

TLEMCEN

N° d'ordre



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE de TLEMCEN

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et d'Immunologie

MEMOIRE

Présenté par

BENMANSOUR Souheila Amal

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Immunologie

Intitulé

**Effet de la vitamine C sur la capacité phagocytaire des cellules endothéliales vis-à-vis
de *Staphylococcus aureus***

Soutenu le 09 juillet 2017, devant le jury composé de :

Président	Mourad ARIBI	Professeur
Encadreur	Mohamed Chems eddine SMAHI	Professeur
Examinatrice	Mustapha HADDOUCHE	Professeur
Examineur	Kamel GHEZZAZ	Maitre-assistant A

09/07/2017

TLEMCEN

N° d'ordre



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE de TLEMCEN

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et d'Immunologie

MEMOIRE

Présenté par

BENMANSOUR Souheila Amal

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Immunologie

Intitulé

**Effet de la vitamine C sur la capacité phagocytaire des cellules endothéliales vis-à-vis
de *Staphylococcus aureus***

Soutenu le 09 juillet 2017, devant le jury composé de :

Président	Mourad ARIBI	Professeur
Encadreur	Mohamed Chems eddine SMAHI	Professeur
Examinatrice	Mustapha HADDOUCHE	Professeur
Examineur	Kamel GHEZZAZ	Maitre-assistant A

09/07/2017

Résumé

Introduction : *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) est une bactérie fréquemment responsable d'infections sévères et récurrentes. Sa capacité à déjouer les réponses immunitaires explique en grande partie sa virulence. La cellule endothéliale se situe en première ligne des défenses immunitaires contre *S. aureus* mais représente aussi l'un des principaux moyens de dissémination de l'infection.

Objectif : Etudier *ex-vivo* l'effet de la vitamine C sur l'activité antibactérienne des cellules endothéliales.

Matériels et méthodes : Des cellules endothéliales ont été isolées à partir de la veine du cordon ombilical humain et cultivées jusqu'à confluence. Après deux passages les cellules ont été infectées à 25 ou à 50 multiplicités d'infections (MOI) et traitées par différentes doses de vitamine C (1, 4, 7, 10 mM). Après incubation, la capacité phagocytaire, la bactéricidie et la croissance intracellulaire ont été mesurées.

Résultats : L'activité phagocytaire a été significativement diminuée par rapport au témoin dans les cellules traitées avec les doses de 1, 4 et 7 mM à MOI 25 ($p < 0.01$), et avec la dose de 10 mM à MOI 50 ($p < 0.05$). De même la bactéricidie intracellulaire a augmenté significativement à MOI 25 avec les doses de 7 et 10 mM ($p < 0.05$) et à MOI 50 avec les doses 1 et 4 mM ($p < 0.05$). Enfin, toutes les doses de vitamines C ont inhibé la croissance intracellulaire avec un effet plus marqué pour la dose de 1 mM ($p < 0.01$).

Conclusions : Ces résultats suggèrent que la vitamine C peut moduler l'activité antibactérienne des cellules endothéliales envers *S. aureus*. Les doses ayant un effet homogène sur l'activité antibactérienne restent à préciser.

Mots clé : Vitamine C, *S. aureus*, phagocytose.

Abstract

Background: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is frequently responsible for severe and recurrent infections. Its ability to thwart immune responses largely explains its virulence. The endothelial cell is at the forefront of immune defenses against *S. aureus* but is also one of the main means of spreading the infection.

Objective: To study *ex-vivo* the effect of vitamin C on the antibacterial activity of endothelial cells.

Materials and methods: Endothelial cells have been isolated from the human umbilical cord vein and grown to confluence. After two passages, the cells were infected with 25 or 50 multiplicities of infections (MOI) and treated with different doses of vitamin C (1, 4, 7, 10 mM). After incubation, phagocytic capacity, bactericidal activity and intracellular growth were measured.

Results : The phagocytic activity was significantly decreased compared to the control in the cells treated with 1, 4 and 7 mM doses at MOI 25 ($p < 0.01$), and with 10 mM dose at MOI 50 ($p < 0.05$). Similarly, intracellular bactericidal activity increased significantly at MOI 25 with 7 and 10 mM doses ($p < 0.05$) and MOI 50 with 1 and 4 mM doses ($p < 0.05$). Finally, all doses of vitamin C inhibited intracellular growth with a more pronounced effect for the 1 mM dose ($p < 0.01$).

Conclusions: These results suggest that vitamin C may modulate the antibacterial activity of endothelial cells towards *S. aureus*. The doses having a homogeneous effect on the antibacterial activity remain to be specified.

Keywords: Vitamin C, *S. aureus*, phagocytosis

ملخص

مقدمة : *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) هو سبب شائع للعدوى الشديدة و التهابات متكررة. قدرته على إفشال الاستجابات المناعية يفسر إلى حد كبير شدته. الخلية البطانية التي تمثل خط الدفاع الأول للمناعة ضد *S. aureus* تمثل أيضا وسيلة رئيسية لنشر العدوى.

الهدف : دراسة التأثير خارج الحي لفيتامين سي على النشاط المضاد للبكتيريا من طرف الخلايا البطانية.

المواد والطرق : تم عزل خلايا بطانة الأوعية الدموية من وريد الحبل السري البشري ونمت حتى الالتقاء. بعد مرورين اثنين تمت إصابة الخلايا بالعدوى بنسبة 25 أو 50 بكتيريا لكل خلية (MOI) ومعلجتها بجرعات مختلفة من فيتامين سي (1، 4، 7، 10 mM). بعد مرور فترة الحضانة تم قياس البلعمة، قدرة إبادة الجراثيم ، والنمو داخل الخلايا.

النتائج : انخفض نشاط البلعمة بشكل ملحوظ مقارنة بالمجموعة الضابطة في الخلايا المعالجة بجرعات 1، 4 و 7 mM بنسبة MOI 25 ($p < 0.01$)، و جرعة 10 mM بنسبة MOI 50 ($p < 0.05$). وبالمثل ارتفعت قدرة إبادة الجراثيم داخل الخلايا بشكل كبير عند نسبة MOI 25 بجرعات 7 و 10 mM ($0.05 < p$) و عند نسبة MOI 50 بجرعات 1 و 4 mM ($p < 0.05$). وأخيرا، منعت كل الجرعات من فيتامين سي النمو داخل الخلايا مع وجود تأثير أقوى لجرعة 1 mM ($p < 0.01$).

الاستنتاجات : هذه النتائج تشير إلى أن فيتامين سي بإمكانه تعديل النشاط المضاد للجراثيم للخلايا البطانية ضد *S. aureus* غير انه لا يزال يتعين تحديد الجرعات ذات تأثير موحّد.

كلمات البحث : فيتامين سي، النشاط المضاد للبكتيريا، *S. aureus*.

Avant-propos

Le présent mémoire entre dans le cadre de l'obtention du diplôme de master en Immunologie. Il a été réalisé au sein du laboratoire de biologie moléculaire et d'immunologie appliquée, dirigé par Monsieur Mourad Aribi.

Cette étude est avant tout le fruit d'un travail d'équipe. Je tiens à signifier ma reconnaissance à l'ensemble des personnes qui y ont contribué de près ou de loin.

Mes remerciements vont particulièrement à Monsieur Mourad ARIBI qui m'a permis de m'inscrire au master d'immunologie et m'a largement ouvert les portes du laboratoire.

Je tiens à remercier les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail.

J'exprime aussi ma reconnaissance envers Madame Sara Dahou pour tous ses efforts, sa disponibilité et ses précieux conseils.

Je tiens à formuler mes remerciement à l'endroit de;

Wafa Nouari, Zouheir Dahmani, Lamia Ysmail-Dahlouk ainsi qu'à tous les autres membres du laboratoire;

A Fadéla, Amina, Nassima, Yassine, Mouaad et à l'ensemble des masterants de la promotion 2016/2017 pour cette année très spéciale que j'ai passée parmi eux.

Enfin, à Loubna Bouhmama, pour nous avoir aimablement aidés en Maternité.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Résumé en arabe.....	v
Avant-propos.....	vi
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xi
Introduction.....	1
 Revue de la littérature.....	 3
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	3
1.1.1. Généralités.....	3
1.1.2. Epidémiologie.....	3
1.1.3. Caractéristiques microbiologiques.....	3
1.1.4. Facteurs de virulence.....	4
1.1.5. <i>S. aureus</i> et système immunitaire.....	5
1.1.6. Mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	7
1.2 Cellules endothéliales.....	7
1.2.1. Généralités.....	7
1.2.2. Origine cellulaire.....	8
1.2.3. Structure.....	9
1.2.4. Marqueurs.....	9
1.2.5. Fonctions.....	10
1.3 Vitamine C.....	15

1.3.1.	Généralités.....	15
1.3.2.	Structures chimiques.....	15
1.3.3.	Biosynthèse et absorption.....	16
1.3.4.	Métabolisme et biodisponibilité.....	17
1.3.5.	Effets et fonctions biologiques de la vitamine C	18
1.3.6.	Vitamine C et cellules endothéliales	19
Chapitre 2		23
Partie expérimentale		23
2.1.	Conception de l'étude	23
2.2.	Matériels et méthodes.....	23
2.2.1.	Culture cellulaire	23
2.2.2.	Etude de l'activité phagocytaire, bactéricide et bactériostatique.....	27
2.2.3.	Test de phagocytose	28
2.2.4.	Capacité bactéricide.....	28
2.2.5.	Croissance intracellulaire	29
2.3.	Analyse statistique des données.....	29
Chapitre 3		30
Résultats		30
3.1	Etude de l'activité phagocytaire	30
3.2	Etude de l'activité bactéricide intracellulaire	32
3.3	Etude de la croissance intracellulaire	33
Chapitre 4		34
Discussion		34
Chapitre 5		37
Conclusion		37
Chapitre 6		38
Conclusions et perspectives		38

Chapitre 7	39
Bibliographie.....	39

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Principales protéines de surface de <i>S. aureus</i> et leurs fonctions	5
Tableau 3.1. Activité phagocytaire, bactériostatique et bactéricide des HUVEC envers <i>S. aureus</i> avec MOI 25	31
Tableau 3.2. Activité phagocytaire, bactériostatique et bactéricide des HUVEC envers <i>S. aureus</i> avec MOI 50	31
Tableau 3.3. Valeurs de p calculées selon le test non paramétrique de Mann Whitney U entre différentes doses de vitamine C pour les tests de phagocytose, bactéricidie et croissance intra cellulaire de <i>S. aureus</i> à MOI 25 et 50	32

Liste des figures

Figure 1.1. <i>S. aureus</i> en microscopie électronique à balayage	4
Figure 1.2. Inhibition du complément et de la phagocytose par <i>S. aureus</i>	6
Figure 1.3. Origine des cellules endothéliales	8
Figure 1.4. Fonctions métaboliques et synthétiques des cellules endothéliales	10
Figure 1.5. Mécanismes d'hétérogénéité des cellules endothéliales	11
Figure 1.6. Structures des différentes jonctions endothéliales	12
Figure 1.7. Régulation de la thrombose, hémostase et fibrinolyse par les cellules endothéliales	13
Figure 1.8. Fonctions immunitaires des cellules endothéliales	14
Figure 1.9. Structures des espèces chimiques associées à la vitamine C. En bleu, les structures biochimiquement dominantes	16
Figure 1.10. Biosynthèse de l'acide ascorbique	17
Figure 1.11. Homéostasie de la vitamine C	18
Figure 1.12. Absorption et recyclage de la vitamine C par la cellule endothéliale	20
Figure 1.13. Modulation intracellulaire des effets délétères du sepsis sur les cellules endothéliales par l'ascorbate	21
Figure 2.1. Organigramme de l'étude	23
Figure 2.2. Isolation des cellules endothéliales. a : Lavage du cordon ombilical. b : Collecte des cellules endothéliales digérées par la collagénase	24
Figure 2.3. Ensemencement des cellules endothéliales dans la flasque	25
Figure 2.4. Cellules endothéliales confluentes à 80-90% observées au microscope optique inversé (x 40)	25
Figure 2.5. Microplaque à fond plat contenant la suspension de cellules endothéliales	26
Figure 3.1. Effet de la vitamine C sur l'activité phagocytaire des HUVEC	31
Figure 3.2. Effet de la vitamine C sur l'activité bactéricide intracellulaire des HUVEC sur <i>S. aureus</i>	32
Figure 3.3. Effet de la vitamine C sur la croissance intracellulaire de <i>S. aureus</i>	33

Liste des abréviations

A

AA : Acide ascorbique

Asc[•] : Radical ascorbate

AscH[•] : Ascorbate

AscH₂ : Acide ascorbique

Aur : Auréolysine

B

BH₄ : Tétrahydrobioptérine

BHIB : Brain-Heart Infusion Broth

BIOMOLIM : Laboratoire de biologie moléculaire appliquée et d'immunologie

C

C : Fraction du complément

CCL : chimiokines

CD : cluster de différenciation

CE : Cellules endothéliales

CHIPS : Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus*

Clf A : Clumping factor A

Clf B : Clumping factor B

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

Cna : Protéine de liaison au collagène ou collagène adhésine

CoA : Coagulase canonique

D

DHA : Acide déshydroascrobique

DMEM : Delbecco's Modified Eagle Medium

E

E-selectin : Endothelial selectin

Eap : Protéine d'adhérence extracellulaire

Ecb : Protéine extracellulaire de transport du complément

EDTA : Acide éthylène dinitrilotétra acétique

Efb : Protéine extracellulaire de transport du fibrinogène Fibrinogen-binding protein Efb

F

FAK : Focal adhesion kinase

Fbp : Fibronectin binding protein

fH : Facteur H

fI : Facteur I

FnBP : Protéine de liaison à la fibronectine

G

GLUT : Transporteurs de glucose Na⁺ indépendants

H

HBSS : Hank's balanced salt solution

HIF : Facteur de transcription induit par l'hypoxie

HUVEC : Cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine

I

I-CAM- 1 : Intracellular cell adhesion molecule 1

IFN- α : Interféron gamma

Ig : Immunoglobulines

IL : Interleukine

K

K-W : Test non paramétrique de Kruskal-Wallis

KDR : kinase insert domain receptor

L

LPS : Lipopolysaccharides

M

MW : Test non paramétrique de Mann Whitney U

MOI : Multiplicité d'infection

N

NO : Monoxyde d'azote

P

P-selectin : Platelet selectin

PBS : Phosphate buffer salin

PAF : Facteur d'activation plaquettaire

PFTs : Toxines formant des pores

PGF : Facteur de croissance placentaire

PGI₂ : Prostaglandine I₂

PI3K : Phosphoinositide-3-

PLG : Plasminogène

S

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

Sak : Staphylokinase

Sbi : Transporteur staphylococcique des immunoglobulines

SCIN : Inhibiteur staphylococcique du complément

SpA : Protéine staphylococcique A

SSL : Superantigènes-like

SVCT : Transporteur de vitamine C sodium Na⁺ dépendant

SVF : Sérum de vœu fœtal

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

T

t-PA Activateur du plasminogène tissulaire

TCR T cell receptor

TNF- α Tumor necrosis factor

U

UFC Unité formant colonie

V

V-CAM-1

VEGF Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VEGFR Récepteur du Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

vWbp Protéine de transport du vWF

vWF Facteur de Von Willebrand

Introduction

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) est une bactérie qui colonise de façon permanente la peau et les narines d'environ 30% de la population humaine alors que 60% sont colonisés occasionnellement (Foster, 2005; Thammavongsa et al., 2015). C'est également un germe invasif causant diverses infections allant de la peau et des tissus mous jusqu'aux septicémies (Thomer et al., 2016). Même correctement traitées, les infections à *S. aureus* ont la particularité d'être souvent récurrentes. De plus, elles concernent fréquemment des sujets immunocompétents ce qui démontre bien la capacité de ce germe à manipuler les réponses immunitaires innées et adaptatives (Thammavongsa et al., 2015). L'invasion de l'hôte par *S. aureus* entraîne une forte réponse inflammatoire impliquant le recrutement de neutrophiles et de macrophages, l'activation du complément par ses différentes voies ainsi que la production d'anticorps (Montgomery et al., 2014). Face à cet arsenal défensif, *S. aureus* oppose une série de facteurs de virulence incluant des protéines de surface qui favorisent l'adhésion cellulaire et lient des protéines pour échapper à la réponse immunitaire. *S. aureus* est en mesure de produire également des toxines qui ont des effets cytolytiques sur les cellules de l'hôte et des superantigènes qui contribuent aux symptômes du choc septique (Foster, 2005).

