apparue également diminuée après l'internalisation de *S. aureus.*

Cette perte observée pour le collagène semble se réduire au cours du temps, ce qui pourrait être expliqué par i) la faible persistance des souches utilisées et donc leur élimination rapide par les cellules au cours du temps et ii) l'utilisation du modèle GPA, qui fait que nous ne sommes pas dans un modèle chronique d'infection car toutes les bactéries sortant du compartiment intracellulaire lors de la mort des cellules sont éliminées par la gentamicine et la lysostaphine.

Finalement, l'ostéocalcine à 3 et à 5 jours, montrait *a contrario* une tendance à l'augmentation. Ceci pourrait refléter une réponse cellulaire de compensation par la formation d'excroissance osseuse, observé *in vivo* sur les images de microtomographie, et ce qui est en accord avec les observations décrit dans la littérature (Cassat et al. 2013; Kavanagh et al. 2018). De plus, le fait que l'ostéocalcine soit un gène connu pour être exprimé par les ostéoblastes de manière tardive (après 14 à 21 jours de différenciation) pourrait expliquer que dans les phases précoces que nous avons, aucun effet n'est observé.

Globalement, ces résultats corrèlent avec la tendance à la baisse observée pour la formation de dépôts calciques marqués au rouge d'Alizarine à 5 jours après infection (même si elle n'était pas statistiquement significative probablement par manque de sensibilité de la technique). Au-delà de 5 jours après infection, le retard est comblé et on note même une tendance à l'augmentation de la minéralisation dans les conditions cellules infectées par rapport à la condition contrôle cellules non infectées. D'un point de vue technique, il apparait compliqué de mesurer les taux de minéralisation des OB suite à l'infection. En effet pour les qRTPCR, il est important de prendre en compte qu'au-delà de 5 jours après infection, l'extraction des ARNs est complexe en raison de l'apparition de nodule de minéralisation et donc d'agrégats pouvant limiter l'homogénéité de l'extraction et l'obtention d'extraits de qualité. De plus nous avons constaté que la technique de coloration en rouge d'alizarine manquait de sensibilité, plus particulièrement à des temps précoces, les quantités de dépôts calciques étant faibles.

L'utilisation de souches avec des taux d'internalisation plus important et une forte persistance pourrait permettre de parer à ces contraintes techniques et ainsi d'obtenir des données pertinentes sur des temps de différenciation plus longs.

Ces résultats *in vitro* montrant une baisse de la différenciation et de la minéralisation des ostéoblastes à des temps précoces ont ensuite été complétés par des analyses *in vivo* des effets des souches 8325-4 et DU5883.

Dans ce modèle, la souche capable d'être internalisée (8325-4) induisait une perte osseuse plus importante que la souche DU5883 avec une baisse du contenu, de la densité et du volume de l'os trabéculaire. Ces résultats ont confirmé les observations de défaut de différenciation et minéralisation induite *in vitro* par l'infection par *S. aureus* des OB.

Il faut noter que l'effet observé *in vivo* était moins important avec les souches 8325-4 et DU5883 que celui obtenu avec les souches cliniques utilisées en début de projet. Ces souches cliniques apparaissent plus virulentes que nos souches de référence 8325-4 et DU5883, et il serait intéressant de les tester dans notre modèle *in vitro*. Il serait également intéressant de tester dans le modèle *in vitro* différentes souches bactériennes ayant de bonnes capacités d'internalisation et de persistance dans le compartiment intracellulaire, pour approfondir cette première grande partie de l'étude consacrée aux effets de l'internalisation de *S. aureus* sur la différenciation et la minéralisation des ostéoblastes. De même, en utilisant des souches de référence bien caractérisées, il serait intéressant de tester des souches présentant des délétions i) de facteurs de virulence (comme PVL, PSM, SpA) et iii) de facteurs régulant la formation de biofilm ou l'échappement du système immunitaire, ou induisant une modification des capacités de persistance intracellulaire, pour révéler les effecteurs du blocage de minéralisation observé.

Les effets observés apparaissent tous exacerbés lorsque la souche de *S. aureus* est capable d'être internalisée dans les ostéoblastes, ce qui constitue un mécanisme de chronicisation de l'infection. Cette observation nous a donc conduits à étudier le mécanisme d'internalisation de *S. aureus* dans les ostéoblastes par la voie de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$.

L'objectif était de comprendre la base moléculaire requise pour ce processus, d'identifier les acteurs principaux de ce mécanisme, ainsi que l'effet d'inhibiteurs pharmacologiques qui pourraient à terme avoir des utilisations thérapeutiques pour prévenir l'internalisation et la chronicisation, et ainsi, réduire ou abolir les risques de perte osseuse liés à la diminution de la minéralisation par les ostéoblastes infectés.

L'adhésion de *S. aureus* à la surface des ostéoblastes est un élément requis pour son internalisation.

