



HAL
open science

Rôle et mode d'action des vésicules extracellulaires produites par *Staphylococcus aureus* sur les cellules de l'hôte

Mathilde Lecot

► To cite this version:

Mathilde Lecot. Rôle et mode d'action des vésicules extracellulaires produites par *Staphylococcus aureus* sur les cellules de l'hôte. Microbiologie et Parasitologie. 2022. hal-03781479

HAL Id: hal-03781479

<https://hal.inrae.fr/hal-03781479>

Submitted on 20 Sep 2022

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



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



Université de Bretagne Occidentale
UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE
(U.F.R. des Sciences)

MASTER SCIENCES, TECHNOLOGIES, SANTÉ
Mention MICROBIOLOGIE
Parcours : Microbiologie Fondamentale et Appliquée
2020-2021

Rôle et mode d'action des vésicules extracellulaires produites par *Staphylococcus aureus* sur les cellules de l'hôte

Mémoire présenté le 20 Juin 2022
Par Mathilde LECOT
Maitre de stage : Monsieur Éric GUEDON

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





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



Université de Bretagne Occidentale
UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE
(U.F.R. des Sciences)

MASTER SCIENCES, TECHNOLOGIES, SANTÉ
Mention MICROBIOLOGIE
Parcours : Microbiologie Fondamentale et Appliquée
2020-2021

**Rôle et mode d'action des vésicules extracellulaires produites
par *Staphylococcus aureus* sur les cellules de l'hôte**

Mémoire présenté le 20 Juin 2022
Par Mathilde LECOT
Maitre de stage : Monsieur Éric GUEDON

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



Ce stage est effectué dans le cadre de la 2ème année de Master Microbiologie Fondamentale et Appliquée en collaboration avec l'Université de Bretagne Occidentale au cours de l'année universitaire 2021/2022. Le mémoire s'intitule « Rôle et mode d'action des vésicules extracellulaires produites par *Staphylococcus aureus* sur les cellules de l'hôte ». Le stage est effectué par Mathilde Lécot et il est encadré par Monsieur Éric Guédon. Il est effectué au Laboratoire de l'UMR 1253 STLO, « Science et technologie du lait et de l'oeuf », INRAE, l'Institut Agro, Agrocampus Ouest, 65 Rue de Saint-Brieuc, 35000 Rennes, du 3 janvier 2022 au 8 juillet 2022

Remerciement

Je tiens tout d'abord à remercier, Yves LE LOIR, directeur de l'UMR 1253 Science et Technologie du Lait et de l'œuf pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et pour m'avoir permis de réaliser ce stage.

J'aimerais tout particulièrement remercier mon maître de stage Monsieur Éric GUEDON pour le temps, l'aide et tous les conseils qu'il m'a consacré tout au long de ce projet.

Je remercie Brenda DA LUZ pour m'avoir formé sur les différents protocoles concernant les EVs et ses nombreux conseils.

Je voudrais aussi remercier Nathalie DANIEL, pour m'avoir formée sur la culture cellulaire ainsi que toute son aide, sa gentillesse et ses conseils qui m'ont beaucoup aidé pour réaliser la mise en place de mon projet.

Je remercie également Nadejda BERKOVA pour son temps et ses connaissances en cytométrie en flux ainsi que Jordane OSSEMOND et Yann LE-GOUAR pour leur aide et les belles images obtenus en microscopie confocale.

Enfin, Je remercie l'ensemble de l'équipe MICROBIO pour leur accueil au sein du laboratoire, leurs gentillesse, ainsi que toutes les autres équipes travaillant au sein du STLO. Merci également à mes collègues stagiaires pour le soutien et les moments conviviaux que l'on a passés ensemble.

Table des matières

Introduction.....	1
1. <i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.1. Généralités.....	1
1.2. Facteurs de virulence	1
2. Vésicules extracellulaires (EVs).....	2
2.1. Généralités.....	2
2.2. Rôles biologiques des vésicules de <i>Staphylococcus aureus</i>	4
3. Interaction des EVs de <i>S. aureus</i> avec les cellules de l'hôte.....	6
3.1. Interaction avec les cellules de l'hôte.....	6
3.2. Utilisation d'inhibiteurs	7
Matériel et méthodes.....	10
1. Souche bactérienne et conditions de croissance	10
2. Lignée cellulaire et condition de culture.....	10
3. Isolation et purification des VE de <i>S. aureus</i>	10
3.1. Culture de la souche de <i>Staphylococcus aureus</i> N315.....	10
3.2. Récupération du surnageant.....	10
3.3. Concentration par ultrafiltration et centrifugation.....	11
3.4. Purification.....	11
3.5. Concentration finale des EVs.....	12
4. Détermination de la taille et de la concentration des EVs	12
5. Détermination de la quantité de protéines.....	12
6. SDS PAGE.....	13
7. Cytométrie en flux	14
8. Microscopie confocal à fluorescence	14
9. Test d'inhibition de l'internalisation des EVs dans les cellules de l'hôte.	15
Résultats et discussion	16
1. Production des EV's à partir d'une culture en RPMI + LB.....	16
1.1. Détermination de la taille et de la concentration des EVs.....	16

1.2. Analyses des protéines	17
2. Optimisation des marquages des vésicules extracellulaires	18
3. Optimisation des interactions entre les EVs et les cellules MG-63	19
4. Impact d'inhibiteurs sur l'interaction des EVs avec les cellules MG-63.....	23
Conclusion	27
Bibliographie	28

Table des figures

Figure 1 : Facteurs de virulence sécrétés par <i>S. aureus</i> (d'après Ferry et al., 2009).	2
Figure 2 : Architecture et composition des EVs à Gram négatif et à Gram positif.	3
Figure 3 : Mécanismes d'internalisation des EVs dans les cellules hôtes	6
Figure 4 : Inhibiteurs associées aux différentes voies d'internalisation des EVs dans les cellules de l'hôte. (d'après O'Donoghue and Krachler, 2016).....	8
Figure 5 : Protocole d'isolation et purification des EVs en milieu RPMI + 10% de glucose.....	11
Figure 6 : Protocole d'utilisation du Qubit et du Kit Qubit Protein Assay fourni par Invitrogen.	13
Tableau 1 : Listes des inhibiteurs utilisés, leur milieu de dissolution et leurs concentrations finales...	15
Figure 7 : Résultats obtenus après analyse au NTA (nanoparticle tracking analysis).	16
Figure 8 : SDS-PAGE (12%) montrant le profil protéique de la souche N315 de <i>S. aureus</i> . Les tests sont réalisés en triplicata (R1, R2, R3). MW : Marqueur de tailles (kDa).	17
Figure 9 : Essais de marquages des EVs avec les différents marqueurs de membrane (DiI, DiO, FM4-64) par microscopie confocale.	18
Figure 10 : Observation en microscopie confocale des cellules MG-63 marquées au Hoesch et à la phalloïdine-488, en présence du marqueur DiI.	19
Figure 12 : Interactions des EVs avec les cellules MG-63 pendant une gamme de temps allant de 30 minutes à 17h.	21
Figure 13 : Observation des interactions entre les cellules MG-63 et les EVs en microscopie confocale.	22
Figure 14 : Observation en microscopie confocale de l'interaction cellules/EVs*.	23
Figure 15 : Interactions des EVs avec les cellules MG-63 en présence des différents inhibiteurs.	24
Figure 16 : Interactions des EVs avec les cellules MG-63 en présence des différents inhibiteurs.	25

Liste des abréviations

Agr : accessory gene regulator (Régulateur de gènes accessoires)

ASC : Apoptosis associated speck-like protein containing a CARD

BHI : Brain Heart Infusion (Infusion cœur-cerveau)

DMEM : Milieu Eagle modifié Dulbecco

DMSO : Diméthylsulfoxyde

Eap : Protéine d'adhésion extracellulaire)

Efb : Protéine de liaison au fibrinogène extracellulaire

Emp : Protéine de liaison à la matrice extracellulaire

EVs : Vésicules extracellulaires

Ig : immunoglobulines.

IL : Interleukine

LPS : Lipopolysaccharide

MSCRAMMs : composant de surface microbienne reconnaissant les molécules de la matrice adhésive

MVs : Vésicules membranaires

M β CD : méthyl- β -cyclodextrine

NF-KB : Nuclear factor-kappa B

NTA : Nanoparticle tracking analysis

OMVs : Vésicules de la membrane externe

PBS : Tampon phosphate salin

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

SEA : Staphylococcal enterotoxin A

SERAMs : molécules adhésives sécrétables à répertoire élargi

TBS : Tampon Tris-Salin

TLR2 : Toll-Like Receptor 2

TSST-1: Toxic-shock -syndrome-toxin-1;

Introduction

1. Staphylococcus aureus

1.1. Généralités

Staphylococcus aureus (*S. aureus*), une bactérie à Gram positif, est à la fois une bactérie commensale et un pathogène opportuniste de l'homme et des animaux. Elle fait partie de la flore cutanée naturelle et elle colonise habituellement les voies nasales humaines sans provoquer de maladie (Kwiecinski and Horswill, 2020). Cependant, *S. aureus* est aussi responsable d'un large spectre d'infections aiguës et chroniques, qui peuvent être suppuratives ou invasives, et toucher divers tissus (Tong *et al.*, 2015). En outre, elle est de plus en plus fréquemment retrouvée dans les infections communautaires (peau, tissus mous ...) et nosocomiales (endocardites infectieuses, pneumonie staphylococcique...) (Tong *et al.*, 2015). Les infections à *S. aureus* sont problématiques de par leur résistance fréquente à de nombreux antibiotiques parmi lesquels on retrouve les infections à *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) qui est devenue un agent pathogène nosocomial majeur dans de nombreux hôpitaux du monde. Par ailleurs, depuis quelques années, des infections causées par les SARM sont retrouvées en dehors des centres hospitaliers ainsi que chez le bétail (Stefani *et al.*, 2012). Chez les ruminants, *S. aureus* constitue la principale cause infectieuse des mammites (inflammation de la mamelle) chez les bovins. Les traitements antibiotiques contre la mammite à *S. aureus* étant généralement inefficaces, cette infection entraîne une grande perte économique dans la production laitière (Le Maréchal *et al.*, 2011).

1.2. Facteurs de virulence

Les infections et les pathologies qui sont causées par *S. aureus* vont dépendre de facteurs de virulence produits spécifiquement par les différentes souches (Gill *et al.*, 2011). Les facteurs de virulence sont en effet responsables d'un affaiblissement de la réponse immunitaire de l'hôte, entraînant l'évasion immunitaire, l'apparition des infections et la pathogénicité (Luz *et al.*, 2021a). Parmi ces facteurs de virulence, nous retrouvons notamment des protéines de surface, qui vont être impliquées dans les processus d'adhésion, de colonisation et d'évasion de la réponse immunitaire de l'hôte, et des facteurs sécrétés qui vont inactiver les mécanismes de défense de l'hôte et contribuer à la dissémination et à l'invasion (Ferry *et al.*, 2009); (Dunman *et al.*, 2001). On observe donc tout d'abord la synthèse des

protéines de surfaces en début de croissance de la bactérie qui sera par la suite réprimée pour laisser place à la synthèse des protéines sécrétées telles que les toxines en début de phase stationnaire de croissance. La régulation des facteurs de virulence dépendant de la croissance bactérienne est médiée par le système du quorum sensing agr (Gordon and Lowy, 2008) (Figure 1).