Les cellules endothéliales (CE), en plus de leurs nombreuses fonctions, sont impliquées dans les défenses immunitaires notamment envers *S. aureus*. Cet ensemble cellulaire profondément hétérogène qui tapisse la face interne de l'endothélium était considéré comme une membrane passive aux activités restreintes avant que ses fonctions synthétiques et métaboliques ne soient mieux précisées (Michiels, 2003). On sait actuellement que les CE interviennent, entre autres, dans l'hémostase, la coagulation et la fibrinolyse et qu'elles participent à l'angiogénèse, à la régulation du tonus vasculaire et aux réactions inflammatoires et immunitaires (Félétou, 2011). Face à une agression bactérienne, les CE ont la capacité de contrôler les mouvements des cellules immunitaires, de produire des cytokines et des chimiokines, d'augmenter l'expression de molécules d'adhésion et de présenter l'antigène à des effecteurs circulants (Mai et al., 2013). En outre, les CE sont douées d'activité phagocytaire. D'ailleurs l'internalisation et la croissance intracellulaire de bactéries à l'exemple de *S. aureus* est mise en avant pour expliquer la dissémination de certaines infections (Menzies and Kourteva, 1998a). L'une des caractéristiques constantes des septicémies est la dysfonction endothéliale médiée par la surproduction de radicaux libres (Oudemans-van Straaten et al., 2014).

Le rôle de la vitamine C dans les états septiques est bien connu (Mandl et al., 2009). Ce composé hydrosoluble participe à de nombreuses fonctions homéostatiques grâce à son

statut antioxydant. La vitamine C n'est pas synthétisée par l'organisme humain et doit être apporté par l'alimentation (Mandl et *al.*, 2009). La supplémentation en vitamine C dans les états septiques améliore les fonctions endothéliales en réduisant les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et en stimulant la production d'oxyde nitrique (NO). Cet effet est rapide et durable du fait de l'accumulation importante d'ascorbate dans les CE (Wilson, 2009). Par ailleurs, la vitamine C régule l'activité phagocytaire des macrophages au cours du sepsis, ce qui pourrait réduire la sévérité de l'état de choc (Victor et *al.*, 2000). Dans cette optique, nous proposons d'étudier l'effet de la vitamine C sur la capacité phagocytaire, bactériostatique et bactéricide des cellules endothéliales au cours de l'infection à *S. aureus*.

Chapitre 1

Revue de la littérature

1.1 *Staphylococcus aureus*

1.1.1. Généralités

S. aureus a été isolé pour la première fois par Alexandre Ogston qui lui donna le nom de staphylocoque en référence à l'aspect caractéristique des bactéries en grappe de raisin (Thomer et al., 2016). Bien que largement répandu comme un germe commensal, il est à l'origine d'un grand nombre d'infections pouvant être graves en raison du terrain fragile sur lequel elles se greffent et de l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques. Ces infections sont superficielles sous forme d'abcès ou d'impétigo, ou invasive comme l'arthrite, l'endocardite ou encore la septicémie (Foster, 2005).

1.1.2. Epidémiologie

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

1.1.3. Caractéristiques microbiologiques

S. aureus est une cocci de forme arrondie, mesurant environ 1 µm de diamètre, immobile, non sporulée et possédant le plus souvent une capsule polysaccharidiques. Les cocci sont regroupées en « grappe de raisin ». *S. aureus* est un germe Gram positif, catalase positif, coagulase positif et anaérobie facultatif (Figure 1.1).

Il se distingue par la coloration dorée de ses colonies, à laquelle il doit son nom, et qui est due à la présence de caroténoïde lié à la membrane (Thomer et *al.*, 2016).

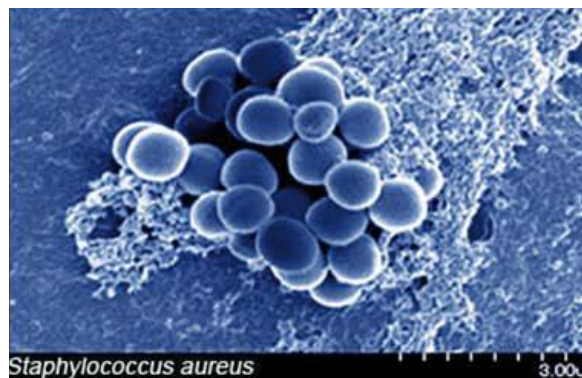


Figure 1.1 *S. aureus* en microscopie électronique à balayage (Vincenot, 2008)

1.1.4. Facteurs de virulence

La gravité des infections à *S. aureus* s'explique par son ubiquité, sa résistance aux antibiotiques notamment en milieu hospitalier, la diminution des défenses immunitaires des patients hospitalisés, mais aussi et surtout par des facteurs de virulence qui lui sont propres. *S aureus* exprime après invasion des facteurs d'adhésion, des toxines ou des enzymes.

1.1.4.1. Toxines

- **Toxines formant des pores (PFTs)** : Ce sont des toxines cytolitiques qui agissent en détruisant les cellules immunitaires de l'hôte par la formation de pores dans leurs membranes cellulaires et par l'altération de la barrière épithéliale ou endothéliale (Delta-hémolysine, leucotoxines, etc) (Los et *al.*, 2013).
- **Toxines à activité protéolytique ou anti-protéolytique** : Elles regroupent les sérines protéases dont les plus importantes sont les épidermolysines et les inhibiteurs de protéases parmi lesquels le « chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus* » (CHIPS). Le mécanisme d'action des épidermolysines est l'hydrolysatation des protéines sur un site spécifique. Leur principale cible est la desmogéline-1, une protéine importante de l'épiderme.
CHIPS agit en se fixant à l'anaphylatoxine C5a du complément et en empêchant le chimiotactisme des neutrophiles et des monocytes. Il agit en diminuant l'opsonisation et en altérant la maturation de la réponse immune adaptée (Otto, 2014)
- **Superantigènes** : Ce sont les plus puissants mitogènes des cellules T. Plus de trente superantigènes ont été identifiés pour *S. aureus*. Ces protéines dont les entérotoxines, sont capables d'interagir avec la liaison entre CMH de classe II du macrophage et le récepteur TCR des lymphocytes T entraînant la stimulation massive du système immunitaire avec

libération incontrôlée de cytokines proinflammatoires et notamment de facteur de nécrose tumoral (TNF- α), d'interleukine 1 (IL-1), d'interleukine 2 (IL-2) et d'interféron gamma (IFN- α) (Proft and Fraser, 2003).

1.1.4.2. Protéines de surface

S. aureus peut exprimer plus de 24 protéines de surface différentes. Leur expression dépend des conditions de croissance de la bactérie. Ces protéines ont un rôle crucial dans la survie et la croissance bactérienne aussi bien dans les conditions commensales que pathogènes. Une seule protéine peut avoir de multiples fonctions et parallèlement, plusieurs protéines peuvent avoir des fonctions redondantes (Foster et al., 2013; Kwiecinski et al., 2014)(Tableau 1.1).

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

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

1.1.5. *S. aureus* et système immunitaire

1.1.5.1 Mécanismes de défense de l'hôte

Suite à une brèche cutanée ou muqueuse, *S. aureus* se confronte au système immunitaire. L'infection localisée entraîne une forte réponse inflammatoire qui implique la migration des neutrophiles et des macrophages au site d'infection suite à la production de substances chémoattractantes. Ces cellules, avec la participation des anticorps sériques et du complément tentent de faire face à l'infection (Foster, 2005). Le rôle du complément est surtout l'opsonisation et la promotion de la phagocytose par les neutrophiles et les macrophages. Les microorganismes ainsi maîtrisés sont transportés vers les ganglions lymphatiques où les lymphocytes B se différencient et se multiplient pour produire des

anticorps et renforcer la réponse immunitaire (Thammavongsa et *al.*, 2015). *S. aureus* a cependant développé un arsenal de facteurs pour contourner cette réponse immunitaire.

1.1.5.2 Défenses de *S. aureus* contre le complément et les phagocytes

Parmi les nombreux moyens utilisés par *S. aureus* pour contourner la réponse immunitaire innée, il y a l'entrave à la migration des neutrophiles vers le site infecté par production de superantigènes-like 5 et 10 (SSL5 et SSL10) et de molécule CHIPS qui diminuent le chimiotactisme. *S. aureus* empêche également le roulement des neutrophiles sur l'endothélium. Pour bloquer les différentes voies du complément, *S. aureus* cible la protéine C3 et le complexe C3 convertase via l'inhibiteur staphylococcique du complément (SCIN) principalement. Il sécrète l'auréolysine qui clive et inhibe C3 et produit SSL7 qui inactive C5. Pour contrer l'opsonisation par les immunoglobulines, *S. aureus* sécrète la protéine A qui bloque leur fraction Fc (Figure 1.8) (Thammavongsa et *al.*, 2015). Pour échapper ainsi à la phagocytose, *S. aureus* sécrète la staphyloxanthine, la catalase et autres enzymes antioxydantes qui le protègent contre les espèces réactives d'oxygène (ROS). Il procède aussi à des modifications de son enveloppe pour renforcer sa résistance aux enzymes lysosomales (Thomer et *al.*, 2016). Enfin, *S. aureus* sécrète des toxines qui altèrent l'intégrité et le fonctionnement des cellules endothéliales comme les PFTs (Wilke and Bubeck Wardenburg, 2010) (Figure 1.2).

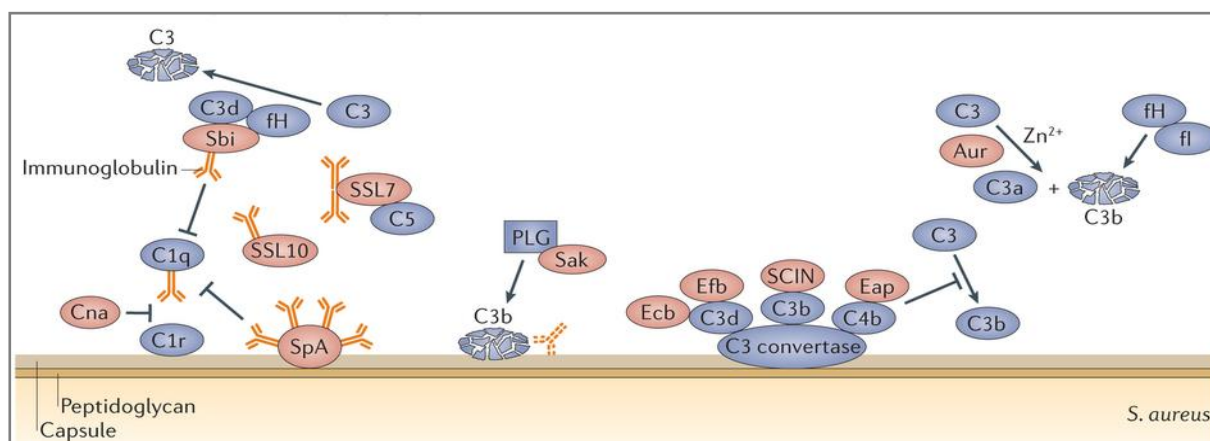


Figure 1.2 Inhibition du complément et de la phagocytose par *S. aureus* (D'après Thammavongsa et *al.*, 2015).

S. aureus sécrète des facteurs d'inhibition qui interfèrent avec l'opsonisation. Cna bloque l'association C1q lié aux Ig et C1r. SpA et Sbi liée aux Ig bloquent la liaison de C1q aux Ig. Sbi, SpA, SSL7 et SSL10 séquestrent les Ig pour les empêcher d'activer le complément. Sbi et SSL7 inactivent C3 et C5. Sak s'associe à PLG pour cliver C3b. Ecb, Efb, SCIN et Eap inhibent C3 convertase et Aur clive C3 produisant C3b qui sera dégradé par fH et fl. Cna : Collagène adhésine, Ig : immunoglobulines, SpA : protéine staphylococcique A, Sbi : transporteur staphylococcique des immunoglobulines, SSL7 et SSL10 : superantigènes 7 et 10, C3 et C5: fractions 3 et 5 du complément, Sak : staphylokinase, PLG : plasminogène, Ecb : protéine extracellulaire de transport du complément, Efb : protéine extracellulaire de transport du fibrinogène, SCIN : inhibiteur staphylococcique du complément, Eap : protéine d'adhérence extracellulaire, Aur : auréolysine, fH : facteur H, fl : facteur I.

1.1.5.3 Interférence de *S. aureus* avec l'hémostase

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

1.1.5.4 Dissémination septicémique de *S.aureus*

S. aureus passe à travers la barrière hématologique essentiellement en utilisant les CE auxquelles il adhère fortement via ses molécules d'adhésion en particulier les protéines de transport de la fibronectine (FnBPs). Après absorption par les CE, le mécanisme de sortie n'est pas connu. L'altération de la barrière endothéliale par les toxines constitue également une voie possible de dissémination de *S. aureus*. Enfin, la survie de *S. aureus* dans les cellules phagocytaires peut constituer un mécanisme de sortie de la circulation sanguine (Thomer et al., 2016).

1.1.6. Mécanismes de résistance aux antibiotiques

Plus que tout autre pathogène, *S. aureus* a démontré une habilité à développer de nouveaux mécanismes de résistance face à chaque nouvel antibiotique. Parmi ces mécanismes, il y a l'inactivation enzymatique de l'antibiotique (Pénicillinase), l'altération du ciblage de la bactérie par production d'une protéine de transport de faible affinité (Protéine de liaison à la pénicilline 2a) ou encore le piégeage de l'antibiotique. Des réarrangements génétiques complexes ont plus récemment été impliqués dans la résistance aux derniers antibiotiques (Linézolide, daptomycine) (Pantosti et al., 2007)

1.2 Cellules endothéliales

1.2.1. Généralités

Les cellules endothéliales composent l'unique lignée cellulaire qui tapisse la face interne des vaisseaux sanguins et forme ainsi, une interface entre les éléments sanguins circulants et les cellules parenchymateuses des différents organes (Ince et al., 2016).

Les CE atteignent un nombre estimé à $1-6 \times 10^{13}$ et représentent un poids d'environ 1 Kg dans l'organisme humain (Cines et al., 1998).

Reléguées initialement au rôle de simple barrière, les CE ont connu depuis les années 1980 un regain d'intérêt en raison de leur rôle central de mieux en mieux connu dans un large éventail de processus pathologiques (Fishman, 1982).

1.2.2. Origine cellulaire

Les CE dérivent du mésoderme, une couche cellulaire se trouvant entre l'ectoderme et l'endoderme et qui est à l'origine du tissu conjonctif, des cellules sanguines, vasculaires, musculaires et rénales.

Les CE et les cellules hématopoïétiques auraient le même précurseur, l'hémangioblaste, une cellule ayant un double potentiel cellulaire (Choi et al., 1998).

L'origine de son développement embryonnaire se trouve probablement dans l'étage ventral de l'aorte dorsale dans l'aorto-gonado-mésonephros, une région du mésoderme embryonnaire (Marshall et al., 1999).

