



HAL
open science

Infections chroniques à staphylocoques: mécanismes de persistance intracellulaire et nouvelles approches thérapeutiques

Virginie Dyon-Tafani

► **To cite this version:**

Virginie Dyon-Tafani. Infections chroniques à staphylocoques: mécanismes de persistance intracellulaire et nouvelles approches thérapeutiques. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. hal-01968927

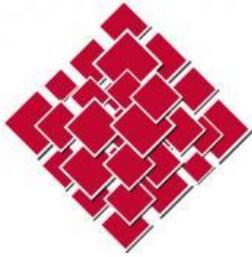
HAL Id: hal-01968927

<https://ephe.hal.science/hal-01968927>

Submitted on 21 Jan 2019

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

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



École Pratique
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

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

MÉMOIRE

présenté par Virginie Dyon-Tafari

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

TITRE: Infections chroniques à staphylocoques: mécanismes de persistance intracellulaire et nouvelles approches thérapeutiques

Soutenu le 4 Décembre 2018 devant le jury suivant:

Dr. Laurence Mathieu - Présidente

Pr. Frédéric Laurent - Tuteur scientifique

Pr. Jean-Marie Exbrayat - Tuteur pédagogique

Dr. Paul Verhoeven - Rapporteur

Dr. Fany Reffuveille – Examinatrice

Mémoire préparé sous la direction de:

Pr. Frédéric Laurent

Institut des agents infectieux, département de bactériologie, Centre National de Référence des Staphylocoques, 103 grande rue de la Croix Rousse, 69004 Lyon

INSERM U1111 – CNRS UMR 5308 – ENS Lyon

Et de

Pr Jean-Marie Exbrayat

UMRS 449, Biologie générale – Reproduction et Développement comparé,
UCLy, UDL ; EPHE, PSL, 10, Place des Archives, 69288 Lyon Cedex 02

EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

Remerciements

Je remercie Pr. Frédéric Laurent pour m'avoir permis d'intégrer son équipe de recherche, de m'avoir donné l'opportunité de participer à ce projet, pour son aide et son soutien tout au long de ce stage EPHE ainsi que pour la confiance qu'il m'a accordée.

Je remercie également mon tuteur pédagogique, Dr. Exbrayat, d'avoir accepté de m'encadrer. Je le remercie pour son aide lors de nos échanges tout au long de mon projet ainsi que pour la rédaction de ce mémoire.

Merci à Jérôme et Alan pour leur présence, leur soutien, leur aide et leur contribution dans tous mes projets mais surtout dans l'écriture de ce mémoire pour le diplôme EPHE.

Je tenais à remercier Sophie Assant et Régis Villet de m'avoir encadré en ce début de stage EPHE, pour leur enthousiasme, leur grande disponibilité, leur aide quotidienne et toutes les connaissances qu'ils ont pu m'apporter.

Je remercie Pr. Vandenesch et l'ensemble de l'unité INSERM U1111 pour son accueil dans son équipe ainsi que toute l'équipe de Laennec pour leur aide et leurs conseils.

Je remercie également le CNR des staphylocoques particulièrement Michèle Bes pour sa contribution dans mon projet pour l'obtention de souches ainsi que pour ses conseils.

Je remercie Youssef et Jason pour leur grande disponibilité, leur aide et leur soutien pendant toute la durée du stage de l'EPHE.

Merci aux personnes de mon bureau (Marine, William, Alice, Andréa, Yousef, Alison) de m'avoir supporté, surtout pendant les périodes de stress.

Merci à Lélia et Andréa de m'avoir aidé plus d'une fois dans mes manips de culture cellulaire.

Merci à Alice, Alison, Andréa, Jason et William d'être toujours prêt à m'aider dans mes manips, particulièrement pour les fameux dosages de cytokines.

Merci à Marine pour sa contribution dans mon projet, pour la création de son bel arbre phylogénétique.

Merci à Patricia, Marina, Lélia, Coquillet, Marie, Paul, Anaïs et Camille d'avoir contribué au bon déroulement de mon projet et pour leurs bonnes humeurs.

Merci aux techniciennes du CNR : Christine, Caroline, Emeline, Charline et Nadia pour leur gentillesse, leur sourire et leur aide quotidienne.

Je remercie également toutes les techniciennes des laboratoires de bactériologie et de biochimie, d'avoir accepté de m'aider dans la réalisation de mon projet.

Je remercie aussi mes parents ainsi que mon mari de m'avoir supporté et soutenu tout au long de ce projet EPHE.

Table des matières

Remerciements	0
Table des matières figures	4
Table des matières tableaux	5
Liste des abréviations	6
I. Problématique de la recherche	8
I.1. <i>Staphylococcus aureus</i> et persistance intracellulaire	8
I.1.a. <i>Staphylococcus aureus</i>	8
I.1.b. Résistance aux antibiotiques	11
I.1.c. Internalisation et persistance intracellulaire	15
I.2. Antibiotiques anti-staphylococciques et efficacité contre les staphylocoques intracellulaires	20
I.3. <i>Staphylococcus non-aureus</i> et persistance intracellulaire	22
I.3.a. Généralités / Phylogénie	22
I.3.b. Internalisation et persistance intracellulaire	24
II. Présentation des axes du projet de recherche	27
III. Matériels et méthodes	29
III.1. Souches bactériennes utilisées dans les différents projets	29
III.2. Test de sensibilité aux antibiotiques	31
III.2.a. Antibiogramme par bandelette	31
III.2.b. Antibiogramme par diffusion	31
III.2.c. Tests de sensibilité aux antibiotiques : Détermination de la concentration minimale inhibitrice par microdilution	32
III.3. Courbe de croissance	33
III.4. Culture cellulaire	33
III.5. Modèle d'infection cellulaire	34
III.5.a. Adhésion	36
III.5.b. Internalisation	37
III.5.c. Persistance intracellulaire	37
III.5.d. Mécanismes d'internalisation	37
III.5.e. Etude de l'efficacité de molécules contre les staphylocoques intracellulaires	38
III.5.f. Evaluation de la quantité de cellules vivantes	42
III.5.g. Mesure de la cytotoxicité induite	42
III.5.h. Production de cytokines	43
III.6. Analyses statistiques	43

IV.	Résultats	44
IV.1.	Compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la chronicisation des infections à staphylocoques par l'étude des souches VSSA/VISA	44
IV.1.a.	Impact du phénotype VISA sur la croissance bactérienne.....	44
IV.1.b.	Impact du phénotype VISA dans le modèle d'infection cellulaire.....	45
IV.1.c.	Impact du phénotype VISA dans le modèle expérimental adapté	50
IV.1.d.	Conclusion pour le projet VISA	53
IV.2.	Efficacité de nouvelles molécules anti-staphylococciques à visée intracellulaire	54
IV.2.a.	Projet industriel 1 : laboratoire Sanofi	54
IV.2.b.	Projet industriel 2 : laboratoire Debiopharm	58
IV.2.c.	Conclusion pour les projets avec les laboratoires Sanofi et Debiopharm... Erreur ! Signet non défini.	
IV.3.	Caractérisation des <i>Staphylococcus non-aureus</i>	63
IV.3.a.	Antibiogramme	63
IV.3.b.	Adhésion, internalisation et persistance	63
IV.3.c.	Cytotoxicité induite par la persistance intracellulaire.....	67
IV.3.d.	Production de cytokines induite par la persistance intracellulaire.....	69
IV.3.e.	Mécanisme d'internalisation de <i>S. argenteus</i>	72
IV.3.f.	Conclusion projet <i>Staphylococcus non-aureus</i>	73
V.	Discussion	73
VI.	Conclusion	80
	Références Bibliographiques.....	82
	Annexe	92

Table des matières figures

Figure 1 : Organisation de la membrane de <i>S. aureus</i>	11
Figure 2 : Epaissement de la paroi chez les souches VISA et VSSA	14
Figure 3 : La virulence des souches VISA chez un modèle invertébré (<i>Galleria mellonella</i>) est proportionnelle à la CMI pour la vancomycine	14
Figure 4 : Schéma de la liaison entre <i>S. aureus</i> et une cellule hôte grâce à la protéine FnBP et à l'intégrine $\alpha 5\beta 1$	16
Figure 5 : L'invasion cellulaire par <i>S. aureus</i> met en jeu des invaginations et protrusions membranaires	17
Figure 6 : Photographies en microscopie électronique documentant la présence de <i>S. aureus</i> internalisés au sein d'ostéocytes, d'ostéoblastes et dans la matrice osseuse	17
Figure 7 : Phénotype SCV de <i>S. aureus</i>	18
Figure 8 : Arbre phylogénique du genre <i>Staphylococcus</i> basé sur dnaG, rpoB et tuf.	23
Figure 9 : Modèle cellulaire <i>in vitro</i> utilisé dans le cadre du projet VISA..	35
Figure 10 : Modèle cellulaire <i>in vitro</i> utilisé dans le cadre du projet <i>Staphylococcus non-aureus</i>	36
Figure 11 : Modèle cellulaire <i>in vitro</i> utilisé dans le cadre de l'étude Sanofi afin d'étudier l'activité antibactérienne intracellulaire des molécules Sar1 et Sar2 à 24h post-infection.....	39
Figure 12 : Modèle cellulaire <i>in vitro</i> utilisé dans le cadre de l'étude Debiopharm afin d'étudier l'activité antibactérienne intracellulaire de la molécule Debio 1452 à 24 h, 48 h et 72 h post-infection.....	40
Figure 13 : Modèle cellulaire <i>in vitro</i> utilisé dans le cadre de l'étude Sanofi afin d'étudier l'activité antibactérienne intracellulaire de la molécule Sar2 à 48 h post-infection	41
Figure 14 : Courbe de croissance de <i>S. aureus</i>	45
Figure 15 : Capacité d'adhésion de <i>S. aureus</i> sur les ostéoblastes MG-63 à 2 h post infection	46
Figure 16 : Capacité d'internalisation de <i>S. aureus</i> dans les ostéoblastes MG-63 à 3 h post-infection.....	47
Figure 17 : Persistance de <i>S. aureus</i> dans les ostéoblastes MG-63.....	48
Figure 18 : Cytotoxicité induite par <i>S. aureus</i> sur les ostéoblastes MG-63 à 24 h, 48 h et 72 h post-infection.....	49
Figure 19 : Réponse inflammatoire induite par <i>S. aureus</i> sur les ostéoblastes MG-63 à 72 h post-infection.....	50
Figure 20 : Cytotoxicité induite par <i>S. aureus</i> sur les ostéoblastes MG-63 à 24 h, 48 h et 72 h post-infection (*avec une capacité d'internalisation identique à 3 h).....	52
Figure 21: Réponse inflammatoire induite par <i>S. aureus</i> sur les ostéoblastes MG-63 à 72 h post infection (*avec une capacité d'internalisation identique à 3 h)	53
Figure 22 : Capacité de Sar1 et Sar2 à éradiquer <i>S. aureus</i> HG001 intra-ostéoblastique à 24 h et à 48 h post-infection.	55
Figure 23 : Cytotoxicité de Sar1 et Sar2 induite par <i>S. aureus</i> HG001 et/ou les différents traitements à différentes concentrations sur ostéoblastes MG-63 à 24 h et à 48 h post-infection.....	57

