



HAL
open science

L'immunité entraînée chez les cellules non immunitaires et son rôle dans la protection contre *Staphylococcus aureus*.

Emmanuel Chaumond

► To cite this version:

Emmanuel Chaumond. L'immunité entraînée chez les cellules non immunitaires et son rôle dans la protection contre *Staphylococcus aureus*.. Microbiologie et Parasitologie. 2021. hal-03282831

HAL Id: hal-03282831

<https://hal.inrae.fr/hal-03282831v1>

Submitted on 9 Jul 2021

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

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



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



STLO
SCIENCE & TECHNOLOGIE
du LAIT & de l'ŒUF



l'institut Agro
agriculture • alimentation • environnement



UBO
Université de Bretagne Occidentale

UNIVERSITÉ DE RENNES I

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

**UNIVERSITÉ DE BRETAGNE
OCCIDENTALE**

(U.F.R. des Sciences)

**Laboratoire de l'UMR 1253 STLO, Science et technologie du lait et de l'œuf, INRAE,
L'Institut Agro, Agrocampus Ouest, Rennes**

MASTER SCIENCES, TECHNOLOGIES, SANTÉ

Mention MICROBIOLOGIE

Parcours

Microbiologie Fondamentale et Appliquée

2020-2021

**L'immunité entraînée chez les cellules non immunitaires et son rôle dans la protection
contre *Staphylococcus aureus*.**

Mémoire présenté le 21 Juin 2021

par Emmanuel CHAUMOND

Maitre de stage : Madame Nadejda BERKOVA

Co-encadrant : Monsieur Gwénaél JAN

**Stage effectué au Laboratoire de l'UMR STLO 1253 INRAE, l'Institut Agro, Agrocampus
Ouest, Rennes**

Remerciements

Je tiens à remercier Mme Hélène LUCAS, présidente du centre INRAE Bretagne-Normandie, Yves LE LOIR Directeur de l'UMR STLO et Eric GUEDON Chef de l'équipe MICROBIO pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire et permis de faire ce stage.

Je remercie également Mme Nadejda BERKOVA mon encadrante et M Gwenaël JAN mon co-encadrant pour leurs gentillesse, leurs patiences, leurs conseils, et les enseignements qu'il m'ont prodigués pour m'améliorer tout au long de mon stage et qui en ont fait une expérience très agréable et enrichissante.

Je remercie Mme Sandrine PERON pour l'aide qu'elle m'a apporté pendant toute la durée du stage, son connaissance et son expérience sur la culture cellulaire ainsi que Mme Lucie RAULT, Mme Nathalie DANIEL pour m'avoir expliqué comment fonctionne le laboratoire P2 et qui ont toujours répondu présente lorsque j'avais besoin d'aide.

Je tiens à remercier toute l'équipe MICROBIO pour leur accueil au sein du laboratoire leurs gentillesse, toujours à l'écoute. Ils m'ont permis d'évoluer dans une ambiance de travail extrêmement positive.

Je remercie également Fillipe Luiz Rosa do CARMO et Charles LE BRAS pour les moments convivial que l'on a passé ensemble.

Je remercie mes professeurs pour la qualité de l'enseignement qu'ils m'ont prodigué au cours de ces années passées à l'Université de Rennes 1

Enfin je remercie ma famille et mes amis pour leur soutien morale qui m'ont poussé de l'avant et m'ont permis d'arriver à ce stade.

Ce stage est effectué dans le cadre de la 2^{ème} année de Master Microbiologie Fondamentale et Appliquée en collaboration avec l'Université de Bretagne Occidentale au cours de l'année universitaire 2020/2021. Le thème du stage est l'immunité entraînée chez les cellules non immunitaires et son rôle dans la protection contre *Staphylococcus aureus*. Le stage est effectué par Emmanuel CHAUMOND et est encadré par Madame Nadejda BERKOVA et co-encadré par Monsieur Gwénaél JAN. Il est effectué au Laboratoire de l'UMR 1253 STLO, « Science et technologie du lait et de l'œuf », INRAE, l'Institut Agro, Agrocampus Ouest, 65 Rue de Saint-Brieuc, 35000 Rennes, du 4 janvier 2021 au 9 juillet 2021.

Sommaire :

| | |
|--|----|
| Introduction bibliographique..... | 1 |
| I. <i>Staphylococcus aureus</i> : agent infectieux..... | 1 |
| II. Le système immunitaire..... | 2 |
| III. Les inducteurs de l'immunité entraînée..... | 3 |
| IV. L'établissement d'une mémoire immunitaire innée : l'immunité entraînée..... | 4 |
| V. <i>Lactococcus lactis</i> et <i>Propionibacterium freudenreichii</i> | 5 |
| VI. Les cellules humaines ostéoblastes-like MG-63..... | 6 |
| VII. Hypothèse..... | 7 |
| VIII. Objectif et stratégies..... | 7 |
| Matériel et méthodes..... | 8 |
| I. Lignées cellulaires : conditions de croissance..... | 8 |
| II. Souches bactériennes : condition de croissance..... | 8 |
| III. Les réactifs utilisés..... | 9 |
| IV. Cinétiques de croissance..... | 9 |
| V. Numérations bactériennes..... | 9 |
| VI. Comptage des cellules ostéoblastes-like MG-63..... | 10 |
| VII. Induction de l'immunité entraînée des ostéoblastes-like MG-63..... | 11 |
| VIII. Quantification de la production d'IL-6 par ELISA..... | 12 |
| IX. Analyses statistiques..... | 12 |
| Résultats et Discussion..... | 13 |
| I. Mise au point des conditions de culture des ostéoblastes-like MG-63..... | 13 |
| II. Détermination des conditions de culture des bactéries utilisées..... | 15 |
| III. L'induction de l'immunité entraînée chez les ostéoblastes MG-63 par les différents inducteurs..... | 16 |
| IV. <i>Lactococcus lactis</i> MG1363 est capable d'induire le développement de l'immunité entraînée chez les cellules MG-63..... | 21 |
| V. <i>Propionibacterium freudenreichii</i> CIRM-BIA 129 n'induit pas l'immunité entraînée chez les cellules les MG-63..... | 22 |
| Conclusion..... | 24 |
| Perspectives..... | 25 |
| Références bibliographiques..... | 27 |
| Résumé | |

Liste des figures :

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Schéma des maladies provoqué par <i>S. aureus</i> chez l'homme et l'animal..... | 1 |
| Figure 2 : Schéma montrant le fonctionnement de l'immunité entraînée..... | 2 |
| Figure 3 : Les modifications apportées par l'immunité entraînée..... | 4 |
| Figure 4 : Caractéristique des bactéries utilisées dans cette étude..... | 6 |
| Figure 5 : Schéma explicatif de la numération bactérienne par microméthode..... | 10 |
| Figure 6 : Schéma d'expérience de l'entraînement des ostéoblastes-like MG-63..... | 11 |
| Figure 7 : Schéma de la quantification d'IL-6 par ELISA..... | 12 |
| Figure 8 : Dénombrement des cellules MG-63 au 7 ^{ème} jour..... | 13 |
| Figure 9 : Dénombrement des cellules MG-63 au 7 ^{ème} jour..... | 14 |
| Figure 10 : Cinétique de croissance des souches utilisées..... | 15 |
| Figure 11 : Quantification d'IL-6 produits par les cellules MG-63 prétraitées par le β -glucane..... | 16 |
| Figure 12 : Quantification d'IL-6 produits par les cellules MG-63 prétraitées par le Tri-DAP..... | 18 |
| Figure 13 : Quantification d'IL-6 produits par les cellules MG-63 prétraitées par le MDP..... | 19 |
| Figure 14 : Quantification d'IL-6 produits par les cellules MG-63 prétraitées par le MDP..... | 20 |
| Figure 15 : Quantification d'IL-6 produits par les cellules MG-63 prétraitées par <i>L. lactis</i> | 22 |
| Figure 16 : Quantification d'IL-6 produits par les cellules MG-63 prétraitées par <i>P. freudenreichii</i> | 22 |
| Figure 17 : <i>L. lactis</i> MG1363 et le MDP induisent le développement de l'immunité entraînée chez les cellules MG-63..... | 25 |
| Tableau 1 : Réactifs utilisés durant cette étude..... | 9 |
| Tableau 2 : Correspondance en CFU/mL de chaque suspension à une DO précise..... | 16 |
| Tableau 3 : Taux de survie des cellules MG-63 exposées à différentes MOI de <i>L. lactis</i> | 21 |

Liste des abréviations utilisées :

BCG : Bacille de Calmette Guérin

BHI : Infusion cœur-cervele

CFU : Unité formant colonie

CIRM-BIA : Centre international de ressource microbiologique-bactéries d'intérêts alimentaires

DMEM : milieu Eagle modifié Dulbecco

GRAS : Generally recognized as safe

IL : Interleukine

LPS : Lipopolysaccharide

MDP : Muramyl dipeptide

MOI : multiplicité d'infection

NOD 1/2 : Nucleotide-binding oligomerisation domain-containing protein ½

Ox-LDL : Lipoprotéine à faible densité oxydée

PBS : Tampon phosphate salin

PS : Pénicilline-streptomycine

QSP : Présomption qualifiée de sécurité

SVF : Sérum de veau fœtal

TLR : Toll-like receptor

TMB : tetraméthylbenzidine

TNF-α : Tumor necrosis factor alpha

Tri-DAP : L-Ala-γ-D-Glu-acide diamino pimélique

YEL : Yeast extract lactate

I. *Staphylococcus aureus* : agent infectieux

Staphylococcus aureus (*S. aureus*), bactérie Gram positive du Phylum des firmicutes, est un pathogène opportuniste de l'homme et des animaux. Ce germe est fréquemment rencontré dans les infections communautaires et nosocomiales. Il fait partie des 3 espèces bactériennes donnant le plus d'infections nosocomiales, avec *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Il est retrouvé dans 16% des infections nosocomiales. (« Infections nosocomiales | INSERM - La science pour la santé » s. d.) Il est responsable de différentes maladies, d'infections bénignes de la peau à des maladies plus graves comme l'endocardite, la pneumonie et l'ostéomyélite, une infection osseuse à évolution chronique, difficiles à traiter, chez l'homme. Chez les ruminants, il constitue la principale cause infectieuse des mammites chroniques (inflammation de la mamelle) (Figure 1) (Wong Fok Lung et al. 2020).

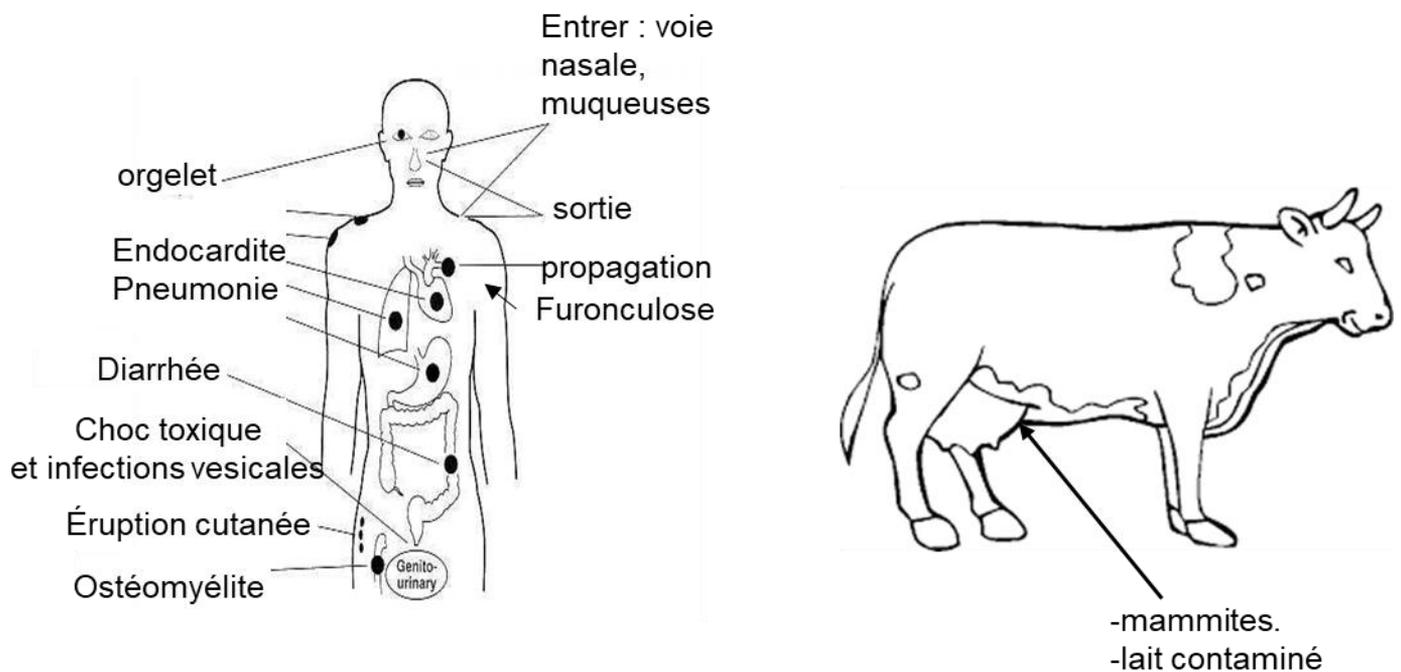


Figure 1 : Schéma des maladies provoqué par *S. aureus* chez l'homme et l'animal

Un des plus grands problèmes du traitement reste la résistance de nombreuses souches aux antibiotiques. Les conséquences économiques associées aux infections à *S. aureus* sont très lourdes. Entre autres, la majorité des ostéomyélites causées par ce pathogène deviennent chroniques et 20 à 50% des bactéries responsables de ces infections sont multirésistantes. (« Staphylocoque : informations et traitements - Institut Pasteur » s. d.) L'ostéomyélite est généralement déclenchée par la formation de biofilms au niveau d'une prothèse. Les staphylocoques s'internalisent, dans les ostéoblastes et les ostéoclastes, au sein de vésicules. Ils se localisent ensuite dans le cytoplasme des cellules infectées, échappant ainsi au lysosome. C'est le cas, en particulier, des variants « small colony » de *Staphylococcus aureus* (Josse, Velard, et Gangloff 2015).

II. Le système immunitaire

Les réponses immunitaires constituent les mécanismes de défense de l'organisme. L'immunité est scindée généralement selon deux types de réponse : l'immunité adaptative et l'immunité innée, chacune ayant des caractéristiques propres.