L'hémangioblaste se transforme en cellule pré-endothéliale intermédiaire qui se différencie soit en s'engageant dans la lignée hématopoïétique, soit en angioblaste. Ce dernier à son tour se différencie soit en cellule musculaire lisse ou en précurseur de cellule endothéliale puis en cellule endothéliale (Boshoff and Weiss, 2002) (Figure 1.3).

Les CE, par la suite, peuvent se différencier en cellules mésenchymateuses ou en cellules musculaires lisses intimes (Arciniegas et al., 2000).

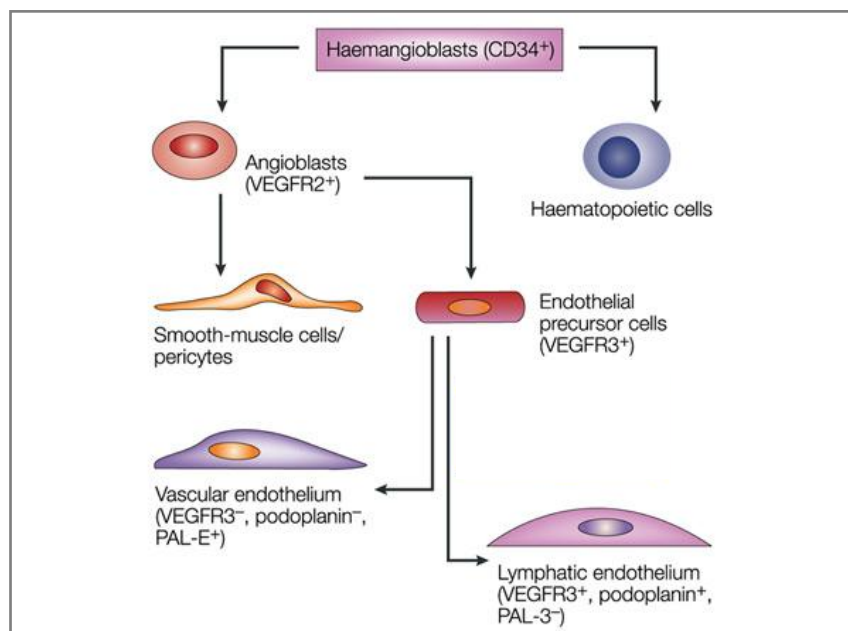


Figure 1.3 Origine des cellules endothéliales (D'après Bashoff and Weiss, 2002)

1.2.3. Structure

Les CE apparaissent histologiquement comme des cellules très aplaties, possédant un noyau central. Elles ont un diamètre et une épaisseur variables en fonctions des segments vasculaires. Les cellules et leurs noyaux sont orientés en direction du flux sanguin dans les portions artérielles droites mais pas aux points de bifurcation. Elles forment un aspect de pavé à l'intérieur du vaisseau et sont liées entre elles par des jonctions (Aird, 2007).

1.2.4. Marqueurs

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

- **CD34** : Il est exprimé par les CE jeunes et matures. N'étant pas exprimé par les CE lymphatiques dans les conditions normales, il permet de distinguer l'origine des cellules endothéliales (Rakocevic et *al.*, 2017).
- **CD31 (PECAM-1)** : C'est un récepteur de la superfamille des immunoglobulines. Il est exprimé par les CE jeunes et matures. Il participe au renforcement des jonctions entre deux cellules voisines. Il est crucial pour la transmigration leucocytaire durant l'inflammation, pour les réactions immunes et l'angiogénèse (Rakocevic et *al.*, 2017).
- **CD105 (endogelin)** : Il est exprimé par les CE en prolifération active et de ce fait, son expression est marquée durant l'angiogénèse notamment dans les tissus inflammatoires et tumoraux. Il revêt une importance capitale pendant la période embryonnaire (Rakocevic et *al.*, 2017).
- **La famille des récepteurs VEGF** : Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) est une protéine produite par des cellules et dont le rôle est de stimuler l'angiogénèse et la vasculogénèse. Il en existe sept isotypes connus dont cinq chez l'Homme (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F et le facteur de croissance placentaire – PGF) qui fonctionnent comme des mitogènes spécifiques des CE lymphatiques et vasculaires. L'action de VEGF s'exerce par l'interaction avec ses récepteurs VEGFR1 (KDR/Flk-1) et VEGFR2 (Flt-1). Ce sont des récepteurs de la famille des tyrosine-kinase.

VEGFR2 est fortement exprimé par les cellules CE mais il est aussi exprimé par les mégacaryocytes, les cellules souches hématopoïétiques, les progéniteurs endothéliaux et les plaquettes. L'interaction entre VEGF et ses récepteurs est essentielle pour le développement vasculaire embryonnaire et pour de nombreux autres processus physiologiques et pathologiques comme les maladies inflammatoires chroniques ou bien l'ischémie myocardique (Rakocevic et *al.*, 2017).

VEGFR3 (Flt-4), un autre récepteur VEGF à tyrosine kinase est surtout porté par l'endothélium lymphatique. Ses ligands sont le VEGF-C et le VEGF-D qui sont les principaux régulateurs de la lymphangiogenèse (Alitalo and Carmeliet, 2002).

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

Les CE issues de la veine du cordon ombilical humain (HUVEC) expriment des marqueurs exclusivement veineux comme EphB4 et COUPTFII et expriment aussi l'ensemble des marqueurs spécifiques exprimés par les cellules endothéliales.

1.2.5. Fonctions

L'accumulation de connaissances aussi bien sur la structure que sur les fonctions des cellules endothéliales depuis les années 1980 jusqu'à ce jour les a transposées du statut de membrane passive à celui de cellules dynamiques ayant des fonctions de synthèse et de régulation majeures. On sait aujourd'hui que les cellules endothéliales forment un tissu complexe avec des fonctions complexes et surtout adaptables aux besoins spécifiques selon le temps et l'espace. Ces différentes fonctions sont résumées dans la figure 1.4.

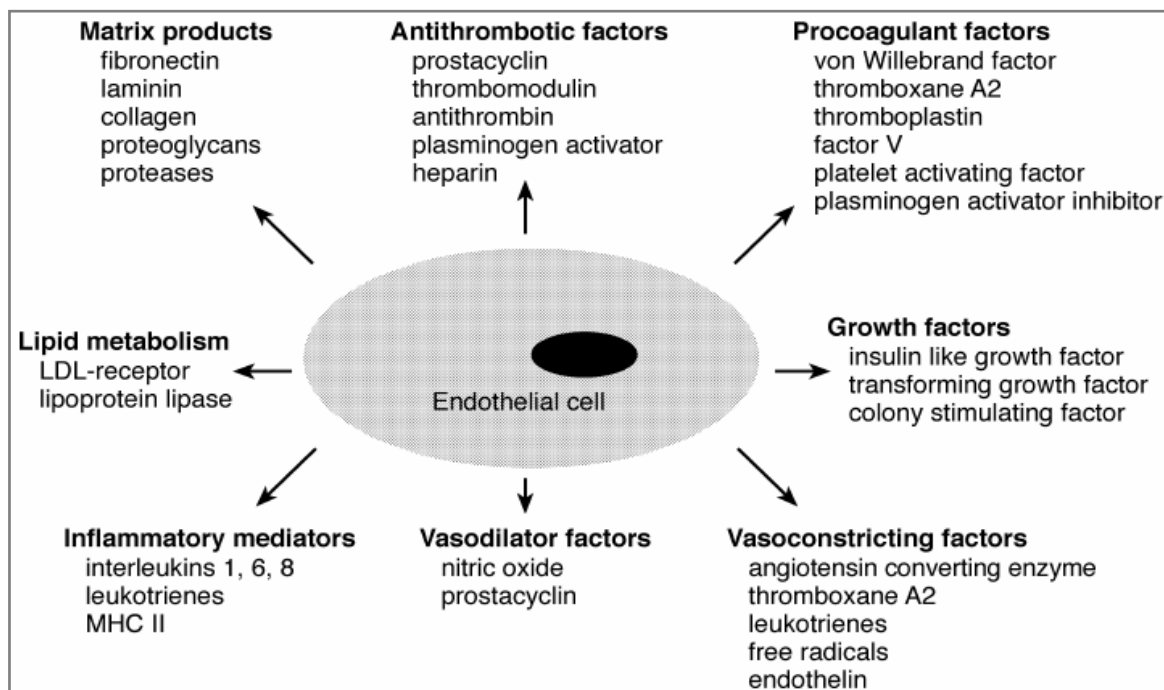


Figure 1.4 Fonctions métaboliques et synthétiques des cellules endothéliales (Galley, 2004)

1.2.4.1. Hétérogénéité des cellules endothéliales

La principale caractéristique des cellules endothéliales est certainement leur plasticité.

L'hétérogénéité structurale inclue différentes formes cellulaires, l'expression de différents types de jonctions, la variabilité dans l'épaisseur et la composition du glycocalyx, etc (Aird, 2007).

Bien qu'ayant des fonctions similaires, selon leurs positions dans l'arbre vasculaire, les cellules endothéliales exercent des fonctions prédominantes différentes, qui peuvent être immunitaires, métaboliques ou autre (Félétou, 2011).

Cette plasticité est expliquée par des facteurs génétiques ou environnementaux (Figure 1.5)

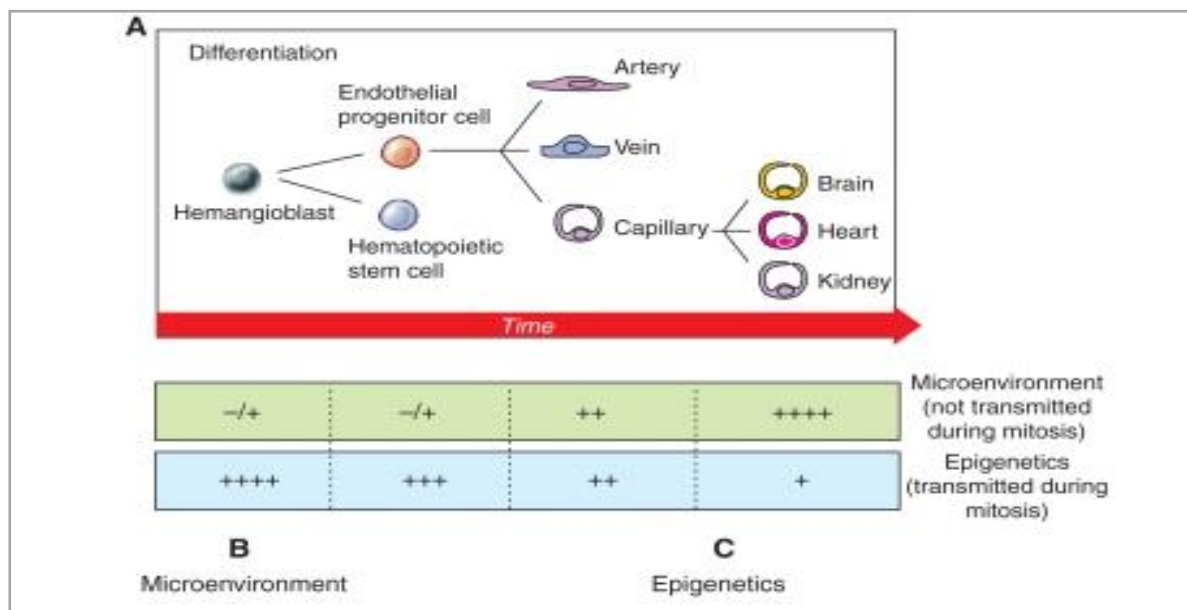


Figure 1.5 Mécanismes d'hétérogénéité des cellules endothéliales (D'après Aird, W.C.,2013)

1.2.4.2. Fonction de barrière vasculaire

L'endothélium représente une barrière semi-perméable qui contrôle le transfert de petites et grosses molécules. La surface d'échanges que constitue l'endothélium est estimée chez l'être humain à 350 m² (Pries et al., 2000).

Les cellules endothéliales sont reliées entre elles par trois types de jonctions : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les jonctions lacunaires (Figure 1.6). Ces structures sont impliquées dans le contrôle de la perméabilité vasculaire aux cellules. Leur régulation est coordonnée par les besoins fonctionnels de l'organe irrigué. La perte de cette fonction barrière peut conduire à un œdème extra-cellulaire (Michiels, 2003).

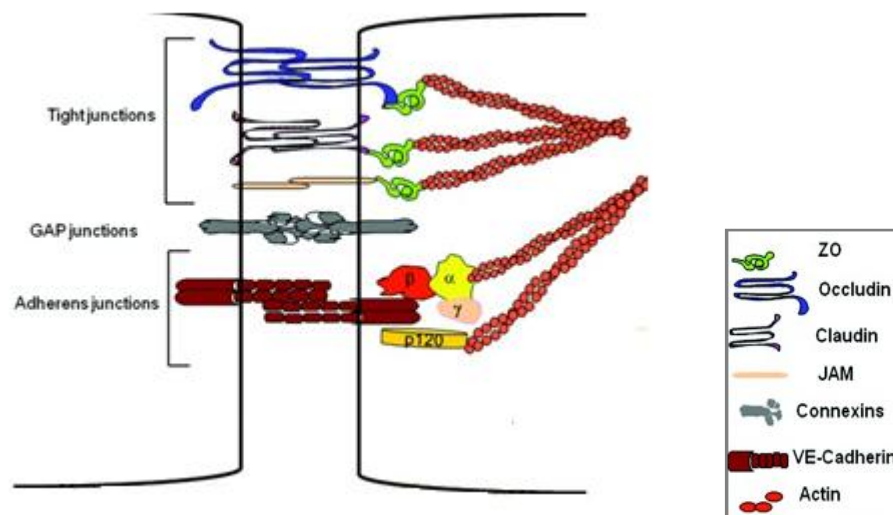


Figure 1.6 Structures des différentes jonctions endothéliales (D'après Sukriti, 2014). Occludine, claudines et molécules d'adhésion de jonction (JAM) composent le squelette de jonctions serrées, alors que la cadhérine endothéliale vasculaire (VE-cadhérine) est requise pour la formation de des jonctions adhérentes. La connexine forme les jonctions lacunaires. Les domaines intracellulaires fournissent une stabilité de jonction à travers leurs liens avec le cytosquelette d'actine via les caténines (α , β , γ et p120) ou la protéine zona occluden 1 (ZO).

1.2.4.3. Hémostase, coagulation et fibrinolyse

A l'état basal, la surface d'un endothélium sain est à la fois anticoagulante et antithrombotique (Figure 1.7).

Au repos, l'endothélium inhibe l'agrégation plaquettaire par production de NO et des prostacyclines (PGI₂) (Sumpio et al., 2002). Il inhibe également la coagulation par l'activation de la voie protéine C/protéine S qui inactive le facteur VIIIa et le Va. Enfin, l'endothélium active la fibrinolyse par production de l'activateur du plasminogène tissulaire (t-PA), et de l'urokinase qui permettent la transformation du plasminogène en plasmine qui dégrade les thrombi (Michiels, 2003).

Une lésion vasculaire ou une exposition à certaines cytokines ou stimuli proinflammatoires déplace la balance vers un profil procoagulant et prothrombotique de l'endothélium.

L'agrégation plaquettaire est activée par production du facteur d'activation plaquettaire (PAF) qui agit avec P-sélectine pour favoriser l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles à l'endothélium (Sumpio et al., 2002). Il y a également une libération du vWF qui provient principalement des CE. (Sumpio et al., 2002). Enfin, la coagulation est activée par l'exposition du facteur tissulaire qui lie le facteur VII. Dans les conditions basales, il est inactivé par l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire synthétisé par les CE.

Le vWF agit également en liant et en protégeant le facteur VIII (Sumpio et al., 2002).