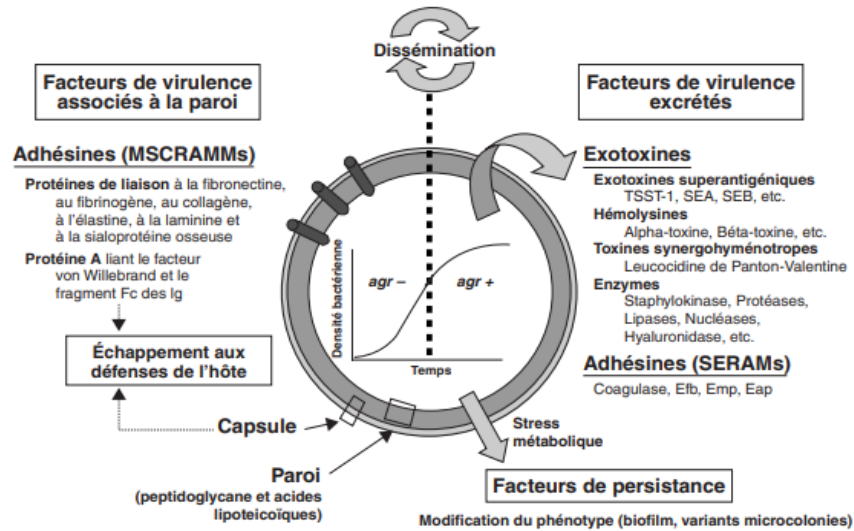


Figure 1 : Facteurs de virulence sécrétés par *S. aureus* (d'après Ferry et al., 2009). MSCRAMMs : composant de surface microbienne reconnaissant les molécules de la matrice adhésive; Ig : immunoglobulines ; TSST-1: toxic-shock -syndrome-toxin-1; SEA : staphylococcal enterotoxin A, SERAMs : molécules adhésives sécrétables à répertoire élargi ; Efb : protéine de liaison au fibrinogène extracellulaire; Emp : protéine de liaison à la matrice extracellulaire; Eap : protéine d'adhésion extracellulaire.

Depuis quelques années, un intérêt croissant pour l'étude des vésicules extracellulaires (EVs) sécrétés par *S. aureus* en lien avec la pathogenèse de cette bactérie est observé. En effet, de récentes études indiquent que les EVs sont porteuses de différents facteurs, depuis des facteurs de survie à des facteurs de virulence, tels que les β -lactamases, les toxines et les protéines impliquées dans l'adhésion aux cellules hôtes (Tartaglia et al., 2018).

2. Vésicules extracellulaires (EVs)

2.1. Généralités

Les EVs sont des particules nanométriques, de 20 à 300 nm de diamètre, possédant une bicouche lipidique. Elles sont produites au cours de la croissance chez les eucaryotes, les archées et les bactéries principalement par bourgeonnement des membranes cellulaires. Chez les bactéries à Gram négatif, les vésicules sont synthétisées à partir de la membrane externe et sont donc souvent appelées OMVs (Outer

Membrane Vesicles) (Brown *et al.*, 2015) alors que chez les bactéries à Gram positif, comme *S. aureus*, les vésicules sont synthétisées à partir de la membrane cytoplasmique et sont souvent nommées MVs (Membrane Vesicles) ou EVs (Extracellular Vesicles) (Figure 2) (MacDonald and Kuehn, 2012).

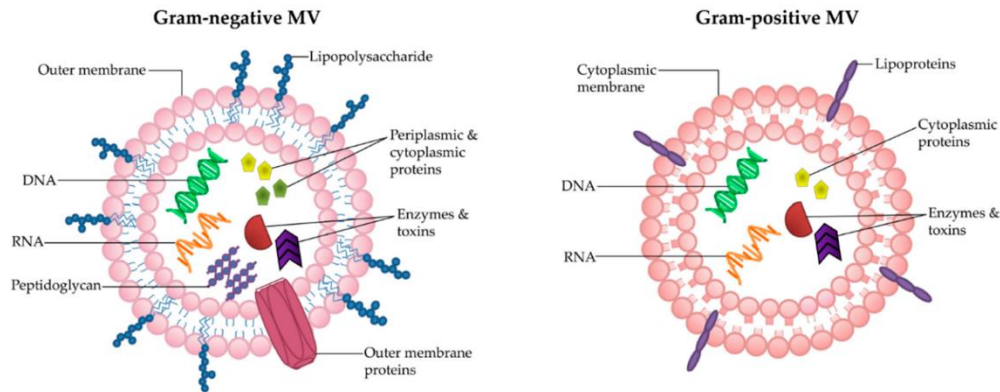


Figure 2 : Architecture et composition des EVs à Gram négatif et à Gram positif. (d'après Bitto and Kaparakis-Liaskos, 2017)

Lors de leur synthèse, ces vésicules peuvent encapsuler diverses molécules telles que des macromolécules, des acides nucléiques, des protéines, des lipides et de petits métabolites. Les EVs sont aujourd'hui reconnu comme d'importants véhicules de communication cellulaire intra- et inter-espèces (Luz *et al.*, 2021b). En raison des différences dans l'architecture des vésicules qu'elles soient de bactéries à Gram positif ou à Gram négatif, il existe quelques différences en ce qui concerne leur composition (Figure 2) (Bitto and Kaparakis-Liaskos, 2017) et (Luz *et al.*, 2021b)). Les vésicules des bactéries à Gram négatif vont contenir du peptidoglycane, des enzymes, des toxines, des protéines cytoplasmiques et périplasmiques, de l'ADN et de l'ARN, ainsi que du LPS et des protéines de la membrane externe. Les vésicules des bactéries à Gram positif, vont quant à elles, contenir des lipoprotéines, des protéines cytoplasmiques, des enzymes, des toxines, de l'ADN et de l'ARN.

Les EVs de *S. aureus* contiennent de 100 à 300 protéines selon les études (cytoplasmiques, membranaires et intracellulaires) parmi lesquelles on retrouve des protéines liées à la résistance aux antibiotiques, tels que les β -lactamases. Elles vont aussi contenir des facteurs de virulence tels que des superantigènes, des toxines qui vont agir sur la paroi cellulaire de l'hôte, des facteurs de coagulases et des protéines immunomodulatrices (Kim *et al.*, 2015) (Tartaglia *et al.*, 2020). Par ailleurs, les EVs de *S. aureus* contiennent également des ARNs dont des ARNs régulateurs (Luz *et al.*, 2021b).

2.2. Rôles biologiques des vésicules de *Staphylococcus aureus*

Les EVs sont aujourd'hui considérées comme ayant un rôle majeur dans la transmission de signaux régulateurs et dans la communication inter et intra-espèces (Jurkoshek *et al.*, 2016). Elles vont assurer plusieurs fonctions biologiques, selon leur contenu, avec des mécanismes aussi bien offensifs que défensifs, tels que la détection du quorum sensing, la livraison de nutriments et de toxines, la résistance aux antibiotiques, l'élimination des organismes compétitifs ainsi que le transfert de matériel génétique (Transfert horizontal d'ADN et transfert d'ARN régulateurs), lui conférant une activité immunomodulatrice (Luz *et al.*, 2021a) (Tartaglia *et al.*, 2018) (Toyofuku *et al.*, 2019).

2.2.1. Rôle dans la virulence

Comme dit précédemment, les EVs servent de véhicules de livraison pour des facteurs de virulence et des toxines vers des cellules hôtes (Kim *et al.*, 2015). De nombreuses études ont permis d'établir que ces facteurs de virulence favorisent l'invasion, la dissémination à travers les tissus et le développement de diverses maladies (Deatherage and Cookson, 2012).

2.2.1. Rôle dans la cytotoxicité

Les EVs de *S. aureus* peuvent être cytotoxiques et induire la mort cellulaire en délivrant leur contenu en toxines dans la cellule hôte. Chez *S. aureus*, un des facteurs majeur de la virulence est l' α -hémolysine qui peut induire l'apoptose des cellules de l'hôte en formant des pores dans les membranes et en provoquant une invasion cellulaire et une suppression d'une réponse immunitaire (Brown *et al.*, 2015) (Bose *et al.*, 2020). Il a été établi que l' α -hémolysine associé aux EVs est un médiateur clé dans la pathogénèse de la dermatite atopique (maladie cutanée chronique) en induisant une perturbation de la barrière cutanée et une inflammation cutanée (Hong *et al.*, 2014).

2.2.2. Rôle dans la résistance aux antibiotiques

Les EVs de *S. aureus* permettent à d'autres espèces naturellement sensibles à l'ampicilline, de survivre à la présence de cet antibiotique dans son environnement. En effet, l'analyse protéomique des vésicules de cette bactérie a montré la présence d'une β -lactamase, BlaZ, qui va permettre la dégradation des β -lactamines (Lee *et al.*, 2013) (Bose *et al.*, 2020). Il a donc été suggéré que les EVs peuvent conférer, de manière transitoire, une protection aux bactéries sensibles en dégradant l'ampicilline présente dans leur environnement (Liu *et al.*, 2018). Ainsi, on peut voir que les EVs jouent un rôle majeur dans l'établissement de sous-populations résistantes aux antibiotiques par le transfert de facteurs résistants aux antimicrobiens.

2.2.3. Rôle dans le quorum sensing et la formation de biofilms

Des études ont permis d'associer la biogenèse des EVs de *S. aureus* au système de détection du quorum sensing agr avec une production d'EVs qui se produirait à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire (Im *et al.*, 2017). Plusieurs espèces bactériennes utilisent le quorum sensing, avec différents types de molécules de signalisation qui sont détectées par des récepteurs spécifiques, ce qui va permettre l'activation ou l'inactivation des facteurs de virulence ou la formation de biofilms.

Il a été aussi démontré que la production d'EVs aide au développement de biofilms par certaines souches bactériennes (Im *et al.*, 2017). Un biofilm est formé lorsque des bactéries adhèrent à une surface tout en se développant sur celle-ci pour former une communauté. Quand les cellules bactériennes de *S. aureus* vont libérer des vésicules, elles vont convertir les surfaces hydrophobes en surfaces hydrophiles, de par la présence de plusieurs protéines de surfaces sur les EVs qui sont hydrophiles. C'est un élément très favorable pour la formation d'un biofilm par cette bactérie, cela va ainsi lui conférer une meilleure résistance dans un environnement difficile (Baumgarten *et al.*, 2012). Cette conversion des propriétés de surface permet de conférer un avantage pour *S. aureus* par rapport aux autres souches, ce qui va réduire la capacité de ces souches à se lier et à former eux-mêmes des biofilms. Cela pourrait alors expliquer la prédominance de la bactérie *S. aureus* comme agent pathogène nosocomial très répandu dans le monde.

2.2.4. Rôle dans l'immunomodulation

Diverses études ont également démontré le rôle des EVs de *S. aureus* sur l'immunomodulation par activation de l'inflammasome. Pour cela, les lipoprotéines membranaires de *S. aureus* stimulent un récepteur de type TLR2 (Toll like receptor) qui reconnaît les lipoprotéines, entraînant une production de pro-IL-1 β et de pro-IL-18 (les formes précurseurs inactives de l'IL-1 β et IL-18) via la signalisation du facteur nucléaire NF-KB. Les EVs peuvent également activer l'inflammasome par un efflux de K⁺ et le recrutement d'une protéine de type speck-like associée à l'apoptose (ASC) qui va permettre l'activation de la caspase-1. Cette activation va permettre la libération des formes matures des cytokines IL-1 β et IL-18 qui vont permettre de recruter d'autres cellules inflammatoires pour combattre les pathogènes bactériens. Les EVs de *S. aureus* peuvent donc interagir avec les cellules de l'hôte et moduler leur réponse immunitaire ce qui suggère que les EVs peuvent jouer un rôle important dans la pathogénèse de *S. aureus* (Luz *et al.*, 2021a) (Wang *et al.*, 2020) (Ellis and Kuehn, 2010).

3. Interaction des EVs de *S. aureus* avec les cellules de l'hôte

3.1. Interaction avec les cellules de l'hôte

Les EVs peuvent agir de manière extracellulaire par le biais d'interactions ligand-récepteur déclenchant ainsi une signalisation cellulaire (eg lipoprotéine, TLR2 et la voie de signalisation NF-KB) ou de manière intracellulaire après leur internalisation dans les cellules cibles et la libération de la cargaison. Les EVs peuvent ainsi affecter la réponse et la physiologie des cellules de l'hôte et donc jouer un rôle essentiel dans la colonisation, dans l'adhésion, dans la transmission de facteurs de virulence, dans la cytotoxicité et dans l'atténuation de la réponse immunitaire des cellules de l'hôte (Bose *et al.*, 2020).

Divers mécanismes sont proposés pour l'internalisation des EVs dans les cellules dont l'endocytose médiée par la clathrine, l'endocytose médiée par la cavéoline, l'endocytose médiée par le radeau lipidique, la phagocytose, la macropinocytose et la fusion membranaire (Figure 3) (Mulcahy *et al.*, 2014). Tous ces mécanismes vont conduire par la suite à une libération intracellulaire de leur cargaison.