Figure 24 : Impact des molécules Sar1 (A) ou Sar2 (B et C) et/ou <i>S aureus</i> sur la quantité de cellules d'ostéoblastes MG-63 vivantes à 24 h (A et B) et 48 h post-infection (C).....	58
Figure 25 : Capacité de Debio 1452 à éradiquer <i>S. aureus</i> ATCC 29213 intra-ostéoblastique à 24 h, 48 h et 72 h post-infection.....	60
Figure 26 : Capacité de Debio 1452 à éradiquer <i>S. aureus</i> ATCC 29213 intra-ostéoblastique à 24 h, 48 h et 72 h post-infection en ajoutant les molécules toute les 24 h.	61
Figure 27 : Cytotoxicité de Debio 1452 induite par <i>S. aureus</i> et/ou les différents traitements à différentes concentrations sur les ostéoblastes MG-63 à 24 h, 48 h et 72 h post-infection	62
Figure 28 : Impact de la molécule Debio1452 à et/ou <i>S aureus</i> sur la quantité de cellules d'ostéoblastes MG-63 vivantes à 24 h (A), 48 h (B) et 72 h (C) post-infection Erreur ! Signet non défini.	
Figure 29 : Capacité d'adhésion des différentes espèces de staphylocoques sur les ostéoblastes MG-63 à 2 h post-infection	64
Figure 30 : Capacité d'internalisation de différentes espèces de staphylocoques dans les ostéoblastes MG-63 à 3 h post-infection	65
Figure 31 : Persistance de différentes espèces de staphylocoques dans les ostéoblastes MG-63	66
Figure 32 : Cytotoxicité induite par différentes espèces de staphylocoques sur les ostéoblastes MG-63 à 24 h, 72 h, et 7 j post-infection	69
Figure 33 : Réponse inflammatoire induite par différentes espèces de staphylocoque sur les ostéoblastes MG-63 à 72 h post-infection.....	71
Figure 34 : Capacité d'internalisation de différentes souches de <i>S. argenteus</i> après pré-traitement des ostéoblastes MG-63 avec l'anti-intégrine 10 µg/mL.....	72

Table des matières tableaux

Tableau 1 : Liste des souches de <i>S. aureus</i> utilisées dans le cadre du projet VISA	29
Tableau 2 : Liste des souches utilisées lors des différentes études réalisées sur l'efficacité de nouvelles molécules anti-staphylococcique en intracellulaire	30
Tableau 3 : Liste des souches évaluées dans le cadre de l'étude sur <i>Staphylococcus non-aureus</i>	30
Tableau 4 : Liste des souches de <i>S. aureus</i> utilisées avec leurs CMI.....	31
Tableau 5 : Conditions d'infection afin d'obtenir la même capacité d'internalisation à 3 h post-infection entre les souches testées	51
Tableau 6 : Persistance dans les ostéoblastes MG-63 à 72 h post infection	51
Tableau 7 : Différentes concentrations utilisées pour Debio 1452 et la vancomycine suivant les CMI obtenues pour la souche HG001 <i>S. aureus</i>	59
Tableau 8 : Antibiogramme des différentes souches de <i>Staphylococcus non-aureus</i> étudiées	63
Tableau 9 : Persistance à 7j post-infection suivant les souches	67

Liste des abréviations

Agr : accessory gene regulator

BCC : Bouillon Cœur Cervele

CAMH : Cation Adjusted Mueller Hinton

CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de la Microbiologie

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CPNP : Cellules Phagocytaires Non Professionnelles

COS : Columbia + 5 % sang de mouton

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

Embp : Extracellular Matrix Bind Protein

FnBP : Fibronectin Binding Protein

G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor

GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

IOA : Infections Ostéo-Articulaires

IL-6 : InterLeukine 6

LDH : Lactate DesHydrogénase

MCC : Milieu de Culture Complet

MLST : MultiLocus Sequence Typing

MOI : Multiplicity Of Infection

MSCRAMM : Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules

MTT : MethylThiazolyldiphenyl-Tetrazolium bromide

NRPS : Non-Ribosomal Peptide Synthetase

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns

Pi : Post Infection

PBP : Penicillin Binding Protein

PBS : Tampon Phosphate Sodium

PCR : Polymerase Chain Reaction

PSM : Phenol Soluble Modulin

PVL : Panton-Valentine leukocidin

RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

SARM : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méricilline

SCC : Chromosome à Cassette Staphylococcique

SCN : Staphylocoques à Coagulase Négative

SEM : Standard Error of the Mean

SNA : *Staphylococcus Non-aureus*

SPF : Suspension Bactérienne Finale

SVF : Sérum de Veau Foetal

TSA : Trypto-Caséine Soja

TSST-1 : Toxic Shock Syndrome Toxin 1

UFC : Unité Formant Colonies

VISA : Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus*

VRSA : Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus*

VSSA : Vancomycin Susceptible *Staphylococcus aureus*

I. Problématique de la recherche

I.1. *Staphylococcus aureus* et persistance intracellulaire

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) est un pathogène majeur retrouvé chez l'Homme et l'Animal. Cette bactérie possède différents mécanismes physiopathologiques pour infecter son hôte et persister au sein de celui-ci, notamment la capacité à être internalisée à l'intérieur des cellules eucaryotes. La capacité d'un antibiotique à pénétrer au sein des cellules de l'hôte pour éliminer les staphylocoques intracellulaires et ainsi éviter la chronicisation de l'infection est donc un enjeu important.

I.1.a. *Staphylococcus aureus*

S. aureus, également connu sous le nom de staphylocoque doré consécutivement à la couleur de ses colonies sur les géloses, est un coccus à coloration de Gram positive, pathogène opportuniste appartenant au genre *Staphylococcus*. *S. aureus* est un staphylocoque à coagulase positive, c'est-à-dire qu'il possède une enzyme capable de coaguler le plasma. Les autres espèces sont appelées staphylocoques blancs car les colonies ne sont pas colorées.

I.1.a.1. Colonisation et infection à *Staphylococcus aureus*

Chez l'Homme, *S. aureus* est une bactérie commensale de la peau et des muqueuses, notamment au niveau des fosses nasales et de la gorge (Lecomte et *al.* 2001). 15 à 30 % de la population est "porteur sain" de *S. aureus*, c'est-à-dire que les personnes sont colonisées par *S. aureus* sans être infectées. Ce portage sain peut être soit temporaire soit persistant en fonction des individus. Cette colonisation est un facteur de risque majeur pour le développement d'une infection (Wertheim et *al.* 2005). En effet, *S. aureus* est un pathogène opportuniste et peut être responsable d'un large panel d'infections comme une septicémie ou même une endocardite (Becker et *al.* 2014). Lors d'une rupture de la continuité de la barrière mucoale ou cutanée, *S. aureus* peut pénétrer au sein de l'organisme et infecter les tissus adjacents ou passer dans la circulation sanguine. Ceci peut amener à plusieurs types d'infections : les infections suppuratives superficielles, les infections suppuratives profondes et les infections toxiques. Les infections suppuratives sont caractérisées par la prolifération bactérienne, l'invasion et la destruction des tissus de l'hôte mais aussi par une réponse inflammatoire locale et systématique. Lorsque *S. aureus* adhère et se multiplie au niveau de la peau et des muqueuses, une infection suppurative superficielle se développe induisant des furoncles, des panaris, ou encore des

impétigos (Coates et al. 2014). Cependant, ces infections cutanéomuqueuses superficielles peuvent engendrer des infections suppuratives plus profondes. En effet, *S. aureus* peut passer dans la circulation sanguine, on parle alors de bactériémie. Celle-ci favorise la dissémination des bactéries et la formation de foyers infectieux secondaires localisés à différents endroits de l'organisme, créant des infections suppuratives profondes (Wright & Nair 2010). Ces dernières peuvent être localisées au niveau des reins, du cœur, du cerveau ou des os. Le passage dans le sang et la formation de foyers secondaires peuvent conduire à un choc septique avec une défaillance multi-organe pouvant aller jusqu'à conduire au décès du patient (Kulhankova et al. 2014).

Les infections toxiques staphylococciques sont majoritairement dues à la production d'exotoxines spécifiques appelées superantigènes. Ces infections sont caractérisées par l'apparition rapide d'une forte fièvre, un choc septique et une défaillance multi-organe. Les superantigènes contournent les mécanismes normaux de la réponse inflammatoire et favorisent une hyperstimulation des cellules immunitaires, notamment les lymphocytes T. On observe alors l'apparition d'une réponse inflammatoire exacerbée et non contrôlée qui a un effet néfaste pour l'hôte. Aussi, la toxine TSST-1, pour *Toxic Shock Syndrome Toxin 1*, est une toxine produite par certaines souches de *S. aureus* qui est impliquée dans le syndrome du choc toxique menstruel lors du port prolongé de protections périodiques (Lowy 1998).

1.1.a.2. Facteur de virulence

La pathogénie de *S. aureus* et l'aspect multifactoriel des infections sont liés à la synthèse de nombreux facteurs de virulence (200 à 300). Ces facteurs sont impliqués dans les différentes étapes nécessaires à l'infection par le staphylocoque : l'adhésion, l'échappement aux défenses de l'hôte, la pénétration et la diffusion dans les tissus. La pathogénie implique principalement trois classes de facteurs de virulence: (i) les composants de la paroi, (ii) les protéines de surface et (iii) les protéines sécrétées, notamment les exotoxines et les enzymes extracellulaires.

1.1.a.2.a. Les composants de la paroi

La paroi cellulaire staphylococcique est constituée à 50 % de peptidoglycane. Celui-ci est composé de sous-unités de polysaccharides associés au N-acétylglucosamine ainsi qu'à l'acide N-acétylmuramique. Les chaînes de peptidoglycane sont réticulées quant à elles par des chaînes de térapeptides liées à l'acide N-acétylmuramique et par un pont pentaglycine spécifique de *S. aureus*. Le peptidoglycane peut stimuler la réponse immunitaire en induisant la libération de cytokines par les macrophages, l'activation du complément et l'agrégation des

plaquettes (Schleifer & Kandler 1972). Le peptidoglycane joue donc un rôle essentiel dans la survie des bactéries, au maintien de la forme des cellules en s'opposant à la pression de l'environnement extérieur (van Heijenoort 2001). Il faut noter que la plupart des isolats cliniques de *S. aureus* expriment aussi une capsule qui les protège en empêchant l'action de cellules immunitaires telles que les polynucléaires neutrophiles (Thakker et al. 1998).

I.1.a.2.b. Les protéines de surface

De nombreuses protéines de surface staphylococciques ont des caractéristiques structurales communes : une séquence signal de sécrétion, des acides aminés qui s'étendent dans le cytoplasme, un domaine traversant la membrane et une région d'ancrage à la paroi cellulaire. Le domaine de liaison au ligand qui est exposé à la surface de la cellule bactérienne permet à certaines de ces protéines de fonctionner comme des adhésines. La protéine A est le prototype de ces protéines, c'est la protéine de surface majeure chez *S. aureus*. Elle possède des rôles multiples incluant notamment des propriétés anti-phagocytaires basées sur sa capacité à se lier à l'immunoglobuline (Lowy 1998). Plusieurs de ces protéines apparentées se lient à des molécules de la matrice extracellulaire telles que les *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules* (MSCRAMM) (Patti & Höök 1994). Différentes études suggèrent que ces protéines jouent un rôle important dans la capacité des staphylocoques à coloniser les tissus hôtes. En effet, certains MSCRAMM assurent l'attachement aux composants de la matrice extracellulaire de l'hôte, tels que le fibrinogène (ClfA et ClfB) (McDevitt et al. 1994), la fibronectine (*Fibronectin Binding Protein A* (FnBPA) et B (FnBPB)) (Jönsson et al. 1991) et le collagène (Cna) (Switalski et al. 1989). Les MSCRAMM sont également présents chez d'autres espèces de staphylocoques telles que *Staphylococcus pseudintermedius* (Fischetti et al. 1990) et les staphylocoques à coagulase négative (Schneewind et al. 1993) mais aussi chez d'autres bactéries à Gram positif, telles que les entérocoques (Joh et al. 1994) et les streptocoques (Huff et al. 1994) dont certains utilisent des mécanismes de liaison similaires aux protéines *S. aureus*.

I.1.a.2.c. Les protéines sécrétées

S. aureus produit de nombreuses toxines regroupées sur la base de leurs mécanismes d'action. On distingue les toxines à tropisme membranaire et les toxines superantigéniques. Les toxines ciblant la membrane cellulaire provoquent soit la formation de canaux membranaires dans les cellules cibles soit une déstabilisation des structures membranaires par action enzymatique en formant des pores. On peut citer l' α -hémolysine (Song et al. 1996), la *Leucocidine de Pantone Valentine* (PVL) (Gillet et al. 2002), LukED et LukGH (Gravet et al. 1998), la β -hémolysine

(Dinges et al. 2000) ainsi que les *Phenol Soluble Modulins* (PSMs). Les PSMs sont de petits peptides différenciés en 2 groupes : les PSM α (PSM α 1 à 4), les PSM β (PSM β 1 et 2) et la delta-hémolysine (Queck et al. 2009). Les toxines superantigéniques comprennent la TSST-1 ainsi que les entérotoxines responsables d'intoxications alimentaires (Holtfreter & Bröker 2005). L'expression de ces facteurs de virulence est sous la dépendance de nombreux système de régulation dont un régulateur global majeur appelé système *Accessory Gene Regulator* (*agr*) (Novick et al. 1993).