Lors de l'exposition aux pathogènes ou signaux de danger, différents mécanismes se mettent en place pour lutter contre celui-ci. Le déploiement de l'immunité innée constitue le premier rempart de défense. Si l'infection se prolonge dans le temps, il y a par la suite intervention du système immunitaire adaptatif, qui est une réponse spécifique à la menace. L'immunité innée est considérée comme rapide et, contrairement à l'immunité adaptative, considérée comme ne possédant pas de mémoire immunologique.

Cependant, il avait déjà été montré la présence d'une mémoire immunologique chez les invertébrés ne présentant pas de système immunitaire adaptatif (Kurtz et Franz 2003; Kurtz 2005; Torre, Laure Tsumtsa, et Ghigo 2017). La recherche menée ces dernières années a montré que l'immunité innée chez les invertébrés est plus complexe que ce que l'on pensait. Cette immunité a été nommée *trained immunity*. (immunité entraînée) Elle est également appelée « mémoire immunitaire innée » (Netea, Quintin, et van der Meer 2011). L'immunité entraînée est présente à la fois chez les invertébrés et les vertébrés. Elle est caractérisée par la capacité de l'organisme à développer une réponse immunitaire intensifiée après la deuxième stimulation. Elle est indépendante de l'immunité adaptative. L'immunité entraînée est associée à la reprogrammation métabolique, épigénétique et fonctionnelle des cellules (Figure 2).

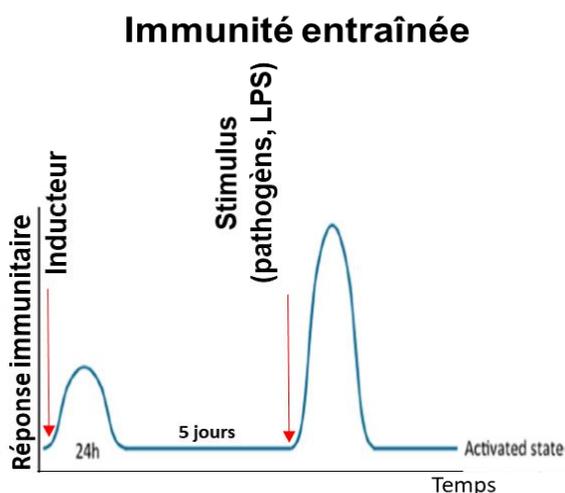


Figure 2 : Schéma montrant le fonctionnement de l'immunité entraînée

Illustration de l'augmentation de l'intensité de la réponse immunitaire à la suite d'une première exposition à l'inducteur, puis une seconde exposition aux bactéries ou l'autre stimulus. La mémoire immunitaire innée correspond à une réponse potentialisée (adapté de Bekkering et al. 2016).

Après une première exposition à l'inducteur, suivie d'une période de repos, l'organisme aura une réponse immunitaire intensifiée lors de la deuxième exposition. (Bekkering et al. 2016). Cette

réponse plus forte se caractérise, entre autres, par une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires comme IL-6, TNF- α et IL-1 β (Netea, Quintin, et van der Meer 2011). Les macrophages, monocytes et les cellules NK sont les cellules les plus étudiées en ce qui concerne l'immunité entraînée. Celle-ci ont une durée de vie de quelques heures à quelques jours. Et l'immunité entraînée peut perdurer quelque mois, voire une année. Les cellules non immunitaires sont aussi capables de développer l'immunité entraînée. Parmi toutes ces cellules on peut citer les cellules souches hématopoïétiques, qui peuvent transmettre les changements dus à l'induction de l'immunité entraînée (Hamada et al. 2018). Les fibroblastes aussi jouent un rôle dans l'immunité et sont capables de lutter contre les pathogènes en sécrétant des cytokines, des peptides antimicrobiens et des facteurs de croissance. Également les cellules stromales intestinales peuvent développer l'immunité entraînée et produire plus de cytokines pro-inflammatoires. Les cellules souches épithéliales prolifèrent et remplacent les cellules endommagées plus efficacement lors d'une deuxième exposition. (Hamada et al. 2018)

III. Les inducteurs de l'immunité entraînée

Différentes molécules sont utilisées pour induire l'immunité entraînée *in vitro* et *in vivo*. Ces molécules sont le β -glucane, qui est un polysaccharide retrouvé sur la paroi des levures ou de céréales. C'est la molécule la plus utilisée pour induire l'immunité entraînée. Les lipoprotéines à faible densité oxydée (Ox-LDL), le Bacille de Calmette-Guérin (BCG, *Mycobacterium bovis* atténué) qui est le vaccin contre la tuberculose. Parmi les inducteurs, se trouve aussi le muramyl dipeptides (MDP) (Mulder et al. 2019) et le L-Ala- γ -D-Glu-acide diamino pimélique (tri-DAP) qui composent le peptidoglycane et sont des agonistes des récepteurs cytosolique NOD1 (tri-DAP) et NOD2 (MDP) (Ifrim et al. 2014) ou encore l'aldostérone qui est une hormone régulant la pression sanguine (Zhong et al. 2020 ; van der Heijden et al. 2020). D'après le modèle d'étude de l'immunité entraînée *in vitro* (Bekkering et al. 2016), la deuxième stimulation implique des stimuli comme le LPS, qui est un élément de l'enveloppe des bactéries Gram négatives et un agoniste du TLR 4, ou le lipo-aminoacide Pam3Cys (N-palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-(R)-cysteine) qui est un agoniste du TLR 1 et 2. (van der Heijden et al. 2018)

IV. L'établissement d'une mémoire immunitaire innée : l'immunité entraînée

Le mécanisme de mémoire immunitaire innée est différent de la mémoire de l'immunité adaptative. La mémoire de l'immunité entraînée nécessite une reprogrammation des fonctions cellulaires par des mécanismes épigénétiques, contrairement à la mémoire immunitaire adaptative qui implique des modifications génétiques permanentes, y compris la recombinaison des gènes codant les domaines variables d'immunoglobulines ou le TCR (*T cell receptor*) (Netea, Quintin, et van der Meer 2011)

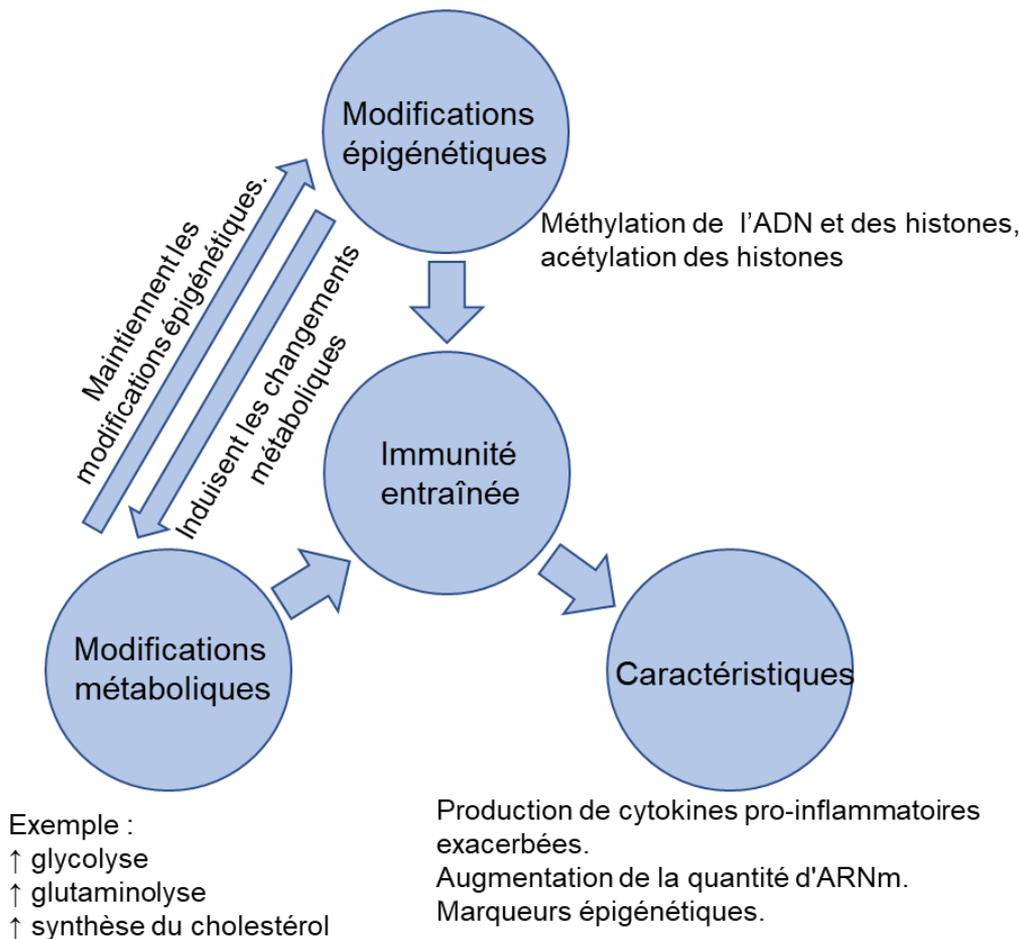


Figure 3 : Les modifications apportées par les inducteurs mettant en place l'immunité entraînée

Illustration montrant les modifications épigénétiques et métaboliques induites chez les cellules ayant développé l'immunité entraînée

Dans l'immunité entraînée, ces cellules sont modifiées à la fois au niveau du métabolisme cellulaire et des modifications des chromosomes. Les histones, protéines permettant la structuration de l'ADN, subissent des modifications qui régulent l'expression des gènes. Les modifications épigénétiques qui se mettent en place sont la méthylation et l'acétylation des histones (van der Heijden et al. 2018). La méthylation de l'ADN est aussi altérée. L'augmentation de méthylation aboutit à la répression du gène, tandis que la diminution de la méthylation conduit à l'activation du gène. Les méthylations se trouvant au niveau des lysines comprises dans les histones sont des marqueurs de l'ouverture ou

de la compaction du chromosome et donc de l'expression (van der Heijden et al. 2018; van Tuijl et al. 2019). Ces modifications sont réversibles, car elles sont mises en place et enlevées par des protéines spécifiques (van der Heijden et al. 2018). Des modifications métaboliques sont aussi impliquées dans les mécanismes de l'immunité entraînée. En fonction de l'inducteur utilisé, les voies métaboliques ne sont pas affectées de la même façon. Les différentes voies pouvant être affectées sont la glycolyse, la glutaminolyse, la phosphorylation oxydative, la synthèse des lipides et la synthèse du cholestérol. L'augmentation de la glycolyse fournit l'énergie nécessaire aux cellules pour augmenter considérablement la production de cytokines en vue d'une deuxième stimulation (Fok et al. 2019). Cela augmente la production de différents éléments qui maintiennent l'immunité entraînée. L'accélération du cycle de Krebs conduit à une augmentation de la concentration de fumarate. Celle-ci va inhiber les lysines déméthylases, permettant de maintenir les modifications épigénétiques qui ont été mises en place. Cela conduit à une augmentation de la voie du mévalonate, provoquant l'augmentation de la voie de synthèse du cholestérol, les isoprénoïdes sont utilisés pour augmenter la réaction inflammatoire. Ce sont des intermédiaires permettant l'activation d'effecteurs régulant la réponse inflammatoire (van Tuijl et al. 2019)

V. *Lactococcus lactis* et *Propionibacterium freudenreichii*

Lactococcus lactis est une bactérie Gram positive appartenant au phylum des firmicutes. Elle est utilisée dans l'industrie alimentaire comme levain fromager d'acidification de nombreux fromages et laits fermentés (Song et al. 2017). Elle est retrouvée principalement chez les plantes et dans le lait (Laroute et al. 2017). C'est une bactérie reconnue GRAS (generally recognized as safe) par la Food and Drug administration (FDA) et l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) la reconnaît comme sans danger pour la consommation (QSP, qualified presumption of safety) (Song et al. 2017; Koutsoumanis et al. 2020). La mise en contact des entérocytes de souris avec *L. lactis* MG1363 induit la production d'IL-6 et de TNF- α . (Zurita-Turk et al. 2014). Elle produit des exopolysaccharides (EPS) qui, en interagissant avec les cellules, induisent la production de cytokines pro-inflammatoires. (Chapot-Chartier et al. 2010; Wu et al. 2016). L'induction de la production de cytokines pro-inflammatoire est souche dépendante car il existe dans la littérature des souches *L. lactis* permettant la production des cytokines anti-inflammatoire chez des souris ayant développées des colites chimiquement induites (Luerce et al. 2014).

Propionibacterium freudenreichii CIRM-BIA 129 est aussi une bactérie Gram positive appartenant au phylum des actinobactéries. Elle est également utilisée dans l'industrie alimentaire en tant que levain d'affinage. Elle est présente en grande quantité dans les fromages comme l'emmental (10^9 CFU/g), une personne en consomme 4 kg/an, elle est ingérée en grande quantité. (Cousin et al. 2011) Elle est retrouvée dans le lait, chez les ruminants et dans le tube digestif humain. (Nair et Kollanoor Johny 2018; Colliou et al. 2017) Elle est reconnue comme probiotique et est aussi reconnue comme GRAS par la FDA et QSP par L'EFSA (Cousin et al. 2011; Ricci et al. 2018). Elle possède une S-Layer qui est une structure composée de glycoprotéines appelées surface layer

protein (Slp) (Fagan et Fairweather 2014). L'exposition de *P. freudenreichii* CIRM-BIA 129 aux PBMC modifie la production d'IL-10 et de TNF- α , lui conférant un profil anti-inflammatoire, ce phénomène est souche dépendant (Foligné et al. 2010). Les mêmes effet anti-inflammatoire sont retrouvés en exposant des PBMC à un extrait de Slp de *P. freudenreichii* CIRM-BIA 129 (Rabah et al. 2018) De plus, l'inactivation du gène slpB conduit à un mutant déficient en S-layer qui induit une augmentation de la production de TNF- α et une diminution de la production d'IL-10 chez les cellules épithéliales intestinale HT-29. Ce mutant ne protège pas, contrairement à la souche sauvage, d'une inflammation intestinale chimiquement induite chez la souris. (do Carmo et al. 2019).



| <i>Lactococcus lactis</i> MG 1363 | <i>Propionibacterium freudenreichii</i> CIRM-BIA 129 | <i>Staphylococcus aureus</i> MW2 |
|---|--|--|
| Gram + Firmicute Intérêt alimentaire Levain fromager Provient du centre international de ressource microbiologique, Bactérie d'intérêt alimentaire (CIRM-BIA) Induit une réponse pro-inflammatoire (\uparrow TNF- α , \uparrow IL-6). | Gram + Actinobactérie Intérêt alimentaire Levain fromager Provient du Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (CNIEL) Induit une réponse anti-inflammatoire (\uparrow IL-10, \downarrow TNF alpha) | Gram + Firmicute Pathogène opportuniste Résiste à la méticilline Provient du Laboratory of Bacteriology, NIH, USA Isolée de patient atteint d'ostéomyélite. Produit des toxines. Induit une réponse pro-inflammatoire (\uparrow IL-1 β , \uparrow TNF alpha) |

Figure 4 : Caractéristique des bactéries utilisées dans cette étude

Liste des caractéristiques des souches alimentaires et pathogènes : leurs colorations de Gram, le phylum auxquelles elles appartiennent, leurs origines et le profil inflammatoire qu'elles induisent chez les cellules avec lesquelles elles entrent en contact.