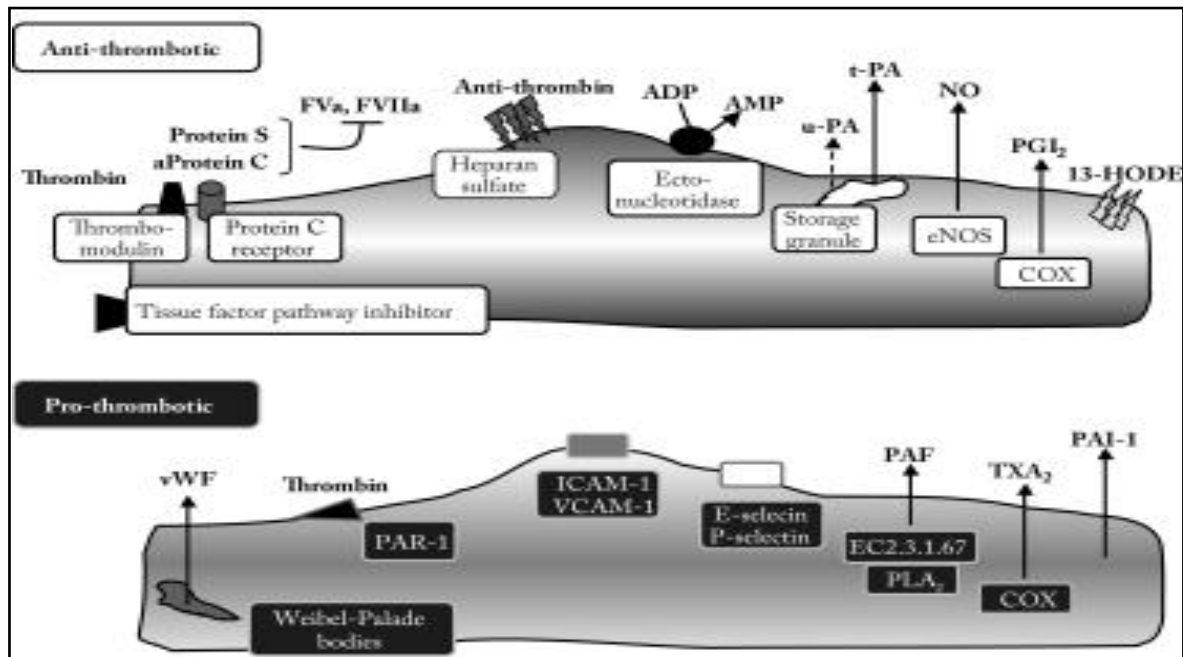


Figure 1.7 Régulation de la thrombose, hémostasie et fibrinolyse par les cellules endothéliales (Féléto, 2011). En Haut, au repos, prédominance du phénotype antithrombotique (Dégradation de l'ADP par les antinucléotidases et prévention de l'hémostasie primaire par expression du 13-hydroxyoctadecadiénoïque (13-HODE), libération de PGI₂ et de NO) et anticoagulant (Expression de thrombomoduline et du système protéine C/S, de l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire) et profibrinolytique (libération de t-PA). En bas, phénotype prothrombotique et procoagulant (Libération de vWF, TXA₂ et PAF, expression des molécules d'adhésion et production de PAI-1)

1.2.4.4. Angiogénèse et vasculogénèse

La quasi totalité des cellules des espèces vertébrées se trouvent à une distance de 50 à 100 µm d'un capillaire. Cette proximité est expliquée par un ajustement parfait du développement vasculaire répondant aux besoins tissulaires aussi bien durant le développement normal que dans les circonstances pathologiques (Alberts, 2002).

La vasculogénèse survient essentiellement en période embryonnaire par le rapprochement et la différenciations d'angioblastes (Michiels, 2003). Depuis la découverte des progéniteurs endothéliaux et de leur habilité à former de nouveaux vaisseaux, le terme de vasculogénèse n'est plus réservé à la période embryonnaire (Rakocevic et al., 2017). Les stades précoces de vasculogénèse requièrent le VEGF et son récepteur spécifique de la cellule endothéliale VEGFR2.

L'angiogénèse qui correspond à la formation de nouveaux vaisseaux à partir de l'endothélium préexistant requiert également le VEGF mais aussi les angiopoïétines qui participent au remodelage et à la maturation des vaisseaux initiaux (Michiels, 2003).

1.2.4.5. Immunité et réactions inflammatoires

En plus de leurs fonctions physiologiques précédentes, les CE ont un rôle crucial dans les réactions immunitaires.

Ce sont de véritables sentinelles du système immunitaire du fait de leur situation qui en fait l'une des premières lignées à interagir avec les microbes. Elles ont la capacité de limiter ou de faciliter le passage tissulaire des cellules immunitaires comme les lymphocytes T et les cellules dendritiques (Young, 2012). Suite à une interaction avec les lipopolysaccharides (LPS), elles produisent des cytokines proinflammatoires (IL-1 β , IL-3, IL-5, IL-6, etc) et des chimiokines (CCL2, CCL5, etc) qui amplifient la réponse immune en recrutant des cellules immunitaires. Une fois activées, les cellules endothéliales surexpriment des molécules d'adhésion (I-CAM-1, V-CAM-1, P-selectin, E-selectin, etc) favorisant ainsi la transmigration des leucocytes vers les sites inflammatoires. Les cellules endothéliales induisent également la production de cytokines par les cellules immunitaires sur lesquelles elles exercent une fonction régulatrice en activant ou en inhibant leur activité (Mai et al., 2013).

En tant que cellules présentatrices d'antigène, elles présentent l'antigène de classe I et de classe II à des effecteurs circulants ou à des lymphocytes T mémoires (Choi et al., 2004).

(Figure1.8).

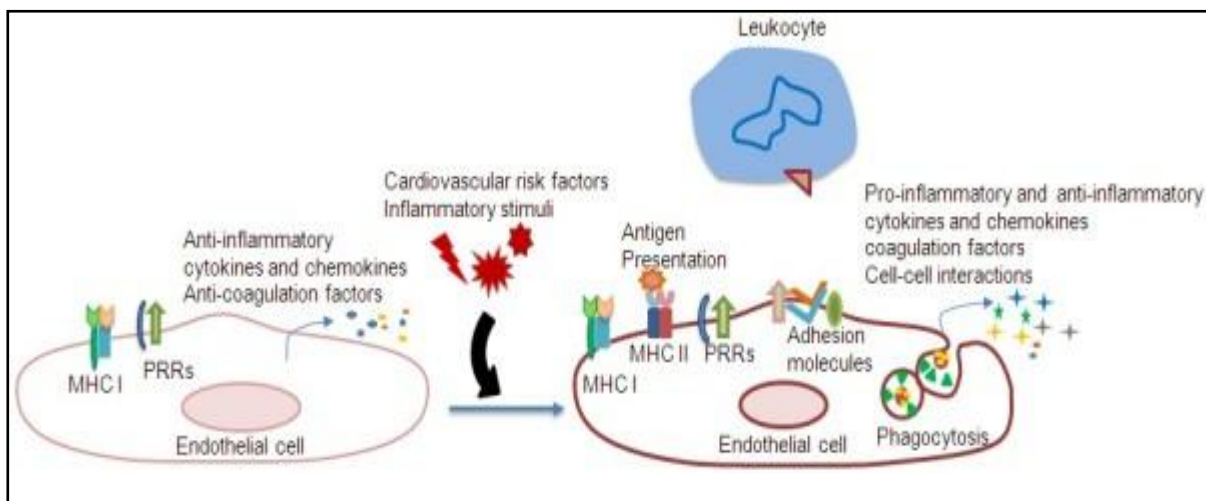


Figure 1.8 Fonctions immunitaires des cellules endothéliales (Mai et al., 2013). A l'état basal, les CE expriment CMH I et PRR. Après stimulation, les CE expriment CMH II et des molécules d'adhésion de surface, facilitent la transmigration et libèrent des cytokines inflammatoires et des chimiokines.

Par ailleurs, les CE sont considérées comme des phagocytes non professionnels et peuvent internaliser des hématies apoptotiques (Fens et al., 2012) ou bien des bactéries (Kozarov, 2012).

Les CE phagocytent *S. aureus* suivant des étapes précises allant de l'adhérence jusqu'à la formation de phagosome (Lowy et al., 1988). Par la suite, même après fusion lysosomale, les CE ne sont pas en mesure de tuer la bactérie ingérée. Ceci explique la fréquence et la persistance d'infections invasives à *S. aureus* impliquant des surfaces endothélialisées (Endocardite, infection sur cathéter, etc) (Menzies and Kourteva, 1998b) Cette invasion des CE par *S. aureus* a pour conséquence une cytotoxicité induisant la mort des CE par apoptose et une croissance bactérienne intracellulaire. De ce fait, *S. aureus* n'est plus considéré comme un germe exclusivement extracellulaire (Alexander and Hudson, 2001; Lowy et al., 1988).

1.3 Vitamine C

1.3.1. Généralités

La vitamine C, aussi appelée acide ascorbique (AA) a été isolée pour la première fois en 1923 par le biochimiste Hongrois Szent-Gyorgyi, qui obtint le prix Nobel de médecine en 1937. Quelques années plus tard, cette vitamine a été reliée à une maladie hémorragique appelée Scorbut. Elle a été ensuite synthétisée par Howarth et Hirst (Chambial et al., 2013; Covarrubias-Pinto et al., 2015).

Il s'agit d'un composé hydrosoluble possédant un grand potentiel antioxydant et qui intervient dans de nombreuses fonctions biologiques, mais pouvant paradoxalement exercer des effets pro-oxydants (Figueroa-Méndez and Rivas-Arancibia, 2015).

La carence en vitamine C est à l'origine de signes hémorragiques, d'anémie, de troubles neurologiques et musculaires alors que le surdosage n'entraîne pas d'effets majeurs (Chambial et al., 2013).

1.3.2. Structures chimiques

L'acide ascorbique (AscH_2) correspondant au nom trivial $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, est un composé hydrosoluble possédant deux groupes hydroxyls. Il se présente sous plusieurs formes chimiques parmi lesquelles la forme monoanionique (AscH^-), l'ascorbate, est physiologiquement prédominante (Chambial et al., 2013). Les autres isoformes métaboliquement actives sont : le radical ascorbate ($\text{Asc}^\cdot$), l'acide déshydroascrobique (DHA) (Figure 1.9).

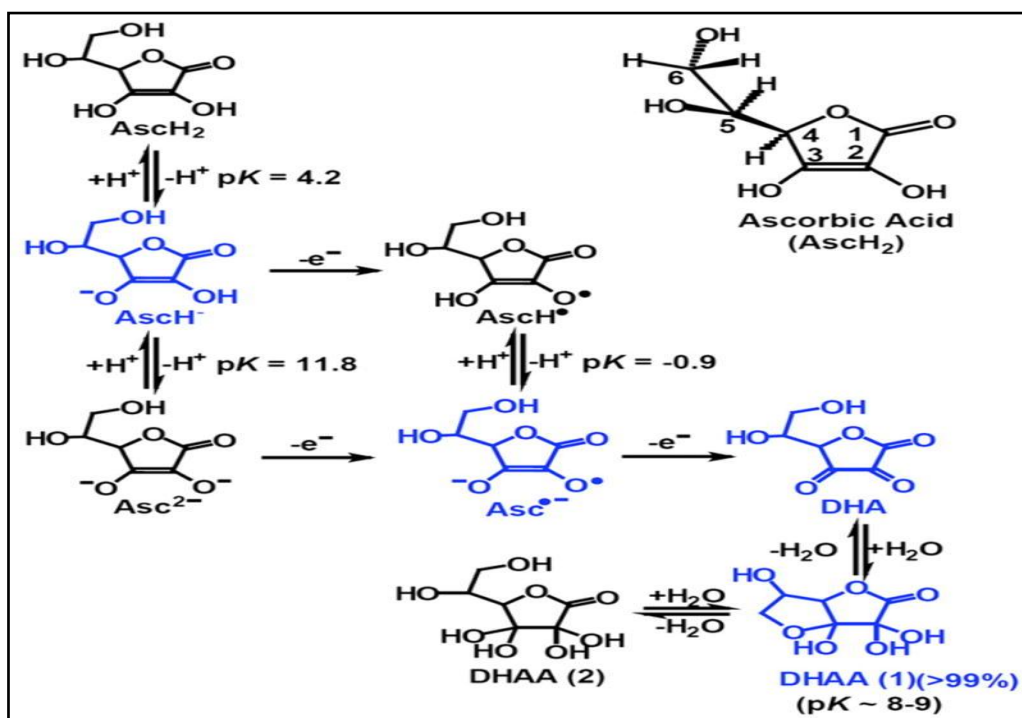


Figure 1.9 Structures des espèces chimiques associées à la vitamine C. En bleu, les structures biochimiquement dominantes (Du J and al, 2012)

1.3.3. Biosynthèse et absorption

Les plantes et la majorité des animaux produisent l'acide ascorbique à partir du glucose (Figure1.10).

Chez les humains, la biosynthèse d'AA ne peut pas se faire et les apports alimentaires sont de ce fait, indispensables.

Les aliments riches en vitamines C sont les agrumes, le poivron, les fraises, les tomates, etc. L'AA est dénaturé par l'air, la lumière, la chaleur et est rapidement détruit si sa conservation est prolongée. La vitamine C apportée par l'alimentation se trouve sous forme d'ascorbate ou de DHA.

L'absorption, contrôlée de près, a lieu dans les entérocytes (Du et al., 2012).

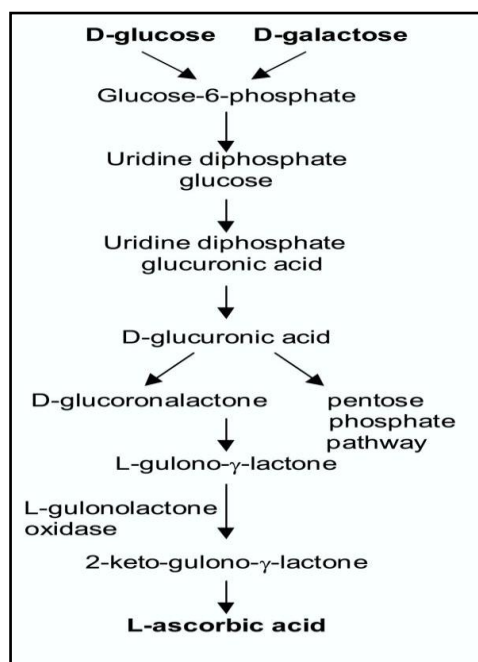


Figure 2.10 Biosynthèse de l'acide ascorbique (Naidu KA, 2003)

1.3.4. Métabolisme et biodisponibilité

L'acide ascorbique apporté par l'alimentation est prêt à être absorbé par les entérocytes de l'intestin grêle. L'ascorbate s'accumule dans les cellules par des transporteurs de vitamine C sodium (Na^+) dépendants (SVCTs) : SVCT1 et SVCT2, alors que le DHA est absorbé via des transporteurs de glucose Na^+ indépendants (GLUT) (Nualart, 2014).

SVCT1 dont l'affinité pour l'ascorbate est faible, est exprimé par les tissus épithéliaux et est responsable de l'absorption intestinale et de la réabsorption rénale.

SVCT2 est exprimé par les cellules non-épithéliales et notamment endothéliales (Carr and Vissers, 2013; May and Harrison, 2013).

Des concentrations intracellulaires élevées en ascorbate sous-régulent les SVCTs et entraînent une baisse de l'absorption intestinale alors que des concentrations faibles ont l'effet inverse (Figure 1.11).

La biodisponibilité est déterminée par l'absorption intestinale et la réabsorption rénales (Du et al., 2012).

La demi-vie est de 10 à 20 jours avec une concentration plasmatique d'environ 50 $\mu\text{mol/L}$ (Naidu, 2003). La concentration intracellulaire d'ascorbate est plus élevée que dans les liquides extracellulaires (Du et al., 2012).