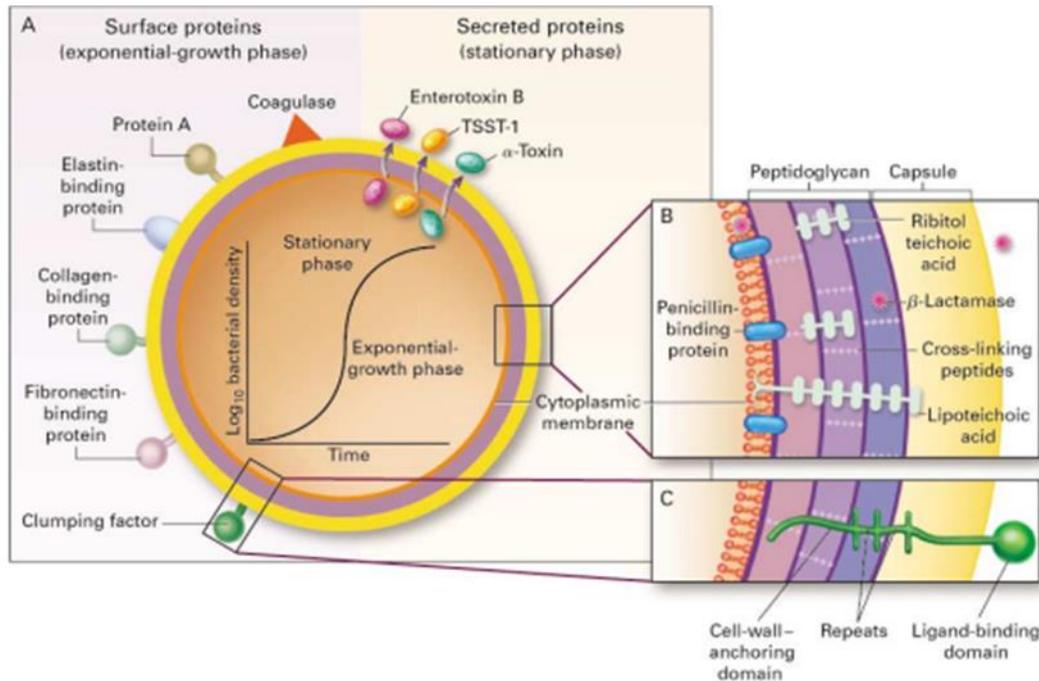


Figure 1 : Organisation de la membrane de *S. aureus*. Protéines de surfaces et protéines sécrétées par *S. aureus* (A). Sections transversales de l'enveloppe cellulaire de *S. aureus* (B et C) (Lowy 1998).

I.1.b. Résistance aux antibiotiques

L'histoire des traitements des infections staphylococciques a été marquée par le développement successif de résistances pour chaque nouvelle classe d'antibiotiques anti-staphylococciques. En effet, la capacité de *S. aureus* à accepter les éléments génétiques mobiles comme par exemple des plasmides ou des transposons, lui a permis d'acquérir de nouveaux gènes de résistance et a joué un rôle considérable dans la résistance aux bêta-lactamines ainsi qu'à la vancomycine.

I.1.b.1. Résistance à la pénicilline et à la méticilline

Les pénicillines sont une famille d'antibiotiques appartenant à la classe des bêta-lactamines. La pénicilline G est la première pénicilline à avoir été utilisée pour le traitement des infections humaines en 1940. Seulement quelques années après sa première utilisation, des souches de

S. aureus résistantes à la pénicilline G ont été identifiées. Ces souches se sont rapidement disséminées dans les hôpitaux et au niveau communautaire tout au long des années 1950 et au début des années 1960 (Barber & Rozwadowska-Dowzenko 1948). La résistance à la pénicilline chez *S. aureus* est conférée par le gène *blaZ*, qui code une β -lactamase qui inactive la pénicilline en hydrolysant le cycle β -lactame de la pénicilline (Olsen et al. 2006). Il faut noter que la résistance à la pénicilline G est présente chez plus de 80 % des souches de *S. aureus* en France. Afin de traiter les infections dues à ces souches, la méticilline, un antibiotique de la famille des bêta-lactamines semi-synthétiques, a été introduite à la fin des années 1950. Malgré l'efficacité de la méticilline dans le traitement de ces infections, les premières souches de *S. aureus Résistantes à la Méticilline* (SARM) ont été signalées à peine deux ans après les premières utilisations des dérivés de la méticilline en clinique humaine (Chambers 1997; Livermore 2000). La proportion de souches SARM dans le monde a augmenté entre 1970 et 2000 pour atteindre dans certains pays développés des prévalences supérieures à 30 % en milieu hospitalier (Hassoun et al. 2017). Actuellement, les souches SARM sont associées à une morbidité et une mortalité importante (Klevens et al. 2006). Les SARM sont responsables d'une grande partie des infections nosocomiales comme le montre les chiffres du « *National Nosocomial Infection Surveillance* » (NNIS) qui rapportaient des prévalences de SARM allant jusqu'à 50 % des souches de *S. aureus* isolées depuis les unités de soins intensifs aux États-Unis et 17.4 % en Europe (Hassoun et al. 2017). Le gène *mecA*, qui code pour une protéine de liaison à la pénicilline (PBP2a ou PBP2) et de faible affinité à la méticilline, confère une résistance à la méticilline. Ce gène a été découvert plus de vingt ans après les premiers cas de SARM rapportés (Katayama et al. 2000). Il est codé sur un élément génétique mobile appelé cassette SCC pour *Staphylococcus Chromosome Cassette* (Ubukata et al. 1989). Les pénicillines se lient normalement à la *Penicillin Binding Protein* (PBP) (enzyme de la paroi cellulaire qui catalyse la formation de pont dans le peptidoglycane de la paroi bactérienne) inhibant ainsi la synthèse de la paroi bactérienne. La PBP2a ayant une très faible affinité pour l'ensemble des pénicillines, son activité n'est donc pas inhibée par cette dernière et la synthèse de la paroi bactérienne peut se dérouler normalement (Peacock & Paterson 2015).

1.1.b.2. Résistance à la vancomycine et émergence du phénotype VISA (Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus*)

La forte prévalence des SARM a entraîné l'utilisation d'antibiotiques appartenant à d'autres familles d'antibiotiques notamment des glycopeptides tels que la vancomycine dont la première

utilisation a été rapportée en 1958. Cet antibiotique inhibe la synthèse de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif non pas en bloquant les enzymes assurant la synthèse du peptidoglycane comme le font les bêta-lactamines mais en se liant de façon stable au précurseur du peptidoglycane, protéine majeure de la paroi (Barna & Williams 1984). La vancomycine reste encore actuellement la plupart du temps l'antibiotique de première intention pour traiter une infection à SARM. Peu de cas de résistance à la vancomycine ont été rapportés immédiatement après les premières utilisations. Néanmoins, des souches ayant un phénotype résistant à la vancomycine (appelées *Vancomycin Resistant S. aureus* (VRSA)) ont été décrites sporadiquement (moins de 20 souches décrites à travers le monde). Cette résistance est liée à l'acquisition d'un cluster de gènes permettant de produire des précurseurs du peptidoglycane (terminaison D-Ala-D-Lac au lieu de D-Ala-D-Ala). Ainsi l'affinité de la vancomycine pour les précurseurs terminés par D-Ala-D-Lac devient mille fois moins élevée que celle pour les précurseurs sauvages (terminés en D-Ala-D-Ala) (Walsh 2000). Ces souches présentent une *Concentration Minimale Inhibitrice* (CMI) pour la vancomycine supérieure à 16 µg/mL (Sievert et al. 2008). Par ailleurs, d'une manière plus inquiétante, des auteurs japonais ont observé en 1997 l'émergence des souches de SARM d'origine clinique présentant une réduction de la sensibilité à la vancomycine, avec des CMI comprises entre 3-8 µg/mL. Ceci a généré une importante préoccupation dans la communauté médicale (Hiramatsu et al. 1997). Ces souches nommées *Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus* (VISA) ont commencé à être de plus en plus recensées dans le monde entier. Ainsi, Rybak et al. ont décrit que 2.2 à 8.3 % des souches de SARM isolées à Détroit entre 1986 et 2007 présentaient un phénotype VISA (Rybak et al. 2008). Ceci pose un véritable problème de santé publique car malgré une augmentation de CMI modérée, le traitement avec la vancomycine pour des infections à VISA conduit à des échecs (Fridkin et al. 2003).

D'un point de vue phénotypique, les souches VISA se caractérisent par un épaississement de leurs parois (Cui et al. 2000) (Figure 2). Les mécanismes moléculaires responsables de la réduction de la sensibilité à la vancomycine observée chez les souches VISA ont fait l'objet de nombreuses recherches. Cette baisse de sensibilité à la vancomycine n'est pas liée à l'acquisition d'un gène unique responsable de la résistance mais surviendrait en raison de l'accumulation de mutations (35 mutations décrites sur 31 locus) dans des gènes impliqués dans le métabolisme de la paroi des staphylocoques abaissant pas à pas le niveau de la sensibilité de la vancomycine (Mwangi et al. 2007). Malgré cette diversité de gènes impliqués, certains gènes comme *graS* qui régule la biosynthèse de la paroi et la réponse au stress cellulaire sont

systématiquement mis en cause dans l'épaississement de leur paroi (Cameron *et al.* 2012a; Howden *et al.* 2008). Plus récemment, le gène *stp1* (de l'opéron *walKR*) a été décrit comme ayant un rôle dans le métabolisme de la paroi cellulaire de *S. aureus*, devenant ainsi la cible de mutations participant à l'émergence des souches VISA (Beltramini *et al.* 2009).

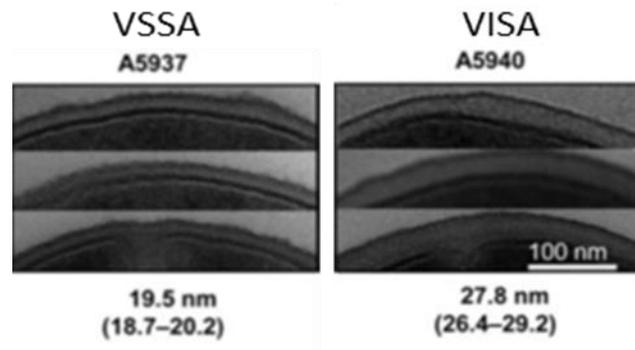


Figure 2 : Épaissement de la paroi chez les souches VISA et VSSA (VISA : Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus* ; VSSA : Vancomycin Susceptible *Staphylococcus aureus*) (Cameron *et al.* 2012b).

Les premières études portant sur de telles souches présentant une sensibilité diminuée pour la vancomycine ont montré qu'une infection à VISA entraînait des complications et une mortalité importante chez les patients infectés par des souches SARM (Charles *et al.* 2004). Or de nouvelles données ont récemment révélé que les souches VISA présentaient une virulence amoindrie par rapport aux souches *Vancomycin Susceptible Staphylococcus aureus* (VSSA), dans un modèle *in vivo* d'invertébré (Peleg *et al.* 2009) (Figure 3), et *in silico* en montrant la perte d'un gène régulateur majeur associé à la virulence chez les souches VISA (Sakoulas *et al.* 2005). Ainsi, ces études ont mis en évidence un lien entre virulence et sensibilité à la vancomycine. Par ailleurs, des auteurs ont suggéré que la baisse de virulence observée chez ces souches VISA pouvait être associée à la persistance et au passage à la chronicité des infections qu'elles provoquent (Peleg *et al.* 2009).