VI. Les cellules humaines ostéoblastes-like MG-63.

Les cellules ostéoblastes-like MG63 ont été isolées à partir d'un ostéosarcome humain (Heremans et al. 1978). Les ostéoblastes peuvent être modifiées par *S. aureus* pour lui permettre d'échapper aux défenses immunitaires et survivre dans l'organisme. Les cellules changent alors et forment des nidus qui sont des cavités. *S. aureus* coupe l'approvisionnement en sang dans la zone et dégradent les cellules, formant ainsi un environnement favorable à leur croissance. Il persiste dans ces nidus et continu à endommager les tissus voisins, causant ainsi des inflammations et la nécrose des

cellules (Urish et Cassat 2020). Elles ont la capacité de produire des cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-6 et le TNF α , quand elles sont exposées à *S. aureus* (Musso et al. 2021). Cette production de cytokines va recruter les cellules de l'immunité innée et adaptatif (Stracquadiano et al. 2021). Elles jouent un rôle actif dans la mise en place de l'immunité innée en contribuant à la différenciation des cellules souches hématopoïétique (Ponzetti et Rucci 2019).

VII. Hypothèse

Les molécules pouvant induire l'immunité entraînée proviennent du vivant (levure, céréale, Ox-LDL, aldostérone). Certaines bactéries bénéfiques pour l'homme ont des capacités immunomodulatrices, c'est-à-dire qu'elles sont capables d'induire un profil pro- ou anti-inflammatoires chez les cellules avec lesquelles elles interagissent. Nous faisons l'hypothèse que les bactéries alimentaires sont capables d'induire l'immunité entraînée chez les cellules non immunitaires ostéoblastes-like MG-63

VIII. Objectif et Stratégie

Notre objectif est d'étudier le développement de l'immunité entraînée induite par des bactéries alimentaires chez les cellules non immunitaires ostéoblastes-like MG-63.

En l'absence d'étude du développement de l'immunité entraînée *in vitro* des ostéoblastes, nous allons mettre au point un modèle. Il nous permettra de rechercher et de caractériser l'induction de l'immunité entraînée par les bactéries d'intérêt alimentaire *Lactococcus lactis* MG1363 et *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 129 provenant de la souche de la CIRM (Centre International de Ressource Microbiologique). En utilisant notre modèle, on va étudier la capacité des cellules à développer l'immunité entraînée contre *Staphylococcus aureus* et ce en quantifiant la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 6 une fois l'exposition terminée. La souche qui induit la production de cytokines plus élevée sera sélectionnée pour une étude plus approfondie.

Matériels et Méthodes

I. Lignées cellulaires : conditions de croissance

La lignée cellulaire MG-63 ostéoblaste-like, issue d'un ostéosarcome humain, provient de LGC Standards, Teddington, UK. Ce sont des cellules osseuses ressemblant à des fibroblastes. Elles sont cultivées dans du milieu Eagle modifié Dulbecco (DMEM) (Dulbecco et Freeman 1959) (DMEM high glucose, Dominique Dutscher) auquel on a rajouté du sérum de veau fœtal (SVF) 10% (volume/volume), 100 U/mL de pénicilline, et 100 mg/mL de sulfate de streptomycine. Elles sont incubées à 37°C avec 5% de CO₂. Elles sont décollées par addition de trypsine/EDTA (Gibco, Saint Aubin, France), les détachant du support afin de les repiquer.

II. Souches bactériennes : conditions de croissance

Staphylococcus aureus

La souche de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) MW2, résistante à la méticilline (MRSA) (Baba et al., 2002) a été fournie par le Laboratory of Bacteriology, NIH, USA. Elle est cultivée sur milieu BHI (Brain Heart Infusion, composition : Extrait cœur-cerveau, Peptone de gélatine, NaCl, Phosphate disodique, glucose). Des stocks de *S. aureus* sont préparés en mélangeant 4 mL de culture en début de phase stationnaire avec 4 mL de glycérol à 30%. Le stock a ensuite été réparti en cryotubes contenant chacun 0.5 mL. Ces cryotubes, stockés à -80°C, servent à démarrer de nouvelles précultures sur BHI (une nuit avec agitation à 37°C dans du BHI). Les cultures de *S. aureus* sont ensuite réalisées sur milieu DMEM (DMEM high glucose, Dominique Dutscher) à partir de ces précultures.

Propionibacterium freudenreichii

La souche *Propionibacterium freudenreichii* (*P. freudenreichii*) CIRM-BIA 129 (équivalent à la souche ITGP20) provient du Centre National Interprofessionnel de l'Économie Laitière (CNIEL) et elle est maintenue au centre international de ressources microbiologique, bactéries d'intérêt alimentaire (CIRM-BIA, Rennes, France). *P. freudenreichii* est cultivé sur un milieu YEL (yeast extract lactate) (Malik, Reinbold, et Vedamuthu 1968) (composition : lactate de sodium 12 g/L, tryptone 10 g/L, extrait autolytique de levure 10 g/L, solution de K₂HPO₄ 0,328 g/L, et MnSO₄H₂O 0,056 g/L) qui est un milieu adapté à la croissance des bactéries propioniques. Des stocks congelés sont préparés à partir de culture en phase stationnaire comme décrits ci-dessus. Des suspensions calibrées (10⁹ CFU/mL) sont réalisées dans du PBS additionné de glycérol à 20% et stockées à -80°C pour les interactions propionibactéries/cellules.

Lactococcus lactis

La souche *Lactococcus lactis* MG 1363, fournie par le CIRM-BIA, est cultivée sur milieu M17 (Tryptone 2,5 g/L, Peptone papaïnique de soja 5,0 g/L, Peptone pepsique de viande 2,5 g/L, Extrait de viande 5,0 g/L, Extrait autolytique de levure 2,5 g/L, Béta-Glycérophosphate de sodium 19,0 g/L, Sulfate de magnésium 0,25 g/L). Des stocks congelés sont préparés à partir de culture en phase stationnaire comme décrits ci-dessus. Pour la remise en activité, les lactocoques subissent deux repiquages sur M17 glucosé (5 g/L) pour enlever le glycérol du milieu.

III. Les réactifs utilisés

Tableau 1 : Inducteurs de l'immunité entraînée et leurs récepteurs

Tableau 1 indique les réactifs utilisés pour induire l'immunité entraînée et les récepteurs pour lequel ils sont ligand

| Nom du réactif | Récepteurs | Fournisseur | Référence |
|----------------|------------|-----------------------|------------------------|
| B-glucane | Dectin-1 | Pr. David L. Williams | (Williams et al. 1991) |
| Tri-DAP | NOD1 | InvivoGen | 15A30-MM |
| MDP | NOD2 | InvivoGen | 16A22-MM |
| LPS | TLR-4 | Sigma-Aldrich | L2630 |

L'inducteur β -glucane a été fourni par le Professeur David L. Williams (College of Medicine, Tennessee, USA), c'est une molécule présente sur les parois des champignons, céréales, algues et bactéries. Le tri-DAP et le MDP proviennent de InvivoGen et ce sont des molécules présentes dans les parois bactériennes composant le peptidoglycane. Le LPS provient de Sigma-Aldrich, Il a été purifié à partir de la souche *Escherichia coli* 055:B5.

IV. Cinétique de croissance

Des cinétiques de croissance ont été effectuées pour les trois souches bactériennes citées précédemment. Pour *S. aureus*, la densité optique (DO) à 600 nm a été suivie pendant une journée, une mesure toutes les 30 minutes, sur DMEM. Pour *L. lactis*, la même procédure a été suivie sur M17 glucosé avec une DO à 650nm. Dans les deux cas, le milieu stérile était utilisé comme blanc. Pour *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 129, la cinétique a été effectuée en différée. 3 flacons de 50 mL de milieu YEL ont été faits au temps 0 et 3 autres flacons ont été faits après 6 h 30. Les prises de DO ont été faites 3 fois par jour pour tous les flacons à une longueur d'onde de 650 nm également.

V. Numérations bactériennes

Les numérations bactériennes permettent de connaître la quantité de bactéries à une DO précise afin d'utiliser une population bactérienne standardisée lors des interactions bactéries/cellules.

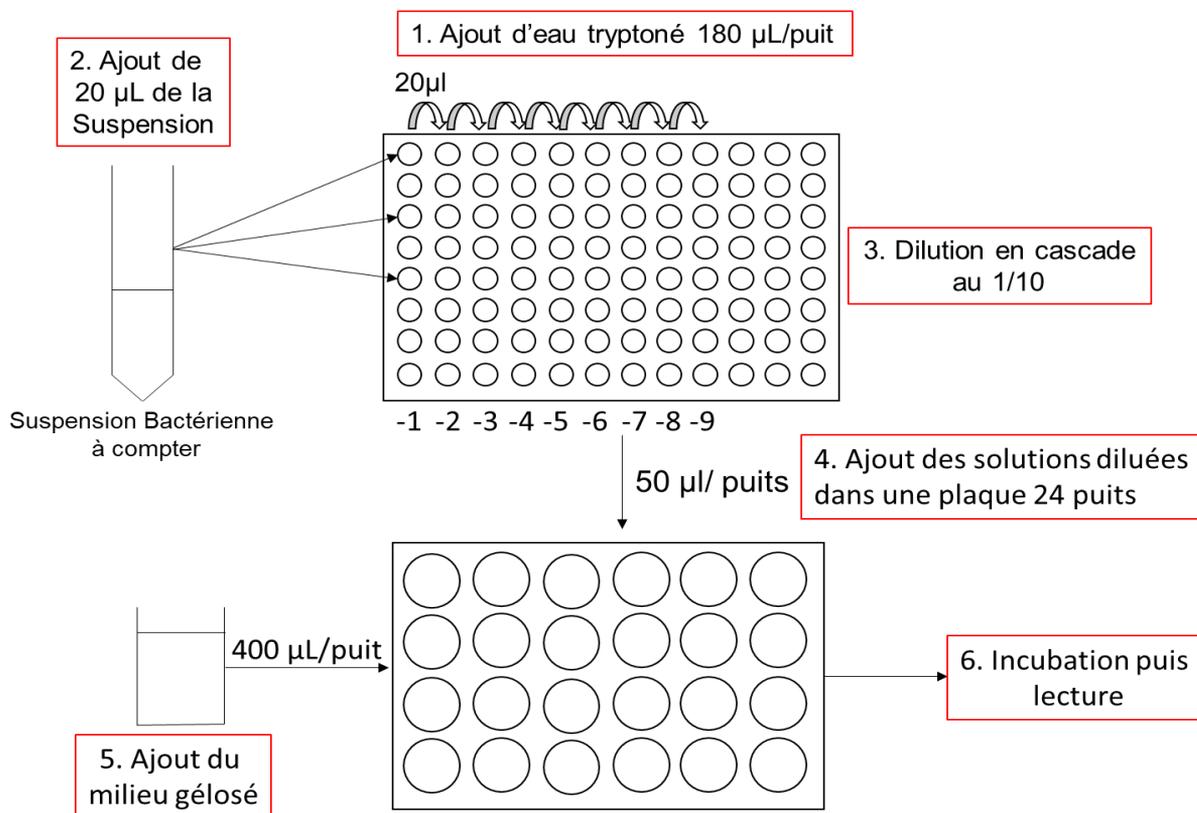


Figure 5 : Schéma de la numération bactérienne par microméthode

Illustration montrant les étapes de la numération bactérienne par microméthode, les dilutions au 1/10 sont effectuées dans une plaque 96 puits et l'ensemencement est réalisée sur plaque 24 puits.

Elles sont faites par dilution sériée pour toutes les bactéries, une aliquote de culture est prélevée aux différents temps indiqués dans la figure 9, puis soumise à des dilutions en cascade au 1/10. Pour les dilutions choisies, les CFU sont énumérées à l'aide du milieu de culture gélosé approprié. Ces numérations ont été réalisées selon Baron et al. (Baron et al. 2006). Les dilutions en cascade sont réalisées dans des plaques de microtitration à 96 puits. Les numérations sur milieux gélosés dans des puits de plaque à 24 puits (BHI gélosé pour *S. aureus* MW2, YEL gélosé pour *P. freudenreichii* et M17 + 0.5% glucose gélosé pour *L. lactis* MG1363). Après la prise en masse, les plaques à 24 puits sont incubées à 30°C (*L. lactis* MG1363 et *P. freudenreichii*) et 37°C (*S. aureus* MW2). Le comptage des colonies est effectué au bout de 24 h (*S. aureus*, *L. lactis*) ou de 5 jours (*P. freudenreichii*) (Figure 5).

VI. Comptage des cellules ostéoblastes-like MG-63

Les ostéoblastes MG-63 sont comptés au compteur de cellules automatisées TC20 (Biorad, Californie, USA). Elles sont détachées avec de la trypsine. L'action de la trypsine est arrêtée par addition de milieu DMEM + 10 SVF + 1% PS Les cellules sont récupérées par deux lavages avec le milieu. Après avoir déterminé la quantité de milieu, 10 µL sont aliquotés pour le comptage.

VII. Induction de l'immunité entraînée chez les ostéoblastes-like MG-63

Pour la mise au point du modèle de l'immunité entraînée chez les ostéoblastes MG-63, nous avons testé les inducteurs β -glucane, Tri-DAP et MDP. Ensuite nous avons examiné la capacité de *L. lactis* et *P. freudenreichii* à induire l'immunité entraînée.