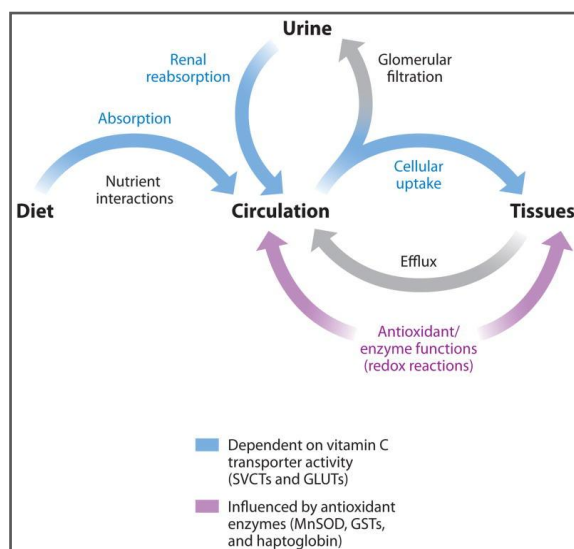


Figure 1.11 Homéostasie de l'acide ascorbique (Michels AJ, 2013)

1.3.5. Effets et fonctions biologiques de la vitamine C

Toutes les fonctions biologiques de la vitamine C sont dues à ses propriétés oxydo-réductrices et notamment à son habilité à donner des électrons.

1.2.1.1 Fonctions biochimiques

L'ascorbate est un cofacteur des hydroxylases et des mono-oxygénases. Ces deux enzymes sont impliquées dans la synthèse du collagène, principale protéine constitutive de plusieurs tissus (ex : peau, os, dents, vaisseaux sanguins, etc), de la carnitine et des neurotransmetteurs. L'AA accélère l'hydroxylation de la proline et de la lysine qui jouent un rôle dans la synthèse du collagène. IL est essentiel pour la synthèse de la carnitine musculaire impliquée dans le transfert des acides gras dans la mitochondrie à des fins de production énergétique. C'est aussi un cofacteur de l'enzyme dopamine-béta-hydroxylase qui catalyse la conversion de la dopamine en norépinéphrine. L'ascorbate est nécessaire pour la transformation du cholestérol en acides biliaires empêchant son accumulation.

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

1.2.1.2 Effets pro-oxydants

Dans certaines conditions (faible concentration, présence d'ions libres de fer ou de cuivre, etc), la vitamine C peut avoir un effet pro-oxydant (Mandl et al., 2009). Cet effet qui peut paraître désavantageux peut avoir des bénéfices notamment dans certains cancers

(Putchala et al., 2013). Il apparaît néanmoins que ces effets *in vivo* sont moindres par rapport à ceux antioxydants (Naidu, 2003).

1.2.1.3 Effets sur le système immunitaire

La vitamine C affecte pratiquement tous les composants du système immunitaires.

La concentration intracellulaire en vitamine C des phagocytes et des lymphocytes est largement supérieure à celle du plasma. Le processus de phagocytose entraîne la libération d'agents oxydants délétères qui peuvent être réduits par la vitamine C (Hemilä, 2009).

Lors du sepsis, la vitamine C influence l'activité des macrophages en régulant le processus de phagocytose par la diminution de l'adhésion, du chimiotactisme, de l'internalisation et aussi de la production superoxyde. La phagocytose s'accompagne de libération de cytokines et de radicaux libres impliqués dans la pathogénèse du choc septique (Victor et al., 2000).

De plus, l'ascorbate possède des effets bactériostatiques (Oudemans-van Straaten et al., 2014).

La vitamine C renforce de nombreuses fonctions des neutrophiles comme le chimiotactisme, l'ingestion de particules, etc (Leibovitz and Siegel, 1978).

Son effet sur l'immunité cellulaire semble plus marqué que sur l'immunité humorale (Animashaun et al., 1990)

La vitamine C renforce la barrière cutanée en synergie avec d'autres micronutriments et répare les dégâts cellulaires secondaires au stress oxydatif. Elle renforce la réponse immune de type Th1 médiée par les cytokines. Elle protège également les cellules immunitaires contre les radicaux libres (Chambial et al., 2013).

Par ailleurs, des taux plasmatiques faibles d'ascorbate sont associés à plusieurs états pathologiques notamment au sepsis (Wilson, 2009). Dans ce sens, des études ont montré l'effet positif de la vitamine C sur le renforcement de la réponse immunitaire au cours du sepsis et son rôle bactériostatique notamment vis-à-vis de *S. aureus* (Kallio et al., 2012a; Wilson, 2009).

1.3.6. Vitamine C et cellules endothéliales

1.2.1.4 Mouvements cellulaires

L'entrée de l'ascorbate dans la cellule endothéliale se fait principalement à travers le transporteur SVTC2 que la plupart des CE expriment (May and Qu, 2009). Il peut également pénétrer sous forme de DHA par transfert facilité à travers les récepteurs ubiquitaires GLUT. Il sera rapidement réduit en ascorbate (Meredith et al., 2011).

Une fois dans la cellule, il exerce ses fonctions en cédant un électron à différentes espèces de radicaux libres (fer ferrique, superoxyde, etc). Le radical ascorbate ($\text{Asc}^\cdot$) qui en résulte est rapidement réduit en ascorbate ($\text{AsCH}^\cdot$) par les NADPH réductases (Figure 1.12).

Les mécanismes de libération d'ascorbate par les cellules demeurent incertains, mais on sait qu'elle est renforcée par l'augmentation de calcium intracellulaire (Figuerola-Méndez and Rivas-Arancibia, 2015).

Les concentrations intracellulaires d'ascorbate sont plutôt basses, de l'ordre de 2 à 4 mM (May and Harrison, 2013).

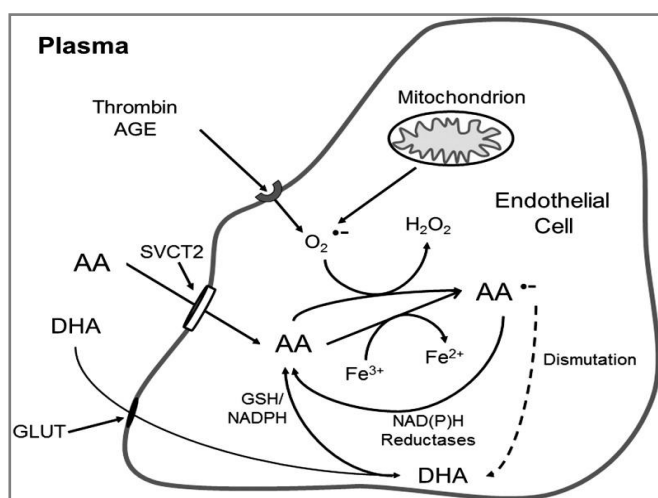


Figure 1.12 Absorption et recyclage de l'ascorbate par la cellule endothéliale (May, James M, 2013).

L'ascorbate pénètre dans la cellule principalement par SVCT2, et accessoirement sous forme de DHA par GLUT pour être réduit rapidement en ascorbate. À l'intérieur, il peut donner un électron au Fe^{+3} à O_2^- ou aux autres radicaux libres mitochondriaux ou générés par l'activation de récepteurs de surface comme le récepteur de thrombine ou des produits finis de la glycation (AGE). $\text{AA}^\cdot$ qui en résulte est réduit en ascorbate par NADPH réductase ou dismuté en AA et DHA .

1.2.1.5 Fonctions cellulaires

1.2.1.5.1 Rôle antioxydant

L'ascorbate participe à l'élimination du superoxyde par la superoxyde dismutase et diminue de ce fait également le peroxy-nitrite. Son action antioxydante est au moins aussi importante que celle du glutathion (May and Harrison, 2013).

1.2.1.5.2 Rôle d'enzyme cofacteur

La fonction d'enzyme cofacteur exercée par l'ascorbate et décrite précédemment est également présente dans les cellules endothéliales.

1.2.1.5.3 Prolifération cellulaire et apoptose

En culture, l'ascorbate stimule la prolifération cellulaire et la formation de structures analogues aux capillaires, grâce à sa capacité de stimuler la synthèse du collagène de type IV (Schor et al., 1983; Shekhonin et al., 1987). Il a également un effet préventif sur l'apoptose des CE induite par différents agents (May and Harrison, 2013).

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

1.2.1.5.4 Modulation du tonus vasculaire

L'ascorbate favorise la vasodilatation vasculaire dépendante du monoxyde d'azote en préservant le NO intracellulaire notamment par le recyclage du tétrahydrobioptérine (BH4) (May and Harrison, 2013).

1.2.1.5.5 Supplémentation en vitamine C et fonctions endothéliales

Du fait de la grande implication de la vitamine C dans le fonctionnement cellulaire endothélial, on peut s'attendre à ce que la supplémentation alimentaire apporte des effets bénéfiques dans les maladies caractérisée par un dysfonctionnement endothélial.

En effet, en 2014, une méta-analyse confirme cet effet bénéfique dans le diabète, l'athérosclérose et l'insuffisance cardiaque. En revanche, aucun effet positif n'a été constaté chez des sujets sains, fumeurs ou hypertendus (Ashor et *al.*, 2014).

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

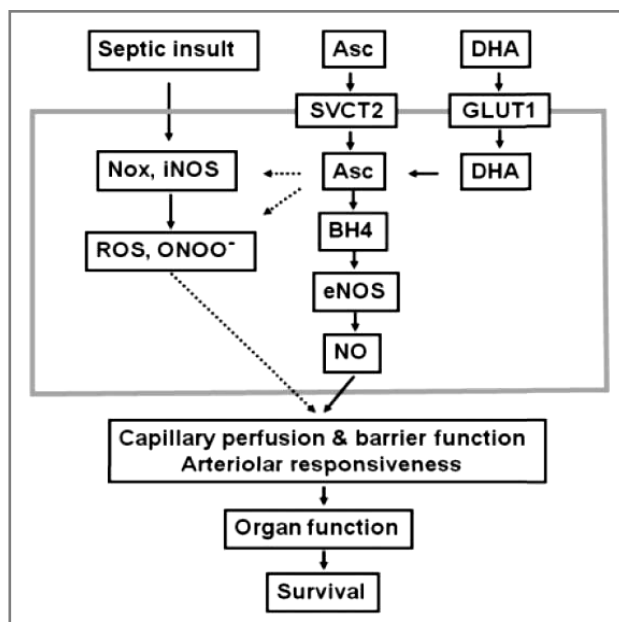


Figure 1.13 Modulation intracellulaire des effets délétères du sepsis sur les cellules endothéliales par l'ascorbate (Wilson, John X, 2009). La cellule endothéliale est représentée par le grand rectangle. Les lignes continues signifient stimulation alors que les lignes discontinues signifient l'inhibition. Le sepsis stimule la NADPH oxydase (Nox) et l'oxyde nitrique synthase inducible (iNOS) qui augmentent les ROS et le peroxy-nitrique (ONOO⁻). Ces radicaux libres ont des effets néfastes sur les fonctions vasculaires. L'ascorbate récupère les radicaux libres et stimule eNOS (Oxyde nitrique synthase endothéliale) qui dépend de BH4 (Tétrahydrobioptérine) pour augmenter le NO. L'Asc inhibe aussi Nox et iNOS.

Problématique et objectif**Problématique**

Staphylococcus aureus est une bactérie fréquemment responsable d'infections sévères et récurrentes. Sa capacité à déjouer les réponses immunitaires explique en grande partie sa virulence. La cellule endothéliale se situe en première ligne des défenses immunitaires contre *S. aureus* mais représente aussi l'un des principaux moyens de dissémination de l'infection. En effet, la cellule endothéliale douée d'activité phagocytaire peut internaliser *S. aureus* mais les facteurs de virulence exprimés permettent le plus souvent à la bactérie d'échapper à la lyse intracellulaire, de poursuivre sa croissance et même de se disséminer à travers la paroi endothéliale. De ce fait, les cellules endothéliales constituent une cible thérapeutique potentielle pour le traitement des infections staphylococciques.

Il est admis que la vitamine C, substance antioxydante par excellence, apporte des effets positifs lors du sepsis notamment à travers son action sur les cellules endothéliales. Cependant ses effets immunomodulateurs sur les cellules endothéliales au cours de l'infection à *S. aureus* ne sont pas connus. Dans cette perspective, nous proposons d'étudier l'effet de la vitamine C sur les capacités antibactériennes des cellules endothéliales au cours de l'infection à *S. aureus*.

But

Montrer que la vitamine C peut influencer l'activité antibactérienne de la cellule endothéliale lors d'infections à *S. aureus*

Objectif

Evaluer la capacité phagocytaire et le pouvoir bactéricide et bactériostatique des HUVEC infectées par *S. aureus*.

Chapitre 2

Partie expérimentale

2.1. Conception de l'étude

Les expériences ont été réalisées sur des cellules endothéliales obtenues par culture de cellules provenant d'une veine ombilicale humaine (HUVEC). Une fois confluentes, les cellules ont été infectées par *S. aureus* puis traitées ou non avec quatre doses différentes de vitamine C. Ensuite, les capacités phagocytaires et bactéricides ont été étudiées (Figure 2.1)

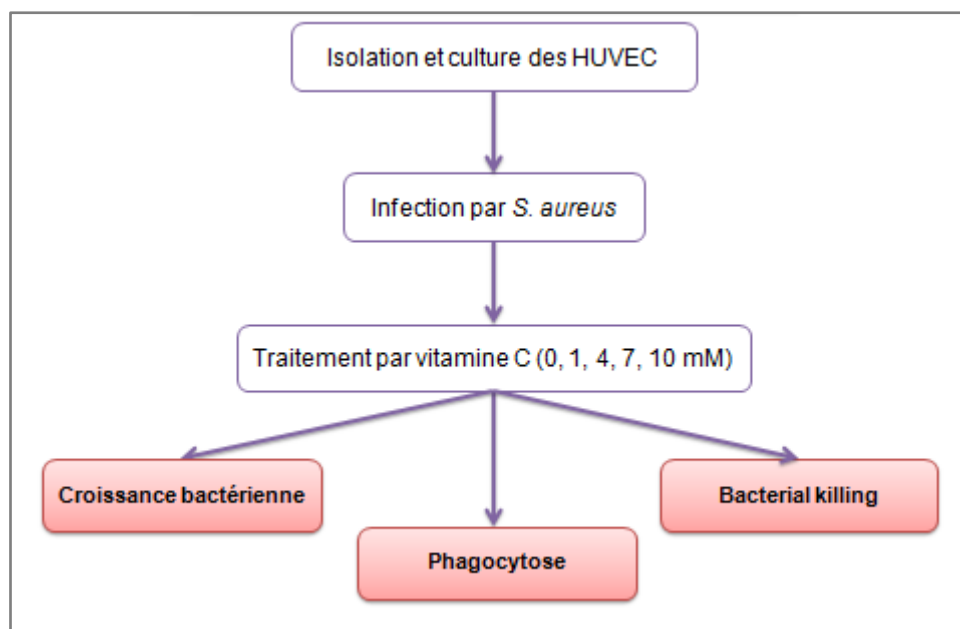


Figure 3.1 Organigramme de l'étude

2.2. Matériel et méthodes

2.2.1. Culture cellulaire

L'isolation des cellules endothéliales issues de la veine du cordon ombilical humain et leur mise en culture ont été réalisées selon la méthode utilisée par Davis et *al.*, modifiée selon la méthode de Marin et *al.* (Davis et *al.*, 2007; Marin et *al.*, 2001). Des conditions d'asepsie strictes ont été respectées durant toute la période expérimentale.