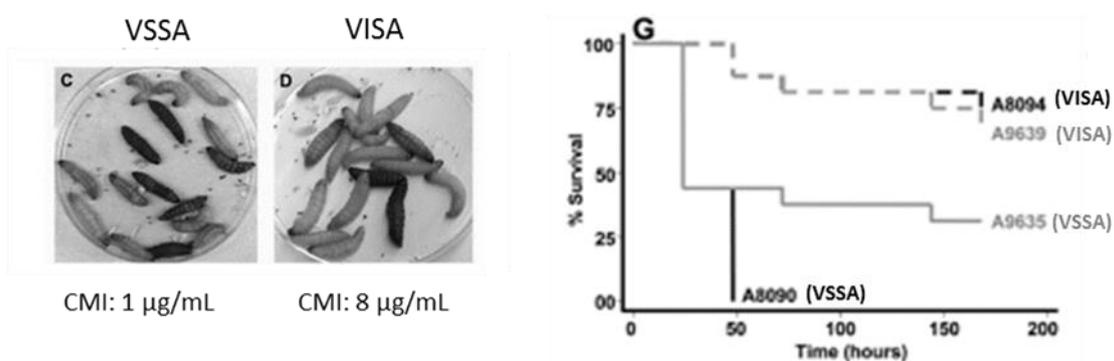


Figure 3 : La virulence des souches VISA chez un modèle invertébré (*Galleria mellonella*) est proportionnelle à la CMI pour la vancomycine (VISA : Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus* ; VSSA : Vancomycin Susceptible *Staphylococcus aureus* ; CMI : Concentration Minimal Inhibitrice) (Peleg *et al.* 2009).

I.1.c. Internalisation et persistance intracellulaire

Deux mécanismes physiopathologiques majeurs ont été identifiés dans le passage à la chronicité des infections staphylococciques : la capacité de *S. aureus* (i) à former du biofilm (Sanchez et al. 2013) et (ii) à persister dans les cellules de l'hôte, notamment les cellules phagocytaires non professionnelles telles que les cellules épithéliales, endothéliales et les kératinocytes (Ellington et al. 1999, 2003; Hudson et al. 1995; Jevon et al. 1999). En effet, longtemps considéré comme un pathogène exclusivement extracellulaire, plusieurs équipes de recherche ont montré que *S. aureus* est capable d'être internalisé dans les cellules eucaryotes (Ellington et al. 1999). Une fois internalisés, les staphylocoques peuvent persister au niveau intracellulaire, échappant ainsi au système immunitaire et à l'action de la plupart des antibiotiques.

I.1.c.1. Internalisation

L'internalisation de *S. aureus* au sein des *Cellules Phagocytaires Non Professionnelles* (CPNP) débute par l'adhésion de la bactérie aux cellules, ou plus précisément aux composants de la matrice extracellulaire des cellules hôtes.

La voie principale de l'internalisation de *S. aureus* au sein des cellules hôtes implique l'adhésion de la bactérie à la fibronectine, protéine de la matrice extracellulaire grâce aux adhésines *Fibronectin Binding Proteins* A et B (FnBP A et B) pour former un pont avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ présente à la surface cellulaire (Peleg et al. 2009) (Figure 4). Le système "FnBP-fibronectine-intégrine $\alpha 5\beta 1$ " est actuellement la voie principale pour l'internalisation de *S. aureus* dans les CPNP. Cependant, il existe aussi des voies secondaires permettant l'internalisation de *S. aureus* dans les CPNP, mais les rendements d'internalisation sont plus faibles et dépendent du type cellulaire étudié.

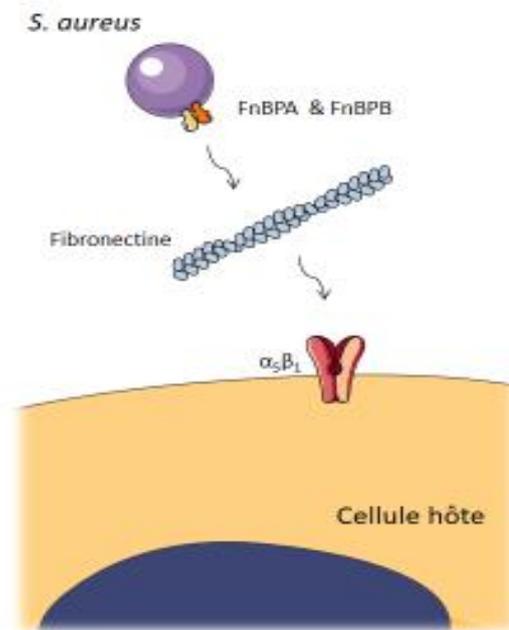


Figure 4 : Schéma de la liaison entre *S. aureus* et une cellule hôte grâce à la protéine FnBP et à l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ (FnBP : Fibronectin Binding Protein, Fn : Fibronectin). Source interne au laboratoire.

Par la suite, un réarrangement du cytosquelette d'actine est assuré, notamment via des microfilaments d'actine afin de permettre l'endocytose de la bactérie. En effet, l'adhésion de la bactérie à la cellule via le système FnBP-Fn- $\alpha 5 \beta 1$ permet de concentrer les intégrines ce qui conduit à l'apparition de protrusions membranaires venant recouvrir la surface bactérienne ainsi qu'une invagination attirant la bactérie vers le cytoplasme cellulaire (Figure 5) (Jevon et al. 1999). Le processus d'internalisation de *S. aureus* peut se produire avec des bactéries mortes mais pas avec des cellules mortes, ce qui suggère que l'internalisation est plus actif sur le versant cellulaire que bactérien (Hudson et al. 1995).

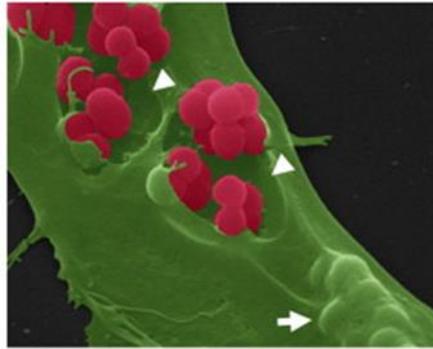


Figure 5 : L'invasion cellulaire par *S. aureus* met en jeu des invaginations et protrusions membranaires. Visualisation par microscopie électronique à balayage avec pseudocouleurs (vert : surface cellulaire ; rouge : *S. aureus*) de l'invasion de fibroblastes murins par *S. aureus* (Schröder et al. 2006).

La poursuite de ce phénomène aboutit à la séquestration de la bactérie dans une vacuole de membrane plasmique, désignée sous le terme de phagosome (Schröder et al. 2006). A noter que l'internalisation est un phénomène observé *in vitro* mais est aussi une réalité clinique. En effet, il a été rapporté dans la littérature, le cas d'un homme de 73 ans présentant une ostéite chronique du péroné, chez lequel une biopsie osseuse a été réalisée. Par microscopie électronique, cette biopsie a révélé la présence de staphylocoques internalisés au sein d'ostéocytes et d'ostéoblastes, les CPNP qui composent le tissu osseux (Figure 6) (Bosse et al. 2005).

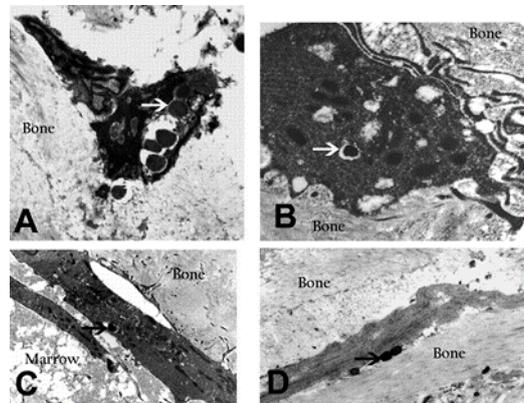


Figure 6 : Photographies en microscopie électronique documentant la présence de *S. aureus* (flèches) internalisés au sein d'ostéocytes (A et B), d'ostéoblastes (C) et dans la matrice osseuse (D) lors de l'analyse d'une biopsie osseuse réalisée chez un patient de 73 ans présentant une ostéite chronique du péroné (A, x 14,000 ; B, x 15,600 ; C, x 5,540 ; D, x 12,900) (Joo & Otto 2012).

I.1.c.2. Survie intracellulaire, cytotoxicité et réponse inflammatoire

I.1.c.2.a. Survie intracellulaire

Après son internalisation, *S. aureus* a la capacité de s'adapter et de persister dans le milieu intracellulaire pendant des périodes variées en minimisant la réponse de défense de la cellule hôte (Tuchscher et al. 2010). Une fois internalisée, la bactérie arrêterait temporairement la

plupart de ses fonctions métaboliques et adopterait un « état de dormance » afin de s'adapter à son nouvel environnement amenant parfois à un changement de phénotype: les *Small Colony Variants* (SCVs) (Tuchscher et al. 2011). Ces SCVs correspondent à une sous-population de bactéries avec une croissance ralentie ce qui leur confère une capacité à survivre (Schröder et al. 2006) en les rendant plus tolérantes aux antibiotiques à portée intracellulaire (Proctor et al. 2006). Sur gélose, elles forment des petites colonies non hémolytiques et non pigmentées (Figure 7). Ce phénotype SCV est aussi réversible car il a été observé que les SCVs sont capable de retrouver leur phénotype sauvage rapidement lorsque celles-ci quittent le compartiment intracellulaire (Tuchscher et al. 2011). Ce phénotype leur permet également d'être moins cytotoxiques. En effet, il a été décrit qu'un haut pourcentage de SCV était corrélé à une cytotoxicité amoindrie lors de la persistance de *S. aureus* dans les ostéoblastes (Kalinka et al. 2014).

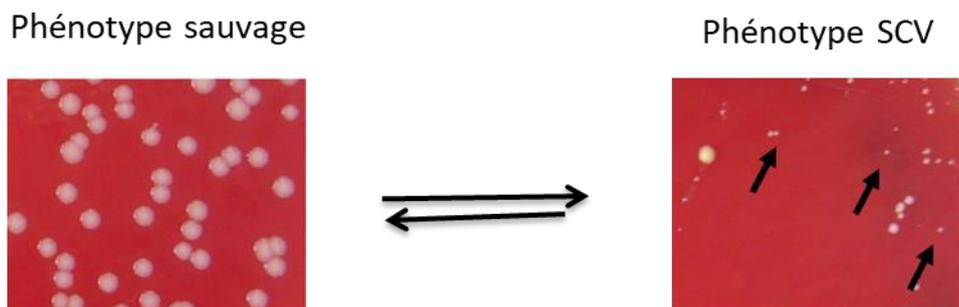


Figure 7 : Phénotype SCV de *S. aureus* (Löffler et al. 2014).

Une fois internalisé, *S. aureus* peut se retrouver dans un phagosome au sein de la cellule hôte (Jauregui et al. 2013). Ce phagosome va ensuite fusionner avec un lysosome, une vacuole au pH acide contenant des molécules antimicrobiennes. La formation du phagolysosome va permettre l'élimination de la bactérie internalisée. La capacité de *S. aureus* à survivre dans la cellule sera définie soit par sa capacité à persister dans les vacuoles malgré l'acidité et les molécules antimicrobiennes, soit par sa capacité à sortir de la vacuole pour atteindre le cytoplasme afin d'échapper à l'activité protéolytique du lysosome.

Concernant l'échappement phagosomal, certains agents pathogènes intracellulaires (tels que *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Trypanosoma cruzi* et *Leishmania* spp.) s'échappent du phagosome dans le cytosol de la cellule hôte quelques minutes après l'invasion, grâce à la sécrétion de facteurs de virulence (Hybiske & Stephens 2008). Concernant *S. aureus*, ce phénomène serait plus tardif et sous la régulation du système *agr* (Blättner et al. 2016).