Néanmoins en observant les taux d'adhésion de notre couple de souches (8325-4, DU5883) sur différentes lignées mutées ou en présence ou non d'inhibiteurs, nous avons pu mettre en évidence que leur capacité d'adhésion n'était pas affectée, et ce, quelles que soient les conditions testées. La présence de plusieurs autres intégrines (Josse, 2017) ou protéines d'adhésion ainsi que de différents sites de fixation à la surface des cellules pourrait expliquer ce résultat.

Nous nous sommes ensuite intéressés au processus d'internalisation en étudiant d'abord l'importance de la cavéoline dans ce processus. Cette protéine a été choisie car elle joue un rôle dans la structure de la membrane mais aussi dans la signalisation cellulaire et l'endocytose (figure 39).

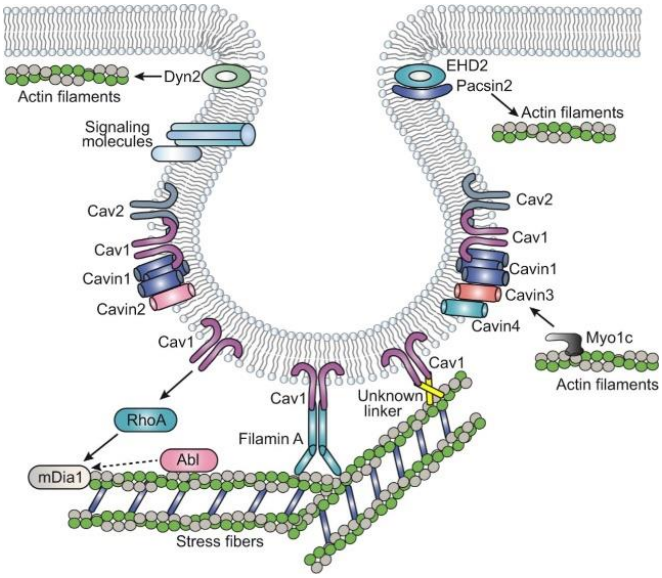


Figure 39 : Composition des cavéoles et liens avec les fibres de stress et le cytosquelette d'actine
D'après « Caveolae – mechanosensitive membrane invaginations linked to actin filaments », Echarri et Del Pozo, 2015.

Si nos résultats ont confirmé la dépendance de l'internalisation à la présence de l'intégrine β_1 cellulaire et à la FnBP bactérienne, nous avons pu montrer de façon intéressante une restauration partielle de l'internalisation de *S. aureus* en absence d'intégrine β_1 et de cavéoline, au niveau de la membrane. Ce résultat suggère en effet une voie alternative d'internalisation des souches de *S. aureus*.

Ces résultats sont en accord avec ceux observés dans des fibroblastes (Hoffmann et al. 2010), ces auteurs ayant mise en évidence que la cavéoline pouvait inhiber l'internalisation intégrine-dépendante. Cependant, nos résultats ont été obtenus dans des conditions différentes et en absence d'intégrine, nous avons de plus montré que cette absence d'intégrine peut être compensée soit par l'absence de la cavéoline soit par son activation constitutive. En effet, il a été montré que la cavéoline a un rôle à la membrane plasmique dans l'organisation des microdomaines membranaires et est normalement recrutée au niveau des sites de fixations des bactéries. De ce fait, l'invalidation de cette protéine augmenterait la mobilité des lipides membranaires et des protéines associées aux microdomaines membranaires, et pourrait favoriser ainsi l'endocytose par la voie de l'intégrine. Ceci n'explique cependant pas pourquoi son activation constitutive entrainerait un effet similaire à son invalidation, et des travaux complémentaires sont nécessaires. Il serait notamment intéressant d'étudier la localisation cellulaire de la cavéoline constitutivement active qui pourrait être séquestrée dans des vésicules intracellulaires. Ceci entrainerait une déplétion au niveau de la membrane induisant de ce fait un phénotype similaire à son invalidation. En complément de ces travaux il serait intéressant d'effectuer sur les différentes lignées cellulaires utilisées dans notre travail des marquages du ganglioside GM1, en utilisant la sous unité B de la cholera toxine, dans le but de déterminer si l'engagement de l'intégrine par la liaison à *S. aureus* via la fibronectine modifie la distribution des composants membranaires.

Ces premiers résultats portant sur l'internalisation nous ont également permis de mettre en évidence l'importance des protéines intracellulaires associées à la voie de signalisation de l'intégrine β_1. Nous avons dans un premier temps utilisé des lignées mutées pour les molécules de signalisation Src et Rac1 afin de décrire la cascade de signalisation en aval de l'intégrine, nécessaire au mécanisme tri-partite $\alpha_5\beta_1$/Fn/FnBP. Le résultat principal a été que l'activation en continu de Src et Rac1 ne permet pas aux bactéries d'être internalisées en absence d'intégrine β_1. Néanmoins de manière intéressante, l'activation constitutive de Src en présence d'intégrine induit une diminution du nombre de bactéries internalisées d'environ 1/3. Cet effet pourrait être lié au fait que Src est normalement activée de manière transitoire lors de l'engagement de la voie de l'intégrine après la fixation des cellules à une matrice de fibronectine (Kaplan et al. 1995).