2.1.1.1. Récupération du cordon ombilical

Le cordon ombilical provenait d'une parturiente saine HIV négative et HBS négative, non obèse et non fumeuse, ayant donné naissance à un enfant vivant et sain dans la maternité de l'établissement hospitalier spécialisé Mère et Enfant de Tlemcen, après consentement éclairé. Le cordon a été récupéré juste après la délivrance. La portion prélevée a été conservée à une température de 4°C dans un tampon du cordon additionné de pénicilline à 100 UI/mL et acheminée directement au Laboratoire de recherche de biologie moléculaire et d'immunologie appliquée (BIOMOLIM). Le cordon retenu n'était pas endommagé.

2.1.1.2. Isolation des cellules endothéliales

La technique utilisée consistait à laver le cordon avec une solution tampon Hank's balanced Salt (HBSS) préchauffée ne contenant pas de Ca^{+2} ou de Mg^{+2} puis à catéthériser la veine ombilicale avec une aiguille épicroânienne 21G montée d'une seringue. Après lavage de la veine avec HBSS, le cordon a été clampé à sa deuxième extrémité et une quantité de collagénase à 0.1%, suffisante pour remplir la veine, a été injectée. Une fois la veine remplie, le tout a été immergé dans un bain-marie de solution phosphate buffer salin (PBS), supplémentée par du Ca^{2+} et du Mg^{2+} à 37°C. Après 15 minutes d'incubation, le cordon a été coupé à hauteur du clamp. Ensuite, la veine a été perfusée par une solution de lavage (HBSS) pour récupérer la solution de digestion contenant HUVEC dans un tube conique stérile à 50mL. Le tube était prérempli par 10ml de milieu d'enrichissement «Delbecco's Modified Eagle Medium » (DMEM) complet (Additionné de 2 mM de L-glutamine, 20% de sérum de veau foetal (SVF), 100U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de Streptomycine) (Figure 2.2).



Figure 2.2 Isolation des cellules endothéliales. a : Lavage du cordon ombilical. b : Collecte des cellules endothéliales digérées par la collagénase

2.1.1.3. Mise en culture

Le tube contenant HUVEC a été centrifugé à 1200 RPM pendant 5 minutes, puis relavé trois fois avec PBS. Après le dernier lavage, le culot cellulaire a été suspendu dans DMEM complet et la suspension cellulaire a étéensemencée dans une flasque de 25 cm² pré-enduite de gélatine, et incubée à 37°C et à 5% de CO₂ dans une atmosphère humide (Figure 2.2).

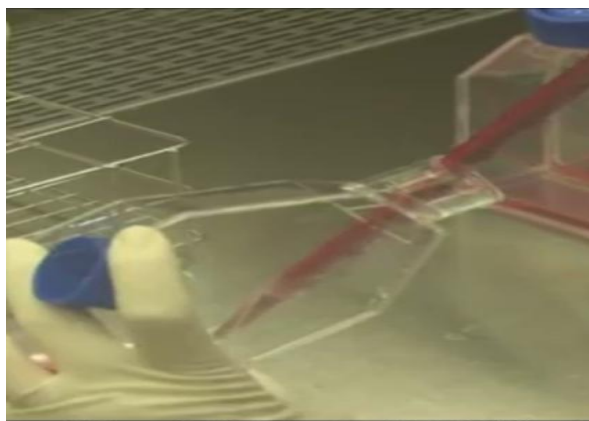


Figure 4.2 Ensemencement des cellules endothéliales dans la flasque

Le milieu de culture a été remplacé le lendemain, après lavage au PBS, puis tous les deux jours jusqu'à confluence cellulaire. La confluence était vérifiée à chaque changement du milieu de culture par l'observation des cellules endothéliales au microscope optique inversé. Une confluence de 80 à 90% était recherchée (Figure 2.3).

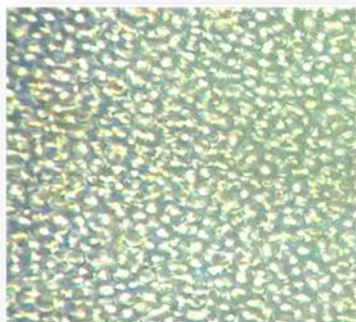


Figure 2.3 Cellules endothéliales confluentes à 80-90% observées au microscope optique inversé (x 40)

2.1.1.4 Détachement des HUVEC

Les cellules confluentes ont été lavées avec PBS sans Ca^{+2} et Mg^{+2} et suspendues dans une solution contenant 0.05% de trypsine et 0.02% d'EDTA (Acide éthylène dinitrilotétra acétique) pendant 2 minutes à 37°C. Après détachement cellulaire, l'activité de la trypsine a été stoppée par l'adjonction de milieu de culture complet. La suspension cellulaire a été centrifugée, puis lavées trois fois avec PBS. Enfin, le culot a été resuspendu dans DMEM complet, puis, après agitation, la suspension cellulaire a étéensemencée dans deux nouvelles flasques pour un deuxième passage.

Après deux passages, les HUVEC ont été détachées de la même manière et ensemencées sur des microplaques à fond plat contenant 24 puits pré-enduits de gélatine et incubées à 37°C à 5% de CO_2 en atmosphère humide (Figure 2.4). Le nombre de cellules par puits était de 10^6 , calculé après dénombrement cellulaire.



Figure 2.4 Microplaque à fond plat contenant la suspension de cellules endothéliales

2.1.1.5. Dénombrement et mesure de la viabilité des HUVEC

Pour le dénombrement cellulaire, le test d'exclusion cellulaire au bleu de trypan a été utilisé. 20 μL de suspension cellulaire ont été mélangés avec 20 μL de Bleu de trypan puis une goutte de cette solution a été déposée puis fixée sur un hématimètre de Malassez et observée en microscopie optique. La concentration cellulaire a été calculée comme suit :

$$C = \frac{\text{Nombre de cellules dénombrées dans 10 rectangles} \times 2 \times 10^5}{10}$$

C correspond au nombre de cellules par mL.

La viabilité cellulaire a été déterminée par le nombre de cellules vivantes c'est-à-dire réfringentes sur le nombre total des cellules.

$$\% \text{ de viabilité} = \frac{\text{Nombre de cellules vivantes}}{\text{Nombre total des cellules dénombrées}}$$

Les HUVEC contenue dans les microplaques ont été utilisées après confirmation d'une viabilité cellulaire de plus de 98 à 99%.

2.2.2. Etude de l'activité phagocytaire, bactéricide et bactériostatique

L'expérience a été réalisée comme décrit par Hamill et *al* avec quelques modifications (Hamill et *al.*, 1986).

2.2.2.1 Infection des HUVEC et traitement par vitamine C

Des bactéries de type *S aureus* de souche **ATCC 25923** ont été revifiées dans le milieu de culture BHIB (Brain-Heart Infusion Broth) et incubées pendant 18 heures à 37°C pour atteindre une phase de croissance logarithmique. Ensuite, elles ont été récoltées par centrifugation à 3000G pendant 5 mn, lavées deux fois au PBS puis une fois au DMEM avant d'être resuspendues dans DMEM complet et ajustées à une densité optique de 1.0 à 650 nm.

Avant infection, les puits contenant HUVEC ont été lavés trois fois avec PBS.

La suspension bactérienne a été répartie dans plusieurs tubes et supplémentée ou pas par différentes doses de vitamine C (1, 4, 7, 10 mM). Des volumes correspondant à la multiplicité d'infection (MOI) désirée ont été prélevés de chaque tube et ajoutés aux puits contenant les cellules endothéliales, ensuite les puits ont été remplis par DMEM complet pour un volume final de 1 mL par puits. Des puits contrôles contenant les cellules endothéliales traitées aux différentes doses de vitamine C et non infectés ont été également préparés. Les plaques ont été incubées pendant 2 heures à 37°C, à 5% de CO₂, en atmosphère humide et à l'abri de la lumière.

Des microplaques témoins contenant uniquement la suspension bactérienne mélangée avec les mêmes concentrations de vitamine C ont été préparées.

Les cellules ont été infectées à une MOI de 25 et de 50 (C'est-à-dire respectivement 25 et 50 bactéries pour une cellule endothéliale).

La viabilité des cellules endothéliales après infection a été vérifiée par dénombrement cellulaire au Bleu de Trypan.

2.2.3. Test de phagocytose

Les essais ont été réalisés à 0 (t_0) et à 1 heure (t_1) sur un mélange de cellules endothéliales infectées par *S. aureus* à une MOI de 25 et de 50 et sur la bactérie seule (2.5×10^7 , 5×10^7 cfu/mL respectivement) comme témoin en présence des différentes doses de vitamine C.. Après prélèvement des surnageants, des séries de dilutions ont été préparées (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) puis inoculées sur des pétris stériles coulées en gélose de Chapman afin de compter après 24 heures le nombre de bactéries extracellulaires viables par unités formant une colonie (CFU).

Le pourcentage de phagocytose à t_1 correspondant au pourcentage de diminution du nombre de bactéries extracellulaires entre t_0 et t_1 et à a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ de phagocytose} = H_0 - 100 \times \frac{E_1 / \frac{C_1}{C_0}}{H_0}$$

H_0 est le nombre de bactéries dans le mélange à t_0 , E_1 est le nombre de bactéries extracellulaires dans le mélange à t_1 , enfin C_0 et C_1 représentent les contrôles à t_0 et t_1 respectivement.

2.2.4. Capacité bactéricide

Des puits contenant les cellules endothéliales infectées et traitées ou non aux différentes doses de vitamine C ont été lavés trois fois avec PBS et supplémentés par 50 µg/ml de gentamycine afin de lyser les bactéries extracellulaires (Kubica et al., 2008a). Après une heure d'incubation correspondant à t_0 , certains puits ont été lavés avec PBS et supplémentés avec 1% de Triton X-100 pour lyser les cellules endothéliales. Le lysat cellulaire a été inoculé sur gélose de Chapman et étudié comme décrit plus haut. D'autres puits ont été incubés une heure supplémentaire (t_1) dans un milieu sans antibiotiques.

A t_1 , la lyse a été stoppée par ajout de BHIB. Les surnageants ont étéensemencés après une série de dilutions sur gélose de Chapman, incubés une nuit à 37°C puis comptées en CFU.

Des contrôles contenant HUVEC non infectées et d'autres contenant des bactéries seules ont été également préparés pour s'assurer de l'absence de colonies bactériennes dans les lysats cellulaires non infectés, et de la mort de toutes les bactéries incubées seules avec la gentamycine après une heure (< 10 CFU).

Le pourcentage de la lyse intracellulaire des bactéries a été calculé suivant la formule (Aribi et al., 2015; Mehrzad et al., 2009; Nouari et al., 2016).

$$\% \text{ de lyse intracellulaire} = 100 \times \frac{N0 - N1}{N0}$$

N0 et N1 correspondent respectivement aux nombres de bactéries intracellulaires viables à t_0 et t_1 .

2.2.5. Croissance intracellulaire

La croissance intracellulaire a été étudiée en comparant le nombre de colonies dans les lysats de cellules endothéliales infectées et traitées ou non et incubées pendant une heure. Les lysats cellulaires ont été obtenus comme indiqué plus haut.

2.3. Analyse statistique des données

Les expériences ont été répétées trois fois. L'analyse statistique des données a été réalisée avec le logiciel SPSS 20 en utilisant les tests non-paramétriques de Kruskal-Wallis (K-W) et de Mann Whitney U.

Les résultats ont été représentés par la moyenne plus ou moins erreur standard. Une valeur de $p < 0.05$ a été considérée comme significative.

Chapitre 3

Résultats

Le propos de cette étude est d'examiner l'effet *ex-vivo* de la vitamine C sur la capacité phagocytaire de *S. aureus* par HUVEC ainsi que sur la lyse et la croissance bactérienne intracellulaire.

Les tableaux 3.1 et 3.2 récapitulent les résultats des tests de phagocytose, de l'activité bactéricide et de l'activité bactériostatique des HUVEC en présence des différentes doses de vitamine C, avec une MOI de 25 et 50 respectivement. Les différences entre les groupes pour chaque test ont été calculées par K-W. Les résultats de chaque test sont détaillés plus bas. Au sein de chaque groupe, les effets des différentes doses de vitamine C ont été comparés par le test de Mann Whitney U et les valeurs de p correspondantes ont été représentées dans le tableau 3.3.

3.1 Etude de l'activité phagocytaire

La figure 3.1 montre le pourcentage de bactéries phagocytées par HUVEC après une heure d'incubation et de traitement par différentes doses de vitamines (1, 4, 7, 10 mM) C à une MOI de 25 et de 50. Globalement, à MOI 25, l'activité phagocytaire est moins importante qu'à MOI 50. A MOI 25, on remarque que le pourcentage de phagocytose est proportionnel aux doses de vitamines C. Comparées au témoin, les doses 1, 4 et 7 mM inhibent significativement la phagocytose alors que la dose 10 l'augmente. A l'inverse, à MOI 50, la phagocytose est significativement augmentée dans les HUVEC traitées par 1 et 4 mM de vitamine C par rapport aux cellules non traitées et nettement diminuée avec une dose de 10 mM.

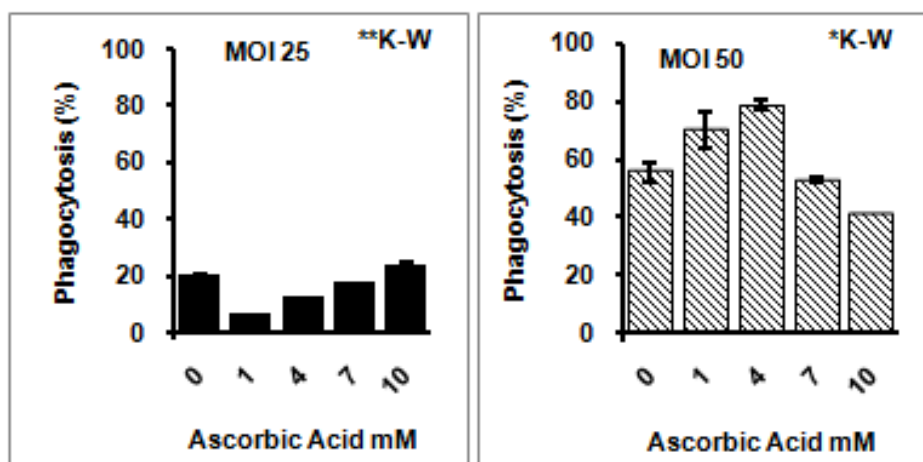


Figure 3.1 Effet de la vitamine C sur l'activité phagocytaire des HUVEC. Phagocytosis (%) correspond au pourcentage de *S. aureus* internalisé par HUVEC après incubation d'une heure en présence des différentes doses de vitamine C. A gauche, MOI 25 ; à droite, MOI 50 ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; K-W : Test de Kruskal-Wallis.

Tableau 3.1 Activité phagocytaire, bactériostatique et bactéricide des HUVEC envers *S. aureus* avec MOI 25

Vit C (mM)	Moyenne $\pm$ ES					
	Phagocytose 25	$p1$	Bactéricidie 25	$p2$	Croissance 25	$p3$
0	20,22 $\pm$ 0,46	0,009	65,88 $\pm$ 0,98	0,01	2,356 $\pm$ 0,014	0,009
1	6,96 $\pm$ 0,05		28,11 $\pm$ 1,76		0,267 $\pm$ 0,003	
4	12,60 $\pm$ 0,18		50,59 $\pm$ 0,34		0,870 $\pm$ 0,006	
7	18,07 $\pm$ 0,18		76,95 $\pm$ 0,69		0,960 $\pm$ 0,006	
10	24,01 $\pm$ 0,62		68,68 $\pm$ 0,99		1,053 $\pm$ 0,012	

Vit C : Concentrations de vitamine C en mM. ES : Erreur standard. Phagocytose 25 : % calculé de phagocytose à MOI 25. Bactéricidie 25 : % calculé de bactéricidie à MOI 25. Croissance 25 : Nombre de colonies de *S. aureus* intracellulaire à MOI 25 $\times 10^{-6}$. $p1$, $p2$ et $p3$ ont été calculées par le test de Kruskal Wallis.