Les PSM α , exotoxines produites par *S. aureus*, ont aussi été identifiés comme des médiateurs clés de l'évasion phagosomale chez les cellules phagocytaires professionnelles et non

professionnelles (Grosz et al. 2014). Cependant, la production de PSM α seule n'est pas suffisante pour induire une évasion phagosomale. En effet, des facteurs d'échappement phagosomaux supplémentaires ont récemment été identifiés comme nécessaires à l'échappement hors des vacuoles de phagocytose. Parmi ces autres facteurs, on compte la synthétase *Non-Ribosomal Peptide Synthetase* (NRPS), ainsi qu'une peptidase potentielle de traitement du peptide signal (Blättner et al. 2016). Néanmoins, le mécanisme d'action moléculaire de ces protéines n'est à ce jour pas encore élucidé et nécessitera des études complémentaires. De plus, il a aussi été montré que la faible production de δ -toxine chez des souches cliniques de *S. aureus* isolées d'infections ostéo-articulaires était aussi corrélée avec la chronicité des infections (Valour et al. 2015a). Les PSMs et le système *agr* sont donc les éléments clés de l'échappement phagosomal, nécessitant une régulation fine afin de sur-exprimer ou sous-exprimer la production de PSMs.

Un fois sorti de la vacuole, *S. aureus* serait capable de se multiplier dans le cytoplasme des CPNP alors qu'à l'intérieur des phagocytes professionnels comme les macrophages, *S. aureus* se répliquerait à l'intérieur des phagosomes (Flannagan et al. 2016). Actuellement, le rôle de l'autophagie dans l'échappement phagosomal de *S. aureus* est aussi débattu. L'autophagie correspond à la formation d'une vacuole à double membrane, l'autophagosome, permettant la séquestration du contenu cytoplasmique à dégrader tel qu'un agent pathogène intracellulaire dans le cas d'une infection (Deretic 2011). Certains auteurs ont identifié que certaines souches de *S. aureus* étaient également capable de se répliquer dans les autophagosomes (Schnaith et al. 2007). D'autres auteurs ont montré une réplication cytoplasmique après l'échappement de *S. aureus* hors des autophagosomes (Mestre et al. 2010).

1.1.c.2.b. Cytotoxicité

En plus de sa capacité à persister dans les cellules, *S. aureus* peut induire la mort de la cellule, on parle de cytotoxicité (Widaa et al. 2012). En effet, *S. aureus* est capable d'induire la mort cellulaire par apoptose ou nécrose (Alexander et al. 2003). L'apoptose a été associée à l'internalisation de *S. aureus* dans plusieurs modèles *in vitro* d'infection de CPNP comme les ostéoblastes (Tucker et al. 2000). Les avis divergent quant à savoir si l'apoptose est induite par la cellule hôte pour se défendre ou par *S. aureus* pour se propager. Les PSM α ont aussi été décrit comme étant impliqués dans la médiation de la cytotoxicité lors du passage intracellulaire de *S. aureus* dans les ostéoblastes (Rasigade et al. 2013). Comme l'a indiqué Josse et al. 2015, il existe donc bien une corrélation entre l'échappement de la vacuole, la cytotoxicité et le facteur

d'endommagement de la membrane suggérant que les PSMs permettent à *S. aureus* d'échapper aux vacuoles en endommageant la membrane cellulaire (Josse et al. 2015).

I.1.c.2.c. Production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules infectées par *S. aureus*

Lors d'une infection, *S. aureus* peut interagir directement avec les ostéoblastes au niveau membranaire (extracellulaire) ainsi qu'au niveau intracellulaire après internalisation. C'est notamment le cas lors d'une internalisation au sein des ostéoblastes (Hudson et al. 1995).

S. aureus possède différentes *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMP) qui interagissent avec les ostéoblastes afin d'induire la production de chimiokines et de cytokines qui vont recruter et activer les cellules de la réponse inflammatoire innée et adaptative (Claro et al. 2013). Les cytokines sont des protéines solubles produites en réponse à différents stimuli par tous les types de cellules eucaryotes, qu'il s'agisse de cellules phagocytaires professionnelles ou non professionnelles. Ces cytokines sont impliquées dans la régulation des fonctions immunitaires et jouent un rôle essentiel dans la réponse de l'hôte à l'infection. Plus spécifiquement, la production de certaines cytokines peut être augmentée lors d'une infection à *S. aureus*, telles que l'*Interleukine 6* (IL-6) qui permet de recruter et d'activer les macrophages (Bost et al. 1999). Une intense augmentation du niveau de la sécrétion de *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (G-CSF) et *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor* (GM-CSF), deux facteurs de croissances qui favorisent la maturation des leucocytes, peut aussi être observée (Bost et al. 2001).

I.2. Antibiotiques anti-staphylococciques et efficacité contre les staphylocoques intracellulaires

L'internalisation de *S. aureus* au sein des ostéoblastes et leur capacité à persister au niveau intracellulaire sous forme de SCVs est un mécanisme qui peut mener à l'établissement d'un réservoir bactérien responsable de rechutes et de chronicisation des *Infections Ostéo-Articulaires* (IOA). Wieland et al. (2012) et Valour et al. (2015) ont rapporté un taux d'échec à 12.2 % et 24.2 % sur des souches SASM issues d'IOA (Valour et al. 2015b; Wieland et al. 2012). Même si actuellement l'activité intracellulaire d'un antimicrobien n'est pas prise en compte dans la stratégie de traitement des IOA, il apparaît important de tester l'activité des antibiotiques déjà commercialisés contre les staphylocoques intracellulaires et de prendre en compte cette activité lors du développement de nouvelles molécules anti-staphylococciques.

L'efficacité d'un antibiotique contre les staphylocoques intracellulaires est soumise à plusieurs paramètres : la capacité à traverser la membrane cellulaire afin de pénétrer au sein de la cellule (molécule à tendance plutôt lipophile), la capacité à rester active dans l'environnement intracellulaire (le pH intracellulaire pouvant inactiver un antibiotique) et la capacité à avoir une concentration intracellulaire suffisante pour conserver son activité antimicrobienne. De plus, les staphylocoques persistants au niveau intracellulaire présentent une tolérance accrue aux différents antibiotiques ciblant la paroi du fait de leur croissance ralentie (von Eiff et *al.* 2006). En effet, *S. aureus* peut prendre le phénotype SCV et se mettre en état de dormance mais aussi augmenter la taille de sa paroi et ainsi être plus tolérant aux antibiotiques (Ellington et *al.* 2003). La concentration administrée est également importante à prendre en compte. En effet, une dose sub-inhibitrice peut engendrer une hausse ou une baisse de l'activité de la molécule en influant sur l'adhésion de *S. aureus* aux cellules via une régulation positive de FnBP (Rasigade et *al.* 2011). En 2015, Valour et *al.* ont ainsi évalué l'activité contre les staphylocoques intra-ostéoblastiques de plusieurs antibiotiques utilisés lors du traitement d'IOA. Ces différents antibiotiques ont été étudiés à leur concentration osseuse, c'est-à-dire en prenant en compte la biodisponibilité osseuse réelle de chaque molécule (Valour et *al.* 2015b). Ces auteurs ont montré que la vancomycine et la daptomycine ne sont pas efficaces sur *S. aureus* intracellulaires, tandis que la ceftaroline et la teicoplanine se sont montrées bactériostatiques. La fosfomycine, la tigecycline, le linézolide et l'oxacilline ont montré une activité intermédiaire alors que la rifampicine, l'ofloxacine et la clindamycine ont montré une très bonne activité contre les staphylocoques présents dans le compartiment intracellulaire. En effet, ces dernières molécules possèdent une accumulation rapide dans les cellules comparativement aux autres molécules (Easmon & Crane 1984). Lors de cette même étude, il a aussi été montré que l'ofloxacine, en plus de sa forte activité intracellulaire, n'engendrait aucune émergence de SCV (Valour et *al.* 2015b). Il est aussi important de prendre en compte que lors de l'internalisation, *S. aureus* se retrouve dans le phagolysosome, compartiment intracellulaire avec un pH acide (Fraunholz & Sinha 2012). Le pH peut donc influencer sur l'efficacité de la molécule sur *S. aureus* (Lemaire et *al.* 2007). Lors d'une seconde étude sur le traitement des IOA, Dupieux et *al.* ont souhaité approfondir l'évaluation de l'efficacité intracellulaire de la daptomycine (Dupieux et *al.* 2017). Cette molécule est très utilisée dans le traitement des IOA du fait de sa bonne diffusion osseuse et de son activité anti-biofilm (Montange et *al.* 2014). L'utilisation de la daptomycine dans le traitement des IOA à *S. aureus* est cependant assez controversée car cette molécule n'a présenté qu'une activité intraostéoblastique assez faible sur *S. aureus* lors d'une précédente étude *in vitro* (Valour et *al.* 2015b). D'autres études ont mis en avant une synergie

potentielle entre la daptomycine et d'autres molécules (Gould et al. 2013). Dupieux et al. (2017) ont alors testé l'efficacité d'une combinaison daptomycine et oxacilline contre les staphylocoques intracellulaires. Ces auteurs ont pu montrer que finalement l'oxacilline augmentait l'activité de la daptomycine sur le réservoir intracellulaire staphylococcique, y compris sur les SARM (Dupieux et al. 2017).

1.3. *Staphylococcus non-aureus* et persistance intracellulaire

1.3.a. Généralités / Phylogénie

En complément de l'espèce *S. aureus*, il existe 46 espèces et 23 sous-espèces au sein du genre *Staphylococcus* (Figure 8). Parmi ces espèces, un petit nombre possède une coagulase comme *S. pseudintermedius* et *S. intermedius*. En effet, la plupart sont des *Staphylocoques à Coagulase Négative* (SCN) notamment *S. epidermidis*, *S. lugdunensis*, *S. saprophyticus* ou *S. haemolyticus* qui sont les espèces les plus prévalentes (Becker et al. 2014). Le terme "Staphylococcus Non-aureus" (SNA) regroupe toutes les espèces du genre *Staphylococcus* en dehors de *S. aureus*, qu'elles soient à coagulase négative ou à coagulase positive. Ces SNA font aussi partie du microbiote cutané des Hommes et Animaux. Cependant, ces espèces commensales peuvent aussi devenir pathogènes opportunistes capables de provoquer des infections suppuratives profondes, comme des IOA chroniques en absence ou en présence de matériel prosthétique. Actuellement, peu de données sont disponibles sur l'internalisation des SNA, que ce soit en termes de capacité ou de mécanisme d'internalisation. Les rares études disponibles concernent principalement *S. epidermidis* et *S. pseudintermedius*.

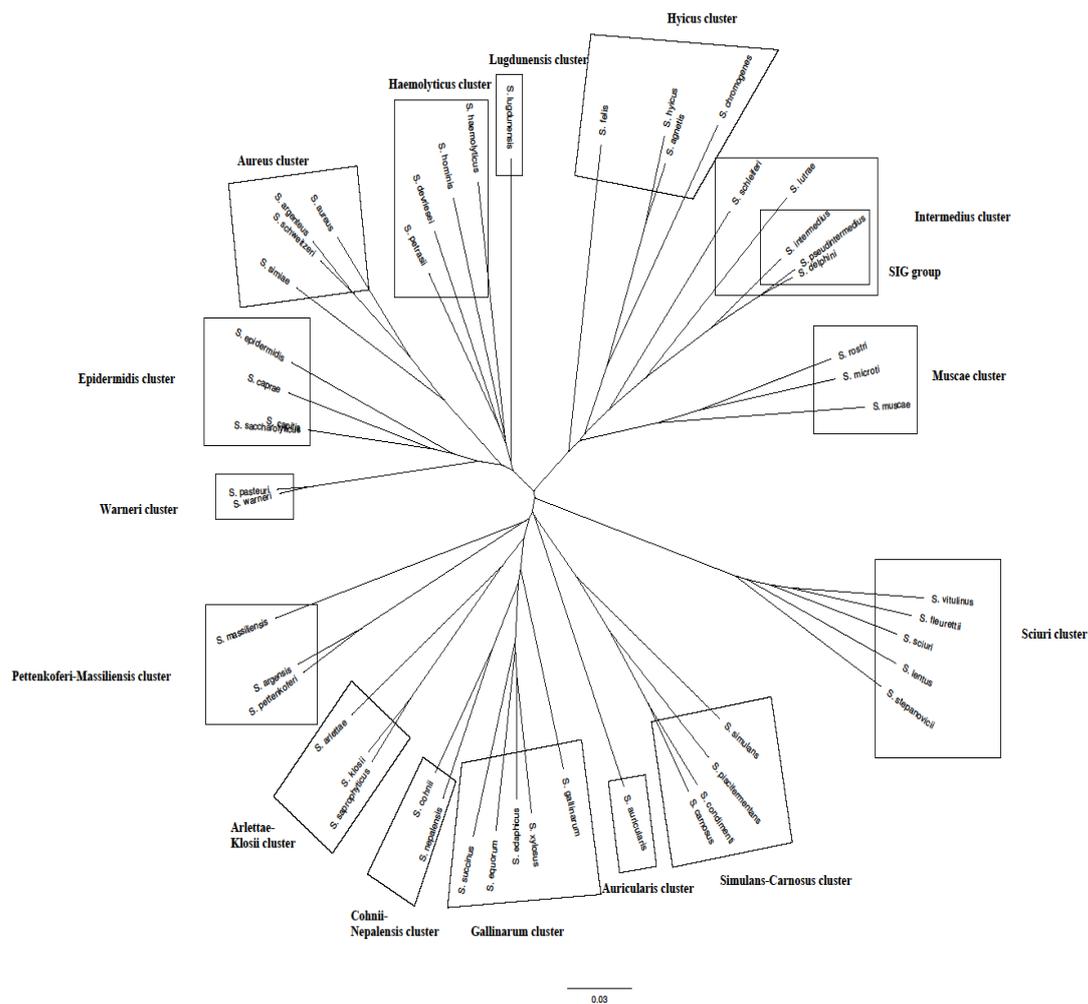


Figure 8 : Arbre phylogénique du genre *Staphylococcus* basé sur *dnaG*, *rpoB* et *tuf*. Source interne au laboratoire.