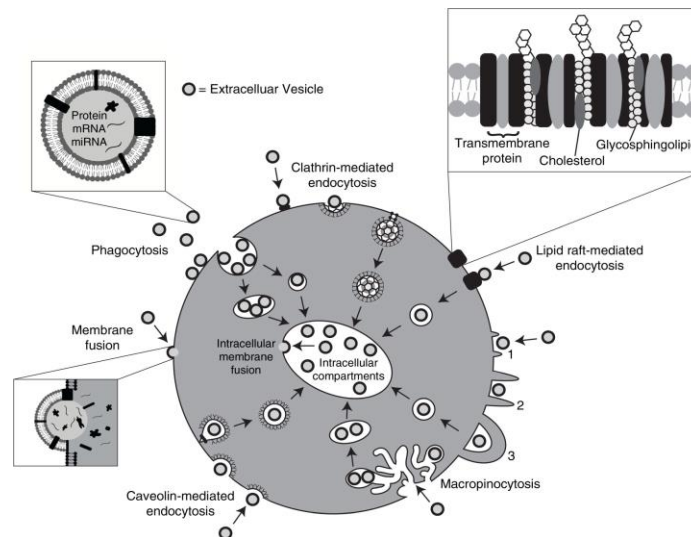


Figure 3 : Mécanismes d'internalisation des EVs dans les cellules hôtes (d'après Mulcahy *et al.*, 2014)

Majoritairement, l'internalisation des EVs dans les cellules de l'hôte se fait via l'endocytose qui correspond à un processus d'invagination de la membrane cellulaire. L'une de ces voies endocytaires, l'endocytose dépendante de la clathrine, implique l'internalisation cellulaire par le biais d'un assemblage de protéines clathrines qui vont recouvrir les EVs (Caruana and Walper, 2020). Associé aux protéines clathrine, on retrouve la protéine dynamine qui joue un rôle important dans la fission membranaire une

fois que les clathrines ont recouvert la vésicule ce qui va permettre la libération des vésicules enveloppées de clathrine dans le milieu cellulaire (Mulcahy *et al.*, 2014), (Anand and Chaudhuri, 2016).

L'endocytose médiée par la protéine cavéoline implique des microdomaines membranaires riches en cavéoline, en cholestérol et en glycosphingolipides ce qui va entraîner la formation d'invaginations membranaires appelées cavéoles qui restent intégrées à la membrane contrairement à l'endocytose dépendante de la clathrine. La dynamine va aussi jouer un rôle dans cette voie endocyttaire en permettant le détachement des vésicules pour ensuite les diriger vers le compartiment intracellulaire (Caruana and Walper, 2020), (Ni *et al.*, 2020). Une autre catégorie de mécanisme endocyttaire existe, il s'agit des radeaux lipidiques. Ce sont des microdomaines dans la membrane plasmique qui sont riches en cholestérol et en glycosphingolipides ce qui leur confère une plus grande rigidité et des mouvements limités par rapport à la membrane plasmique. Ils agissent comme des plateformes pour l'assemblage des molécules de signalisation et la transduction de signaux. Ces radeaux lipidiques sont aussi le site d'internalisation de différentes molécules et ils participent à l'endocytose des vésicules (Caruana and Walper, 2020). Les autres mécanismes tels que la macropinocytose, la phagocytose et la fusion membranaire sont d'autres mécanismes impliqués dans l'internalisation des EVs par la cellule hôte. La fusion membranaire repose sur la fusion directe entre la membrane des EVs et la membrane plasmique de la cellule hôte. Lors de la macropinocytose, une protubérance qui se forme par polymérisation d'anneaux d'actine va recouvrir et enfermer les EVs dans une cavité appelée macropinosomes qui sera ensuite dirigé vers le compartiment intracellulaire.

3.2. Utilisation d'inhibiteurs

Dans ce rapport, nous évaluerons la capacité des cellules eucaryotes à internaliser des EVs produites par *S. aureus* N315 et le cas échéant, déterminerons les voies d'internalisation via l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de certaines voies (Figure 4). Parmi ces inhibiteurs, nous nous intéresserons plus particulièrement au dynasore, à la chlorpromazine, au méthyl- β -cyclodextrine (M β CD), à la nystatine, à la cytochalasine D ainsi qu'à l'amiloride (non représenté dans la Figure 4).

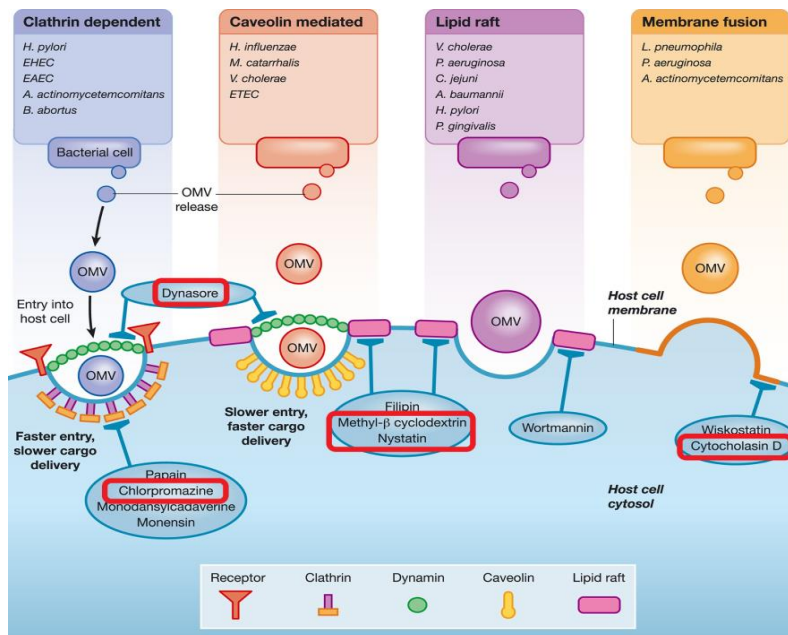


Figure 4 : Inhibiteurs associées aux différentes voies d’internalisation des EVs dans les cellules de l’hôte. (d’après O’Donoghue and Krachler, 2016)

L’endocytose dépendante de la clathrine est le plus généralement inhibée à l’aide de la chlorpromazine et du dynasore. La chlorpromazine va agir au niveau des clathrines en empêchant leur formation en enveloppe autour des EVs (O’Donoghue and Krachler, 2016), (Vercauteren et al., 2010). Le dynasore bloque la dynamine, ce qui entraîne un blocage de l’internalisation des EVs par inhibition de la scission de la vésicule formée, avec la membrane de la cellule (Mulcahy et al., 2014), (O’Donoghue and Krachler, 2016), (Vercauteren et al., 2010).

Le méthyl-β-cyclodextrine (MβCD) et la nystatine, en raison de leur capacité à séquestrer le cholestérol, vont agir au niveau de l’endocytose dépendante de la cavéoline et des radeaux lipidiques. MβCD est un oligomère cyclique qui va inhiber les voies endocytaires qui dépendent des microdomaines riches en cholestérol en l’extrayant de la membrane et en le séquestrant (Danthi and Chow, 2004). La nystatine va également permettre la séquestration du cholestérol ce qui va perturber l’endocytose médiée par les radeaux lipidiques au niveau des microdomaines riches en cholestérol (Cañas *et al.*, 2016), (Bajic *et al.*, 2020).

Deux autres molécules, l’amiloride et la cytochalasine D, ciblant la macropinocytose, un mécanisme d’invagination de la membrane cellulaire médiée par les filaments d’actine, seront également utilisées. La cytochalasine D inhibe directement la polymérisation de l’actine (Bomberger *et al.*, 2009).

L'amiloride joue un rôle indirect dans l'assemblage de l'actine en inhibant l'échange sodium/proton qui est impliqué dans la régulation du pH cellulaire. Une diminution du pH va entraîner une diminution de l'assemblage des filaments d'actine nécessaire à la macrocytose.

L'objectif de nos recherches est d'approfondir les mécanismes moléculaires qui sont responsables des diverses activités des vésicules extracellulaires produites par *S. aureus* et leur mode d'action, *in vitro*, ce qui permettra d'évaluer leurs rôles et leur contribution dans la virulence de la bactérie. Pour cela nous utiliserons la microscopie confocale et la cytométrie en flux afin de visualiser les interactions des EVs avec les cellules de l'hôte, en variant les conditions expérimentales (temps d'interaction, concentration des vésicules etc.). Nous évaluerons, de même, la capacité des cellules eucaryotes à internaliser des EVs produites par *S. aureus* N315 et le cas échéant, détermineront les voies d'internalisation via l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de certaines voies.

Matériel et méthodes

1. Souche bactérienne et conditions de croissance

La souche de *Staphylococcus aureus* étudiée lors de ce travail est la souche N315 qui est une souche résistante à la méthicilline (SARM) isolée en 1982. Elle est cultivée sur gélose avec un milieu BHI (Brain Heart Infusion, composition : Extrait cœur-cerveau, Peptone de gélatine, NaCl, Phosphate disodique, glucose) à 37°C sous agitation. Les précultures et les cultures utilisées par la suite pour nos expériences seront réalisées dans un milieu contenant du RPMI (Milieu RPMI-1640, SIGMA®) et 10% de glucose.

2. Lignée cellulaire et condition de culture

La lignée cellulaire MG-63 ostéoblaste-like utilisée lors de cette étude est issue d'un ostéosarcome humain. Les cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, SIGMA®) complété par 10 % de sérum bovin fœtal et de 1 % de pénicilline/streptomycine. Les cellules seront cultivées dans des plaques 24 puits pour les expériences de cytométrie en flux ou dans une plaque de chambres amovibles Lab-Tek (Lab-Tek™ II Thermo Scientific™) de 4 ou 8 puits pour les expériences avec la microscopie confocale. Du PBS (Phosphate buffered saline, SIGMA®) est utilisé pour les différents lavages ainsi que de la trypsine afin de décoller les cellules des plaques 24 puits afin de pouvoir les utiliser ensuite pour les manipulations par cytométrie en flux.

3. Isolation et purification des VE de *S. aureus*

Les vésicules produites par la bactérie sont isolées à partir de surnageant de culture selon le protocole suivant (Figure 5).

3.1. Culture de la souche de *Staphylococcus aureus* N315

La souche N315 a été pré-inoculée, à partir d'une colonie prélevée sur boîte BHI-agar, dans un milieu RPMI + 10% LB et mise sous agitation à 37°C la journée. La préculture a été inoculée à 0.5% dans 500mL de RPMI + 10% de LB et cultivée pendant la nuit à 37°C sous agitation.

3.2. Récupération du surnageant

La culture bactérienne de la souche N315 est transvasée dans des pots à centrifuger stériles (Beckman coulter) avant, puis elle est centrifugée 15 minutes à 6000g afin de récupérer le surnageant qui contient les EVs. Celui-ci est directement filtré avec un filtre Nalgene de 0,22 µm (Thermo Scientific) dans un

nouveau flacon stérile afin d'éviter de retrouver d'éventuelles cellules bactériennes restantes dans le surnageant et tout autres particules ayant une taille supérieure à celle des pores du filtre.