Tableau 3.2 Activité phagocytaire, bactériostatique et bactéricide des HUVEC envers *S. aureus* avec MOI 50

Vit C (mM)	Moyenne $\pm$ ES					
	Phagocytose 50	$p1$	Bactéricidie50	$p2$	Croissance50	$p3$
0	55,84 $\pm$ 3,37	0,017	55,84 $\pm$ 3,73	0,012	25,40 $\pm$ 0,06	0,009
1	70,23 $\pm$ 6,32		70,23 $\pm$ 6,32		1,82 $\pm$ 0,01	
4	78,75 $\pm$ 1,80		78,75 $\pm$ 1,80		14,23 $\pm$ 0,01	
7	52,79 $\pm$ 0,69		52,79 $\pm$ 0,69		17,93 $\pm$ 0,03	
10	40,98 $\pm$ 0,13		40,98 $\pm$ 0,13		8,23 $\pm$ 0,03	

Vit C : Concentrations de vitamine C en mM. ES : Erreur standard. Phagocytose 50 : % calculé de phagocytose à MOI 50. Bactéricidie 50 : % calculé de bactéricidie à MOI 50. Croissance 50 : Nombre de colonies de *S. aureus* intracellulaire à MOI 50 $\times 10^{-6}$. $p1$, $p2$ et $p3$ ont été calculées par le test de Kruskal Wallis.

Tableau 3.3. Valeurs de p calculées selon le test non paramétrique de Mann Whitney U entre différentes doses de vitamine C pour les tests de phagocytose, bactéricidie et croissance intra cellulaire de *S. aureus* à MOI 25 et 50

Doses comparées	$p1$	$p2$	$p3$	$p4$	$p5$	$p6$
0 vs 1 mM	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01
0 vs 4mM	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
0 vs 7 mM	0.01	0.14	0.01	0.09	0.01	0.01
0 vs 10 mM	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01
1 vs 4 mM	0.01	0.09	0.01	0.01	0.01	0.01
1 vs 7 mM	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
1 vs 10 mM	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
4 vs 7 mM	0.08	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
4 vs 10 mM	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
7 vs 10 mM	0.01	0.01	0.01	0.40	0.01	0.01

Pour chaque essai, les doses de vitamine C (0, 1, 4, 7 et 10 mM) ont été comparées deux à deux. $p1$: Valeurs de p correspondant au test de phagocytose à MOI 25. $p2$: Valeurs de p correspondant au test de phagocytose à MOI 50. $p3$: Valeurs de p correspondant au test de bactéricidie à MOI 25. $p4$: Valeurs de p correspondant au test de bactéricidie à MOI 50. $p5$: Valeurs de p correspondant au test de croissance intracellulaire à MOI 25. $p6$: Valeurs de p correspondant au test de croissance intracellulaire à MOI 50.

3.2 Etude de l'activité bactéricide intracellulaire

Le pourcentage de bactéricidie intracellulaire représente la diminution du nombre de bactéries intracellulaires après incubation d'une heure (Figure 3.2). Comme pour la phagocytose, l'effet de la vitamine C diffère selon la dose de vitamine et l'inoculum bactérien. En effet, à MOI 25, la vitamine C augmente la bactéricidie intracellulaire à fortes doses (7 et 10 mM) par rapport au témoin alors que des doses plus faible la diminuent (1 et 4 mM). A MOI 50, la vitamine C a l'effet inverse. Elle augmente en effet la bactéricidie aux doses de 1 et 4 mM comparées au témoin, alors que les doses plus élevées la diminuent significativement.

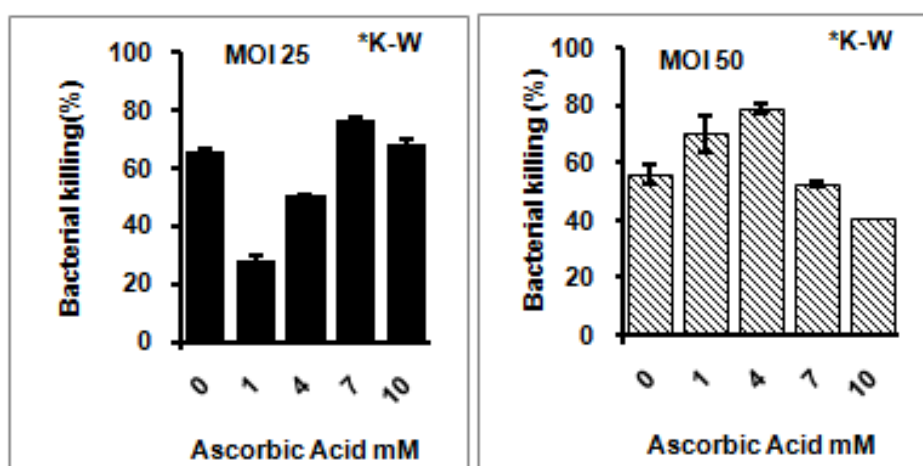


Figure 3.2 Effet de la vitamine C sur l'activité bactéricide intracellulaire des HUVEC sur *S. aureus*. Bacterial killing (%) : Pourcentage de *S. aureus* intracellulaires lysés après une heure d'incubation avec HUVEC et vitamine C. A gauche, MOI 25 ; à droite, MOI 50 ; * $p < 0.05$; K-W : Test de Kruskal-Wallis.

3.3 Etude de la croissance intracellulaire

Le nombre de colonies de *S. aureus* intracellulaires comptés après une heure d'incubation avec HUVEC et traitement par quatre doses croissantes de vitamine C, représente la croissance bactérienne intracellulaire illustrée dans la figure 2.3. Que ce soit à MOI 25 ou 50, toutes les doses de vitamines C ont significativement ralenti la croissance intracellulaire de *S. aureus* par rapport aux témoins. Cet effet bactériostatique est dose-dépendant. Il est maximal pour la plus faible dose marquant une différence significative avec les autres doses aussi bien à MOI 25 qu'à 50.

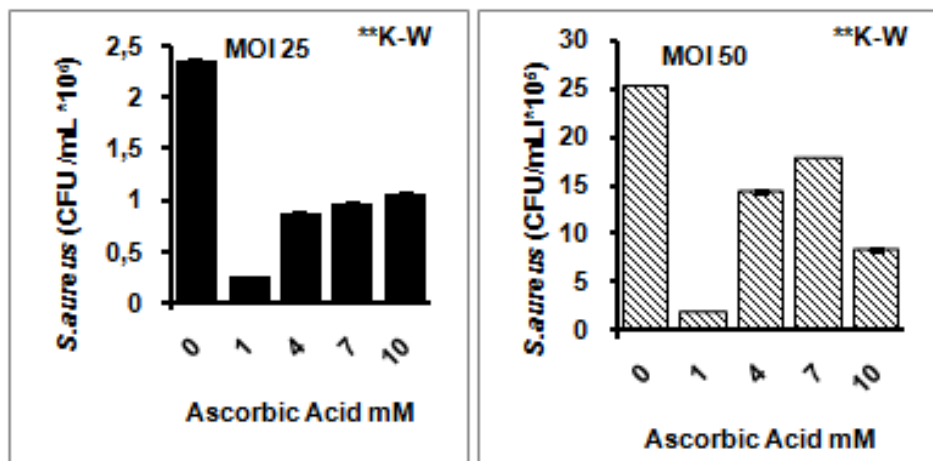


Figure 3.3 Effet de la vitamine C sur la croissance intracellulaire de *S. aureus*.

S. aureus correspond au nombre de CFU par mL/10⁶ de bactéries vivantes intracellulaires après une heure d'incubation avec HUVEC et traitement par différentes doses de vitamine C. A gauche, MOI 25 ; à droite, MOI 50 ; ** $p < 0.01$; K-W : Test de Kruskal-Wallis.

Chapitre 4

Discussion

Les infections à *Staphylococcus aureus* demeurent un sujet de préoccupation par leur fréquence et leur gravité potentielle notamment pour les SARM. Cette gravité est exacerbée par l'absence de découverte et de développement de nouveaux antibiotiques ou de vaccins pouvant s'expliquer par le désintérêt de l'industrie pharmaceutique en raison du faible rendement financier comparé aux traitements pour des maladies chroniques (Sause et *al.*, 2016).

S. aureus a été considéré traditionnellement comme un germe extracellulaire mais de nombreuses études ont montré son habilité à échapper à des cellules phagocytaires non professionnelles comme les cellules épithéliales et endothéliales (Hamill et *al.*, 1986; Oviedo-Boyso et *al.*, 2008). Cette position intracellulaire contribue au maintien de l'infection et protège la bactérie contre les réponses immunitaires. Plusieurs mécanismes moléculaires sont impliqués dans l'internalisation de *S. aureus* par les cellules hôtes. La liaison de la protéine de surface fibronectin binding protein (Fbp) aux intégrines joue un rôle important ainsi que la polymérisation du cytosquelette d'actine. Plus récemment, l'implication de la voie de signalisation phosphoinositide-3-kinase (PI3K) a été démontrée. Le site de liaison de PI3K fait suite à l'autophosphorylation de la Focal adhesion kinase (FAK) en position Y397, induite par *S. aureus*. L'internalisation implique également la translocation nucléaire de NF- κ B induite par TNF α (Oviedo-Boyso et *al.*, 2011).

Les cellules endothéliales, douées d'activité phagocytaire non professionnelle constituent une voie privilégiée pour la dissémination de *S. aureus*. Les bactéries internalisées résident dans des vacuoles endosomales ou sont détournées de la voie endosomale vers des autophagosomes. Les multiples facteurs de virulence exprimés leur permettent de s'échapper dans le cytoplasme et éventuellement de tuer la cellule hôte en induisant son apoptose (Kubica et *al.*, 2008b). La persistance de *S. aureus* dans les phagocytes non professionnels, contrairement aux macrophages, dépend de l'expression du locus *agr* et du facteur alternatif sigma et est favorisée par la production de l'alpha toxine. Elle se distingue par l'induction de l'apoptose de la cellule hôte (Bayles et *al.*, 1998).

La vitamine C exerce de multiples effets immunomodulateurs sur les cellules endothéliales mais ses effets sur leur capacité à internaliser des bactéries ou à exercer des effets bactéricides ou bactériostatiques sont inconnus.

Le but de notre travail était de démontrer que la vitamine C pouvait influencer favorablement l'activité phagocytaire, bactéricide et bactériostatique des cellules endothéliales.

Dans notre étude, la vitamine C a eu des effets différents sur la phagocytose selon la dose utilisée. A MOI 25, l'inhibition de la phagocytose a été obtenue aux doses faibles (4 et 7 mM) alors que des doses plus importantes (7 et 10 mM) ont eu l'effet inverse. A MOI 50, la seule dose qui diminuait la phagocytose était de 10 mM avec une différence significative par rapport au témoin. Dans leur étude sur les macrophages, Victor et *al.* ont montré que la vitamine C régulait le processus phagocytaire en présence de choc toxinique et que cette régulation était dose dépendante et temps dépendante. Seule la dose de 0.01 mM induisait une diminution de la phagocytose à tous les moments étudiés (2, 4, 12 et 24 heures) (Victor et *al.*, 2000).

Ceci démontre bien que la vitamine C n'exerce pas un effet constant sur l'activité phagocytaire et que ses effets dépendent de plusieurs facteurs qui sont la dose utilisée, le temps d'incubation et aussi la taille de l'inoculum.

L'activité bactéricide des HUVEC envers *S. aureus* a été également inconstante dans notre étude dépendant à la fois de la dose de vitamine C et aussi de la MOI utilisée. Globalement, nos résultats montrent que HUVEC exercent une activité bactéricide importante en absence et en présence de vitamine C, aussi bien à MOI 25 qu'à 50. Néanmoins, l'influence de la vitamine C est significative à fortes doses à MOI 25 (7 et 10 mM), et à faibles doses (1 et 4 mM) à MOI 50.

L'activité bactéricide de la vitamine C a fait l'objet de nombreux travaux (Sagripanti et *al.*, 1997; Zhang et *al.*, 1997). Elle est surtout connue pour les bactéries intracellulaires comme le *Mycobacterium tuberculosis* contre lequel la vitamine C exerce une forte activité bactéricide *in vitro* seule et dans les macrophages (Vilchère et *al.*, 2013; Wang et *al.*, 2012). L'effet de la vitamine C sur l'activité phagocytaire cellulaire a été étudié pour les neutrophiles et les leucocytes (McCall et *al.*, 1971; Shilotri and Bhat, 1977).

Dans notre étude, la vitamine C a eu des effets inhibiteurs très significatifs sur la croissance de *S. aureus* à toutes les doses utilisées et pour chaque MOI. Cet effet a été plus marqué dans les deux MOI avec la dose de 1 mM. Ceci va dans le sens des travaux de Kallio et *al.* qui ont montré pour la première fois en 2012 que la vitamine C seule inhibait la croissance de *S. aureus* et que la dose la plus efficace était de 10 mM. Ce travail avait démontré l'effet bactéricide de la vitamine C sur *S. aureus* indépendamment des cellules immunitaires. Une autre étude avait montré que la vitamine C à la dose de 100 μ M inhibait la réplication bactérienne dans les cellules endothéliales des microvasculaires du muscle squelettique de

rats présentant une infection provoquée par ligature caecale et perforation (Armour et *al.*, 2001).

L'effet inhibiteur de la croissance intracellulaire par la vitamine C peut s'expliquer soit par le fait que le métabolisme de la vitamine C en présence d'oxygène expose la bactérie au stress oxydatif ou bien par la production d'acide acétique et de lactate à partir de la vitamine C (Kallio et *al.*, 2012b). Ce mécanisme pourrait également s'appliquer à l'effet intracellulaire exercé par la vitamine C. Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour préciser ce mécanisme.

Chapitre 5

Conclusion

Notre étude a montré que la vitamine C pouvait influencer l'activité phagocytaire, bactéricide et bactériostatique exercée par les cellules endothéliales envers *S. aureus*. Cet effet était constant sur l'inhibition de la croissance bactérienne mais variait en fonction des doses de vitamine C et de l'inoculum bactérien pour la phagocytose et la lyse bactérienne intracellulaire. Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour mieux préciser et comprendre ces effets.

Chapitre 6

Conclusions et perspectives

Staphylococcus aureus est un germe fréquemment responsable d'infections pouvant être graves et résistantes aux traitements antibiotiques. Doté d'un grand nombre de facteurs de virulence, il est en mesure de déjouer les défenses immunitaires innées et adaptatives provoquant des infections invasives, persistantes ou récurrentes.

En l'absence de développement de nouveaux antibiotiques efficaces, il serait intéressant de mettre en évidence des substances pouvant influencer les réponses immunitaires pour lutter contre l'infection.

La vitamine C dont les propriétés antioxydantes sont reconnues depuis longtemps et dont les effets antibactériens sont largement documentés pourrait avoir de l'intérêt à cet égard.

La vitamine C exerce des effets immunomodulateurs sur les cellules endothéliales qui elles-mêmes sont impliquées dans la défense immunitaire contre *S. aureus* notamment à travers son internalisation.

Ce travail avait pour objectif d'étudier l'effet de la vitamine C à différentes doses sur l'activité antibactérienne des cellules endothéliales issues de la veine du cordon ombilical humain envers *S. aureus*.

Nous avons pu montrer que la vitamine C inhibait la croissance bactérienne intracellulaire quelle que soit la dose utilisée et qu'elle pouvait inhiber la phagocytose et la bactéricidie intracellulaire à certaines concentrations bien que les doses nécessaires étaient variables en fonction de la multiplicité d'infection.