1.3.a.1. Nouveaux *Staphylococcus* non-*aureus*

Pour les SNA, deux nouvelles espèces ont été identifiées récemment: *S. argenteus* et *S. schweitzeri* (Tong et al. 2015). Ces deux espèces de SNA étaient jusque-là la plupart du temps associées voire confondues avec *S. aureus* (Ruimy et al. 2009).

1.3.a.1.a. *S. argenteus*

L'espèce *S. argenteus* a été identifiée pour la première fois dans le Nord de l'Australie en 2006 (McDonald et al. 2006) mais cette espèce n'a reçu une classification taxonomique qu'en 2014. D'un point de vue diagnostique, les techniques standards de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pour l'identification des espèces ne permettent pas de différencier *S. aureus* de *S. argenteus*. En revanche Thaipadungpanit et al. proposent une technique de séparation des 2 espèces

voisines via la technique de *MultiLocus Sequence Typing* (MLST) (Thaipadungpanit et al. 2015). Par ailleurs, au niveau clinique, les infections à *S. argenteus* sont associées à des infections de la peau mais rarement des bactériémies (Tong et al. 2013) et provoquerait moins d'insuffisances respiratoires que *S. aureus* (Chantratita et al. 2016). Cette espèce semble en effet être moins virulente que *S. aureus in vivo* dans des modèles de sepsis et d'infection de la peau chez la souris (Tong et al. 2013). Ceci pourrait s'expliquer par une sensibilité plus importante au stress oxydatif ainsi qu'à la réponse des neutrophiles, montrée *in vitro* (Tong et al. 2013). Néanmoins, d'autres études cliniques ont montré que le taux de morbidité et mortalité était identique entre ces deux espèces (Thaipadungpanit et al. 2015). Tong et al. ont montré que *S. argenteus* ne possède pas les gènes codant pour la toxine PVL (Tong et al. 2010) et une étude de Chantratita et al. a aussi mis en évidence une présence de toxines réduite pour les souches de *S. argenteus* ainsi qu'une sensibilité aux antibiotiques plus importante par rapport aux souches de *S. aureus* (Chantratita et al. 2016). Cependant Dupieux et al. ont rapporté deux cas de patients présentant une infection à *S. argenteus* PVL+ indiquant que cette espèce est aussi capable d'acquérir le gène de cette toxine (Dupieux et al. 2015). Enfin, de récentes études soulignent l'importance clinique de *S. argenteus*, décrivant cette nouvelle espèce comme un pathogène émergent. C'est notamment le cas de Moradigaravand et al. qui ont montré que *S. argenteus* avait la capacité d'acquérir de nouvelles exotoxines et de nouveaux gènes de résistance (Moradigaravand et al. 2017).

1.3.a.1.b. *S. schweitzeri*

S. schweitzeri est aussi une espèce de SNA décrite très récemment. Comme *S. aureus*, les bactéries de cette espèce possèdent des activités catalase et coagulase mais leur paroi diffère de celle de *S. aureus* en terme de composition du peptidoglycane (Schaumburg et al. 2012). Cette espèce a été isolée chez le singe ainsi que chez la chauves-souris et seulement très rarement chez l'Homme (Schaumburg et al. 2015).

1.3.b. Internalisation et persistance intracellulaire

Comme nous l'avons vu, l'internalisation et la persistance intracellulaire sont des mécanismes importants dans la chronicité des infections staphylococciques. Ils ont été étudiés en détail chez *S. aureus* même si tous les mécanismes physiopathologiques ne sont pas encore élucidés. Concernant les SNA, la capacité à être internalisé est controversée pour *S. epidermidis* et n'a

fait l'objet que de peu ou pas d'étude pour les autres espèces à l'exception de *S. pseudintermedius*.

1.3.b.1. Exemple de *S. epidermidis*

S. epidermidis est un SCN longtemps considéré comme une bactérie peu virulente et commensale de la peau humaine et des muqueuses. Néanmoins, il est à présent considéré comme un pathogène opportuniste responsable de nombreuses infections nosocomiales (Otto 2009). Ainsi, *S. epidermidis* est responsable de 30 à 43 % des IOA sur prothèse (Zimmerli et al. 2004). Au cours de ces infections, le mécanisme physiopathologique proposé est l'inoculation directe au niveau ostéoarticulaire des bactéries colonisant la peau lors d'un acte chirurgical (Uçkay et al. 2009). Ceci suggère que les IOA à *S. epidermidis* correspondraient à un évènement accidentel dû aux souches commensales. Les premières études sur l'adhésion de *S. epidermidis* aux cellules ont montré que ce staphylocoque avait de bonnes capacités d'adhésion à la fibronectine (Switalski et al. 1983). En 1995, Minhas et al. ont rapporté la présence d'un gène *fnb* codant une protéine FnBP putative chez *S. epidermidis* similaire à celle de *S. aureus*. Cependant, la présence de la protéine membranaire FnBP n'a jamais été mise en évidence (Minhas et al. 1995). Plus tard, une autre protéine pouvant se lier à la fibronectine, *Extracellular Matrix Bind Protein* (EmBP) a été identifiée chez *S. epidermidis* mais aucune donnée n'est disponible concernant son rôle dans l'internalisation (Williams et al. 2002). L'internalisation de *S. epidermidis* dans les CPNP est controversée selon les études réalisées. D'une part, Oviedo-Boyso et al. ont décrit une internalisation dans les cellules endothéliales bovines (Oviedo-Boyso et al. 2009), Almeida et al. dans les cellules épithéliales bovines (Almeida & Oliver 2001) et Khalil et al. dans les cellules ostéoblastes humaines (Khalil et al. 2007). D'autres auteurs ont décrit une absence ou une quasi-absence d'internalisation de *S. epidermidis* au sein des ostéoblastes humains (Campoccia et al. 2016; Maali et al. 2016; Valour et al. 2013). En effet, il a été montré que les souches de *S. epidermidis* étaient très peu internalisées dans les ostéoblastes et que peu de différences étaient relevées entre des souches commensales et des souches issues d'IOA (Valour et al. 2013). Ces observations suggèrent que l'invasion cellulaire au sein des ostéoblastes ne serait donc probablement pas le mécanisme principal de la physiopathologie des IOA à *S. epidermidis* contrairement à ce qui a été observé chez *S. aureus*. Ce taux d'internalisation très faible pourrait s'expliquer par l'absence de système "FnBP-fibronectine-intégrine $\alpha 5\beta 1$ ". Le faible taux d'internalisation observé par certains auteurs pour *S. epidermidis* serait uniquement dû à des mécanismes mineurs indépendants de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (Khalil et al. 2007).

1.3.b.2. Exemple de *S. pseudintermedius*

S. pseudintermedius est un pathogène commensal à coagulase positive responsable d'infections chez le chien, notamment de lésions nécrosantes de la peau et d'IOA (Nazarali et al. 2015). Il existe des risques de transmission de l'Animal à l'Homme (Darlow et al. 2017). Une étude récente sur plusieurs SNA menée par notre équipe a montré que, parmi le panel testé, *S. pseudintermedius* était capable d'être internalisé dans des quantités supérieures à *S. aureus* (Maali et al. 2016). En effet, Maali et al. ont montré que parmi plusieurs SNA, seul *S. pseudintermedius* avait la capacité d'adhérer à la fibronectine, d'être internalisé dans les cellules ostéoblastiques humaines et d'induire une cytotoxicité. Ce résultat a été confirmé sur un panel de 17 souches cliniques de *S. pseudintermedius*, une seule des souches était incapable d'être internalisée. Cette dernière était la seule souche incapable de se lier à la fibronectine. Ce résultat suggère la nécessité de la présence de la fibronectine lors de l'internalisation chez *S. pseudintermedius*. De plus, Bannoehr et al. ont rapporté l'absence des gènes *fnbA* et *fnbB* du génome de *S. pseudintermedius* mais la présence de deux protéines de la membrane, SpsD et SpsL, homologues aux protéines membranaires de *S. aureus* FnBPA et FnBPB pouvant se lier aussi à la fibronectine (Bannoehr et al. 2011). Une autre équipe a simultanément montré une possible internalisation de *S. pseudintermedius* dans des kératinocytes de chien et l'importance de la présence de SpsD, SpsL ainsi que de la fibronectine dans cette internalisation (Pietrocola et al. 2015). Maali et al. ont eux démontré l'importance du récepteur cellulaire $\alpha 5\beta 1$ pour l'invasion cellulaire de *S. pseudintermedius*. Ces auteurs ont aussi montré une induction de la mortalité cellulaire lors de l'infection intra-ostéoblastique par *S. pseudintermedius*, plus importante que celle observée avec *S. aureus*. Ceci suggère qu'il y aurait une expression de facteurs de virulence spécifique exprimée dans le compartiment intracellulaire. Dans leur article de 2015, Pietrocola et al. ont suggéré que les facteurs de virulence impliqués dans la cytotoxicité de *S. pseudintermedius* étaient Luk-I, une leucotoxine similaire à la PVL de *S. aureus* permettant à *S. pseudintermedius* d'induire l'apoptose (Chi et al. 2014). Or, les gènes de PSM ont aussi été décrits comme étant présents dans le génome de *S. pseudintermedius* (Cheung et al. 2014). En 2018, Maali et al. ont confirmé par PCR la présence de Luk-I ainsi que des PSMs (δ -toxin et PSM ϵ) dans les génomes de 17 souches de *S. pseudintermedius* (Maali et al. 2018). Ils ont montré que Luk-I n'avait pas d'activité cytotoxique sur les CPNP telles que les ostéoblastes, mais seulement sur les cellules immunitaires telles que les macrophages car Luk-I (comme la toxine PVL des staphylocoques) nécessitait des récepteurs spécifiques exprimés uniquement sur certaines cellules immunitaires (absence chez les CPNP).

A l'inverse, la δ -toxin et le PSM ϵ de *S. pseudintermedius* ont présenté une haute activité cytotoxique contre tous les types cellulaires. Ceci est cohérent avec les précédents résultats de notre groupe démontrant que la cytotoxicité intracellulaire de *S. aureus* était liée à l'expression de PSM et que la PVL n'était pas impliquée dans la cytotoxicité intracellulaire (Rasigade et al. 2013). Enfin, Maali et al. ont montré qu'une supplémentation avec du sérum dans le surnageant des cultures de *S. pseudintermedius* (connu pour inhiber l'effet des PSMs) induisait une perte totale de la cytotoxicité, suggérant fortement que les PSMs seraient bien les toxines impliquées dans la toxicité de *S. pseudintermedius* vis-à-vis des CPNP (Maali et al. 2018).