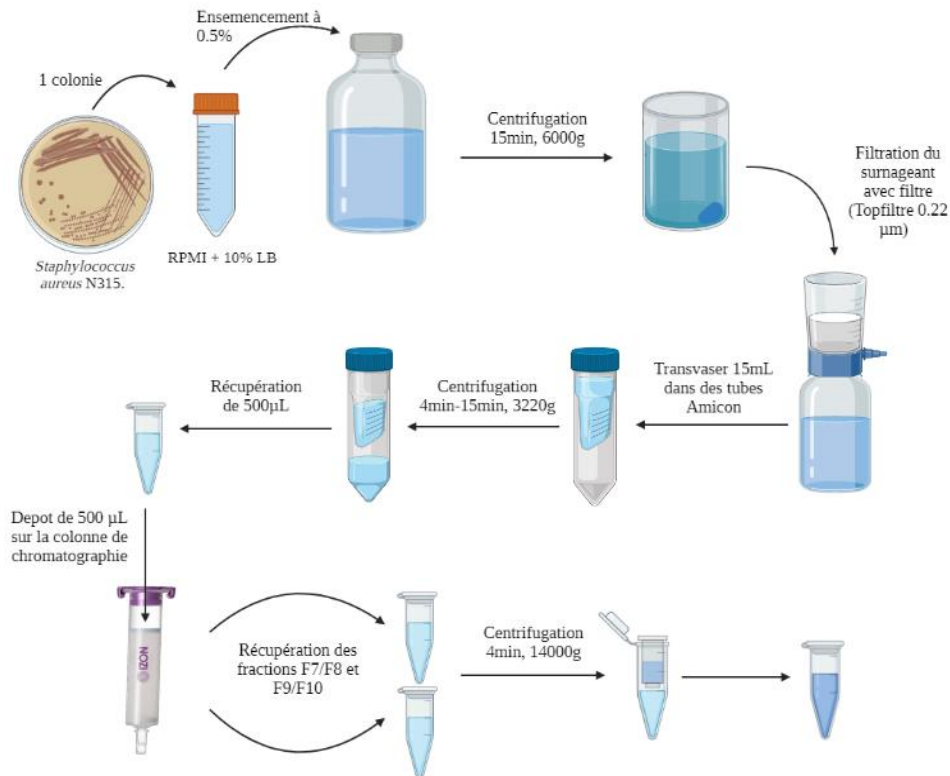


Figure 5 : Protocole d'isolation et purification des EVs en milieu RPMI + 10% de glucose.

3.3. Concentration par ultrafiltration et centrifugation

Les surnageants filtrés sont chargés sur un filtre Amicon Ultra-15 100 KD (Merk Milipore) et centrifugés à 3220g pendant 4 minutes pour commencer et ensuite le temps sera augmenté progressivement de 2 min entre chaque centrifugation. Après chaque centrifugation, on vide la partie inférieure du Falcon Amicon dans un flacon poubelle et on passe ainsi tout notre volume de surnageant. Après avoir passé tout notre volume de surnageant, il faut récupérer au maximum 500 µL de rétentat (partie supérieure du falcon contenant les vésicules extracellulaires) et le déposer dans un tube stérile. Lavage en cascade dans des Falcons Amicon avec 3 mL de TBS 1X (50mM TrisHCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) filtré (Topfibre 0.22µm) afin de récupérer les vésicules restantes puis transvaser la solution de lavage dans le tube avec le rétentat.

3.4. Purification

La suspension concentrée d'EVs qui a été récupérée dans un tampon TBS (Tris Buffered Saline) va être purifiée par chromatographie d'exclusion stérique (qEV original 70 nm; iZON). Tout d'abord la colonne est lavée avec du TBS puis les 500 µL de suspension concentrée en EVs sont déposés au sommet de la

colonne chromatographique, suivis de tampon TBS pour l'élution. Ensuite, on laisse passer 3 mL qui vont correspondre aux fractions 1 à 6 qui ne correspondent pas aux fractions contenant les vésicules. On va donc prélever des fractions de 1mL par la suite dans des tubes séparés qui vont correspondre aux fractions 7/8 et 9/10 qui vont contenir les EVs.

3.5. Concentration finale des Ev's.

Les fractions résultantes (F7/8 et F9/10) qui contiennent les EVs sont regroupées (2 mL) et sont concentrées encore une fois en utilisant un filtre Amicon Ultra-0,5 mL 100 KD (Merk Milipore). Les fractions sont alors centrifugées à 14000g pendant 4 min puis elles vont subir une dernière centrifugation à 1000g pendant 2 min avec le filtre retourné comme indiqué par le fabricant pour récupérer la solution d'EVs. La solution contenant les EVs est conservée à 4°C et servira pour la suite de nos diverses expériences.

4. Détermination de la taille et de la concentration des EVs

Pour évaluer la taille et la concentration des EVs, une analyse de suivi des nanoparticules (NTA, nanoparticle tracking analysis) a été réalisée à l'aide d'un NanoSight NS300 (Malvern Panalytical) équipé d'une caméra sCMOS et d'un laser Blue488 (Nano Sight NS300). Cet appareil permet d'utiliser les propriétés de la lumière et les mouvements browniens pour déterminer la taille et la concentration des EVs qui sont en suspension dans du liquide. Pour cela, les différents échantillons ont été dilués dans du TBS pour obtenir une concentration optimale. Un flux constant va être appliqué avec une vitesse de pompe à seringue de 50, à 25°C. Pour les différentes mesures, des vidéos de 60s sont enregistrées avec un niveau de caméra de 15 et analysées avec le logiciel NTA 3.3 Dev Build. Les autres paramètres sont ajustés en conséquence pour obtenir une optimisation de l'image.

5. Détermination de la quantité de protéines

La concentration en protéines des vésicules est déterminée à l'aide du fluorimètre Qubit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) et du kit Invitrogen Qubit Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) en suivant le protocole du fournisseur (Figure 6). L'appareil va détecter les colorants fluorescents qui vont se lier spécifiquement aux protéines.

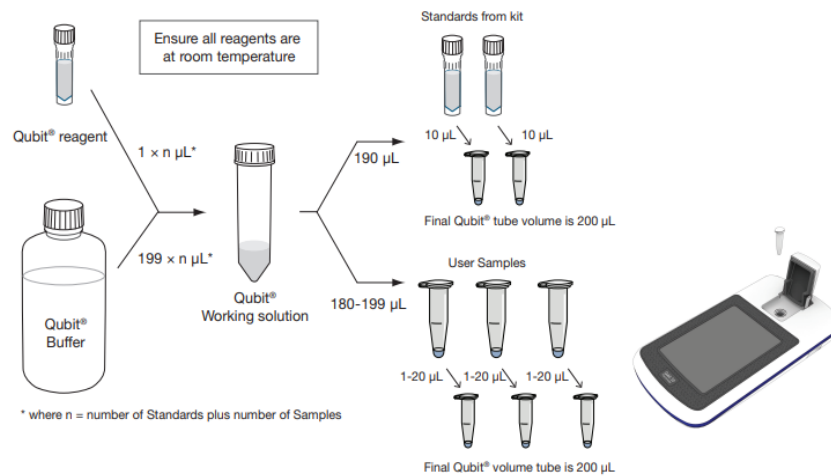


Figure 6 : Protocole d'utilisation du Qubit et du Kit Qubit Protein Assay fourni par Invitrogen.

6. SDS PAGE

Le contenu protéique des fractions contenant les vésicules est étudié par SDS-PAGE selon le protocole Laemmli (Laemmli UK, 1970). Ce procédé va permettre via des gels de polyacrylamide de séparer les protéines en fonction de leurs tailles après avoir été dénaturé pour les rendre linéaires.

Les EVs (5 μL) sont tout d'abord traités pendant 5 min à 100°C avec 5 μL de tampon dénaturant Laemmli (15,14% de Tris, 4% de SDS, 0,6% de DDT, 20% de glycérol, 0,02% de bleu de bromophénol à pH=6,8). En parallèle, les gels supérieurs et inférieurs sont réalisés et polymérisés. Le gel supérieur non-tamisant qui va permettre la concentration des protéines est un gel résolutif à 4% de polyacrylamide alors que le gel inférieur tamisant qui va permettre la séparation des protéines en fonction de leur taille est un gel résolutif à 12% de polyacrylamide.

Les 10 μL d'échantillons (EVs + tampon Laemmli) ainsi que le marqueur de taille sont déposés sur le gel supérieur au niveau des puits. La quantité déposée pour chaque puits est la même, on va déposer 10 μg de protéines pour chaque puits. Pour cela, on utilise l'appareil Qubit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) qui va nous permettre de connaître notre concentration en protéines dans nos échantillons.

La migration est faite à 90 volts durant la phase supérieure puis augmentée à 100 volts pour le gel inférieur. La cuve d'électrophorèse, est quant à elle, remplie avec du tampon de cuve 1X (tampon de cuve: Tris 50 mM - Glycine 0,2 M - SDS 0,1% - pH 8,3 – 8,8).

Dès que le front de migration commence à sortir du gel inférieur, la migration est arrêtée et les gels sont rincés dans de l'eau distillée avant d'être immergés dans un tampon de fixation (40% d'éthanol 96%, 10% d'acide acétique glacial, 50% d'eau osmosée) pendant 1h. Le gel est finalement coloré pendant la nuit sous agitation avec une solution de bleu de Coomassie (1610787 Biorad), ce qui va permettre de colorer les protéines en bleu. Après avoir réalisé un lavage pour enlever le bleu de la coomassie qui ne s'est pas fixé, on procède à un scan du gel (ImageScanner III – GE Healthcare) et on ajuste les contrastes avec le logiciel ScanLab.

7. Cytométrie en flux

Pour les expériences de cytométrie en flux, les cellules MG-63 (environ 10^5 cellules par puits dans 500 μ L de milieu de culture cellulaire) sontensemencées sur une plaque 24 puits, puis incubées avec les EVs marquées au FM4-64 (Invitrogen™ Colorant FM™ 4-64) pendant 3h d'interactions. Tout d'abord les EVs (15 μ L) sont marquées avec 5 μ L de FM4-64 avant d'être incubées pendant 30 minutes à 37°C dans le noir. Des cycles de lavage seront ensuite réalisés pour éliminer les restes de marqueur non fixés sur les EVs, en utilisant des filtres Amicon Ultra-0,5 mL 100 KD (Merk Milipore). Pour cela 3 cycles de centrifugation à 14000g pendant 4 min sont réalisés avec entre chaque centrifugation, rajout de 500 μ L de TBS (Tris Buffered Saline) pour bien laver les EVs. Pour déterminer la concentration d'EVs à déposer sur les puits avec les cellules, on utilise l'appareil Qubit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) qui va permettre de déterminer la quantité de protéines présente dans nos EVs après le marquage et les différents lavages. La concentration optimale d'EVs à déposer a été déterminée en utilisant une gamme allant 10 à 40 μ g de protéines. Ensuite, les différentes manipulations seront effectuées avec 20 μ g de protéines dans chaque puits.

Après incubation, les cellules ont été collectées pour l'analyse par cytométrie en flux en les décollant par trypsinisation. Les échantillons vont être fixés avec du PFA (Paraformaldéhyde) pendant 20 minutes avant de subir des lavages avec du PBS et des centrifugations. La cytométrie en flux a été réalisée sur un cytomètre de flux BD ACCURI C6 (BD Accuri™) avec 20 000 événements enregistrés par échantillon pour mesurer l'intensité de la fluorescence. Les données de cytométrie en flux ont été analysées à l'aide du logiciel BD Accuri™ C6 Software.

8. Microscopie confocal à fluorescence

Pour les expériences avec observation à l'aide la microscopie confocale à fluorescence, nous utiliserons un protocole similaire à celui utilisé à la cytométrie en flux que nous adapterons. Les cellules MG-63

(environ 10^5 cellules par puits dans 500 μ L de milieu de culture cellulaire) sontensemencées sur une plaque avec des chambres amovibles Lab-Tek (Lab-Tek™ II Thermo Scientific™), puis incubées avec les EVs marquées au DiI ou au DiO (Vybrant™ Invitrogen™) pendant 3h d'interactions. Tout d'abord les EVs (15 μ L) sont marquées avec 5 μ L de DiI ou DiO avant d'être incubées pendant 30 minutes à 37°C dans le noir. Des cycles de lavage seront ensuite réalisés pour éliminer les restes de marqueur non fixés sur les EVs, en utilisant des filtres Amicon Ultra-0,5 ml 100 KD (Merk Milipore). Pour cela 4 cycles de centrifugation à 14000g pendant 4 min sont réalisés avec entre chaque centrifugation, rajout de 500 μ L de TBS (Tris Buffered Saline) pour bien laver les EVs. Pour déterminer la concentration d'EVs à déposer, nous réalisons le même protocole que décrit pour la cytométrie en flux.

Après incubation, pour l'analyse par microscopie confocale à fluorescence, les puits seront lavés 2 fois avec du PBS avant d'être fixées avec du PFA pendant 20 minutes. Le marquage des cellules est tout d'abord réalisé avec de la Phalloïdine-488 1000X (Phalloïdin-iFluor 488 Reagent, Abcam), pour les puits avec les EVs marquées aux DiI, pendant 60 minutes. Le noyau est par la suite marqué avec du Hoechst 33342 (Hoechst 33342 Staining Dye Solution abcam) pendant 5 minutes à l'obscurité. Les observations sont réalisées à l'aide du microscope confocale a fluorescence Zeiss LSM880.