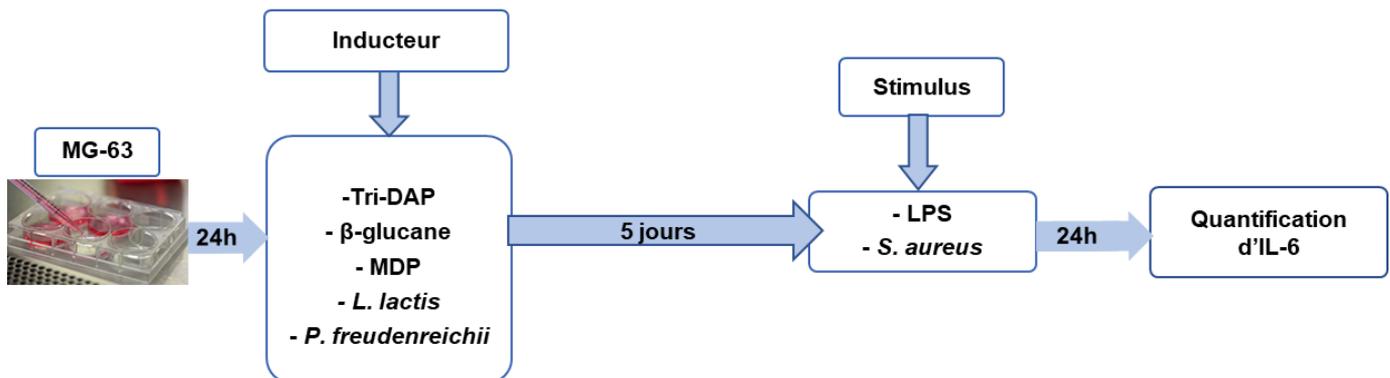


Figure 6 : Schéma de l'induction l'immunité entraînée chez les ostéoblastes-like MG-63

Illustration du déroulement de l'expérience de l'induction de l'immunité entraînée chez les cellules MG-63. Les cellules sont mises en contact avec un inducteur (24 h) ou une souche bactérienne (1 h 30), la gentamicine et la lysostaphine sont utilisées pour éliminer les bactéries dans le milieu. Après un repos de 5 jours, la deuxième exposition est effectuée avec le LPS (24 h) ou *S. aureus* (1 h 30) enfin l'IL-6 dans les surnageant est quantifiée par ELISA

Des cellules MG-63 sont cultivées dans une plaque à 24 puits pendant 24h. Un premier comptage des cellules dans trois puits est effectué afin de déduire la quantité de bactéries nécessaire lors de la l'induction. Au bout de 24h, la première induction est réalisée par addition de *L. lactis*, de *P. freudenreichii*, ou de β -glucane, de MDP, ou de Tri-DAP. On utilise des multiplicités d'infection (MOI) comprise entre 10 bactéries pour 1 cellule MG-63 et 500 pour 1 cellule MG-63 en fonction de la bactérie utilisée. Le contact des cellules MG-63 avec les bactéries se fait pendant 1h30. Le contact avec les inducteurs, le β -glucane (Bekkering et al. 2016), le MDP (Mulder et al. 2019; Ifrim et al. 2014) et le Tri-DAP (Ifrim et al. 2014), pendant 24h.

Après 1h30 de contact, les bactéries non-intériorisées ont été éliminées dans le milieu DMEM avec la solution de gentamycine à 100 μ g/mL (DMEMG100). Afin d'éviter le développement des bactéries dans le milieu extracellulaires et adhérentes aux cellules tout au long de l'expérimentation, 2h plus tard nous avons remplacé le milieu par DMEM + 25 μ g/mL de gentamycine (DMEMG25).

Après 24h d'induction, les surnageants sont récupérés dans des tubes Eppendorf 1,5 mL et congelés à -20°C, le milieu est remplacé par DMEMG25. Les cellules sont comptées pour déterminer par la suite la concentration d'IL-6 produite par cellule. Le milieu est de nouveau changé deux jours après par DMEMG25. Au 6^{ème} jour les cellules sont soumises à la deuxième exposition, soit au LPS pendant 24 heures, soit aux bactéries pendant 1 h 30 puis comme précédemment les milieux contenant les bactéries sont remplacés par du DMEMG100 + 20 μ g/mL de lysostaphine, qui est un antibiotique pour lequel *S. aureus* est sensible, pendant 2 heures puis par DMEMG25. Le

jour suivant, les milieux sont récupérés et un comptage des cellules est effectué pour chacune des conditions testées (Figure 6).

VIII. Quantification de la production d'IL-6 par ELISA

La quantification de la production d'IL-6 a été faite avec le kit ELISA INVITROGEN Human IL-6 uncoated Elisa kit en suivant le protocole fourni par le fournisseur.

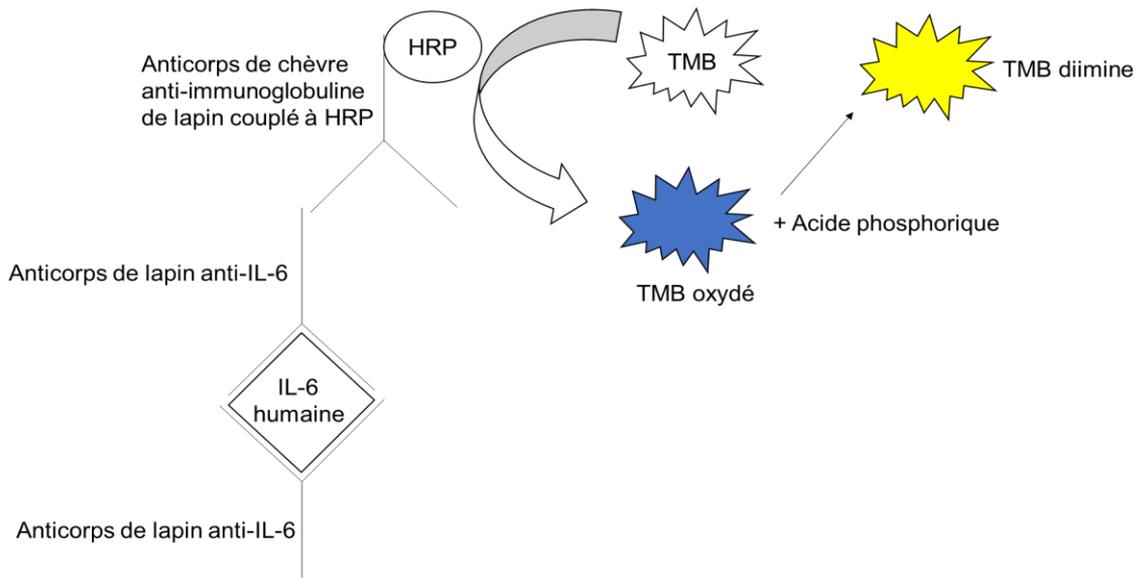


Figure 7 : Schéma de la quantification de l'IL-6 par ELISA

Illustration de la quantification de l'IL-6 avec sa capture par les anticorps anti-IL-6 et sa détection avec la peroxydase de raifort (HRP) et le Tetraméthylbenzidine (TMB)

Une plaque de microtitration en polystyrène est remplie avec une solution d'anticorps de lapin anti-IL-6 humaine. La plaque est incubée une nuit à 4°C pour fixer les anticorps à la surface des puits. Les puits sont ensuite lavés avec une solution de PBS tween 0.05%. Les puits sont saturés avec une solution ELISA/ELISPOT pendant au moins 2 heures. Après un autre lavage, les échantillons sont déposés dans la plaque et incubés une nuit à 4°C. Après lavage, une solution d'anticorps de lapin anti IL-6 humaine est déposée (1 heure). Après un lavage, une solution d'anticorps secondaire de chèvre anti-immunoglobuline de lapin couplé à la peroxydase de raifort (HRP) est déposée (30 min). Un lavage est effectué et le substrat chromogène, le tetraméthylbenzidine, est ajouté. Dès que le milieu change de couleur, la réaction est arrêtée avec 100 µL d'acide phosphorique à 1 mol/L (Figure 7). La lecture de la plaque est faite avec le lecteur de plaque BIOTEK ELX800NB (FISHER, Illkirch, France) à 450 nm.

IX. Analyses statistiques

Les résultats ont été analysés en utilisant le test de Student avec la correction de Bonferroni, les p-values en dessous du seuil de 0.05 sont considéré comme étant significatif. Toutes les données ont été analysées avec le logiciel R. Les bibliothèques utilisées pour les analyses statistiques sont ggpubr, rstatix, tidyverse. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± l'écart-type de la moyenne.

Résultats et discussion :

I. Mise au point des conditions de culture des cellules ostéoblastes-like MG-63

L'immunité entraînée est mise en évidence par la quantification de cytokines pro-inflammatoires synthétisées par les cellules de l'hôte (TNF-alpha, IL-6). Le but de cette expérience est de déterminer les conditions de culture. Les expérimentations durent 7 jours pendant lesquels les cellules ne doivent pas dépasser 90% de confluence, ni rentrer en phase G0. Les *cellules quiescentes* ne se divisent plus et ont un *métabolisme* ralenti, ce qui va impacter la production des cytokines et peptides antimicrobiens en réponse aux différents stimuli (Deplanche et al. 2015; Owen, Soprano, et Soprano 1989), D'un autre côté nous devons avoir une quantité de cellules suffisante dès le premier jour pour mesurer la production d'IL-6. Pour cela, il a fallu fixer la quantité initiale de cellules (inoculum) et la concentration de SVF (milieu). Les cellules MG-63 sont habituellement cultivées dans du DMEM, complémenté avec 10% de SVF, 100 U/mL de pénicilline, et 100 mg/mL de sulfate de streptomycine. Plusieurs concentrations de SVF ont été testées ici, avec deux ensemencements initiaux différents. (Figure 8)

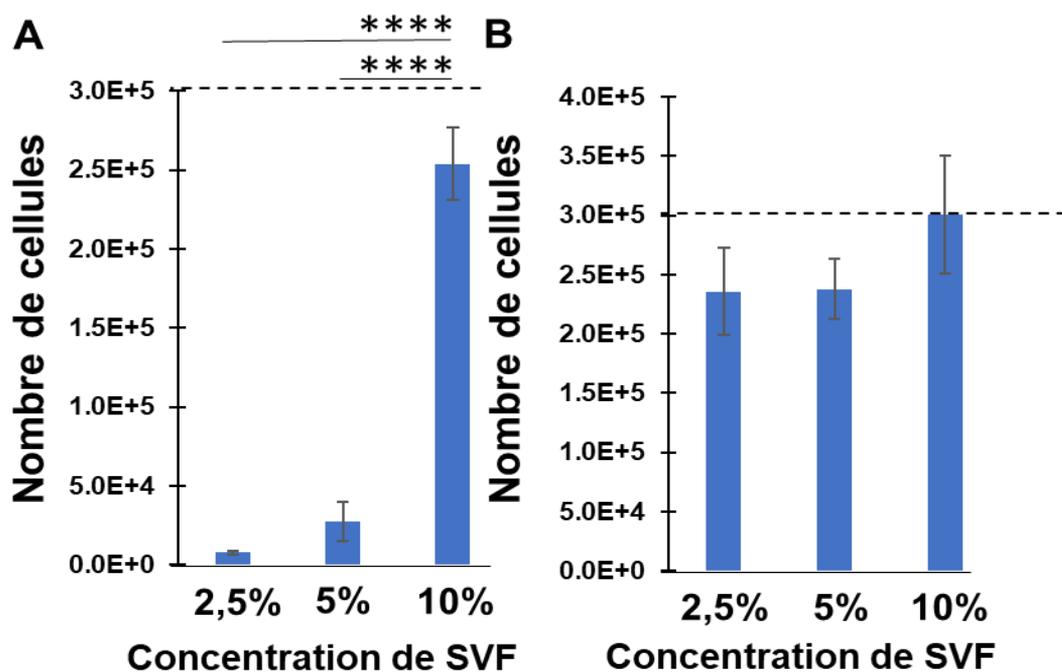


Figure 8 : Dénombrement de cellules au 7^{ème} jour

Ensemencement initial de 10 000 (A) ou 20 000 (B) cellules par puits avec différentes concentrations de SVF. Test de Student avec correction de Bonferroni (**** : p-value ≤ 0.0001). La barre pointillée représente 100% de confluence de cellules MG-63 dans le puit.

D'après les résultats présentés dans la Figure 8, un ensemencement initial de 10 000 cellules ne permet pas aux cellules d'arriver à confluence quand la concentration de SVF est diminuée à 2.5% ou 5% de SVF. La confluence n'a pas atteint 90% au septième jour, donc nous avons testé

l'ensemencement initial de 20 000 cellules par puit. Un ensemencement initial de 20 000 cellules dans le milieu avec 10 % de SVF conduit à 100% de confluence en 7 jours, tandis que la confluence des cellules dans un milieu avec 2.5% ou 5% de SVF n'atteint pas 90%. En conséquence nous avons examiné l'ensemencement initial de 30 000 cellules dans le milieu avec 7% de SVF.

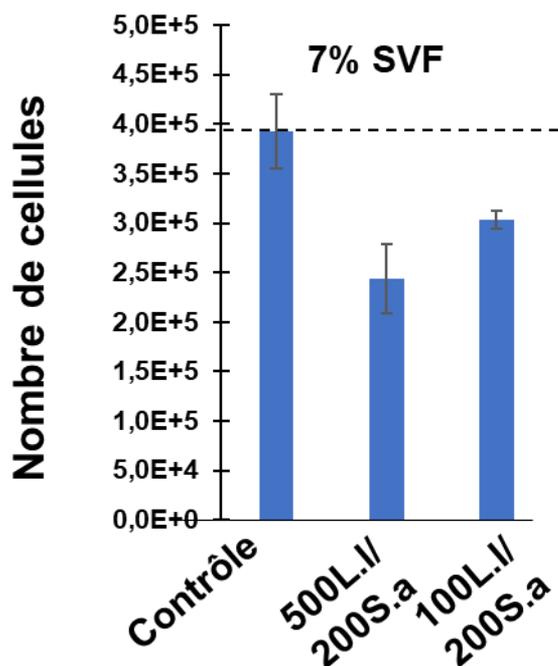


Figure 9 : Dénombrement de cellules au 7^{ème} jour

Ensemencement initial 30 000 cellules par puits avec 7% de SVF. Les cellules MG-63 étaient exposées à l'inducteur *L. lactis* (L.I) à MOI 100 ou MOI 500 le premier jour, puis après un repos de 5 jours, elles sont exposées au stimulus *S. aureus* (S.a) à MOI 200. La barre pointillée représente 100% de confluence de cellules MG-63 dans le puit.