Ces résultats soulèvent d'autres interrogations. En effet, il serait intéressant, à travers d'autres études de comprendre les mécanismes moléculaires qui préludent à ces effets et de préciser les doses optimales pouvant apporter le plus d'efficacité.

Il faudrait également rechercher l'effet de la vitamine C sur d'autres aspects de la réponse immunitaire à l'infection staphylococcique comme l'induction de l'apoptose des cellules hôtes ou la phagocytose par les macrophages ou les neutrophiles.

Enfin, ce résultat expérimental est à consolider par des études cliniques, seul moyen d'évaluer l'impact thérapeutique en termes de bénéfice pour les patients.

Chapitre 7

Bibliographie

A

Abbaspour, N., Hurrell, R., and Kelishadi, R. (2014). Review on iron and its importance for human health. *J. Res. Med. Sci. Off. J. Isfahan Univ. Med. Sci.* *19*, 164–174.

Aird, W.C. (2007). Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium: I. Structure, Function, and Mechanisms. *Circ. Res.* *100*, 158–173.

Alexander, E.H., and Hudson, M.C. (2001). Factors influencing the internalization of *Staphylococcus aureus* and impacts on the course of infections in humans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *56*, 361–366.

Alitalo, K., and Carmeliet, P. (2002). Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell* *1*, 219–227.

Animashaun, A., Kelleher, J., Heatley, R.V., Trejdosiewicz, L.K., and Losowsky, M.S. (1990). The effect of zinc and vitamin C supplementation on the immune status of patients with Crohn's disease. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* *9*, 137–146.

Arciniegas, E., Ponce, L., Hartt, Y., Graterol, A., and Carlini, R.G. (2000). Intimal thickening involves transdifferentiation of embryonic endothelial cells. *Anat. Rec.* *258*, 47–57.

Aribi, M., Meziane, W., Habi, S., Boulatika, Y., Marchandin, H., and Aymeric, J.-L. (2015). Macrophage Bactericidal Activities against *Staphylococcus aureus* Are Enhanced In Vivo by Selenium Supplementation in a Dose-Dependent Manner. *PLOS ONE* *10*, e0135515.

Armour, J., Tyml, K., Lidington, D., and Wilson, J.X. (2001). Ascorbate prevents microvascular dysfunction in the skeletal muscle of the septic rat. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *90*, 795–803.

Ashor, A.W., Lara, J., Mathers, J.C., and Siervo, M. (2014). Effect of vitamin C on endothelial function in health and disease: A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Atherosclerosis* *235*, 9–20.

B

Bayles, K.W., Wesson, C.A., Liou, L.E., Fox, L.K., Bohach, G.A., and Trumble, W.R. (1998). Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect. Immun.* *66*, 336–342.

Boshoff, C., and Weiss, R. (2002). Aids-related malignancies. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 373–382.

C

Carr, A., and Vissers, M. (2013). Synthetic or Food-Derived Vitamin C? Are They Equally Bioavailable? *Nutrients* 5, 4284–4304.

Chambial, S., Dwivedi, S., Shukla, K.K., John, P.J., and Sharma, P. (2013). Vitamin C in Disease Prevention and Cure: An Overview. *Indian J. Clin. Biochem.* 28, 314–328.

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

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

Cines, D.B., Pollak, E.S., Buck, C.A., Loscalzo, J., Zimmerman, G.A., McEver, R.P., Pober, J.S., Wick, T.M., Konkle, B.A., Schwartz, B.S., et al. (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91, 3527–3561.

Covarrubias-Pinto, A., Acuña, A., Beltrán, F., Torres-Díaz, L., and Castro, M. (2015). Old Things New View: Ascorbic Acid Protects the Brain in Neurodegenerative Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 28194–28217.

D

Davis, J., Crampton, S.P., and Hughes, C.C.W. (2007). Isolation of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC). *J. Vis. Exp.*

Du, J., Cullen, J.J., and Buettner, G.R. (2012). Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1826, 443–457.

F

Félétou, M. (2011). The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators (San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences).

Fens, M.H.A.M., van Wijk, R., Andringa, G., van Rooijen, K.L., Dijkstra, H.M., Rasmussen, J.T., de Vooght, K.M.K., Schiffelers, R.M., Gaillard, C.A.J.M., and van Solinge, W.W. (2012). A role for activated endothelial cells in red blood cell clearance: implications for vasopathology. *Haematologica* 97, 500–508.

Figuerola-Méndez, R., and Rivas-Arancibia, S. (2015). Vitamin C in Health and Disease: Its Role in the Metabolism of Cells and Redox State in the Brain. *Front. Physiol.* 6.

Fishman, A.P. (1982). ENDOTHELIUM: A DISTRIBUTED ORGAN OF DIVERSE CAPABILITIES. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 401, 1–8.

Foster, T.J. (2005). Immune evasion by staphylococci. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 948–958.

Foster, T.J., Geoghegan, J.A., Ganesh, V.K., and Høkk, M. (2013). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 49–62.

G

Galley, H.F. (2004). Physiology of the endothelium. *Br. J. Anaesth.* 93, 105–113.

H

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

Hemilä, H. (2006). Do vitamins C and E affect respiratory infections? [Harri Hemilä].

I

Ince, C., Mayeux, P.R., Nguyen, T., Gomez, H., Kellum, J.A., Ospina-Tascón, G.A., Hernandez, G., Murray, P., and De Backer, D. (2016). The Endothelium in Sepsis: SHOCK 45, 259–270.

K

Kallio, J., Jaakkola, M., Mäki, M., Kilpeläinen, P., and Virtanen, V. (2012a). Vitamin C inhibits *staphylococcus aureus* growth and enhances the inhibitory effect of quercetin on growth of *Escherichia coli* in vitro. *Planta Med.* 78, 1824–1830.

Kallio, J., Jaakkola, M., Mäki, M., Kilpeläinen, P., and Virtanen, V. (2012b). Vitamin C Inhibits *Staphylococcus aureus* Growth and Enhances the Inhibitory Effect of Quercetin on Growth of *Escherichia coli* In Vitro. *Planta Med.* 78, 1824–1830.

Kozarov, E. (2012). Bacterial invasion of vascular cell types: vascular infectology and atherogenesis. *Future Cardiol.* 8, 123–138.

Kubica, M., Guzik, K., Koziel, J., Zarebski, M., Richter, W., Gajkowska, B., Golda, A., Maciag-Gudowska, A., Brix, K., Shaw, L., et al. (2008a). A Potential New Pathway for *Staphylococcus aureus* Dissemination: The Silent Survival of *S. aureus* Phagocytosed by Human Monocyte-Derived Macrophages. *PLoS ONE* 3, e1409.

Kubica, M., Guzik, K., Koziel, J., Zarebski, M., Richter, W., Gajkowska, B., Golda, A., Maciag-Gudowska, A., Brix, K., Shaw, L., et al. (2008b). A Potential New Pathway for *Staphylococcus aureus* Dissemination: The Silent Survival of *S. aureus* Phagocytosed by Human Monocyte-Derived Macrophages. *PLoS ONE* 3, e1409.

Kwiecinski, J., Jin, T., and Josefsson, E. (2014). Surface proteins of *Staphylococcus aureus* play an important role in experimental skin infection. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 122, 1240–1250.

L

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

Leibovitz, B., and Siegel, B.V. (1978). Ascorbic acid, neutrophil function, and the immune response. *Int. J. Vitam. Nutr. Res. Int. Z. Vitam.- Ernährungsforschung J. Int. Vitaminol. Nutr.* 48, 159–164.

Los, F.C.O., Randis, T.M., Aroian, R.V., and Ratner, A.J. (2013). Role of Pore-Forming Toxins in Bacterial Infectious Diseases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77, 173–207.

Lowy, F.D., Fant, J., Higgins, L.L., Ogawa, S.K., and Hatcher, V.B. (1988). *Staphylococcus aureus*--human endothelial cell interactions. *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* 98, 137–146.

M

Mai, J., Virtue, A., Shen, J., Wang, H., and Yang, X.-F. (2013). An evolving new paradigm: endothelial cells? conditional innate immune cells. *J. Hematol. Oncol. J. Hematol Oncol* 6, 61.

Mandl, J., Szarka, A., and B?nhegyi, G. (2009). Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *Br. J. Pharmacol.* 157, 1097–1110.

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

Marshall, C.J., Moore, R.L., Thorogood, P., Brickell, P.M., Kinnon, C., and Thrasher, A.J. (1999). Detailed characterization of the human aorta-gonad-mesonephros region reveals morphological polarity resembling a hematopoietic stromal layer. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 215, 139–147.

May, J.M., and Harrison, F.E. (2013). Role of Vitamin C in the Function of the Vascular Endothelium. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 2068–2083.

May, J.M., and Qu, Z. (2009). Ascorbic acid efflux and re-uptake in endothelial cells: maintenance of intracellular ascorbate. *Mol. Cell. Biochem.* 325, 79–88.

McAdow, M., Missiakas, D.M., and Schneewind, O. (2012). *Staphylococcus aureus* Secretes Coagulase and von Willebrand Factor Binding Protein to Modify the Coagulation Cascade and Establish Host Infections. *J. Innate Immun.* 4, 141–148.

McCall, C.E., DeChatelet, L.R., Robert Cooper, M., and Ashburn, P. (1971). The Effects of Ascorbic Acid on Bactericidal Mechanisms of Neutrophils. *J. Infect. Dis.* 124, 194–198.

Mehrzaad, J., Duchateau, L., and Burvenich, C. (2009). Phagocytic and bactericidal activity of blood and milk-resident neutrophils against *Staphylococcus aureus* in primiparous and multiparous cows during early lactation. *Vet. Microbiol.* 134, 106–112.

Menzies, B.E., and Kourteva, I. (1998a). Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis. *Infect. Immun.* 66, 5994–5998.

Menzies, B.E., and Kourteva, I. (1998b). Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis. *Infect. Immun.* 66, 5994–5998.

Meredith, M.E., Harrison, F.E., and May, J.M. (2011). Differential regulation of the ascorbic acid transporter SVCT2 during development and in response to ascorbic acid depletion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 414, 737–742.

Michiels, C. (2003). Endothelial cell functions. *J. Cell. Physiol.* 196, 430–443.

Mikrova, N.A., Casciari, J.J., and Riordan, N.H. (2010). Ascorbate inhibition of angiogenesis in aortic rings ex vivo and subcutaneous Matrigel plugs in vivo. *J. Angiogenesis Res.* 2, 2.

Montgomery, C.P., Daniels, M., Zhao, F., Alegre, M.-L., Chong, A.S., and Daum, R.S. (2014). Protective Immunity against Recurrent *Staphylococcus aureus* Skin Infection Requires Antibody and Interleukin-17A. *Infect. Immun.* 82, 2125–2134.

N

Naidu, K.A. (2003). Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr. J.* 2.

Nouari, W., Ysmail-Dahlouk, L., and Aribi, M. (2016). Vitamin D3 enhances bactericidal activity of macrophage against *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. Immunopharmacol.* 30, 94–101.

Nualart, F. (2014). Vitamin C Transporters, Recycling and the Bystander Effect in the Nervous System: SVCT2 versus Gluts. *J. Stem Cell Res. Ther.* 04.

O

Otto, M. (2014). *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr. Opin. Microbiol.* 17, 32–37.

Oudemans-van Straaten, H.M., Man, A.M.S., and de Waard, M.C. (2014). Vitamin C revisited. *Crit. Care* 18.

Oviedo-Boyso, J., Barriga-Rivera, J.G., Valdez-Alarcón, J.J., Bravo-Patiño, A., Cáramez-Trejo, A., Cajero-Juárez, M., and Baizabal-Aguirre, V.M. (2008). Internalization of *Staphylococcus aureus* by Bovine Endothelial Cells is Associated with the Activity State of NF- κ B and Modulated by the Pro-inflammatory Cytokines TNF- α and IL-1 β . *Scand. J. Immunol.* 67, 169–176.

Oviedo-Boyso, J., Cortes-Vieyra, R., Huante-Mendoza, A., Yu, H.B., Valdez-Alarcon, J.J., Bravo-Patino, A., Cajero-Juarez, M., Finlay, B.B., and Baizabal-Aguirre, V.M. (2011). The Phosphoinositide-3-Kinase-Akt Signaling Pathway Is Important for *Staphylococcus aureus* Internalization by Endothelial Cells. *Infect. Immun.* 79, 4569–4577.

P

Pantosti, A., Sanchini, A., and Monaco, M. (2007). Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol.* 2, 323–334.

Pries, A.R., Secomb, T.W., and Gaehtgens, P. (2000). The endothelial surface layer. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* 440, 653–666.

Proft, T., and Fraser, J.D. (2003). Bacterial superantigens. *Clin. Exp. Immunol.* 133, 299–306.

Putchala, M.C., Ramani, P., Sherlin, H.J., Premkumar, P., and Natesan, A. (2013). Ascorbic acid and its pro-oxidant activity as a therapy for tumours of oral cavity -- a systematic review. *Arch. Oral Biol.* 58, 563–574.

R

Rakocevic, J., Orlic, D., Mitrovic-Ajtic, O., Tomasevic, M., Dobric, M., Zlatic, N., Milasinovic, D., Stankovic, G., Ostojić, M., and Labudovic-Borovic, M. (2017). Endothelial cell markers from clinician's perspective. *Exp. Mol. Pathol.* 102, 303–313.

S

Sagripani, J.L., Eklund, C.A., Trost, P.A., Jinneman, K.C., Abeyta, C., Kaysner, C.A., and Hill, W.E. (1997). Comparative sensitivity of 13 species of pathogenic bacteria to seven chemical germicides. *Am. J. Infect. Control* 25, 335–339.

Sause, W.E., Buckley, P.T., Strohl, W.R., Lynch, A.S., and Torres, V.J. (2016). Antibody-Based Biologics and Their Promise to Combat *Staphylococcus aureus* Infections. *Trends Pharmacol. Sci.* 37, 231–241.

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

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

Shilotri, P.G., and Bhat, K.S. (1977). Effect of mega doses of vitamin C on bactericidal activity of leukocytes. *Am. J. Clin. Nutr.* 30, 1077–1081.

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

T

Thammavongsa, V., Kim, H.K., Missiakas, D., and Schneewind, O. (2015). *Staphylococcal* manipulation of host immune responses. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 529–543.

Thomer, L., Schneewind, O., and Missiakas, D. (2016). Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 11, 343–364.

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

V

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

Vilchèze, C., Hartman, T., Weinrick, B., and Jacobs, W.R. (2013). Mycobacterium tuberculosis is extraordinarily sensitive to killing by a vitamin C-induced Fenton reaction. *Nat. Commun.* 4.

Vincenot, F. (2008). Les facteurs de virulence de Staphylococcus aureus. *RFL* 38.

W

Wang, J., Zhou, X., Zhang, Z., Xu, L., Yin, X., Yang, L., and Zhao, D. (2012). Effect of interaction of vitamin C on macrophage immune response to infection with Mycobacterium bovis. *Cell. Mol. Biol. Noisy--Gd. Fr.* 58 Suppl, OL1688-1694.

Wertheim, H.F.L., Melles, D.C., Vos, M.C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H.A., and Nouwen, J.L. (2005). The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections. *Lancet Infect. Dis.* 5, 751–762.

Wilke, G.A., and Bubeck Wardenburg, J. (2010). Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in Staphylococcus aureus alpha-hemolysin-mediated cellular injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 13473–13478.

Wilson, J.X. (2009). Mechanism of action of vitamin C in sepsis: Ascorbate modulates redox signaling in endothelium. *BioFactors* 35, 5–13.

Y

Young, M.R. (2012). Endothelial cells in the eyes of an immunologist. *Cancer Immunol. Immunother.* 61, 1609–1616.

Z

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