9. Test d'inhibition de l'internalisation des EVs dans les cellules de l'hôte.

Sept inhibiteurs de voies d'internalisation potentielles ont été utilisés. Ces inhibiteurs seront déposés sur les cellules pendant 1h avant de réaliser l'interaction de 3 h avec les EVs.

Tableau 1 : Listes des inhibiteurs utilisés, leur milieu de dissolution et leurs concentrations finales.

Inhibiteurs utilisés	Dissolution	Concentrations finales
Dynasore	DMSO (dimethyl sulfoxide, thermoscientific)	80 μ M
Cytochalasine D	DMSO (dimethyl sulfoxide, thermoscientific)	5 μ M
Méthyl- β -cyclodextrine	Eau ultrapure	5 mM
Nystatine	DMSO (dimethyl sulfoxide, thermoscientific)	20 μ M
Chlorpromazine	Eau ultrapure	10 μ M
Amiloride	DMSO (dimethyl sulfoxide, thermoscientific)	10 mM

Résultats et discussion

1. Production des EVs à partir d'une culture en RPMI + LB
 - 1.1. Détermination de la taille et de la concentration des EVs

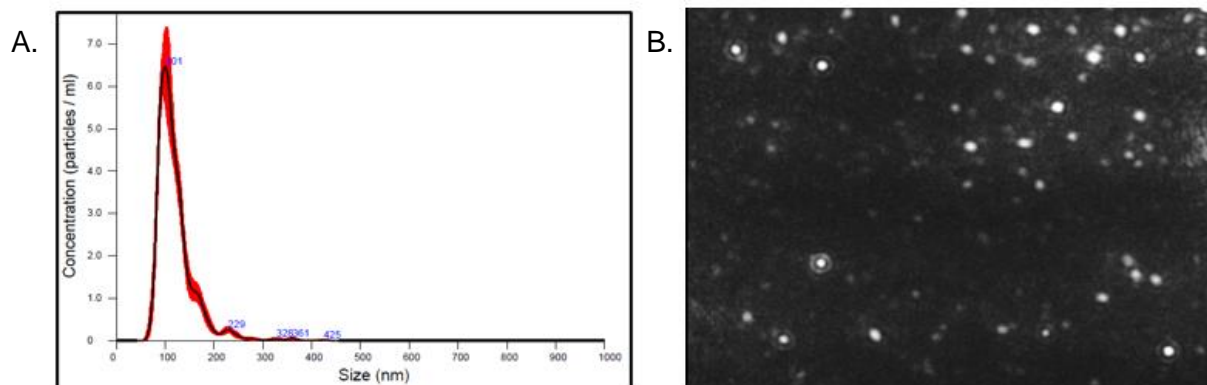


Figure 7 : Résultats obtenus après analyse au NTA (nanoparticle tracking analysis).

- (A) Graphique représentatif de la distribution de la taille des EVs de *S. aureus* N315.
(B) Capture d'une vidéo prise par la caméra de l'appareil qui permet ensuite l'analyse de la taille.

Les EVs produites par *S. aureus* N315 ont été purifiées à partir des surnageants de culture en milieu RPMI+LB. La distribution de taille des EVs purifiées a été estimée par analyse de suivi des nanoparticules (NTA). Après que l'appareil NanoSight NS300 ait enregistré des vidéos de 60 sec via sa caméra (Figure 7, B), le logiciel analyse la trajectoire de manière individuelle des EVs pour ainsi donner une distribution de leur taille et de leur concentration dans l'échantillon (Figure 7, A). Les tailles moyennes des EVs sont de 121,1 +/- 2,7 nm avec une concentration de 3,20e+12 +/- 3,17e+11 particules/mL. Bien que ces résultats puissent varier selon l'échantillon analysé, les différences de taille et de concentration obtenus entre les différentes préparations d'EVs purifiées ne sont pas significatives. (Résultats non montrés)

En revanche, lorsque ces expériences NTA sont réalisées après marquage des EVs par les différents marqueurs de membrane (FM4-64, DiI et DiO) et lavages à l'aide du tampon TBS pour éliminer la fraction de marqueurs non liés aux membranes des EVs, la concentration en EVs diminue. En effet, la concentration en EVs mesurée après marquage et lavages n'est plus que de 6,02e+11 +/- 5,57e+10 particules/mL. En revanche, la taille des EVs ne varie pas (environ 116,4 +/- 0,6 nm).

1.2. Analyses des protéines

L'analyse des protéines contenues dans les échantillons d'EVs préalablement extraites et concentrées est tout d'abord réalisée par SDS-PAGE (Figure 8). On retrouve bien le profil protéique recherché avec les EVs. L'analyse de trois réplicats biologiques indépendants d'EVs purifiées montre le caractère reproductible de leur contenu en protéines.

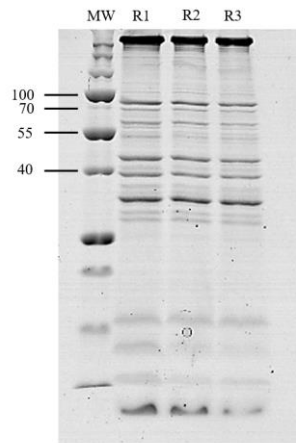


Figure 8 : SDS-PAGE (12%) montrant le profil protéique de la souche N315 de *S. aureus*. Les tests sont réalisés en triplicata (R1, R2, R3). MW : Marqueur de tailles (kDa).

Suite à l'analyse du profil protéique par SDS-PAGE, nous avons déterminé la concentration en protéines des EVs dans les différents échantillons à l'aide de l'appareil Qubit. Pour les EVs qui ont été isoler et purifier, on retrouve une concentration en protéines d'environ 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (cette concentration peut varier en fonction des différentes expériences réalisées). En revanche, après marquage des EVs aux marqueurs de membrane (FM4-64, DiI et DiO) et lavages au TBS, la concentration en protéines des échantillons diminue pour atteindre 0,730 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en moyenne. Cette diminution de concentration en protéines est cohérente avec nos résultats précédemment obtenus avec le NTA ou on observait une diminution de la concentration des EVs dans l'échantillon après leurs marquages et lavages.

Après avoir extrait les EVs et après avoir déterminé leurs tailles et leurs profils protéiques, nous allons pouvoir les utiliser pour réaliser des expériences d'interaction avec les cellules de l'hôte qui seront visualisées par microscopie confocale et analysées par cytométrie en flux.

2. Optimisation des marquages des vésicules extracellulaires

Pour commencer, nous avons réalisé des tests de marquage des EVs avec différents marqueurs de membrane, le FM4-64, le DiI et le DiO qui vont émettre une fluorescence lorsqu'ils sont liés aux membranes des EVs. Ces marquages seront observés par deux méthodes différentes, la cytométrie en flux et la microscopie confocale à fluorescence. Les résultats obtenus en microscopie confocale à fluorescence sont présentés dans la figure 9. Nous pouvons donc observer qu'avec le FM4-64 nous avons très peu d'EVs marquées par rapport aux deux autres marqueurs alors que la même quantité d'EVs marquées a été déposée dans les 3 échantillons. Les marquages avec le DiI et avec le DiO ont, quant à eux, bien marqué les EVs.

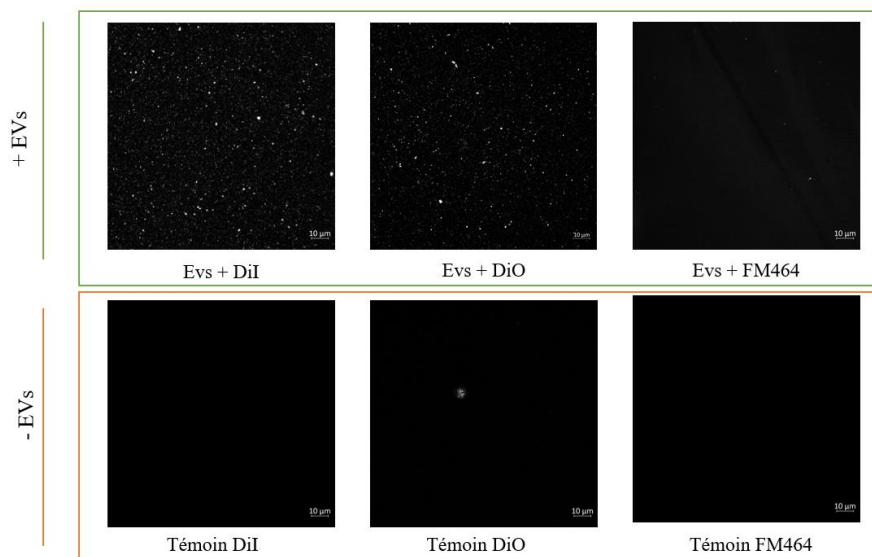


Figure 9 : Essais de marquages des EVs avec les différents marqueurs de membrane (DiI, DiO, FM4-64) par microscopie confocale.

Les témoins sans EVs avec seulement les différents marqueurs nous permettent de constater qu'il y a encore des « traces » des marqueurs pour les échantillons avec le DiI et le DiO. Ces échantillons sont réalisés de la même façon que pour ceux avec l'ajout d'EVs, ils sont marqués, incubés à 37°C pendant 30 minutes à l'obscurité et ils sont lavés 3 fois avec du TBS par centrifugation. Pour vérifier si les « traces » de marqueurs sont encore présentes quand on réalise les interactions avec les cellules MG-63, on va déposer un échantillon avec seulement le marqueur DiI qui a été lavé 3 fois sur les cellules qui sont marquées au Hoesch (marque les noyaux en bleu) et à la Phalloïdine-488 (marque les filaments d'actine en rouge).

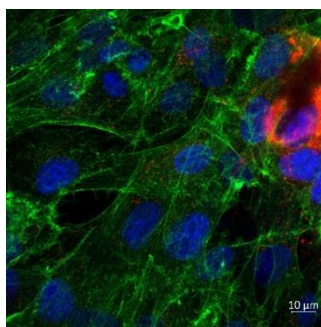


Figure 10 : Observation en microscopie confocale des cellules MG-63 marquées au Hoesch et à la phalloïdine-488, en présence du marqueur DiI.

Lorsqu'on observe les résultats obtenus après l'incubation du marqueur avec les cellules MG-63, nous pouvons observer la présence de « traces » rouges qui ne sont pas dues au Hoesch, ni à la phalloïdine (Figure 10). Cela signifie que les marqueurs ne sont pas assez bien lavés pour l'observation en microscopie confocale. Pour la suite des expériences en microscopie confocale, les lavages des échantillons avec le TBS et les centrifugations seront augmentés, on va passer à 4 lavages avec du TBS. Après vérification avec ce quatrième lavage, nous avons pu constater ne plus avoir de « traces » des marqueurs dans nos témoins.

L'efficacité du marquage des EVs avec les différents marqueurs a également été évaluée par cytométrie en flux. Lors du passage des EVs marquées en cytométrie en flux, on détecte un meilleur signal avec le FM4-64 par rapport aux autres marqueurs (Signal FM4-64 > DiI > DiO) (résultat non montré). Nous allons donc pour la suite des expériences utiliser le FM4-64 pour les marquages des EVs qui seront analysés en cytométrie en flux et pour la microscopie confocale, nous utiliserons le DiI et le DiO.

Une fois que l'optimisation du marquage et des lavages des EVs réalisées, nous allons pouvoir passer à l'optimisation des interactions entre les EVs et les cellules MG-63.

3. Optimisation des interactions entre les EVs et les cellules MG-63

Tout d'abord, nous avons testé différentes concentrations d'EVs afin de déterminer celle permettant une détection optimale des interactions EVs / cellules (Figure 11). Cela nous permettra aussi de voir si l'interaction augmente en fonction de la concentration d'EVs.