Lors de test préliminaire d'interaction avec *Lactococcus lactis* puis avec *Staphylococcus aureus*, un ensemencement de 30 000 cellules a été utilisé ainsi qu'un milieu de culture contenant 7% de SVF (Figure 9). Au 6^{ème} jour les cellules qui n'ont pas subi de traitement se sont multipliées jusqu'à 400 000 cellules et les cellules qui ont été exposées à *L. lactis* et *S. aureus* se sont multiplié entre 250 000 et 300 000 cellules. Ces conditions nous ont permis d'avoir la quantité des cellules suffisante pour mesurer la concentration d'IL-6 le jour 1 et avoir les cellules à confluence 90% au jour 7.

II. Déterminations des conditions de culture des bactéries utilisées

Des cinétiques de croissances de *Lactococcus lactis* MG1363, *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 129, et *Staphylococcus aureus* MW2 ont été réalisées. L'objectif, ici, est de déterminer le

nombre de bactéries à mettre en interaction avec les cellules MG-63. Il faut une MOI suffisante pour stimuler les cellules. Une MOI trop élevée conduirait à l'acidification du milieu DMEM et à la nécrose des cellules.

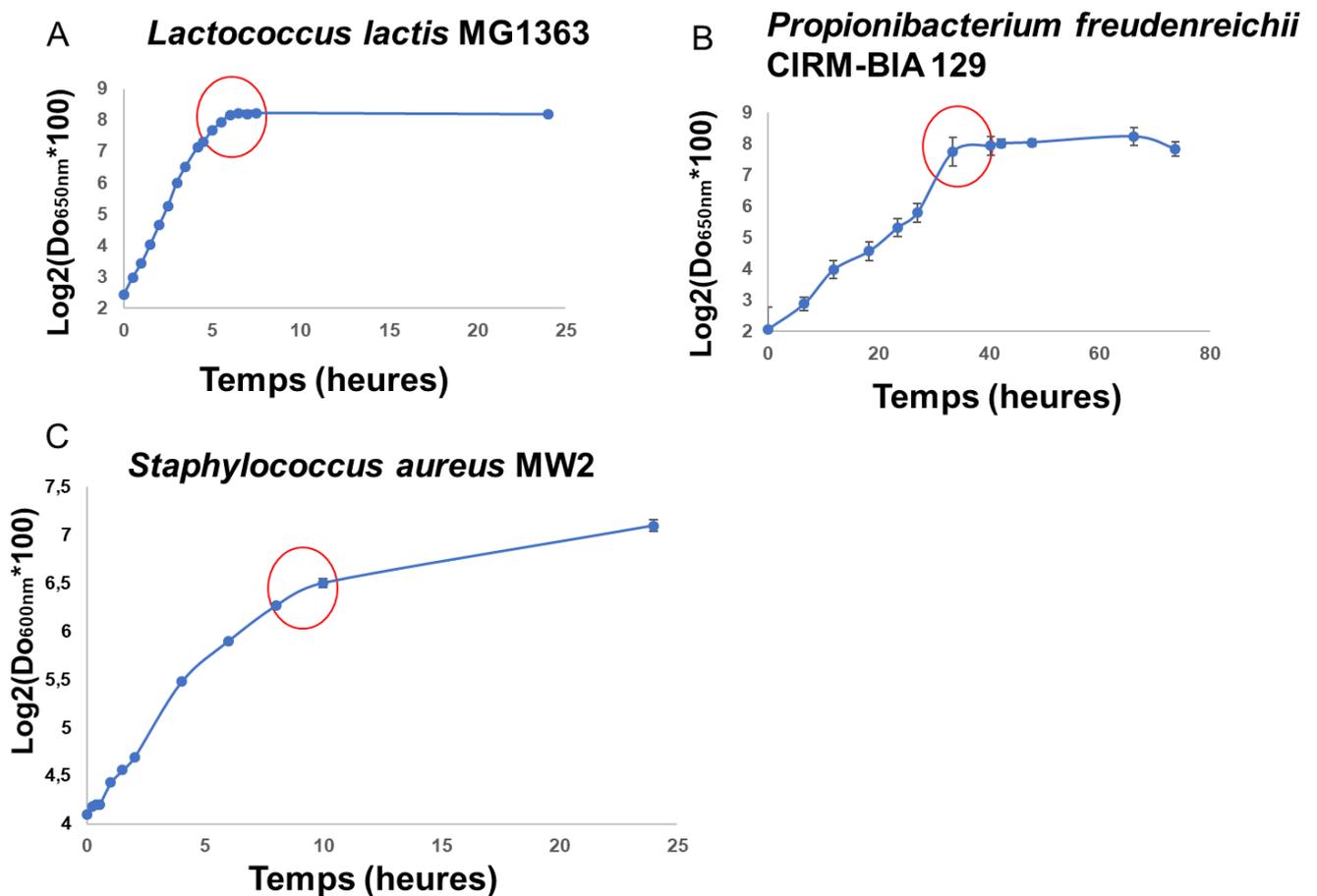


Figure 10 : Cinétique de croissance des souches utilisées

Suivi de croissance par spectrophotométrie. Cinétique de croissance de *Lactococcus lactis* MG1363 dans du M17 + 0,5% glucose (A), *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 129 dans du YEL (B) et *Staphylococcus aureus* MW2 dans du DMEM (C). Les cercles rouges représentent la phase stationnaire où les bactéries ont été récoltées.

La cinétique de croissance de *L. lactis* MG1363 (Figure 10A) montre que la bactérie atteint la phase stationnaire en 6 heures, le temps de doublement de population est de 0.9 heure. Le suivi de croissance par spectrophotométrie et un dénombrement de la population bactérienne avec la microméthode de dénombrement au début de phase stationnaire indique qu'à DO_{650nm} de 2,43 la concentration bactérienne correspond à 1,35x 10⁹ CFU/mL. *P. freudenreichii* CIRM-BIA 129 atteint la phase stationnaire après 33.5h de culture, le temps de doublement de population est de 7,3 heures (Figure 10B). Un dénombrement de la souche au début de phase stationnaire à 33.5h indique qu'à une DO_{650nm} de 2,28, il y a 1.99 x10⁹ CFU/mL. Le suivi de croissance de *S. aureus* MW2 montre que *S. aureus* atteint la phase stationnaire après 10 heures de culture et le temps de

doublent de population est de 3,8 heures (Figure 10C). Le dénombrement de culture de *S. aureus* à une DO_{600nm} de 0.445 nous indique que la culture contient 3,67 x10⁸ CFU/mL (Tableau 2).

Tableau 2 : Correspondance en CFU/mL de chaque suspension à une DO précise

| Souche | DO mesuré | CFU/mL |
|--------------------------|-----------|-----------------------|
| <i>L. lactis</i> | 2,43 | 1,35x 10 ⁹ |
| <i>P. freudenreichii</i> | 2,28 | 1,99x 10 ⁹ |
| <i>S. aureus</i> | 0,455 | 3,67x 10 ⁸ |

Les MOI ont été choisies grâce à des études réalisées précédemment pour *S. aureus* et *P. freudenreichii* (Lima Leite et al. 2020; do Carmo et al. 2019). Pour *L. lactis* nous avons testé des MOI allant de 100 à 2000 et choisi les MOI qui nous permettaient de quantifier d'IL-6 par ELISA.

III. L'induction de l'immunité entraînée chez les ostéoblastes MG-63 par les différents inducteurs

Les cellules MG-63 ont été exposées à trois inducteurs connus de l'immunité entraînée, notamment chez les cellules immunitaires : le B-glucane, le tri-DAP et le MDP. Après un repos de 5 jours, une deuxième stimulation par exposition à 10 ng/mL de LPS pendant 24h a eu lieu avant la quantification d'IL-6 (Figures 11-13). Ces expériences ont pour but de déterminer si les MG-63 peuvent développer l'immunité entraînée et quel inducteur peut être utilisé comme témoin positif dans notre modèle.

Le β-glucane n'induit pas l'immunité entraînée chez les cellules MG-63.

Les résultats de l'exposition des cellules MG-63 au β-glucane à des concentrations de 0,5 µg/mL (A et D), 50 µg/mL (B et E) et 200 µg/mL (C et F) montrent l'absence d'augmentation de la production d'IL-6 au jour 1 (Figure 11). Nous avons également testé les concentrations de β-glucane 5 µg/mL, 10 µg/mL, et 100 µg/mL montrant les mêmes résultats. Le LPS, utilisé comme témoin positif, induit bien l'IL-6 au jour 1. Au jour 7, le LPS induit bien l'IL-6. La préexposition au β-glucane ne potentialise pas cette induction

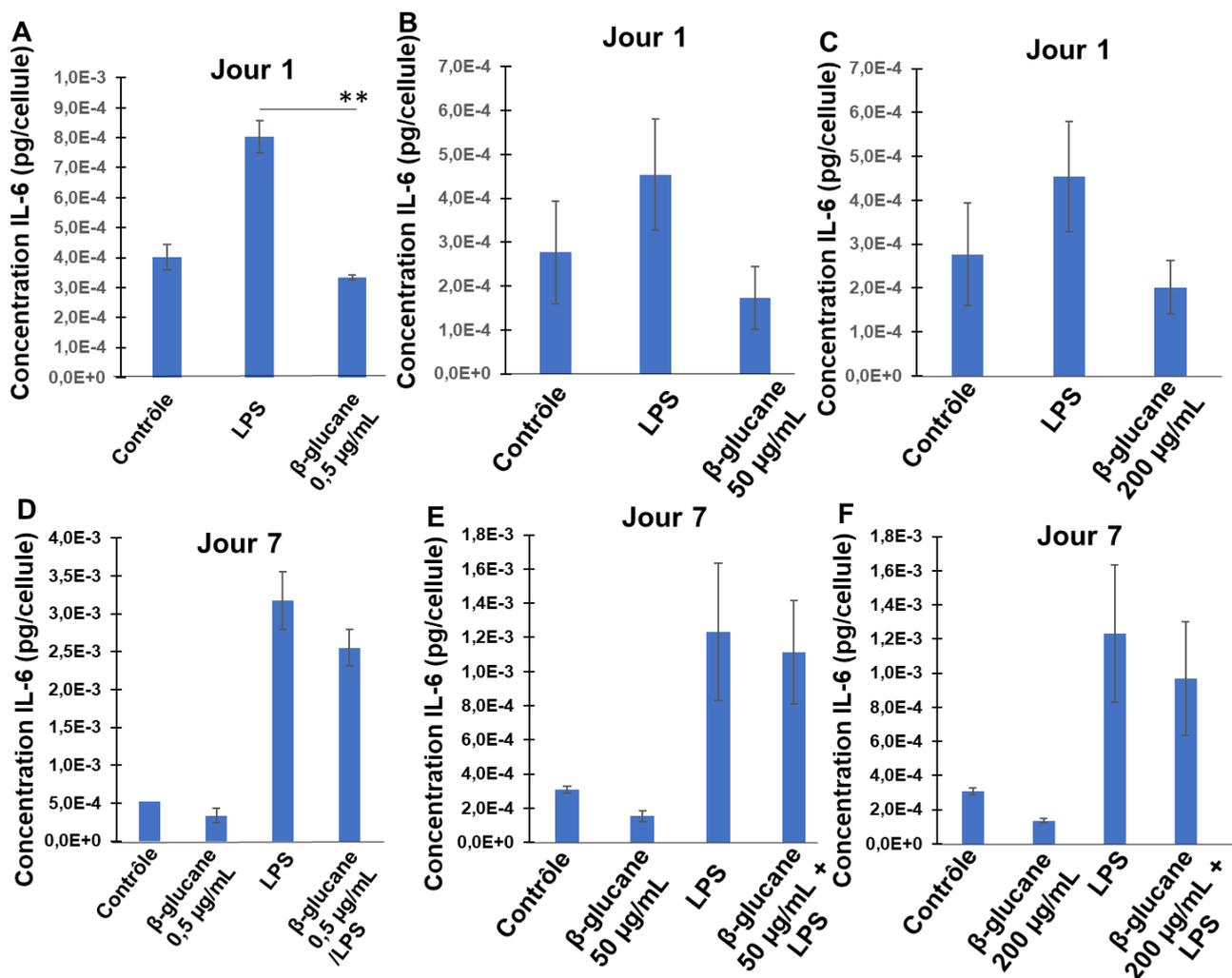


Figure 11 : Quantification d'IL-6 produits par les cellules MG-63 prétraitées par le β-glucane

A, B, C : Les cellules MG-63 étaient exposées 24h à l'inducteur LPS ou β-glucane à concentration 0,5 µg/mL (A), 50 µg/mL (B), 200 µg/mL (C). D, E, F : Après un repos de 5 jours, des cellules contrôle ou prétraitées par le β-glucane étaient ensuite exposées 24 h au stimulus LPS à 10 ng/mL ou laissées sans stimulus. Test de Student avec la correction de Bonferroni (**: p-value ≤ 0,01)

Selon les données de la littérature, le β-glucane, à la concentration de 100 µg/mL, induit l'immunité entraînée chez les cellules THP-1 (Li et al. 2009). L'absence de la production d'IL-6 par les cellules MG-63 exposées au β-glucane dans les conditions testées dans notre expérience peut être due aux doses trop faibles de β-glucane. Des concentrations de β-glucane plus fortes, 50 µg/mL (E), et 200 µg/mL (F) ont par la suite été testées pour déterminer la capacité du β-glucane à induire l'immunité entraînée chez les cellules MG-63. L'augmentation des concentrations de β-glucane ne permet pas d'observer une hausse de la production d'IL-6. Prenant en compte que le β-glucane interagit avec le récepteur membranaire Dectin-1, nous pouvons supposer que les MG-63 n'expriment pas ce récepteur ou l'exprime en petite quantité. Le β-glucane ne peut donc pas être utilisé comme témoin positif de l'induction d'immunité entraînée chez les cellules MG-63.

Le Tri-DAP n'induit pas l'immunité entraînée chez les cellules MG-63.