Cette activation est précédée par la déphosphorylation du site de régulation négative (Thomas et Brugge 1997). On peut émettre l'hypothèse que l'activation continue de Src entraine une altération du processus de déphosphorylation et donc une probable baisse de la capacité d'internalisation des ostéoblastes.
En complément de ces travaux où nous utilisons des lignées mutantes, il serait intéressant d'utiliser dans le modèle d'infection GPA, une lignée dépourvue d'intégrine β_1 et possédant Src activée constitutivement, afin de savoir si la présence de l'intégrine est nécessaire au déclenchement de la voie d'endocytose dépendante de Src.

Pour compléter et conclure cette étude sur l'étude du mécanisme d'internalisation nous avons testé l'impact d'inhibiteurs pharmacologiques, seuls ou en association, ciblant Src et Rac1, mais aussi Pak1 et le transport vésiculaire des DRM.
Une diminution significative de l'internalisation des bactéries pour l'ensemble des inhibiteurs testés a été observée. Ces résultats démontrent que l'ensemble des protéines étudiées sont bien impliquées dans la voie de l'intégrine β_1. L'inhibition de Src limitait le plus fortement l'internalisation, ce qui confirme bien le rôle central de régulation de cette protéine déjà décrit dans le mécanisme d'internalisation des bactéries dans des fibroblastes *in vitro* (Fowler et al. 2003).
L'effet du blocage du transport vésiculaire par les DRM en utilisant la primaquine semble également être un mécanisme important pour l'internalisation et une cible thérapeutique potentielle. L'effet important observé est probablement lié au fait que les ostéoblastes sont composés de deux grandes variétés de DRM de surface, contenant toutes les 2 des protéines kinases de la famille Src. La première est décrite comme une zone « plate » de la membrane des cellules. Les secondes appelées « caveolae » apparaissent comme des "invaginations" membranaires striées (Solomon et al. 2000).
En complément des DRM, le transport des protéines intracellulaires via le trafic vésiculaire joue un rôle important pour le bon déroulement du remodelage du cytosquelette d'actine qui est également un élément clé dans le mécanisme d'endocytose chez les ostéoblastes. Ainsi un blocage de ce trafic via la primaquine apparait comme une cible thérapeutique intéressante.
Il faut noter que la combinaison de l'inhibiteur de Src avec le blocage du transport vésiculaire des DRM par la Primaquine, permet d'obtenir une suppression quasi totale de l'internalisation bactérienne.

L'effet majeur observé avec Src seul est ainsi augmenté par la suppression du trafic intracellulaire global, ce qui entrainerait un défaut complet d'activation de protéines effectrices nécessaires à l'endocytose telles que Pak1 ou Rac1. Sous réserve d'une bonne tolérance de cette combinaison de telles molécules *in vivo*, cette synergie obtenue pourrait constituer une nouvelle piste de recherche à étudier pour la mise au point d'une approche thérapeutique innovante dans la prévention de la chronicisation des infections staphylococciques.

Néanmoins, nos résultats montrent que les associations d'inhibiteurs n'ont pas obligatoirement des effets synergiques. Ainsi, nous n'avons par exemple pas observé une meilleure inhibition de l'internalisation en combinant l'inhibiteur de Rac1 avec la primaquine. Ce résultat pouvait s'expliquer par l'étroite relation entre Rac1 et le transport vésiculaire. Le trafic membranaire est en effet intimement impliqué dans de nombreuses fonctions contrôlées par les membres de la famille Rho comme Rac1, notamment le contrôle de la prolifération cellulaire et surtout de la motilité (Symons & Rusk).

De plus, le fait que Rac1 activé soit transporté vers la membrane par le trafic vésiculaire, inhiber le transport vésiculaire ou Rac1 conduirait à un même effet et donc leur combinaison n'entrainerait pas de synergie dans le blocage de l'internalisation.

Afin de poursuivre nos investigations et d'approfondir nos connaissances sur le mécanisme d'internalisation de *S. aureus* dans les ostéoblastes par la voie de l'intégrine β_1, il serait intéressant de combiner l'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques avec les lignées mutées sur les protéines intracellulaires associées aux microdomaines membranaires. En effet les inhibiteurs pharmacologiques n'ayant pas une efficacité de 100%, utiliser des lignées invalidées pour les protéines intracellulaires ciblées par ces inhibiteurs nous permettrait d'arriver à une inhibition totale. De plus, l'activation constitutive de protéines intracellulaires engendre probablement la mobilisation de voies de signalisations alternatives qui pourront alors être identifiées et leur rôle/importance étudié(e) spécifiquement.

A court terme, l'objectif sera donc de valider l'intérêt thérapeutique des inhibiteurs pharmacologiques identifiés en utilisant le modèle *in vivo* murin et en mesurant les effets physiologiques sur l'os et la persistance de bactéries sur le long terme.

Le but final de cette étude est d'identifier une approche novatrice et non-conventionnelle afin d'interférer avec l'infection et l'internalisation de *S. aureus*.