II. Présentation des axes du projet de recherche

Lors de ce projet de recherche, nous nous sommes intéressés au rôle de l'internalisation et de la persistance intracellulaire dans les infections staphylococciques. Pour cela, nous avons étudié (i) les capacités d'internalisation de différentes espèces de staphylocoques, (ii) les mécanismes impliqués dans la persistance intracellulaire et la chronicisation des infections et (iii) nous avons aussi évalué de nouvelles molécules anti-staphylococciques à visée intracellulaire. Ce projet d'étude a été divisé en trois axes.

Le premier axe de ce projet a visé à comprendre l'impact du phénotype VISA (Vancomycin Intermediate *S. aureus*) dans la chronicisation des infections à *S. aureus*, particulièrement son rôle dans la persistance intracellulaire. Ce projet a été réalisé en collaboration avec Dr. Anton Pelleg (Département de Microbiologie, Université de Monash, Melbourne, Australie). Nous avons étudié deux couples de souches cliniques VISA/VSSA. Chaque couple était composé de deux souches provenant du même patient, (i) une souche VSSA et (ii) une souche VISA obtenue ultérieurement chez un même patient après un traitement antibiotique. Pour chacune d'entre elles, nous avons étudié *in vitro* leurs capacités à être internalisées dans un modèle d'infection cellulaire et à persister au cours du temps dans le compartiment intracellulaire des ostéoblastes. D'autre part, une souche inactivée pour le gène *stpI*, suspecté d'avoir un rôle dans la diminution de la sensibilité à la vancomycine des souches VISA, a également été testée dans ces modèles. Le second axe a porté sur l'évaluation de nouvelles molécules innovantes contre les staphylocoques intracellulaires. Deux projets indépendants ont été réalisés en collaboration avec des compagnies pharmaceutiques : une étude portant sur les molécules Sar1 et Sar2 produites par Sanofi ainsi qu'une étude portant sur la molécule Debio 1452 de Debiopharm. Nous avons évalué l'activité intracellulaire à plusieurs concentrations de ces différentes

molécules actives sur *S. aureus* dans un modèle d'infection de cellules ostéoblastiques humaines.

Le dernier axe a consisté à étudier un panel de différentes espèces de SNA afin de déterminer leurs capacités et leurs mécanismes d'internalisation dans les CPNP ainsi que leur capacité à persister dans ces cellules. Lors de cette étude, nous avons étudié pour la première fois l'internalisation et la persistance intracellulaire au sein de CPNP d'espèces peu étudiées (*S. simiae*, *S. schleiferi*) ainsi que des espèces récemment décrites (*S. argenteus* et *S. schweitzeri*).

III. Matériels et méthodes

III.1. Souches bactériennes utilisées dans les différents projets

Pour toutes les expériences réalisées au cours de ce projet, les souches conservées à -20°C ont été repiquées sur des géloses au sang (Columbia +5 % de sang de mouton (COS), bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) puis incubées à 37°C sur la nuit.

L'étude portant sur les souches de *S. aureus* VISA a été réalisée sur deux couples de souches cliniques, issus chacun d'un patient différent (patient 1 et 2). Chaque couple se compose d'une souche clinique VSSA sensible à la vancomycine isolée dès la mise en évidence de l'infection chez le patient et de son homologue VISA (à sensibilité diminuée pour la vancomycine) correspondant à la souche VSSA ayant acquis une résistance à la vancomycine au cours du traitement du patient (Tableau 1). *In vitro*, la souche VSSA 1 a été invalidée pour le gène *stp1* afin d'évaluer l'impact de ce gène dans nos modèles (Tableau 1). Cette souche a été modifiée par l'équipe d'Anton Peleg (Monash Biomedicine Discovery Institute and Department of Microbiology, Monash University) en utilisant un vecteur navette *Escherichia coli/S. aureus*, pKOR1. Après clonage des régions flanquantes du gène *stp1* (environ 500pb en amont et en aval) dans le vecteur en utilisant le kit BP clonase d'Invitrogen, le plasmide a été introduit dans la souche parentale (VSSA 1) par électroporation. Les recombinaisons homologues ont été induites par croissance à 43°C (température non-permissive pour le plasmide pKOR1) et l'invalidation a été confirmée par séquençage génomique, Southern blot et *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) (Cameron et al. 2012b).

Tableau 1 : Liste des souches de *S. aureus* utilisées dans le cadre du projet VISA (VISA : Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus* ; VSSA : Vancomycin Susceptible *Staphylococcus aureus*).

	Nom souches	Type
patient 1	VSSA 1	VSSA
	VISA 1	VISA
	VSSA 1 Δ <i>stp1</i>	VSSA Δ <i>stp1</i>
patient 2	VSSA 2	VSSA
	VISA 2	VISA

Les études d'efficacité de nouvelles molécules contre les staphylocoques intracellulaires ont été réalisées avec des souches de *S. aureus* de référence : la souche HG001 pour l'étude Sanofi et la souche ATCC 29213 pour l'étude Debiopharm (Tableau 2).

Tableau 2 : Liste des souches utilisées lors des différentes études réalisées sur l'efficacité de nouvelles molécules anti-staphylococcique en intracellulaire.

Projets	Souche <i>S. aureus</i> de référence
Sanofi	HG001
Debiopharm	29213

L'étude portant sur SNA a été réalisée en testant une série de souches cliniques de *S. argenteus* (n=4), *S. schleiferi* (n=4), *S. swcheitzeri* (n=1) et *S. simiae* (n=4). Pour chaque espèce, une souche de référence et des souches cliniques isolées de patients différents ont été incluses. Les différentes souches de SNA ont été comparées à 2 souches de référence de *S. aureus* (8325-4 et 29213) (Tableau 3).

Tableau 3: Liste des souches évaluées dans le cadre de l'étude sur *Staphylococcus non-aureus*.

Noms	Souches
29213	<i>S. aureus</i> de référence ATCC 29213
8325-4	<i>S. aureus</i> de référence NCTC 8325-4
Arg1	<i>S. argenteus</i> clinique
Arg2	<i>S. argenteus</i> de référence DSM 28299
Arg3	<i>S. argenteus</i> clinique
Arg4	<i>S. argenteus</i> clinique
Schl1	<i>S. schleiferi schleiferi</i> de référence ATCC 43808
Schl2	<i>S. schleiferi coagulans</i> clinique
Schl3	<i>S. schleiferi coagulans</i> clinique
Schl4	<i>S. schleiferi schleiferi</i> clinique
Sim1	<i>S. simiae</i> de référence CCM 7213
Sim2	<i>S. simiae</i> clinique
Sim3	<i>S. simiae</i> clinique
Sim4	<i>S. simiae</i> clinique
Schw1	<i>S. schweitzeri</i> de référence DSM 28300

III.2. Test de sensibilité aux antibiotiques

III.2.a. Antibiogramme par bandelette

La détermination de la CMI a été déterminée grâce à des bandelettes (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Une densité optique de 0.5 McFarland a été réalisée dans de l'eau stérile stérile (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), à l'aide d'un densitomètre (ATB 1550, VITEK systems, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), en prélevant avec une pipette stérile 2 ou 3 colonies sur une gélose COS. Un ensemencement sur une gélose Mueller-Hinton (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) a ensuite été réalisé en imprégnant un écouvillon de suspension puis en faisant des stries serrées dans 3 sens différents. Une bandelette E-test® imprégnée d'une quantité décroissante d'antibiotique a ensuite été déposée à la surface de la gélose. La molécule diffuse dans la gélose et crée ainsi une ellipse d'inhibition après une incubation pendant 24 h à 37°C. La CMI a alors été déterminée par la valeur obtenue au point d'intersection entre la limite de la zone d'inhibition et la bandelette graduée.

La détermination de la CMI pour la vancomycine a été réalisée par cette technique sur les différentes souches utilisées dans le cadre du projet VISA (Tableau 4).

Tableau 4: Liste des souches de S. aureus utilisées avec leurs CMI (Concentration minimale inhibitrice) pour la vancomycine (VISA : Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus ; VSSA : Vancomycin Susceptible Staphylococcus aureus).

	Souches	CMI pour la vancomycine mesurée en Etest (mg/L)
patient 1	VSSA 1	1
	VISA 1	1.75
	VSSA 1 Δ stp1	1.25
patient 2	VSSA 2	1
	VISA 2	2.5

III.2.b. Antibiogramme par diffusion

Les antibiogrammes ont été réalisés à l'aide de disques d'antibiotiques standards selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de la Microbiologie (CA-SFM). Une densité optique de 0.5 McFarland a été réalisée d'une façon identique à l'antibiogramme par bandelette (voir III.2.a.). Puis un ensemencement sur une gélose Mueller-Hinton (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) a été réalisé en imprégnant un écouvillon de suspension puis en faisant des stries serrées. Les disques imprégnés d'antibiotiques ont ensuite été déposés à la surface de la gélose. Après une incubation pendant 24 h à 37°C, un cercle d'inhibition par diffusion de l'antibiotique a été observé. La résistance ou sensibilité aux

antibiotiques a alors été déterminée en mesurant le diamètre obtenu et en le comparant aux diamètres critiques selon les recommandations du CA-SFM.

Des antibiogrammes ont été réalisés selon cette technique sur les souches utilisées dans le cadre du projet portant sur les SNA.

III.2.c. Tests de sensibilité aux antibiotiques : Détermination de la concentration minimale inhibitrice par microdilution

La détermination de la CMI liquide a été réalisée par la méthode de microdilution en milieu liquide en accord avec les instructions du *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (M100-A10, M100-S25) dans le cadre des deux projets Sanofi et Debiopharm pour les molécules Sar1, Sar2 et Debio 1452. Les tests de CMI ont été réalisés en triplicat en utilisant du milieu *Cation Adjusted Mueller Hinton* (CAMH) (Sigma Aldrich, 70192-500G, UK).

Une suspension bactérienne à 0.5 Mc.Farland a été réalisée avec des colonies fraîches, correspondant à 1.5×10^7 *Unité Formant Colonies* (UFC) /mL puis cette suspension bactérienne a été diluée au 1/100^{ème} dans du milieu CAMH afin d'obtenir une *Suspension Bactérienne Finale* (SPF) correspondant à 1.5×10^5 UFC/mL. Chaque essai a été réalisé sur une plaque 96 puits à fond rond. Un volume de 50 µL de milieu CAMH a été déposé dans chaque puits. Puis, 50 µL de la solution mère de la molécule à tester ont été déposés dans la première colonne (colonne 1) de la plaque puis des dilutions successives de raison 2 ont été réalisées en prenant 50 µl de chaque colonne, redéposés dans la colonne suivante jusqu'à la dernière colonne (colonne 12). Les 50 µl de la dernière colonne ont été jetés. Puis 50 µL de la SPF ont été déposés dans chaque puits représentant une concentration finale bactérienne par puits de 0.75×10^5 UFC/mL. Deux contrôles négatifs ont été réalisés avec du CAMH pur, et avec 50 µL de CAMH et 50 µL de molécule pour vérifier la non contamination de la molécule. Un contrôle positif a été réalisé avec 50 µL de CAMH et 50 µL SPF. La plaque a été incubée pendant 24 h à 37°C. La concentration correspondant à la première cupule sans croissance bactérienne correspondant à la CMI de la molécule pour la souche étudiée.

Dans le cadre du projet Sanofi, cette technique par microdilution a été utilisée pour la souche HG001 afin d'évaluer la CMI de la rifampicine ainsi que les CMI des molécules Sar1 et Sar2. Dans le cadre du projet Debiopharm, cette technique par microdilution a été utilisée sur la souche 29213 dans le but d'évaluer la CMI de la vancomycine ainsi que la CMI de la molécule Debio 1452. La détermination de la CMI pour la molécule Debio 1452 a été réalisée une

seconde fois pour la souche 29213 après passage dans le modèle intracellulaire 72 h afin d'évaluer une éventuelle modification de la CMI.

III.3. Courbe de croissance

La croissance bactérienne a été évaluée par la réalisation d'une cinétique, en mesurant l'absorbance des suspensions bactériennes au cours du temps, qui est directement proportionnelle à la quantité de bactéries présentes.