Le tri-DAP est un autre inducteur connu de l'immunité entraînée. Nous avons examiné sa capacité à induire l'immunité entraînée chez les cellules MG-63 en utilisant les solutions de Tri-DAP à 10 µg/mL, et 50 µg/mL. D'après nos résultats l'exposition seule au tri-DAP à 50 µg/mL induit la production d'IL-6 au jour 1, mais elle est moins forte par rapport à l'exposition au LPS (Figure 12A). Le prétraitement des cellules avec Tri-DAP à 10 µg/mL, et 50 µg/mL suivi par l'exposition pendant 24h à LPS après les 5 jours de repos n'augmente pas la production d'IL-6 au 7^{ème} jour (Figure 12B). Au contraire cette induction au Tri-DAP réprime la réponse IL-6 au LPS. Le Tri-DAP ne peut donc pas être utilisé comme témoin positif de l'induction d'immunité entraînée chez les cellules MG-63.

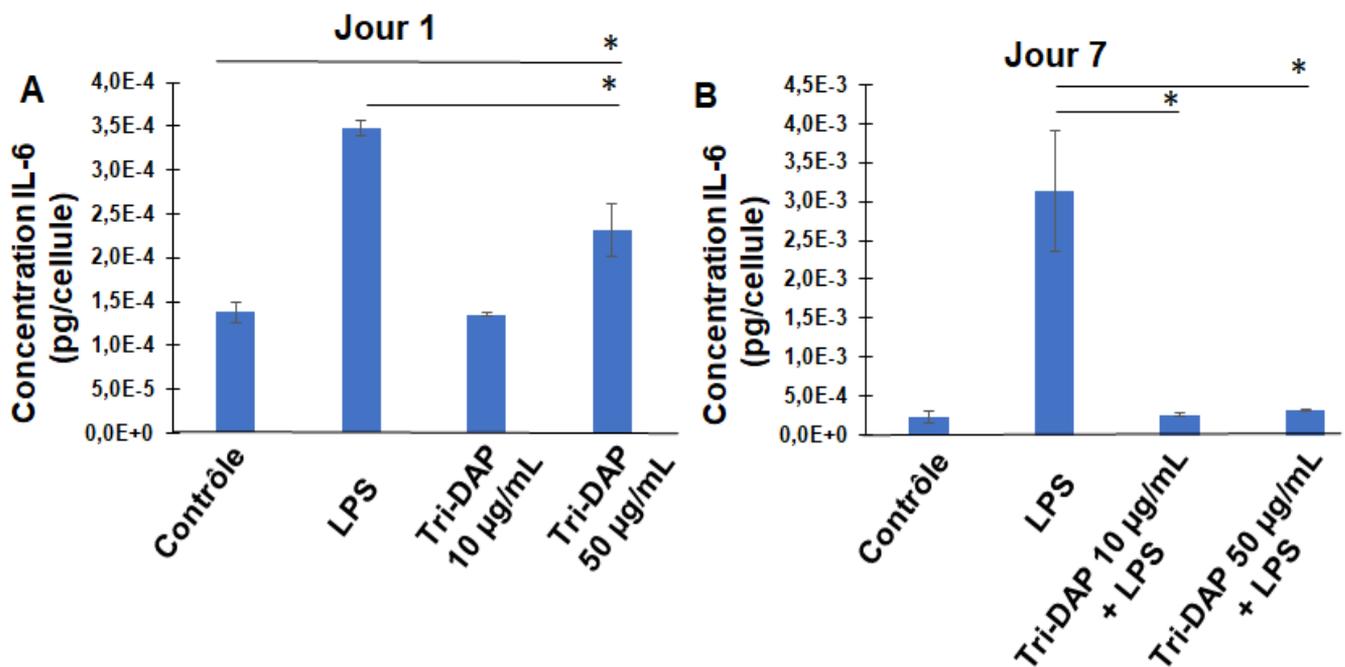


Figure 12 : Quantification d'IL-6 produite par les cellules MG-63 prétraitées par le Tri-DAP

A : Les cellules MG-63 étaient exposées 24h au LPS ou au Tri-DAP ou laissées non-traitées (contrôle). B : Les cellules MG-63 étaient exposées 24h au tri-DAP suivi d'un repos (5 jours) avant exposition 24 h au LPS 10 ng/mL (B). Test de Student avec la correction de Bonferroni (*: p-value ≤ 0,05)

MDP comme l'inducteur potentiel de l'immunité entraînée chez les cellules MG-63.

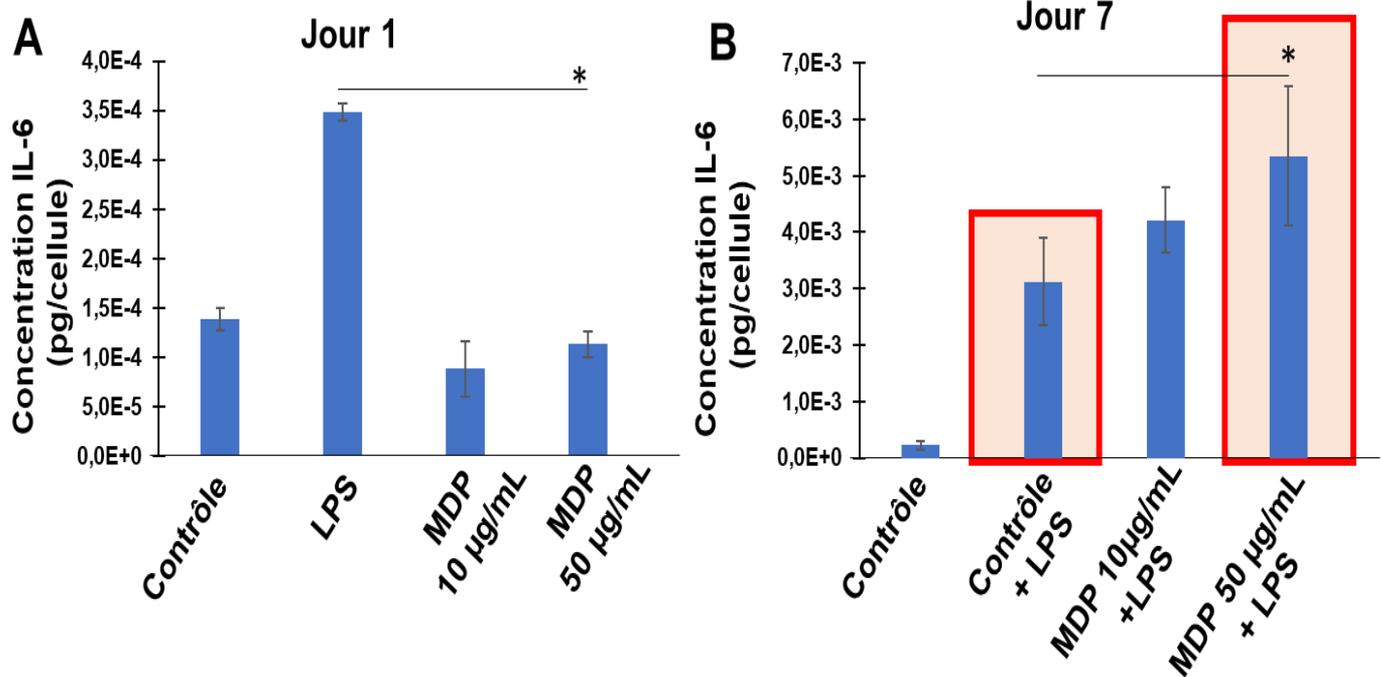


Figure 13 : Quantification d'IL-6 produite par les cellules MG-63 prétraitées par le MDP

A : Les cellules MG-63 étaient exposées 24h à l'inducteur LPS ou MDP ou laissées non-traitées (contrôle). B : Les cellules MG-63 étaient exposées 24h à l'inducteur MDP. Après un repos (5 jours) elles étaient ensuite exposées 24 h au stimulus LPS 10 ng/mL (B).

Test de Student avec la correction de Bonferroni (*: p-value $\leq 0,05$)

Pour examiner la capacité du MDP à induire l'immunité entraînée chez les cellules MG-63, deux concentrations, 10 $\mu\text{g/mL}$ et 50 $\mu\text{g/mL}$ ont été testées. L'exposition des cellules MG-63 pendant 1 jour n'induit pas de production d'IL-6 (Figure 13A). Les cellules prétraitées par le MDP à 50 $\mu\text{g/mL}$ produisent plus d'IL-6 en réponse au LPS que les cellules n'ayant pas subi de prétraitement. (Figure 13B).

Les résultats suggèrent que le MDP est l'inducteur potentiel de l'immunité entraînée des cellules MG-63. La concentration de 50 $\mu\text{g/mL}$ sera ensuite utilisée pour les prochaines expériences.

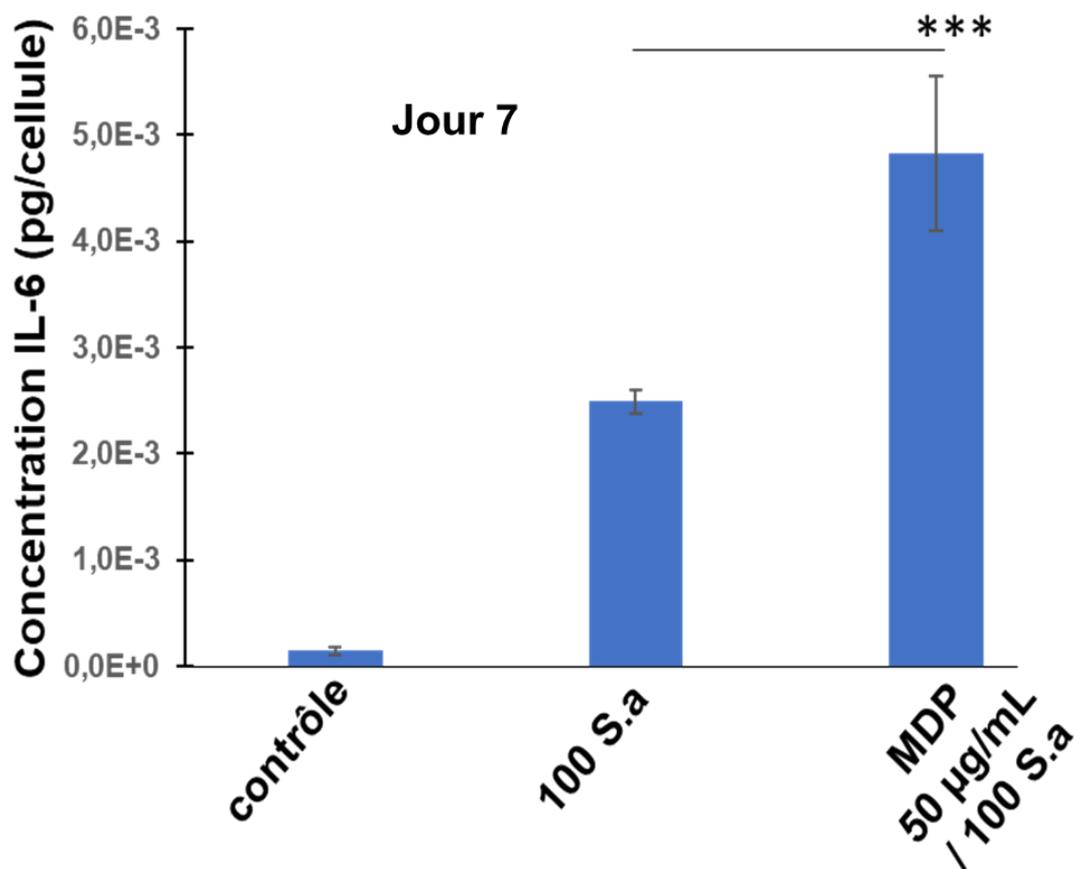


Figure 14 : Quantification d'IL-6 produite par les cellules MG-63 prétraitées par le MDP

Les cellules MG-63 étaient exposées 24h à l'inducteur MDP à 50 µg/mL. Après un repos (5 jours), Elles étaient ensuite exposées 24 h au stimulus *S. aureus* à MOI 100.

Test de Student avec la correction de Bonferroni (***: p-value ≤ 0,001)

Pour examiner la capacité du MDP à induire l'immunité lors d'une infection à *S. aureus* MW2, les cellules MG-63 sont exposées à 50 µg/mL de MDP et après 5 jours de repos les cellules sont infectées par *S. aureus* MW2 (MOI 100) comme décrit dans le Matériels et Méthodes (Figure 6). Le staphylocoque seul induit la production d'IL-6 au jour 7. Cette induction est augmentée de façon significative si les cellules MG-63 ont été prétraitées au MDP. L'augmentation atteint une différence statistique significative après le prétraitement des cellules avec 50 µg/mL de MDP (Figure 14)

IV. *Lactococcus lactis* MG1363 est capable d'induire le développement de l'immunité entraînée chez les cellules MG-63

Avant d'étudier la capacité de *L. lactis* à induire l'immunité entraînée chez les cellules MG-63 exposées à *S. aureus*, nous avons prétraité les cellules avec *L. lactis* à MOI 100, 500, 1000 et 2000 avant l'infection par *S. aureus* selon la méthode décrite précédemment (Figure 5). L'analyse du taux de survie des cellules des cellules MG-63 après 24 h d'exposition à *L. lactis* montre que les taux de survie sont plus élevés dans les cultures de cellules prétraitées avec *L. lactis* à MOI 100 et 500 (37% et 31%) que dans les cultures exposées à MOI 1000 et 2000 (14% et 8%) (Tableau 3). Les MOI 100 et 500 ont été choisies afin d'être testées comme inducteurs potentiels d'immunité entraînée chez les cellules MG-63 lors de l'infection à *S. aureus* pour les prochaines expériences

Tableau 3 : Taux de survie des cellules MG-63 exposées à différentes MOI de *L. lactis*

| MOI <i>Lactococcus</i> MG1363 | <i>lactis</i> | Taux de survie (%) |
|-------------------------------|---------------|--------------------|
| 100 | | 37 |
| 500 | | 31 |
| 1000 | | 14 |
| 2000 | | 8 |

L. lactis, avec MOI 100 et 500 comme inducteur a été suivi par le repos 5 jours avant exposition à *S. aureus* à MOI 200 selon la méthode décrit précédemment (Figure 6). Les résultats présentés dans la Figure 15 montrent que l'induction d'IL-6 stimulée par *S. aureus* est exacerbée par le prétraitement par *L. lactis* à MOI 100 et 500. L'augmentation représente une différence significative avec les cellules exposées uniquement à *S. aureus*. Ces résultats suggèrent que *L. lactis* peut induire l'immunité entraînée chez les cellules MG-63 lors de l'infection à *S. aureus*.