Cet enjeu est majeur car les antibiotiques ont un effet de plus en plus limité et l'émergence de résistance au sein des souches de *S. aureus* est en constante augmentation. L'internalisation bactérienne dans les cellules étant un des paramètres pouvant entrainer la chronicisation des IOA à *S. aureus*, bloquer cette invasion permettrait de la limiter. Ainsi les récidives mais aussi l'utilisation d'antibiotiques seraient réduits, et donc la pression de sélection des résistants restreinte, tout en facilitant la prise en charge et le traitement des patients.

BIBLIOGRAPHIE

Blair, Harry C., Quitterie C. Larrouture, Yanan Li, Hang Lin, Donna Beer-Stoltz, Li Liu, Rocky S. Tuan, Lisa J. Robinson, Paul H. Schlesinger, et Deborah J. Nelson. 2017. « Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation *In Vivo* and *In Vitro* ». *Tissue Engineering Part B: Reviews* 23 (3): 268-80. https://doi.org/10.1089/ten.teb.2016.0454.

Bonewald, Lynda F. 2011. « The Amazing Osteocyte ». *Journal of Bone and Mineral Research* 26 (2): 229-38. https://doi.org/10.1002/jbmr.320.

Bosse, Michael J., Helen E. Gruber, et Warren K. Ramp. s. d. « Internalization of Bacteria by Osteoblasts in a Patient with Recurrent, Long-Term Osteomyelitis ». *VO LU M E*, 5.

Boyce, Brendan F., et Lianping Xing. 2008. « Functions of RANKL/RANK/OPG in Bone Modeling and Remodeling ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 473 (2): 139-46. https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.03.018.

Boyce, Brendan F., Zhenqiang Yao, et Lianping Xing. 2009. « Osteoclasts Have Multiple Roles in Bone in Addition to Bone Resorption ». *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 19 (3): 171-80.

Brown, Philip M., James D. Hutchison, et Julie C. Crockett. 2011. « Absence of Glutamine Supplementation Prevents Differentiation of Murine Calvarial Osteoblasts to a Mineralizing Phenotype ». *Calcified Tissue International* 89 (6): 472-82. https://doi.org/10.1007/s00223-011-9537-6.

Cassat, James E., Neal D. Hammer, J. Preston Campbell, Meredith A. Benson, Daniel S. Perrien, Lara N. Mrak, Mark S. Smeltzer, Victor J. Torres, et Eric P. Skaar. 2013. « A Secreted Bacterial Protease Tailors the Staphylococcus Aureus Virulence Repertoire to Modulate Bone Remodeling during Osteomyelitis ». *Cell Host & Microbe* 13 (6): 759-72. https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.05.003.

Chung, C. H., E. E. Golub, E. Forbes, T. Tokuoka, et I. M. Shapiro. 1992. « Mechanism of Action of Beta-Glycerophosphate on Bone Cell Mineralization ». *Calcified Tissue International* 51 (4): 305-11.

Couret, Isabelle. 2004. « Biologie du remodelage osseux ». *Médecine Nucléaire*, 9.

Dharmawardhane, S., D. Brownson, M. Lennartz, et G. M. Bokoch. 1999. « Localization of P21-Activated Kinase 1 (PAK1) to Pseudopodia, Membrane Ruffles, and Phagocytic Cups in Activated Human Neutrophils ». *Journal of Leukocyte Biology* 66 (3): 521-27.

Ellington, John K., Sheila S. Reilly, Warren K. Ramp, Mark S. Smeltzer, James F. Kellam, et Michael C. Hudson. 1999. « Mechanisms OfStaphylococcus Aureusinvasion of Cultured Osteoblasts ». *Microbial Pathogenesis* 26 (6): 317-23. https://doi.org/10.1006/mpat.1999.0272.

Ellington, J. K., M. Harris, L. Webb, B. Smith, T. Smith, K. Tan, et M. Hudson. 2003. « Intracellular *Staphylococcus Aureus*: A MECHANISM FOR THE INDOLENCE OF OSTEOMYELITIS ». *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume* 85-B (6): 918-21. https://doi.org/10.1302/0301-620X.85B6.13509.

Feng, Xu, et Jay M. McDonald. 2011. « Disorders of Bone Remodeling ». *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 6 (1): 121-45. https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130203.

Fournier, Bénédicte, et Dana J. Philpott. 2005. « Recognition of Staphylococcus Aureus by the Innate Immune System ». *Clinical Microbiology Reviews* 18 (3): 521-40. https://doi.org/10.1128/CMR.18.3.521-540.2005.

Fowler, Trent, Staffan Johansson, Kishore K. Wary, et Magnus Hook. 2003. « Src Kinase Has a Central Role in in Vitro Cellular Internalization of Staphylococcus Aureus ». *Cellular Microbiology* 5 (6): 417-26. https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00290.x.

Fujisawa, Ryuichi. 2012. « Acidic Bone Matrix Proteins and Their Roles in Calcification ». *Frontiers in Bioscience* 17 (1): 1891. https://doi.org/10.2741/4026.