L'analyse en cytométrie en flux a été effectuée sur les cellules MG-63 seules, sur les cellules en présence d'EVs non marquées ou marquées (EVs*) avec le FM4-64. Deux quantités d'EVs (20 et 40 µg) ont été utilisées lors de ces interactions de 3 h. En présence d'EVs non marquées, on observe aucune différence par rapport au témoin « cellules seules » et cela quelle que soit la quantité d'EVs ajoutée. En revanche, en présence d'EVs marquées, on observe un déplacement du signal en cytométrie en flux qui se traduit par une augmentation du pourcentage d'EVs associées aux cellules, qui est interprété comme le pourcentage de EVs transportées par les cellules MG-63. Ce pourcentage augmente avec l'augmentation de la quantité d'EVs. Il est de 41,4% pour 40 µg d'EVs contre 29,1% en présence de 20 µg d'EVs. Pour une question d'économie de consommation de quantité d'EVs pour effectuer nos différentes expériences, nous utiliserons donc la concentration de 20 µg pour laquelle on observe un bon pourcentage d'association des EVs marquées aux cellules MG-63. Ce résultat suggère également que les cellules internalisent les EVs de *S. aureus* N315.

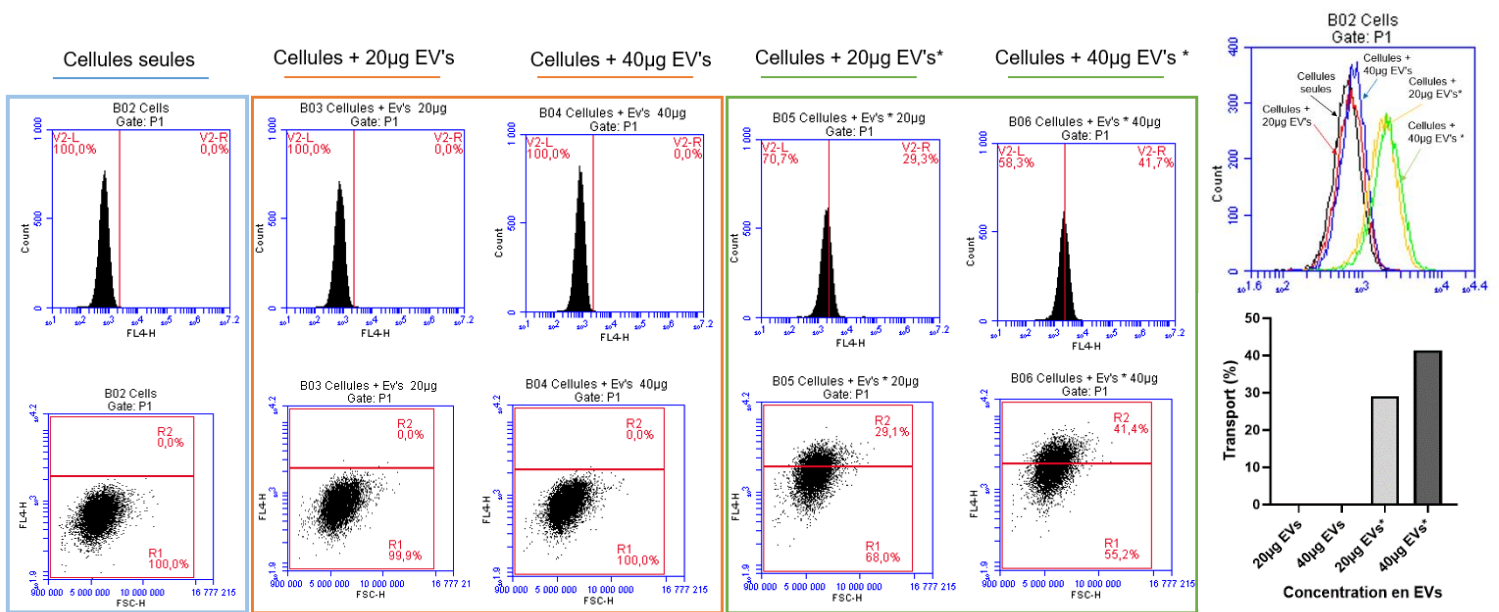


Figure 11 : Interactions des cellules MG-63 avec deux concentrations en EVs (20 µg et 40 µg).

EVs* : vésicules extracellulaires marquées au FM4-64. Cadre bleu : témoin cellule seule.

Cadre orange : Interactions des cellules avec les EVs non marquées. Cadre vert : Interaction des cellules avec les EVs marquées au FM4-64. L'histogramme représente le pourcentage de transport des EVs marquées associées aux cellules MG-63 en fonction de leurs concentrations.

Dans un second temps, l'impact du temps d'interaction sur la dynamique d'internalisation des EVs par les cellules MG-63 a été évalué. Pour cela, 20 µg d'EVs marquées au FM4-64 ont été incubés de 30 min à 17 h avec les cellules et l'interaction analysée par cytométrie en flux (Figure 12).

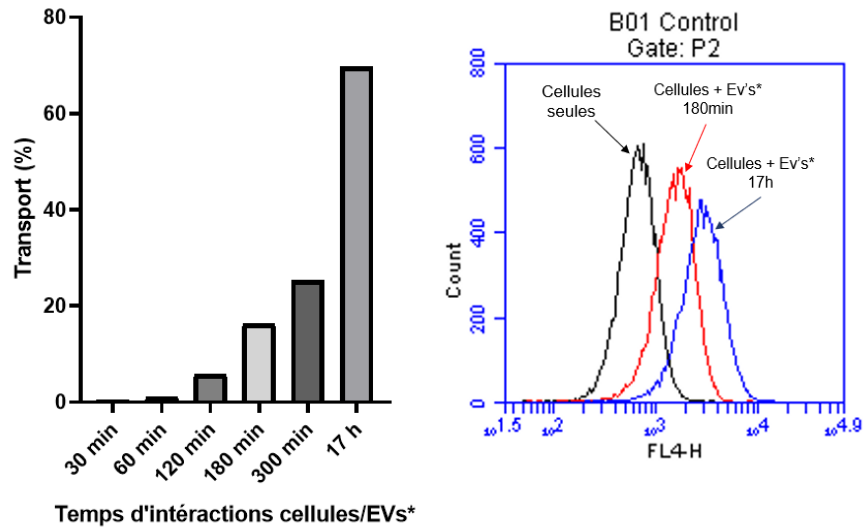


Figure 12 : Interactions des EVs avec les cellules MG-63 pendant une gamme de temps allant de 30 minutes à 17h. EVs* : vésicules extracellulaires marquées au FM4-64. L’histogramme représente le pourcentage de transport des EVs associées aux cellules MG-63 au cours du temps.

D’après les résultats présentés dans la figure 12, nous pouvons observer une différence dans le pourcentage de transport des EVs associées aux cellules au cours du temps. En effet, nous avons peu de transport (environ 1%) lors d’interactions courtes (30 et 60 min). Par contre, à partir de 3 h d’interaction entre les cellules et les EVs marquées au FM4-64, nous observons une forte augmentation du pourcentage de transport (de 15 à 70 % de transport à 17 h). Le transport des EVs semble donc fonction du temps d’interaction entre les EVs et les cellules.

En parallèle de ces mesures en cytométrie en flux, les interactions entre les EVs et les cellules MG-63 ont également été observées en microscopie confocale. Pour cela, les EVs ont été marquées par les marqueurs de membrane DiI ou DiO, et les cellules MG-63 ont été marquées avec le colorant Hoechst, qui se fixe à l’ADN et qui permet de visualiser les noyaux, et la phalloïdine-488, qui se fixe à l’actine (Figure 13). Il est à noter que le marquage à la phalloïdine n’est réalisé que pour les expériences de marquage des EVs au DiI. En effet, les marqueurs DiO et phalloïdine-488 émettent à des longueurs d’onde similaires ce qui ne permet pas de les différencier.

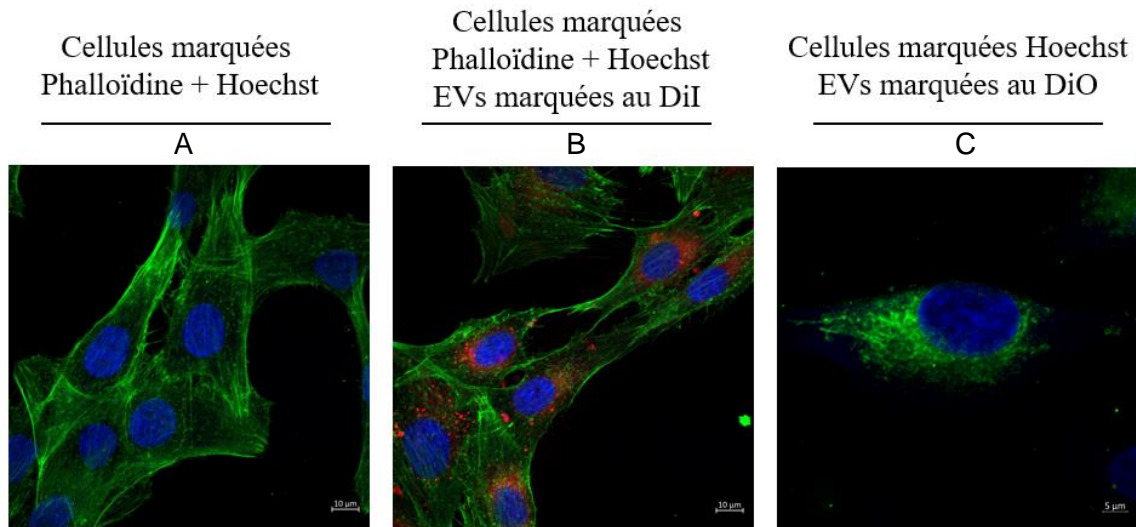


Figure 13 : Observation des interactions entre les cellules MG-63 et les EVs en microscopie confocale. Le Hoeschst marque le noyau des cellules en bleu. La phalloïdine marque les filaments d’actine en vert (photos A et B). Le DiI va marquer les EVs en rouge (photos A et B) tandis que le DiO va les marquer en vert (photo C).

Quand on effectue l’interaction des cellules MG-63 avec les EVs marquées, nous pouvons observer que les EVs semble se concentrer au niveau des cellules (pas de fluorescence détectable entre les cellules) confirmant ainsi leur internalisation. En effet, avec le marquage à la phalloïdine-488, nous pouvons observer la forme de la cellule. Nous voyons donc que les EVs semblent être transportés au niveau des cellules. Il semble aussi que la majorité des EVs (en rouge pour DiI ou vert pour DiO) se retrouve concentrées autour des noyaux des cellules (marquées en bleu).

Suite à l’optimisation des marquages des cellules eucaryotes pour l’observation de leur interaction avec les EVs par microscopie confocale, l’impact du temps d’interaction EVs / cellules MG-63 sur l’internalisation des EVs a été évalué. D’après la figure 14, nous pouvons observer l’interaction des cellules avec les EVs après 3 h et 17 h. Bien que non quantitatif, il semble que plus de fluorescence émise est observée lorsque l’interaction est de 17h. En effet, on peut observer une plus grande quantité d’EVs au bout de 17 h au niveau des cellules, elles semblent être plus concentrées autour du noyau par rapport à une interaction de 3 h. Ces résultats permettent d’appuyer ceux précédemment obtenus en cytométrie en flux avec lesquels nous avons pu observer que le transport des EVs associées aux cellules semble être dépendant du temps d’interaction.

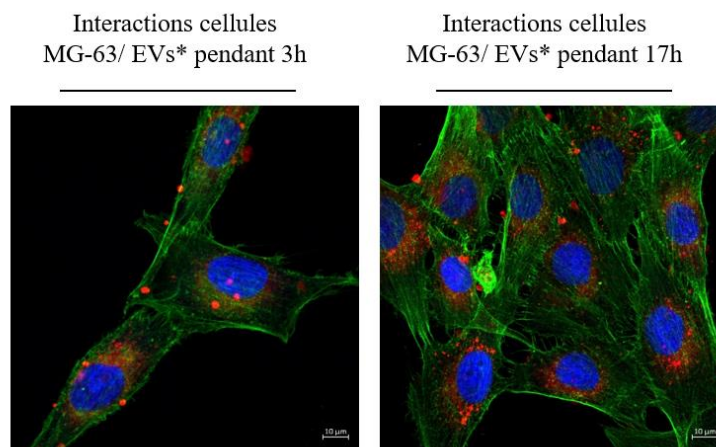


Figure 14 : Observation en microscopie confocale de l'interaction cellules/EVs*.