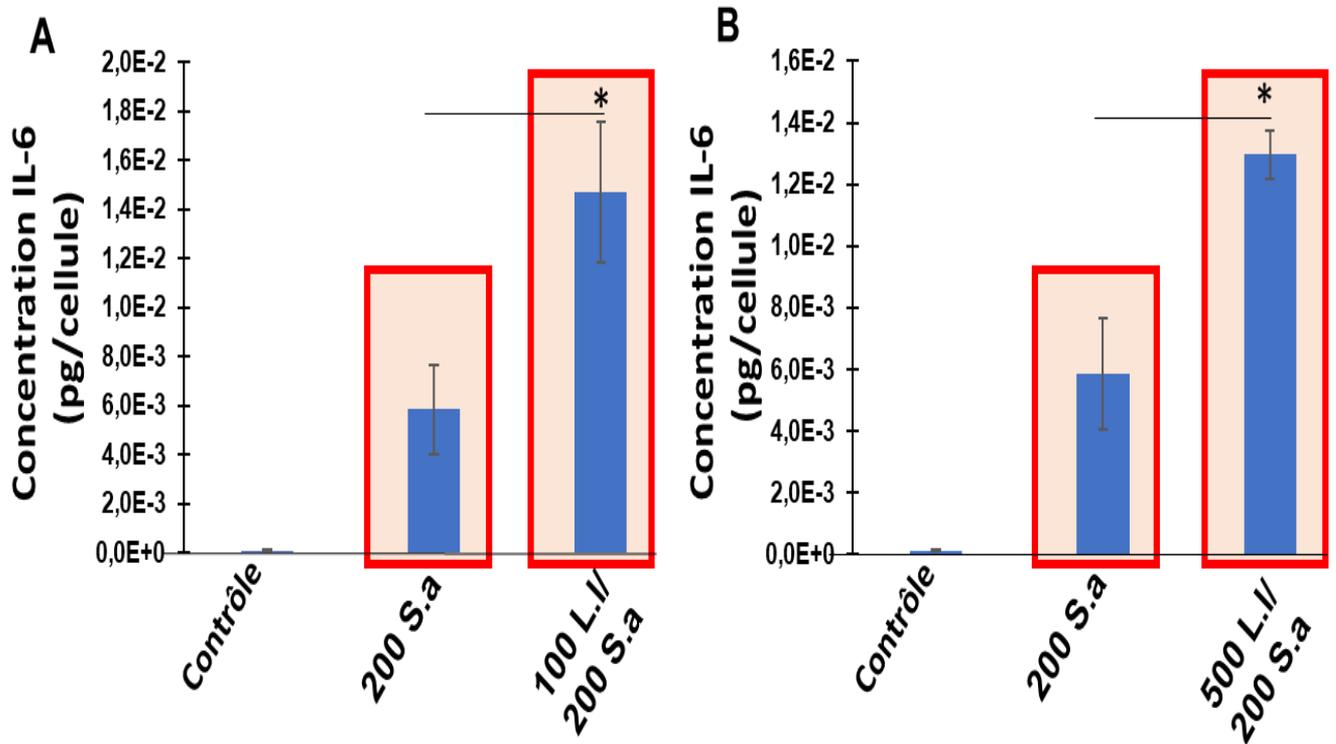


Figure 15 : Quantification d'IL-6 produite par les cellules MG-63 prétraitées par *L. lactis*

Les cellules MG-63 étaient exposées 24h à l'inducteur *L. lactis* à MOI 100 (A) ou MOI 500 (B). Après un repos (5 jours), elles étaient ensuite exposées au stimulus *S. aureus* à MOI 200.

Test de Student avec la correction de Bonferroni (*: p-value ≤ 0,05)

V. *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 129 n'induit pas l'immunité entraînée chez cellules MG-63 dans les conditions testées

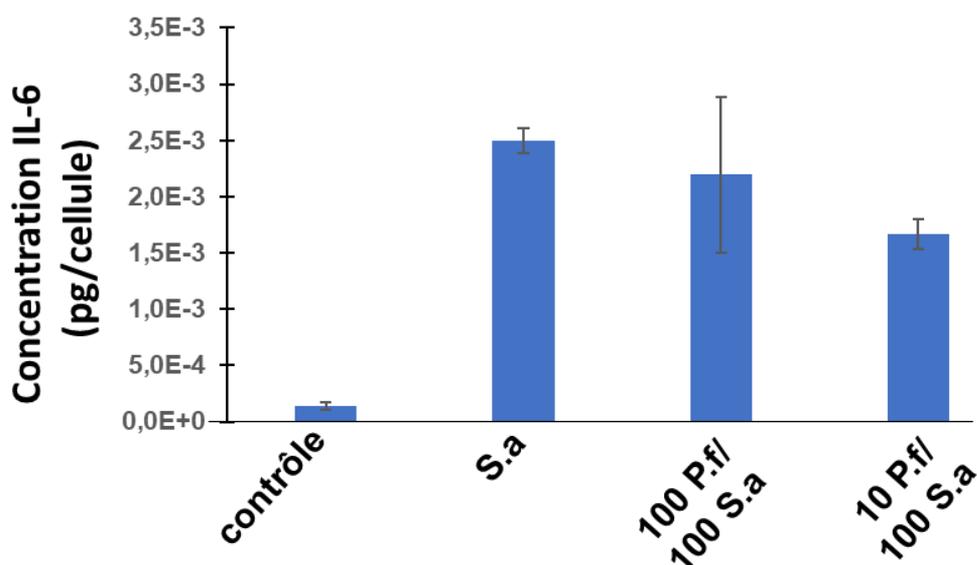


Figure 16 : Quantification d'IL-6 produite par les cellules MG-63 prétraitées par *P. freudenreichii*

Les cellules MG-63 étaient exposées 24h à l'inducteur *P. freudenreichii* à MOI 100 ou MOI 10. Après un repos (5 jours), elles étaient ensuite exposées au stimulus *S. aureus* à MOI 100.

Afin d'étudier si *P. freudenreichii* CIRM-BIA 129 peut induire l'immunité entraînée chez les cellules MG-63, nous avons utilisé *P. freudenreichii* avec MOI 10 et 100 comme l'inducteur, suivi par le repos 5 jours avant l'exposition à *S. aureus*. La MOI 10 a été choisie grâce à l'étude réalisée précédemment pour *P. freudenreichii* (do Carmo et al. 2019) : les auteurs ont montré que *P. freudenreichii* CIRM-BIA 129 à MOI 10 modifie la production d'IL-10 chez les cellules épithéliales intestinales humaine HT-29. Nous avons testé MOI100 pour observer l'effet dose. Les résultats présentés dans la Figure 16 révèlent que le prétraitement des cellules MG-63 avec *P. freudenreichii* avec MOI 10 et 100 n'augmente pas l'induction d'IL-6. Ces résultats préliminaires démontrent que *P. freudenreichii* CIRM-BIA 129 n'induit pas l'immunité entraînée chez MG-63 dans les conditions de nos expériences.

Conclusions

Au cours de ce travail, nous avons mis pour la première fois au point le modèle d'étude du développement de l'immunité entraînée chez les cellules non immunitaire ostéoblastes-like humaines MG-63. Nous avons déterminé le nombre initial de cellules et le pourcentage de SVF pour avoir le nombre des cellules permettant la quantification d'IL-6 à partir du 1^{re} jour jusqu'à la fin de l'expérience.

L'objectif était d'étudier le développement de l'immunité induite par des bactéries alimentaires chez les cellules non immunitaires humaines ostéoblastes-like MG-63. Nous avons démontré pour la première fois que les cellules MG-63 sont capables de développer l'immunité entraînée ce qui pourrait contribuer, au niveau d'organisme, à la protection lors de l'infection en produisant des cytokines pro-inflammatoires qui seront sécrétées. Nous avons également montré que parmi les trois inducteurs connues (B glucane, Tri-DAP et MDP) examinés dans notre étude, l'immunité entraînée n'a été induite que par le MDP (Figure 17). Il peut être utilisé comme témoin positif du développement de l'immunité entraînée des cellules MG-63 dans notre modèle. Ces résultats peuvent être expliqués par l'absence ou l'expression très faible des récepteurs du B glucane et du Tri-DAP contrairement aux récepteurs du MDP.

Les résultats du prétraitement des cellules avec *Lactococcus lactis* MG1363 mettent en évidence que ces bactéries d'intérêt alimentaire peuvent induire l'immunité entraînée chez les cellules non immunitaire ostéoblastes-like humaine MG-63 (Figure 17). Nous avons également observé que *P. freudenreichii* CIRM-BIA 129 n'induit pas l'immunité entraînée chez les cellules MG-63 dans les conditions de notre étude.

Perspectives

À la suite de cette étude, plusieurs perspectives s'ouvrent à court et long terme :

Court terme

Afin d'étudier en profondeur le développement de l'immunité entraînée chez les cellules non immunitaires ostéoblastes-like humaines MG-63 prétraitées par le MDP ou *L. lactis*, il convient de quantifier la production du TNF dont la production est potentialisée suite à la mise en place de l'immunité entraînée chez les cellules. Ainsi qu'examiner les altérations métaboliques et épigénétiques par les approches déjà utilisées dans d'autres études.

Il serait intéressant de cribler plusieurs souches de *L. lactis* et de *P. freudenreichii* pour sélectionner les meilleures inductrices, ainsi que d'identifier les effecteurs bactériens impliqués « entraîneurs ». Nous pouvons envisager de tester les effets d'une culture mixte de bactéries pour rechercher une synergie induisant une immunité entraînée plus forte.

Étudier d'autres types cellulaires non immunitaires humains ou animaux pour voir l'efficacité du développement de l'immunité entraînée lors de l'infection à *S. aureus*. Et étudier le rôle des toxines produites par *S. aureus* sur le développement de l'immunité entraînée chez les cellules en utilisant des mutants qui n'expriment pas de toxine.

Long terme

Les résultats obtenus suggèrent la possibilité d'utiliser un traitement local composé soit de la bactérie inductrice, soit des éléments potentiels permettant le développement de l'immunité entraînée chez les cellules, pour traiter la zone où va se dérouler l'opération afin de renforcer la réponse immunitaire des cellules et prévenir des infections à *S. aureus* suite à l'installation des prothèses de hanche. Si d'autres types cellulaires sont capables de développer l'immunité entraînée, l'utilisation de ce procédé pourra aussi servir à la prévention contre les infections à *S. aureus*. Ce travail ouvre des perspectives pour endiguer la propagation de l'infection à *S. aureus* dans les troupeaux de ruminants.

Le développement des connaissances vise à long terme le développement de stratégies thérapeutiques qui reprogramment le métabolisme immunitaire de l'hôte pour stimuler une réponse immunitaire efficace et combattre les infections chroniques à *S. aureus*.

Nous évaluerons également la capacité des bactéries alimentaires identifiées *in vitro* les plus prometteuses à induire une immunité entraînée lors de l'infection à *S. aureus in vivo* dans un modèle murin.

Référence Bibliographique

- Baron, Florence, Marie-Françoise Cochet, Wilfried Ablain, Noël Grosset, Marie-Noël Madec, Fabienne Gonnet, Sophie Jan, et Michel Gautier. 2006. « Rapid and Cost-Effective Method for Micro-Organism Enumeration Based on Miniaturization of the Conventional Plate-Counting Technique ». *Le Lait* 86 (3): 251-57. <https://doi.org/10.1051/lait:2006005>.
- Bekkering, Siroon, Bastiaan A. Blok, Leo A. B. Joosten, Niels P. Riksen, Reinout van Crevel, et Mihai G. Netea. 2016. « In Vitro Experimental Model of Trained Innate Immunity in Human Primary Monocytes ». *Clinical and Vaccine Immunology: CVI* 23 (12): 926-33. <https://doi.org/10.1128/CVI.00349-16>.
- Carmo, Fillipe Luiz Rosa do, Houem Rabah, Barbara Fernandes Cordeiro, Sara Heloisa da Silva, Rafaela Miranda Pessoa, Simone Odília Antunes Fernandes, Valbert Nascimento Cardoso, et al. 2019. « Probiotic Propionibacterium Freudenreichii Requires SlpB Protein to Mitigate Mucositis Induced by Chemotherapy ». *Oncotarget* 10 (68): 7198-7219. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27319>.
- Chapot-Chartier, Marie-Pierre, Evgeny Vinogradov, Irina Sadovskaya, Guillaume Andre, Michel-Yves Mistou, Patrick Trieu-Cuot, Sylviane Furlan, et al. 2010. « Cell Surface of Lactococcus lactis Is Covered by a Protective Polysaccharide Pellicle ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (14): 10464-71. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.082958>.
- Colliou, Natacha, Yong Ge, Bikash Sahay, Minghao Gong, Mojgan Zadeh, Jennifer L. Owen, Josef Neu, et al. 2017. « Commensal Propionibacterium Strain UF1 Mitigates Intestinal Inflammation via Th17 Cell Regulation ». *The Journal of Clinical Investigation* 127 (11): 3970-86. <https://doi.org/10.1172/JCI95376>.
- Cousin, Fabien J., Denis D. G. Mater, Benoît Foligné, et Gwénaél Jan. 2011. « Dairy Propionibacteria as Human Probiotics: A Review of Recent Evidence ». *Dairy Science & Technology* 91 (1): 1-26. <https://doi.org/10.1051/dst/2010032>.
- Deplanche, Martine, Rachid Aref El-Aouar Filho, Ludmila Alekseeva, Emilie Ladier, Julien Jardin, Gwénaële Henry, Vasco Azevedo, et al. 2015. « Phenol-Soluble Modulin α Induces G2/M Phase Transition Delay in Eukaryotic HeLa Cells ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 29 (5): 1950-59. <https://doi.org/10.1096/fj.14-260513>.
- Dulbecco, R., et G. Freeman. 1959. « Plaque Production by the Polyoma Virus ». *Virology* 8 (3): 396-97. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(59\)90043-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(59)90043-1).
- Fagan, Robert P., et Neil F. Fairweather. 2014. « Biogenesis and Functions of Bacterial S-Layers ». *Nature Reviews. Microbiology* 12 (3): 211-22. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3213>.