Hadjidakis, D. J., et I. I. Androulakis. 2006. « Bone Remodeling ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1092 (1): 385-96. https://doi.org/10.1196/annals.1365.035.

Hadzir, Siti Norhaiza, Siti Norsaidah Ibrahim, Rohaya Megat Abdul Wahab, Intan Zarina Zainol Abidin, Sahidan Senafi, Zaidah Zainal Ariffin, Mohamad Abdul Razak, et Shahrul Hisham Zainal Ariffin. 2014. « Ascorbic Acid Induces Osteoblast Differentiation of Human Suspension Mononuclear Cells ». *Cytotherapy* 16 (5): 674-82. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.07.013.

Hamidouche, Zahia, Olivia Fromigué, Jochen Ringe, Thomas Häupl, Pascal Vaudin, Jean-Christophe Pagès, Samer Srouji, Erella Livne, et Pierre J. Marie. 2009. « Priming Integrin Alpha5 Promotes Human Mesenchymal Stromal Cell Osteoblast Differentiation and Osteogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (44): 18587-91. https://doi.org/10.1073/pnas.0812334106.

Herbert, S., A. K. Ziebandt, K. Ohlsen, T. Schafer, M. Hecker, D. Albrecht, R. Novick, et F. Gotz. 2010. « Repair of Global Regulators in Staphylococcus Aureus 8325 and Comparative Analysis with Other Clinical Isolates ». *Infection and Immunity* 78 (6): 2877-89. https://doi.org/10.1128/IAI.00088-10.

Hoffmann, C., A. Berking, F. Agerer, A. Buntru, F. Neske, G. S. Chhatwal, K. Ohlsen, et C. R. Hauck. 2010. « Caveolin Limits Membrane Microdomain Mobility and Integrin-Mediated Uptake of Fibronectin-Binding Pathogens ». *Journal of Cell Science* 123 (24): 4280-91. https://doi.org/10.1242/jcs.064006.

Hughes, Francis J., Wendy Turner, Georgios Belibasakis, et Gianluca Martuscelli. 2006. « Effects of Growth Factors and Cytokines on Osteoblast Differentiation ». *Periodontology 2000* 41 (1): 48-72. https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00161.x.

Jett, Bradley D., et Michael S. Gilmore. 2002. « Internalization of Staphylococcus Aureus by Human Corneal Epithelial Cells: Role of Bacterial Fibronectin-Binding Protein and Host Cell Factors ». *Infection and Immunity* 70 (8): 4697-4700.

Josse, Jérôme, Frédéric Velard, et Sophie C. Gangloff. 2015. « Staphylococcus Aureus vs. Osteoblast: Relationship and Consequences in Osteomyelitis ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 5 (novembre). https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00085.

Josse, Jérôme, Frédéric Laurent, et Alan Diot. 2017. « Staphylococcal Adhesion and Host Cell Invasion: Fibronectin-Binding and Other Mechanisms ». *Frontiers in Microbiology* 8 (décembre). https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02433.

Kaplan, K. B., J. R. Swedlow, D. O. Morgan, et H. E. Varmus. 1995. « C-Src Enhances the Spreading of Src-/- Fibroblasts on Fibronectin by a Kinase-Independent Mechanism ». *Genes & Development* 9 (12): 1505-17.

Kavanagh, Nicola, Fergal J. O'Brien, et Steve W. Kerrigan. 2018. « Staphylococcus Aureus Protein A Causes Osteoblasts to Hyper-Mineralise in a 3D Extra-Cellular Matrix Environment ». *PloS One* 13 (6): e0198837. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198837.

Kintarak, Sompid, Simon A. Whawell, Paul M. Speight, Samantha Packer, et Sean P. Nair. 2004. « Internalization of Staphylococcus Aureus by Human Keratinocytes ». *Infection and Immunity* 72 (10): 5668-75. https://doi.org/10.1128/IAI.72.10.5668-5675.2004.

Landersdorfer, Cornelia B. 2009. « Penetration of Antibacterials into Bone ». *Clin Pharmacokinet*, 36.

Laurent, E., G. Gras, J. Druon, P. Rosset, S. Baron, A. Le-Louarn, E. Rusch, L. Bernard, et L. Grammatico-Guillon. 2018. « Key Features of Bone and Joint Infections Following the Implementation of Reference Centers in France ». *Medecine Et Maladies Infectieuses* 48 (4): 256-62. https://doi.org/10.1016/j.medmal.2018.02.004.

Liu, Pingsheng, Michael Rudick, et Richard G. W. Anderson. 2002. « Multiple Functions of Caveolin-1 ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (44): 41295-98. https://doi.org/10.1074/jbc.R200020200.

Liu, Y. H., D. Huang, Z. J. Li, X. H. Li, X. Wang, H. P. Yang, S. P. Tian, et al. 2016. « Toll-like Receptor-4-Dependence of the Lipopolysaccharide-Mediated Inhibition of Osteoblast Differentiation ». *Genetics and Molecular Research: GMR* 15 (2). https://doi.org/10.4238/gmr.15027191.