L'interaction est observée au bout de 3h ou au bout de 17h. Le DiI marque les EVs en rouge, le Hoesch les noyaux des cellules en bleu et la phalloidine-488 les filaments d'actine en vert.

Les différentes optimisations réalisées au niveau des interactions cellules MG-63 / EVs pour l'observation en microscopie confocale et l'analyse par cytométrie en flux, nous ont permis d'observer que l'interaction semble dépendante de la quantité d'EVs mais aussi dépendante du temps. Ces expériences ont également montré que les EVs pouvaient être internalisées par les cellules MG-63. Les prochaines expériences d'interaction seront donc réalisées avec 20 μg d'EVs, comme expliquer précédemment, et avec un temps d'interaction de 3 h. En effet, ce temps permet un transport des EVs quantifiable en cytométrie en flux et visualisable en microscopie confocale. En outre, il est plus adapté à des manipulations sur la journée.

Les conditions expérimentales de marquage et d'interaction des EVs avec les cellules MG-63 ayant été optimisées, l'étude des voies d'internalisation des EVs à l'aide d'inhibiteurs spécifiques peut alors être entreprise.

4. Impact d'inhibiteurs sur l'interaction des EVs avec les cellules MG-63

Afin d'étudier le mode d'action, *in vitro*, des EVs produites par *S. aureus* N315 sur les cellules de l'hôte, des inhibiteurs seront utilisés pour évaluer leur impact sur l'interaction des EVs avec les cellules MG-63. L'utilisation de ces inhibiteurs qui lient spécifiquement divers composants de différentes voies d'internalisation possibles pour les EVs, devrait permettre d'identifier les voies d'entrée des EVs dans les cellules. Pour cela, 6 inhibiteurs ont été mis en interaction avec les cellules MG-63 pendant 1 h

avant de réaliser les interactions avec les EVs. Le dynasore est un inhibiteur de l'endocytose médiée par la clathrine qui va cibler la dynamine. La chlorpromazine va aussi cibler l'endocytose médiée par la clathrine mais contrairement au dynasore, il va cibler la formation des clathrines autour des vésicules. Le méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) et la nystatine vont agir au niveau de l'endocytose médiée de la cavéoline et les radeaux lipidiques, en séquestrant le cholestérol. L'amiloride et la cytochalasine vont quant à eux, inhiber la macropinocytose.

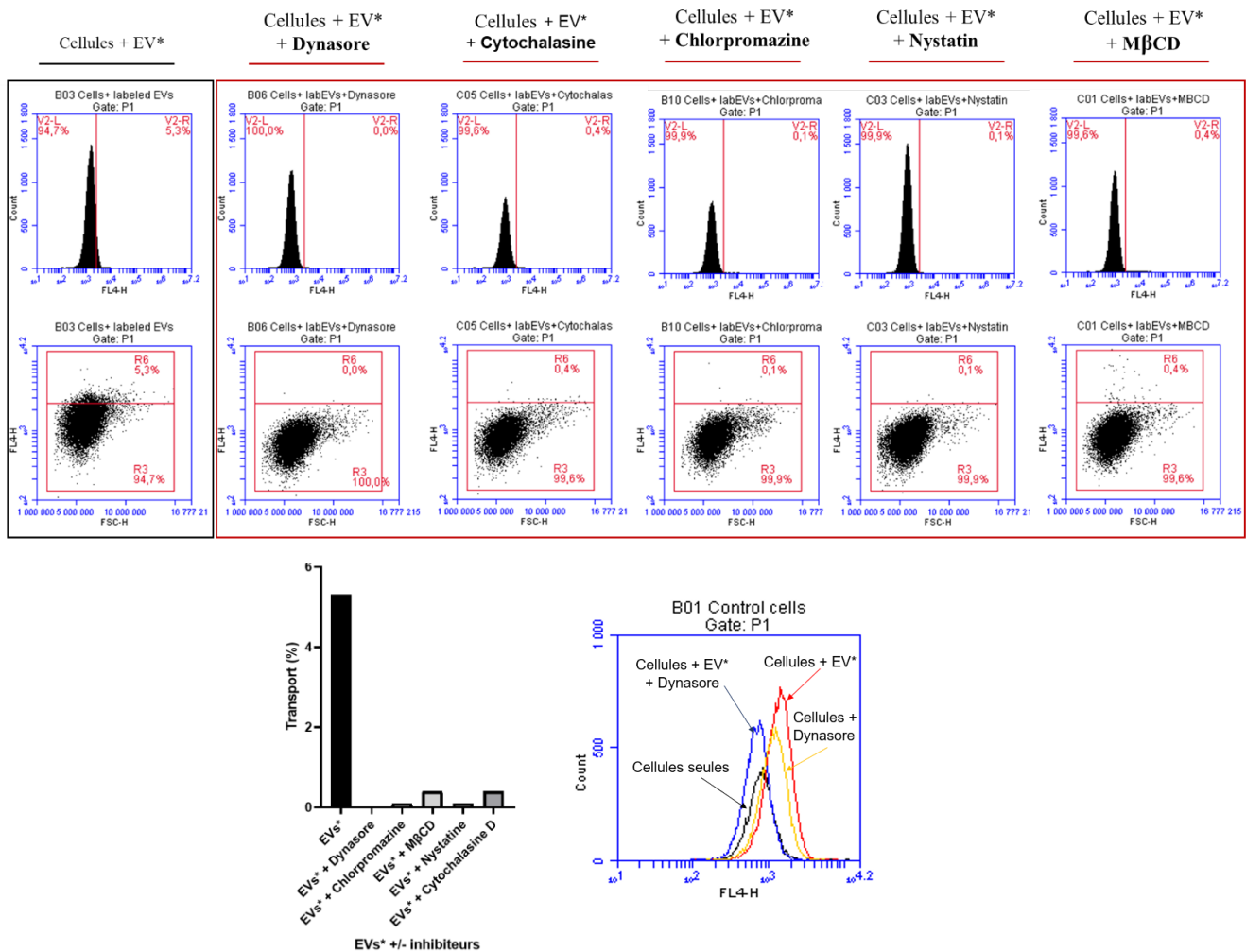


Figure 15 : Interactions des EVs avec les cellules MG-63 en présence des différents inhibiteurs.

Les résultats préliminaires des différentes interactions des EVs avec les cellules MG-63 en présence des différents inhibiteurs sont présentés dans la figure 15. Nous pouvons observer que tous les inhibiteurs testés semblent avoir un impact sur le pourcentage d'EVs internalisées par les cellules. En effet, on observe un décalage, vers la gauche, du signal obtenu par analyse en cytométrie en flux quand on a ajout des inhibiteurs par rapport au signal obtenu par l'interaction des EVs avec les cellules sans

inhibiteur. L'internalisation des EVs est totalement inhibée en présence de dynasore, de chlorpromazine et de nystatine. M β CD et la cytochalasine D inhibent également l'internalisation des EVs mais de façon moins forte que les autres inhibiteurs. Les résultats d'inhibition avec l'amiloride n'ont pas pu être présenté car il n'y avait plus de cellules dans notre échantillon, que des débris, cela peut être dû à la quantité d'amiloride préparé dans du DMSO déposé sur les cellules.

Ces résultats semblent suggérés que le transport des EVs associées aux cellules soit le plus inhibé par les inhibiteurs de l'endocytose médiée par les clathrines, préférentiellement par le dynasore et par l'inhibiteur de l'endocytose médiée par les radeaux lipidiques, la nystatine. Cependant, le fait de ne pas abroger complètement le transport des EVs après un traitement avec un inhibiteur peut être due au fait que le transport des EVs peut se produire par plus d'un mécanisme (Mulcahy *et al.*, 2014).

Pour confirmer ces résultats, des expériences d'interaction entre les cellules MG-63 et les EVs, en présence de dynasore, de chlorpromazine et d'amiloride ont été analysées en microscopie confocale à deux temps d'interaction (3 h et 17 h). Les résultats sont présentés ci-dessous (Figure 16)

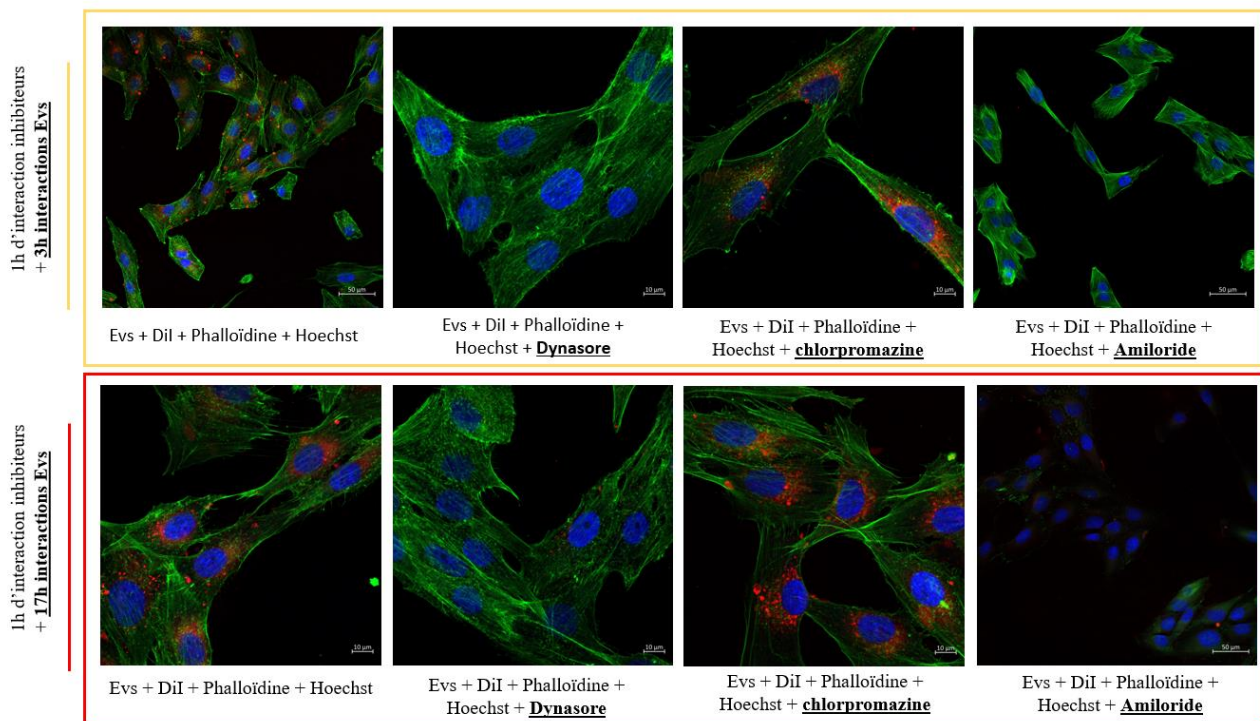


Figure 16 : Interaction des EVs avec les cellules MG-63 en présence des différents inhibiteurs. Observation en microscopie confocale avec le marqueur DiI qui va marquer les EVs, le Hoechst les noyaux des cellules eucaryotes et la phalloïdine-488 les filaments d'actine.

En présence de dynasore, à 3 h d'interaction, aucune EVs n'est détectée par rapport au control sans inhibiteur, confirmant les résultats obtenus en cytométrie en flux. Une internalisation des EVs est néanmoins détectée en présence de dynasore après 17 h d'interaction. Cependant, les EVs sont peu nombreuses comparées au control sans inhibiteur à 17 h. Il est envisageable que l'efficacité de l'inhibiteur puisse diminuer avec le temps d'incubation.

La présence de chlorpromazine ne semble pas moduler la capacité des cellules MG-63 à internaliser les EVs aux deux temps d'interaction testés. Ce résultat est différent de celui obtenu en cytométrie en flux. Une explication pourrait résider dans la quantité de chlorpromazine utilisée dans cette expérience qui est nettement inférieure à celle utilisée en cytométrie en flux. Pour les expériences en cytométrie en flux, les interactions sont réalisées dans des puits avec 500 µL de milieu alors que les expériences en microscopie confocale sont réalisées dans 200 µL de milieu. La quantité de chlorpromazine est donc ajusté en conséquence. Des expériences supplémentaires sont donc à réalisées pour mieux conclure quant à l'effet de la chlorpromazine sur le transport des EVs.