- Fok, Ezio T., Laurianne Davignon, Stephanie Fanucchi, et Musa M. Mhlanga. 2019. « The LncRNA Connection Between Cellular Metabolism and Epigenetics in Trained Immunity ». *Frontiers in Immunology* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03184>.
- Foligné, Benoît, Stéphanie-Marie Deutsch, Jérôme Breton, Fabien J. Cousin, Joëlle Dewulf, Michel Samson, Bruno Pot, et Gwénaél Jan. 2010. « Promising Immunomodulatory Effects of Selected Strains of Dairy Propionibacteria as Evidenced in Vitro and in Vivo ». *Applied and Environmental Microbiology* 76 (24): 8259-64. <https://doi.org/10.1128/AEM.01976-10>.
- Hamada, Attoumani, Cédric Torre, Michel Drancourt, et Eric Ghigo. 2018. « Trained Immunity Carried by Non-Immune Cells ». *Frontiers in Microbiology* 9: 3225. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03225>.
- Heijden, Charlotte D. C. C. van der, Samuel T. Keating, Laszlo Groh, Leo A. B. Joosten, Mihai G. Netea, et Niels P. Riksen. 2020. « Aldosterone Induces Trained Immunity: The Role of Fatty Acid Synthesis ». *Cardiovascular Research* 116 (2): 317-28. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz137>.
- Heijden, Charlotte D. C. C. van der, Marlies P. Noz, Leo A. B. Joosten, Mihai G. Netea, Niels P. Riksen, et Samuel T. Keating. 2018. « Epigenetics and Trained Immunity ». *Antioxidants & Redox Signaling* 29 (11): 1023-40. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7310>.
- Heremans, H., A. Billiau, J. J. Cassiman, J. C. Mulier, et P. de Somer. 1978. « In Vitro Cultivation of Human Tumor Tissues II. Morphological and Virological Characterization of Three Cell Lines ». *Oncology* 35 (6): 246-52. <https://doi.org/10.1159/000225298>.
- Ifrim, Daniela C., Jessica Quintin, Leo A. B. Joosten, Cor Jacobs, Trees Jansen, Liesbeth Jacobs, Neil A. R. Gow, David L. Williams, Jos W. M. van der Meer, et Mihai G. Netea. 2014. « Trained Immunity or Tolerance: Opposing Functional Programs Induced in Human Monocytes after Engagement of Various Pattern Recognition Receptors ». *Clinical and Vaccine Immunology: CVI* 21 (4): 534-45. <https://doi.org/10.1128/CVI.00688-13>.
- « Infections nosocomiales | Inserm - La science pour la santé ». s. d. Consulté le 2 juin 2021. <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/infections-nosocomiales>.
- 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: 85. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00085>.
- Koutsoumanis, Kostas, Ana Allende, Avelino Alvarez-Ordóñez, Declan Bolton, Sara Bover-Cid, Marianne Chemaly, Robert Davies, et al. 2020. « Update of the List of QPS-Recommended Biological Agents Intentionally Added to Food or Feed as Notified to EFSA 12: Suitability of Taxonomic Units Notified to EFSA until March 2020 ». *EFSA Journal* 18 (7): e06174. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6174>.
- Kurtz, Joachim. 2005. « Specific Memory within Innate Immune Systems ». *Trends in Immunology* 26 (4): 186-92. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.02.001>.

- Kurtz, Joachim, et Karoline Franz. 2003. « Innate Defence: Evidence for Memory in Invertebrate Immunity ». *Nature* 425 (6953): 37-38. <https://doi.org/10.1038/425037a>.
- Laroute, Valérie, Hélène Tormo, Christel Couderc, Muriel Mercier-Bonin, Pascal Le Bourgeois, Muriel Cocaïgn-Bousquet, et Marie-Line Daveran-Mingot. 2017. « From Genome to Phenotype: An Integrative Approach to Evaluate the Biodiversity of *Lactococcus Lactis* ». *Microorganisms* 5 (2): 27. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5020027>.
- Li, Min, Ze-hu Liu, Qing Chen, Wu-qing Zhou, Mei-wen Yu, Gui-xia Lü, Xue-lian Lü, Yong-nian Shen, Wei-da Liu, et Shao-xi Wu. 2009. « Insoluble Beta-Glucan from the Cell Wall of *Candida Albicans* Induces Immune Responses of Human THP-1 Monocytes through Dectin-1 ». *Chinese Medical Journal* 122 (5): 496-501.
- Lima Leite, Elma, Arthur Gautron, Martine Deplanche, Aurélie Nicolas, Jordane Ossemond, Minh-Thu Nguyen, Fillipe L. R. do Carmo, et al. 2020. « Involvement of Caspase-1 in Inflammasomes Activation and Bacterial Clearance in *S. Aureus*-Infected Osteoblast-like MG-63 Cells ». *Cellular Microbiology* 22 (8): e13204. <https://doi.org/10.1111/cmi.13204>.
- Luerce, Tessalia Diniz, Ana Cristina Gomes-Santos, Clarissa Santos Rocha, Thais Garcias Moreira, Déborah Nogueira Cruz, Luísa Lemos, Adna Luciana Sousa, et al. 2014. « Anti-inflammatory effects of *Lactococcus lactis* NCDO 2118 during the remission period of chemically induced colitis ». *Gut Pathogens* 6 (juillet): 33. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-6-33>.
- Malik, A. C., G. W. Reinbold, et E. R. Vedamuthu. 1968. « An Evaluation of the Taxonomy of *Propionibacterium* ». *Canadian Journal of Microbiology* 14 (11): 1185-91. <https://doi.org/10.1139/m68-199>.
- Mulder, Willem J. M., Jordi Ochando, Leo A. B. Joosten, Zahi A. Fayad, et Mihai G. Netea. 2019. « Therapeutic Targeting of Trained Immunity ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 18 (7): 553-66. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0025-4>.
- Musso, Nicolò, Giuseppe Caruso, Dafne Bongiorno, Margherita Grasso, Dalida A. Bivona, Floriana Campanile, Filippo Caraci, et Stefania Stefani. 2021. « Different Modulatory Effects of Four Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Clones on MG-63 Osteoblast-Like Cells ». *Biomolecules* 11 (1): 72. <https://doi.org/10.3390/biom11010072>.
- Nair, Divek V. T., et Anup Kollanoor Johny. 2018. « Characterizing the Antimicrobial Function of a Dairy-Originated Probiotic, *Propionibacterium Freudenreichii*, Against Multidrug-Resistant *Salmonella Enterica* Serovar Heidelberg in Turkey Poults ». *Frontiers in Microbiology* 9: 1475. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01475>.
- Netea, Mihai G., Jessica Quintin, et Jos W. M. van der Meer. 2011. « Trained Immunity: A Memory for Innate Host Defense ». *Cell Host & Microbe* 9 (5): 355-61. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.04.006>.
- Owen, Thomas A., Dianne Robert Soprano, et Kenneth J. Soprano. 1989. « Analysis of the Growth Factor Requirements for Stimulation of WI-38 Cells after Extended Periods of Density-

Dependent Growth Arrest ». *Journal of Cellular Physiology* 139 (2): 424-31. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041390227>.

Ponzetti, Marco, et Nadia Rucci. 2019. « Updates on Osteoimmunology: What's New on the Cross-Talk Between Bone and Immune System ». *Frontiers in Endocrinology* 10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00236>.

Rabah, Houem, Stéphanie Ferret-Bernard, Song Huang, Laurence Le Normand, Fabien J. Cousin, Floriane Gaucher, Romain Jeantet, Gaëlle Boudry, et Gwénaél Jan. 2018. « The Cheese Matrix Modulates the Immunomodulatory Properties of Propionibacterium Freudenreichii CIRM-BIA 129 in Healthy Piglets ». *Frontiers in Microbiology* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02584>.

Ricci, Antonia, Ana Allende, Declan Bolton, Marianne Chemaly, Robert Davies, Rosina Girones, Konstantinos Koutsoumanis, et al. 2018. « Update of the List of QPS-Recommended Biological Agents Intentionally Added to Food or Feed as Notified to EFSA 7: Suitability of Taxonomic Units Notified to EFSA until September 2017 ». *EFSA Journal* 16 (1): e05131. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5131>.

Song, Adelene Ai-Lian, Lionel L. A. In, Swee Hua Erin Lim, et Raha Abdul Rahim. 2017. « A Review on Lactococcus Lactis: From Food to Factory ». *Microbial Cell Factories* 16 (1): 55. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0669-x>.

« Staphylocoque : informations et traitements - Institut Pasteur ». s. d. Consulté le 2 juin 2021. <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/staphylocoque>.

Stracquadano, Stefano, Nicolò Musso, Angelita Costantino, Lorenzo Mattia Lazzaro, Stefania Stefani, et Dafne Bongiorno. 2021. « Staphylococcus aureus Internalization in Osteoblast Cells: Mechanisms, Interactions and Biochemical Processes. What Did We Learn from Experimental Models? » *Pathogens* 10 (2): 239. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020239>.

Torre, Cédric, Landry Laure Tsoumtsas, et Éric Ghigo. 2017. « La mémoire immunitaire entraînée chez les invertébrés: Que sait-on? » *médecine/sciences* 33 (11): 979-83. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173311015>.

Tuijl, Julia van, Leo A. B. Joosten, Mihai G. Netea, Siroon Bekkering, et Niels P. Riksen. 2019. « Immunometabolism Orchestrates Training of Innate Immunity in Atherosclerosis ». *Cardiovascular Research* 115 (9): 1416-24. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz107>.

Urish, Kenneth L., et James E. Cassat. 2020. « Staphylococcus Aureus Osteomyelitis: Bone, Bugs, and Surgery ». *Infection and Immunity* 88 (7). <https://doi.org/10.1128/IAI.00932-19>.

Williams, David L., Henry A. Pretus, Rose B. McNamee, Ernest L. Jones, Harry E. Ensley, I. William Browder, et Nicholas R. Di Luzio. 1991. « Development, Physicochemical Characterization and Preclinical Efficacy Evaluation of a Water Soluble Glucan Sulfate Derived from

Saccharomyces Cerevisiae ». *Immunopharmacology* 22 (3): 139-56.
[https://doi.org/10.1016/0162-3109\(91\)90039-2](https://doi.org/10.1016/0162-3109(91)90039-2).

- Wong Fok Lung, Tania, Ian R. Monk, Karen P. Acker, Andre Mu, Nancy Wang, Sebastián A. Riquelme, Silvia Pires, et al. 2020. « Staphylococcus Aureus Small Colony Variants Impair Host Immunity by Activating Host Cell Glycolysis and Inducing Necroptosis ». *Nature Microbiology* 5 (1): 141-53. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0597-0>.
- Wu, Z., G. Wang, D. Pan, Y. Guo, X. Zeng, Y. Sun, et J. Cao. 2016. « Inflammation-Related pro-Apoptotic Activity of Exopolysaccharides Isolated from Lactococcus Lactis Subsp. Lactis ». *Beneficial Microbes* 7 (5): 761-68. <https://doi.org/10.3920/BM2015.0192>.
- Zhong, Chao, Xiaofeng Yang, Yulin Feng, et Jun Yu. 2020. « Trained Immunity: An Underlying Driver of Inflammatory Atherosclerosis ». *Frontiers in Immunology* 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00284>.
- Zurita-Turk, Meritxell, Silvina Del Carmen, Ana C. G. Santos, Vanessa B. Pereira, Denise C. Cara, Sophie Y. Leclercq, Alejandra dM de LeBlanc, et al. 2014. « Lactococcus Lactis Carrying the PValac DNA Expression Vector Coding for IL-10 Reduces Inflammation in a Murine Model of Experimental Colitis ». *BMC Biotechnology* 14 (août): 73. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-73>.

Résumé

Staphylococcus aureus est une bactérie Gram positive responsable de diverses infections. L'immunité entraînée est la capacité des cellules de l'hôte à produire des cytokines pro-inflammatoires de manière exacerbée après une exposition à un inducteur suivi d'une exposition à un stimulus de la réponse immunitaire (bactérie pathogène, LPS). L'observation de l'état entraîné des cellules consiste à suivre des marqueurs métaboliques et épigénétiques ainsi qu'à quantifier les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6. L'objectif de ce travail est d'étudier le développement de l'immunité entraînée induit par les bactéries alimentaires chez les cellules humaines non immunitaires ostéoblastes-like MG-63. Nous avons commencé par mettre en place notre modèle d'étude. Nous avons déterminé les paramètres de croissance des cellules MG-63 et la composition du milieu de culture. Nous avons démontré par la suite que les cellules MG-63 sont capables de développer l'immunité entraînée avec l'inducteur MDP. Suite à cela nous avons vérifié la capacité de *Lactococcus lactis* MG1363 et *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 129 à induire l'immunité entraînée chez les cellules MG-63 exposées à *S. aureus* MW2. Les résultats de cette étude suggèrent qu'une exposition à *L. lactis* MG1363 est capable d'entraîner les cellules MG-63 alors que *P. freudenreichii* CIRM-BIA ne semble pas en être capable dans les conditions testées dans nos expériences.

Mots-clés : *Staphylococcus aureus*, immunité entraînée, IL-6, cellules ostéoblaste-like MG-63, *Lactococcus lactis* MG1363, *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 129.

Staphylococcus aureus is Gram positive bacterium responsible for a wide range of infection such as osteomyelitis. Trained immunity is the capability of the host's cells that are challenged by a pathogen or LPS to produce an exacerbated amount of pro-inflammatory cytokines after an exposition to an inducer of trained immunity. The ways to observe trained immunity consist in monitoring metabolic and epigenetics markers and also by quantifying pro-inflammatory cytokines such as IL-6. We started by setting up our study model. We determined MG-63 cells growth parameters and the growth medium composition. We demonstrated that MG-63 cells can develop trained immunity with the inducer MDP. Following this, we investigated the capacities of *Lactococcus lactis* MG1363 and *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 129 to induce trained immunity in MG-63 cells exposed to *S. aureus* MW2. Our findings suggest that *L. lactis* MG1363 can train MG-63 whereas *P. freudenreichii* CIRM-BIA 129 can't under our test conditions

Keywords: *Staphylococcus aureus*, trained immunity, IL-6, osteoblast-like MG-63 cells, *Lactococcus lactis* MG1363, *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 129.