Murphy, Sean C., Sebastian Fernandez-Pol, Paul H. Chung, S. N. Prasanna Murthy, Stephen B. Milne, Marcela Salomao, H. Alex Brown, Jon W. Lomasney, Narla Mohandas, et Kasturi Haldar. 2007. « Cytoplasmic Remodeling of Erythrocyte Raft Lipids during Infection by the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum ». *Blood* 110 (6): 2132-39. https://doi.org/10.1182/blood-2007-04-083873.

Navarro, Angels, Bela Anand-Apte, et Marie-Odile Parat. 2004. « A Role for Caveolae in Cell Migration ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18 (15): 1801-11. https://doi.org/10.1096/fj.04-2516rev.

Ogston, A. 1881. « Report upon Micro-Organisms in Surgical Diseases ». *British Medical Journal* 1 (1054): 369.b2-375.

Olson, Michael E., et Alexander R. Horswill. 2013. « Staphylococcus Aureus Osteomyelitis: Bad to the Bone ». *Cell Host & Microbe* 13 (6): 629-31. https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.05.015.

Powelka, Aimee M., Jianlan Sun, Jian Li, Minggeng Gao, Leslie M. Shaw, Arnoud Sonnenberg, et Victor W. Hsu. 2004. « Stimulation-Dependent Recycling of Integrin B1 Regulated by ARF6 and Rab11: Integrin Recycling Regulated by ARF6 and Rab11 ». *Traffic* 5 (1): 20-36. https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2004.00150.x.

Price, Leo S., Jie Leng, Martin Alexander Schwartz, et Gary M. Bokoch. 1998. « Activation of Rac and Cdc42 by Integrins Mediates Cell Spreading ». *Molecular Biology of the Cell* 9 (7): 1863-71. https://doi.org/10.1091/mbc.9.7.1863.

Rasigade, Jean-Philippe, Sophie Trouillet-Assant, Tristan Ferry, Binh An Diep, Anaïs Sapin, Yannick Lhoste, Jérémy Ranfaing, et al. 2013. « PSMs of Hypervirulent Staphylococcus Aureus Act as Intracellular Toxins That Kill Infected Osteoblasts ». Édité par J. Ross Fitzgerald. *PLoS ONE* 8 (5): e63176. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063176.

Reich, Adi, Alison S. Bae, Aileen M. Barnes, Wayne A. Cabral, Aleksander Hinek, Jennifer Stimec, Suvimol C. Hill, David Chitayat, et Joan C. Marini. 2015. « Type V OI Primary Osteoblasts Display Increased Mineralization despite Decreased COL1A1 Expression ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 100 (2): E325-332. https://doi.org/10.1210/jc.2014-3082.

Sanchez, Carlos J, Catherine L Ward, Desiree R Romano, Brady J Hurtgen, Sharanda K Hardy, Ronald L Woodbury, Alex V Trevino, Christopher R Rathbone, et Joseph C Wenke. 2013. « Staphylococcus Aureus Biofilms Decrease Osteoblast Viability, Inhibits Osteogenic Differentiation, and Increases Bone Resorption in Vitro ». *BMC Musculoskeletal Disorders* 14 (1). https://doi.org/10.1186/1471-2474-14-187.

Sawada, Naoki, Yutaka Taketani, Norio Amizuka, Masako Ichikawa, Chiharu Ogawa, Kaori Nomoto, Kunitaka Nashiki, et al. 2007. « Caveolin-1 in Extracellular Matrix Vesicles Secreted from Osteoblasts ». *Bone* 41 (1): 52-58. https://doi.org/10.1016/j.bone.2007.02.030.

Shi, F., et J. Sottile. 2008. « Caveolin-1-Dependent 1 Integrin Endocytosis Is a Critical Regulator of Fibronectin Turnover ». *Journal of Cell Science* 121 (14): 2360-71. https://doi.org/10.1242/jcs.014977.

Shi, Sifeng, et Xianlong Zhang. 2012. « Interaction of Staphylococcus Aureus with Osteoblasts (Review) ». *Experimental and Therapeutic Medicine* 3 (3): 367-70. https://doi.org/10.3892/etm.2011.423.

Simonet, W.S, D.L Lacey, C.R Dunstan, M Kelley, M.-S Chang, R Lüthy, H.Q Nguyen, et al. 1997. « Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density ». *Cell* 89 (2): 309-19. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80209-3.

Solomon, Keith R., Layla D. Adolphson, David A. Wank, Kevin P. Mchugh, et Peter V. Hauschka. 2000. « Caveolae in Human and Murine Osteoblasts ». *Journal of Bone and Mineral Research* 15 (12): 2391-2401. https://doi.org/10.1359/jbmr.2000.15.12.2391.

Sung, J. M.-L., D. H. Lloyd, et J. A. Lindsay. 2008. « Staphylococcus Aureus Host Specificity: Comparative Genomics of Human versus Animal Isolates by Multi-Strain Microarray ». *Microbiology* 154 (7): 1949-59. https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/015289-0.