Finalement, contrairement aux résultats de cytométrie en flux, des cellules intacts sont détectées en présence d'amiloride. Ce résultat peut également s'expliquer par les quantités différentes d'inhibiteur utilisées. L'internalisation des EVs par les cellules MG-63 après 3 h d'interaction semble également être inhibée en présence d'amiloride. En revanche au bout de 17 h, nous observons la présence de quelques EVs mais en quantité largement inférieure par rapport au control à 17 h tout comme pour le dynasore. A cela s'ajoute également une dégradation au niveau des cellules à 17 h et notamment au niveau de l'actine. L'amiloride joue un rôle au niveau de l'assemblage de l'actine en inhibant l'échange sodium/proton qui est impliqué dans la régulation du pH cellulaire. On aura donc une diminution du pH ce qui va entraîner une diminution de l'assemblage des filaments d'actine, ce qui peut sans doute expliquer ces résultats obtenus en microscopie confocale au bout de 17 h ainsi que les résultats obtenus en cytométrie en flux.

Conclusion

Pour faire progresser notre compréhension des mécanismes d'action des EVs produites par *S. aureus* dans la pathogénèse des infections, nous nous sommes intéressés à l'étude de leurs interactions *in vitro* avec les cellules de l'hôte. À cette fin, nous avons cherché à déterminer si les EVs produites par la souche N315 pouvaient être internalisées par la lignée cellulaire d'ostéoblastes MG-63, et le cas échéant, via quels processus (endocytose, phagocytose, fusion membranaire, ...) par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de certaines voies d'internalisation. Ce travail a, en premier lieu, nécessité des étapes d'optimisation des marquages (EVs et cellules MG-63) et des interactions (quantité de EVs, temps d'interaction), en vue d'analyses par microscopie confocale et cytométrie en flux. Ce travail nous a permis de mettre en évidence que les EVs pouvaient être internalisées par les cellules MG-63, un processus dépendant de la quantité d'EVs de *S. aureus* et du temps d'interaction.

L'utilisation d'inhibiteurs qui lient spécifiquement divers composants de différentes voies d'internalisation possibles pour les EVs nous a permis de préciser les voies d'entrée des EVs dans les cellules MG-63. Au total, l'impact de 6 inhibiteurs a été évalué sur le processus d'internalisation. L'internalisation des EVs s'est avérée être totalement inhibée en présence de dynasore et de nystatine. Le méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) et la cytochalasine D inhibent également l'internalisation des EVs mais de façon moins forte que les autres inhibiteurs. Ces résultats préliminaires semblent suggérer que l'internalisation des EVs soit le plus inhiber par les inhibiteurs de l'endocytose médiée par les clathrines, préférentiellement par le dynasore et par l'inhibiteur de l'endocytose médiée par les radeaux lipidiques, la nystatine.

Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer ces premiers résultats et conclure sur l'effet de l'amiloride, un inhibiteur de l'internalisation par macropinocytose.

Bibliographie

- Anand, D., and Chaudhuri, A. (2016) Bacterial outer membrane vesicles: New insights and applications. *Mol Membr Biol* 33: 125–137.
- Baumgarten, T., Sperling, S., Seifert, J., Bergen, M. von, Steiniger, F., Wick, L.Y., and Heipieper, H.J. (2012) Membrane Vesicle Formation as a Multiple-Stress Response Mechanism Enhances *Pseudomonas putida* DOT-11E Cell Surface Hydrophobicity and Biofilm Formation. *Appl Environ Microbiol* 78: 6217–6224.
- Bitto, N.J., and Kaparakis-Liaskos, M. (2017a) The Therapeutic Benefit of Bacterial Membrane Vesicles. *Int J Mol Sci* 18: 1287.
- Bose, S., Aggarwal, S., Singh, D.V., and Acharya, N. (2020) Extracellular vesicles: An emerging platform in gram-positive bacteria. *Microb Cell* 7: 312–322.
- Brown, L., Wolf, J.M., Prados-Rosales, R., and Casadevall, A. (2015) Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol* 13: 620–630.
- Caruana, J.C., and Walper, S.A. (2020) Bacterial Membrane Vesicles as Mediators of Microbe – Microbe and Microbe – Host Community Interactions. *Front Microbiol* 11: 432.
- Deatherage, B.L., and Cookson, B.T. (2012) Membrane Vesicle Release in Bacteria, Eukaryotes, and Archaea: a Conserved yet Underappreciated Aspect of Microbial Life. *Infect Immun* 80: 1948–1957.
- Gill, S.R., McIntyre, L.M., Nelson, C.L., Remortel, B., Rude, T., Reller, L.B., and Jr, V.G.F. (2011) Potential Associations between Severity of Infection and the Presence of Virulence-Associated Genes in Clinical Strains of *Staphylococcus aureus*. *PLOS ONE* 6: e18673.
- Hong, S.-W., Choi, E.-B., Min, T.-K., Kim, J.-H., Kim, M.-H., Jeon, S.G., et al. (2014) An Important Role of α -Hemolysin in Extracellular Vesicles on the Development of Atopic Dermatitis Induced by *Staphylococcus aureus*. *PLOS ONE* 9: e100499.
- Im, H., Lee, S., Soper, S.A., and Mitchell, R.J. (2017) *Staphylococcus aureus* Extracellular Vesicles (EVs): Surface-Binding Antagonists of Biofilm Formation. *Mol Biosyst* 13: 2704–2714.

Jurkoshek, K.S., Wang, Y., Athman, J.J., Barton, M.R., and Wearsch, P.A. (2016) Interspecies Communication between Pathogens and Immune Cells via Bacterial Membrane Vesicles. *Front Cell Dev Biol* 4 <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2016.00125>. Accessed May 30, 2022.

Kim, J.H., Lee, J., Park, J., and Gho, Y.S. (2015) Gram-negative and Gram-positive bacterial extracellular vesicles. *Semin Cell Dev Biol* 40: 97–104.

Kwiecinski, J.M., and Horswill, A.R. (2020) *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: pathogenesis and regulatory mechanisms. *Curr Opin Microbiol* 53: 51–60.

Le Maréchal, C., Jardin, J., Jan, G., Even, S., Pulido, C., Guibert, J.-M., et al. (2011) *Staphylococcus aureus* seroproteomes discriminate ruminant isolates causing mild or severe mastitis. *Vet Res* 42: 35.

Lee, J., Lee, E.-Y., Kim, S.-H., Kim, D.-K., Park, K.-S., Kim, K.P., et al. (2013) *Staphylococcus aureus* Extracellular Vesicles Carry Biologically Active β -Lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 2589–2595.

Liu, Y., Defourny, K.A.Y., Smid, E.J., and Abee, T. (2018) Gram-Positive Bacterial Extracellular Vesicles and Their Impact on Health and Disease. *Front Microbiol* 9: 1502.

Luz, B.S.R. da, Azevedo, V., Le-loir, Y., and Guedon, E. (2021a) Extracellular Vesicles and Their Role in *Staphylococcus aureus* Resistance and Virulence. IntechOpen, . <https://www.intechopen.com/chapters/undefined/state.item.id>. Accessed May 27, 2022.

Luz, B.S.R.D., Nicolas, A., Chabelskaya, S., Rodovalho, V. de R., Le Loir, Y., Azevedo, V.A. de C., et al. (2021b) Environmental Plasticity of the RNA Content of *Staphylococcus aureus* Extracellular Vesicles. *Front Microbiol* 12 <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2021.634226>. Accessed May 27, 2022.

MacDonald, I.A., and Kuehn, M.J. (2012) Offense and defense: microbial membrane vesicles play both ways. *Res Microbiol* 163: 607–618.

Mashburn, L.M., and Whiteley, M. (2005) Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature* 437: 422–425.

Mulcahy, L.A., Pink, R.C., and Carter, D.R.F. (2014) Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J*

Extracell Vesicles 3: 24641.

Ni, K., Wang, C., Carnino, J.M., and Jin, Y. (2020) The Evolving Role of Caveolin-1: A Critical Regulator of Extracellular Vesicles. *Med Sci* 8: 46.

O'Donoghue, E.J., and Krachler, A.M. (2016) Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells. *Cell Microbiol* 18: 1508–1517.

Stefani, S., Chung, D.R., Lindsay, J.A., Friedrich, A.W., Kearns, A.M., Westh, H., and MacKenzie, F.M. (2012) Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *Int J Antimicrob Agents* 39: 273–282.

Tartaglia, N.R., Breyne, K., Meyer, E., Cauty, C., Jardin, J., Chrétien, D., et al. (2018) *Staphylococcus aureus* Extracellular Vesicles Elicit an Immunostimulatory Response in vivo on the Murine Mammary Gland. *Front Cell Infect Microbiol* 8 <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2018.00277>. Accessed May 27, 2022.

Tong, S.Y., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., and Fowler, V.G. (2015) *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clin Microbiol Rev* 28: 603–661.

Toyofuku, M., Nomura, N., and Eberl, L. (2019) Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nat Rev Microbiol* 17: 13–24.

Vercauteren, D., Vandenbroucke, R.E., Jones, A.T., Rejman, J., Demeester, J., De Smedt, S.C., et al. (2010) The Use of Inhibitors to Study Endocytic Pathways of Gene Carriers: Optimization and Pitfalls. *Mol Ther* 18: 561–569.

Abstract

Les vésicules extracellulaires (EVs) sont des particules nanométriques, de 20 à 300 nm de diamètre, produites par la plupart des cellules et sécrétées dans le milieu environnant. Elles jouent un rôle essentiel dans la communication entre les cellules (intra- et inter-espèce) et dans le transport des molécules bioactives d'une cellule productrice à une cellule receveuse telle que des toxines. Elles vont assurer plusieurs fonctions biologiques avec des mécanismes aussi bien offensifs que défensifs, tels que la détection du quorum sensing, la livraison de nutriments et de toxines, la résistance aux antibiotiques, l'élimination des organismes compétitifs, ainsi que le transfert de matériel génétique. En raison de leurs propriétés, de nombreux travaux explorent la possibilité d'utiliser ces effecteurs biologiques comme biomarqueurs pour le diagnostic/pronostic de maladies ou comme vecteurs de molécules à visées thérapeutiques. Récemment des études ont montré que les EV sécrétées par *Staphylococcus aureus*, un pathogène de l'homme et l'animal pouvaient jouer un rôle dans la pathogenèse des infections. L'objectif du stage est de faire progresser notre compréhension sur le mécanisme d'action, *in vitro*, des EVs produites par *S. aureus*. À cette fin, des inhibiteurs seront utilisés pour évaluer leur impact sur l'interaction des EVs avec les cellules MG-63. Pour observer l'effet de ces inhibiteurs sur l'interaction des EVs avec les cellules de l'hôte, des analyses en cytométrie en flux et des observations en microscopie confocale seront réalisés.

Mots-clés : vésicule extracellulaire, *Staphylococcus aureus*, communication inter espèce, virulence, inhibiteurs, cytométrie en flux, microscopie confocale.

English Abstract

Extracellular vesicles (EVs) are nanometric particles, 20 to 300 nm in diameter, produced by most cells and secreted into the surrounding environment. They play an essential role in the communication between cells (intra- and inter-species) and in the transport of bioactive molecules from a producing cell to a receiving cell such as toxins. They perform several biological functions with both offensive and defensive mechanisms, such as quorum sensing, nutrient and toxin delivery, antibiotic resistance, elimination of competitive organisms, and transfer of genetic material. Due to their properties, many studies are exploring the possibility of using these biological effectors as biomarkers for the diagnosis/prognosis of diseases or as vectors for therapeutic molecules. Recently, studies have shown that EVs secreted by *Staphylococcus aureus*, a human and animal pathogen, could play a role in the pathogenesis of infections. The objective of the internship is to advance our understanding of the mechanism of action, in vitro, of EVs produced by *S. aureus*. To this end, inhibitors will be used to evaluate their impact on the interaction of EVs with MG-63 cells. To observe the effect of these inhibitors on the interaction of EVs with host cells, flow cytometry analysis and confocal microscopy observations will be performed.

Keywords: extracellular vesicle, *Staphylococcus aureus*, interspecies communication, virulence, inhibitors, flow cytometry, confocal microscopy