Tande, A. J., et R. Patel. 2014. « Prosthetic Joint Infection ». *Clinical Microbiology Reviews* 27 (2): 302-45. https://doi.org/10.1128/CMR.00111-13.

Thomas, S. M., et J. S. Brugge. 1997. « Cellular Functions Regulated by Src Family Kinases ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 13: 513-609. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1.513.

Trouillet-Assant, Sophie, Marlène Gallet, Pauline Nauroy, Jean-Philippe Rasigade, Sacha Flammier, Peggy Parroche, Jacqueline Marvel, et al. 2015. « Dual Impact of Live Staphylococcus Aureus on the Osteoclast Lineage, Leading to Increased Bone Resorption ». *The Journal of Infectious Diseases* 211 (4): 571-81. https://doi.org/10.1093/infdis/jiu386.

Trouillet-Assant, Sophie, Lucie Lelièvre, Patrícia Martins-Simões, Luiz Gonzaga, Jason Tasse, Florent Valour, Jean-Philippe Rasigade, et al. 2016. « Adaptive

Processes of *Staphylococcus Aureus* Isolates during the Progression from Acute to Chronic Bone and Joint Infections in Patients: S. Aureus Adaptation during BJI ». *Cellular Microbiology* 18 (10): 1405-14. https://doi.org/10.1111/cmi.12582.

Vernejoul, Mc, et P Marie. 1993. « Cellules osseuses et remodelage osseux. » *médecine/sciences* 9 (11): 1192. https://doi.org/10.4267/10608/2832.

Waldvogel, F. A., G. Medoff, et M. N. Swartz. 1970. « Osteomyelitis: A Review of Clinical Features, Therapeutic Considerations and Unusual Aspects ». *The New England Journal of Medicine* 282 (4): 198-206. https://doi.org/10.1056/NEJM197001222820406.

ANNEXES

Annexe n°1 : Entretien et culture des lignées cellulaires

D. Décongélation et mise en culture des ostéoblastes OBβ1.

Les cellules OBβ1 ont été conservées congelées dans l'azote liquide (-196°C) dans des cryotubes de 1 mL contenant 10% d'un cryoconservateur : le diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma). Le tube a été directement transféré de l'azote liquide au bain-marie à 37°C afin de décongeler les cellules rapidement. Juste avant la décongélation complète, la totalité du tube a été transférée dans un tube à fond conique de 15 mL contenant 1 mL de milieu MCC additionné de 1 % d'une solution de pénicilline-streptomycine (MCC + ATB) à 37°C. Le cryotube a été rincé à l'aide de 1 mL de MCC + ATB afin de récupérer toutes les cellules restantes. Le tube de 15 mL a été alors centrifugé à 1500 rotations par minute (RPM) pendant 5 min afin d'éliminer le surnageant contenant le DMSO, toxique pour les cellules à température ambiante.

Le culot obtenu après la centrifugation a été repris par 10 mL de milieu MCC + ATB et une numération au bleu de Trypan (0.04%) sur une lame FastReader 102 (Biosigma®) a été effectuée. En dessous de 500 000 cellules viables, une nouvelle décongélation était nécessaire pour obtenir un nombre suffisant de cellules pour une bonne remise en culture des cellules. Deux centrifugations complémentaires ont été réalisées afin d'éliminer les traces de DMSO. Finalement, le dernier culot a été repris dans 4 mL de MCC + ATB puis les cellules ont été transférées dans une flasque de 25 cm² (T25, BD Falcon™) et incubées à l'étuve à 37°C et 5 % CO2.

E. Trypsination des ostéoblastes OBβ1.

Le lendemain, les cellules ont été trypsinées, dénombrées et transférées dans des flasques de 75 cm² (T75, BD Falcon™) à raison de 700 000 cellules maximum par flasque, le nombre de cellule pouvant varier selon le programme des manipulations.

A une confluence proche de 100%, un passage (décollement-dénombrement-ensemencement) des cellules OBβ1 était effectué pour leur permettre de rester en phase de prolifération.

A partir des flasques T75, les cellules confluentes ont été lavées à deux reprises avec 10 mL de DMEM afin i) d'éliminer le SVF présent dans le MCC qui pourrait inhiber l'action de la trypsine, ii) d'éliminer les cellules mortes.

Le surnageant a été aspiré, puis la flasque a été mise à l'étuve à 37°C pendant 2 à 5min en présence de 5 mL de trypsine à 0,05 % avec 0,2 % d'acide éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA) (Gibco®), jusqu'à obtenir le décollement cellulaire. L'action de la trypsine a été neutralisée par dilution avec 10 mL de MCC. Les cellules ont alors été centrifugées à deux reprises à 1500 rpm pendant 5min (SV 11 H, Firlabo) puis numérées au bleu de Trypan (0,2% ; Gibco®) sur cellule de comptage FastReader 102. Sur la base de ces numérations, les cellules ont été ensemencées à raison de 700 000 cellules maximum dans 12 mL de MCC + ATB en flasque T75. Les flasques ont été incubées à l'étuve à 37°C et 5% de CO2.

F. Congélation des ostéoblastes OBβ1.

Lors de la préparation des stocks de cellules, les cellules multipliées en flasques T75 sont trypsinées, et numérées par exclusion au bleu de Trypan, la congélation est réalisée à raison d'environ 2.10^6 cellules par cryotube en utilisant un agent cryoprotecteur : DMSO (Sigma). Les conditions de congélation étaient : 90 % de SVF et 10 % de DMSO. Les ampoules ont été rapidement placées dans une cryoboîte à -80°C permettant de diminuer la température progressivement à raison de 1°C par minute, jusqu'à atteindre -80°C. Après 24 heures à -80 °C, les crytotubes ont été transférés en azote liquide à -196 °C.

Annexe N°2 : Protocoles pour qRTPCR d'ARN cellulaire.

A. Extraction d'Acide ribonucléique (ARN) eucaryote

Protocole adapté selon les recommandations du kit RNeasy minikit de QIAGEN :
Les culots de cellules infectées ou non sont repris en PBS ou conservés en RNA Later Reagent (400 µL total par condition), 200 µL du culot repris sont transféré dans un nouveau tube stérile.
J'ajoute ensuite 600 µL de tampon RLT et 430 µL d'éthanol absolu après mélange. L'échantillon (2x700 µL) est ensuite chargé sur la colonne RNeasy clean up puis centrifugé 15sec à 10 000 rpm et à 4°C. Les échantillons sont ensuite traités sur la colonne à la DNAse I en ajoutant 350 µl de tampon RW1 (contient un sel de guanidine, ainsi que de l'éthanol, et est utilisé comme un tampon de lavage qui élimine efficacement les biomolécules), la colonne est de nouveau centrifugée 15sec à 10 000 rpm et le surnageant contenu dans le fond du tube de 2 mL est éliminé.

Une étape supplémentaire de traitement à la DNase est ensuite réalisée, par ajout de 80 µl de DNAse I par tube à analyser (= 10uL de DNAse I + 70uL de tampon RDD (la composition et la concentration en sel de Buffer RDD permet une digestion efficace de l'ADN et assure également que l'ARN reste lié à la colonne)). L'échantillon est déposé directement sur la membrane de la colonne et incubé 10 min à température ambiante. 350 µL de tampon RW1 sont ajouté de nouveau et une centrifugation de 15 sec à 10 000 rpm à RT est réalisée, enfin le surnageant contenu dans le fond du tube de 2 mL est retiré. Deux étapes de lavages successives sont ensuite réalisées par ajout de 500 µL de tampon RPE (buffer supplémenté de 4 vol d'Ethanol absolu) puis centrifugation à 10 000 rpm pendant 15 sec, le surnageant contenu dans le fond du tube de 2 mL est retiré. Le second lavage est effectué avec pour cette fois-ci une centrifugation à 10 000 rpm pendant 2 min.

Une nouvelle centrifugation est effectuée pendant 1 min à 10 000 rpm pour éliminer l'éthanol restant de la colonne.

L'ARN est élué dans 25µL d'H_2O stérile (Gibco) après incubation d'une minute à température ambiante et centrifugation d'une minute à 10000 rpm (±17000g). On répète une seconde fois cette étape d'élution pour obtenir un volume final de 50 µL d'ARN cellulaire.

B. Passage de l'ARN à l'ADNc par méthode Reverse transcriptase.

Protocole adapté selon les recommandations du kit « Reverse transcyptase system » de Promega :

Une fois les concentrations en ARN connues (par dosage nanodrop), elles sont homogénéisées pour l'ensemble de nos échantillons en se basant sur l'ARN le moins concentré. Les ARN sont alors placés dans un thermocycleur à 70°C pendant 10min. Un mix de 20µL est ensuite réalisé en fonction du nombre d'échantillons à traiter selon le tableau suivant :

MgCl2 25mM	4µL
Reverse Transcription 10X Buffer 2µl	2µL
dNTP Mixture, 10mM	2µl
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor	0.5µl
AMV Reverse Transcriptase (High Conc.)	15u
Total RNA	1µg
Nuclease-Free Water to a final volume of	20 µL

Plusieurs cycles d'incubations sont ensuite réalisés : remise à températures ambiantes, à 95°C pendant 5min et 4°C pendant 5min.
On obtient alors de l'ADNc, utilisable pour les analyses qPCR.

C. Analyse qRTPCR

Une fois la Reverse Transcryptase réalisé, l'ADNc obtenue est dilué au 1/5ème et aliquoté. Un mix est ensuite réalisé en fonction du nombre d'échantillon à analyser selon le tableau suivant :

Nombre de capillaires	**1**
H2O	12,6
MgCl2	2,4
Amorces F-R (d 1/20ème)	1
SYBER (10µL 1a dans 1b)	2

Les amorces à insérer dans le mix correspondent aux amorces du gène cible à analyser. Dans chaque capillaire on ajoute 18 µL de mix et 2µL d'ADNc (précédemment aliquoter). Les capillaires sont ensuite insérés dans le rotor de l'appareil LightCycler, le run est ensuite paramétré selon les amorces du gène cible.