Après une nuit de culture à 37°C en *Bouillon Cœur Cerveille* (BCC), les suspensions bactériennes ont été standardisées à une absorbance à 600 nm (A_{600nm}) de 0.05. Une quantité de 200 µL par puit a été déposée dans une microplaque 96 puits à fond plat. Les puits extérieurs de la plaque ont été remplis avec de l'eau stérile afin d'éviter toute évaporation. La plaque a été incubée à 37°C dans un spectrophotomètre (Infinite M200 Pro, Tecan) permettant des mesures d' A_{600} toutes les 15 minutes pendant 24 h. La vitesse spécifique de croissance (μ) ainsi que le temps de génération (G) qui représente le temps nécessaire pour qu'une population double ont été estimés pendant la phase exponentielle de croissance grâce aux 2 formules suivantes :

$$\mu = \frac{(\ln DO2) - (\ln DO1)}{t2 - t1} \text{ (h}^{-1}\text{)}$$

$$G = \frac{(\ln 2)}{\mu} \text{ (h)}$$

Cette méthode a été utilisée lors de deux expériences indépendantes réalisées en duplicat sur les souches du projet VISA.

III.4. Culture cellulaire

Le type cellulaire utilisé dans toutes les expériences d'infection cellulaire présentées dans ce mémoire est une lignée cellulaire d'ostéoblastes humains, appelée MG-63 et issue d'un ostéosarcome humain. Les cellules ont été cultivées en flasques de 75 cm², à 37°C sous 5 % de CO₂, dans un *Milieu de Culture Complet* (MCC) comprenant du milieu *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Dutsher (DMEM, SAS, Strasbourg, France) supplémenté avec 10 % de *Sérum de Veau Fœtal* (SVF, Dutsher SAS) décomplémenté. Des antibiotiques, 100 U/mL de pénicilline et 100 mg/mL de streptomycine (GE Health care, Vélizy-Villacoublay, France), ont été additionnées au MCC pour les étapes de culture et d'amplification afin d'éviter toutes contaminations bactériennes. Toutes les cellules ont été entretenues à raison de 1 passage par semaine.

III.5. Modèle d'infection cellulaire

Afin d'évaluer les capacités d'adhésion et d'internalisation des différentes souches dans les ostéoblastes ainsi que la persistance intracellulaire, la cytotoxicité et la réponse inflammatoire induite après internalisation, un modèle d'infection cellulaire *in vitro* a été utilisé (Figures 9 et 10).

A J1, des ostéoblastes MG-63 ont étéensemencés dans des plaques 24 puits (80 000 cellules/puits) en vue de l'infection réalisée à J2. Pour les suspensions bactériennes, plusieurs colonies isolées préalablement sur géloses COS ont étéensemencées dans des BCC (J1). A J2, après 18h d'incubation à 37°C (bactéries en phase stationnaire), les suspensions bactériennes ont été diluées afin d'obtenir une A_{600} comprise entre 0.2 et 1, avant d'être centrifugées puis reprises avec du milieu MCC sans antibiotique. Le nombre de bactéries obtenu a ensuite été estimé selon la formule de régression préalablement établie : $UFC/mL = (5.25 \cdot 10^8 \times DO - 3 \cdot 10^7) / 4$. Parallèlement, le nombre exact de cellules par puits a été calculé en numérant trois puits par une technique de comptage précise par exclusion au bleu de Trypan.

Une suspension bactérienne a été préparée dans du MCC sans antibiotique ajustée pour obtenir la *Multiplicity Of Infection* (MOI) désirée, ce qui correspond au ratio du nombre de bactéries par cellule. Pour exemple, une MOI de 100 correspond à un ratio de 100 bactéries par cellule. Les cellules ont ensuite été mises en contact avec cette suspension bactérienne standardisée pendant 2 h à 37°C pour permettre l'adhésion puis l'internalisation des bactéries dans les ostéoblastes. L'inoculum bactérien a été contrôlé *a posteriori* par dénombrements dilutions sériées réalisés sur milieu *Trypto-Caséine Soja* (TSA, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

Deux protocoles différents ont été réalisés en fonction du projet concerné : le projet VISA (Figure 9) ou SNA (Figure 10).

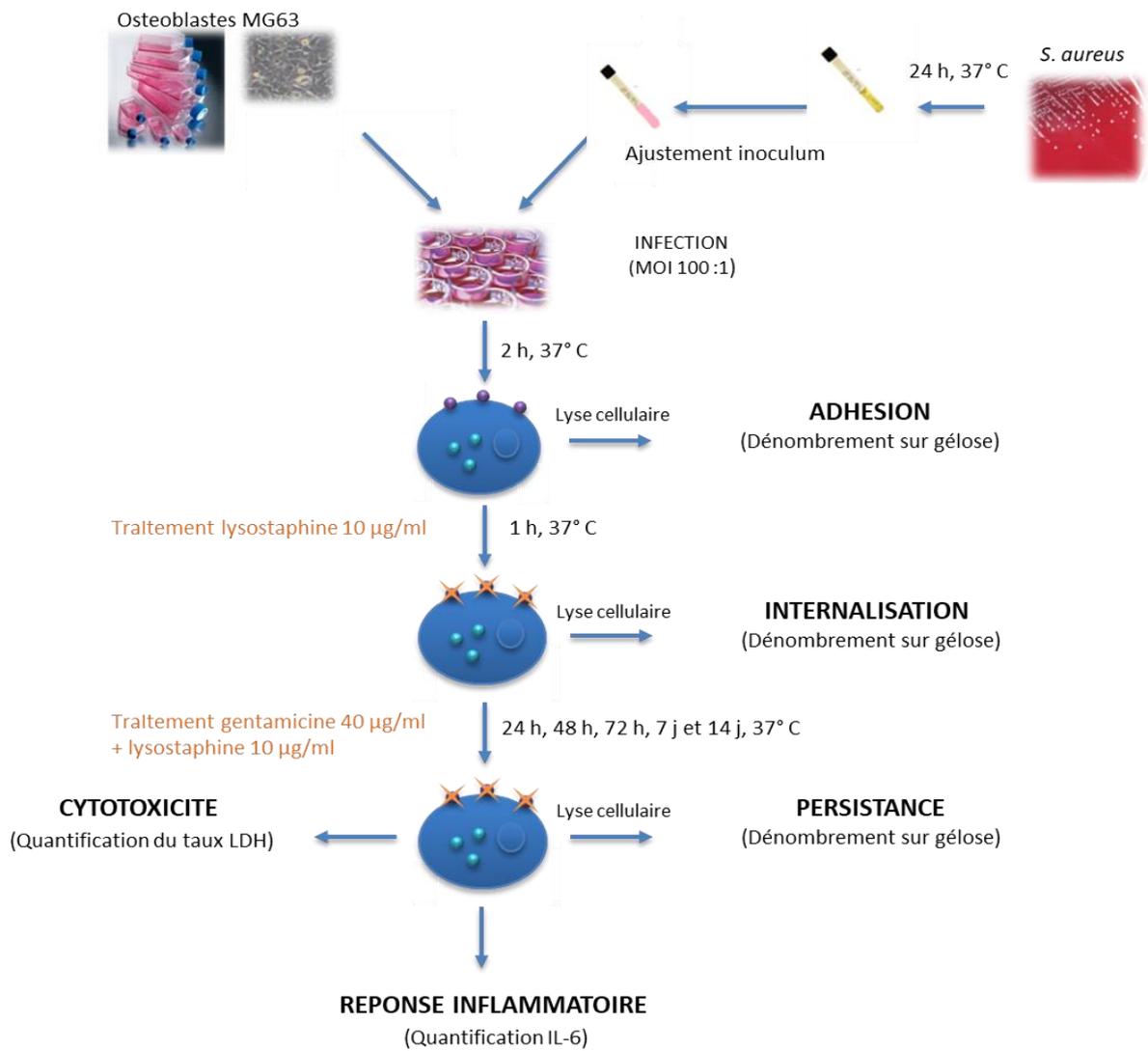


Figure 9 : Modèle cellulaire in vitro utilisé dans le cadre du projet VISA. Etude de l'adhésion, l'internalisation, la cytotoxicité, la réponse inflammatoire et la persistance de *S. aureus* au sein des ostéoblastes MG-63 (LDH : Lactate DesHydrogenase, IL-6 : Interleukine 6).

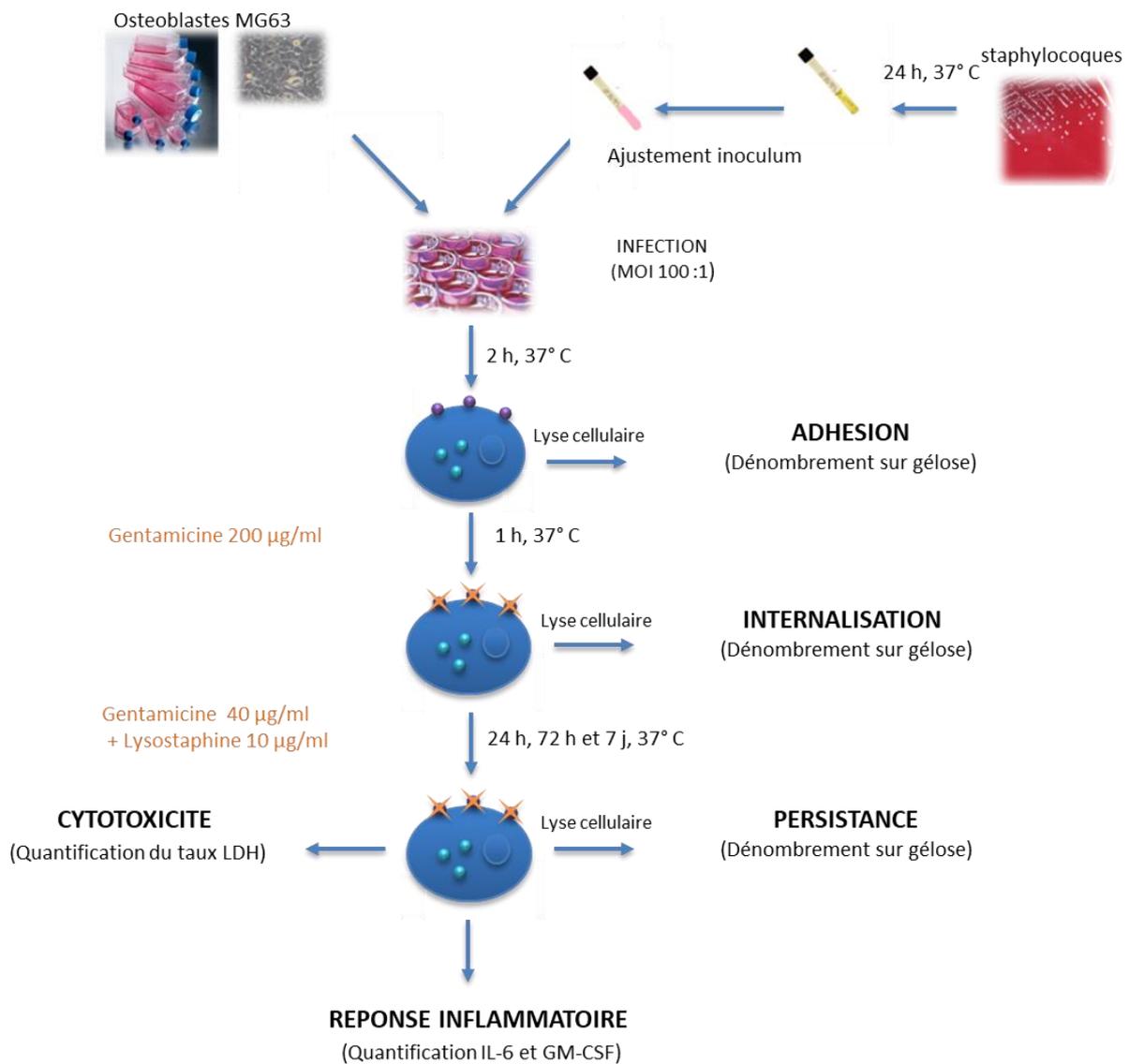


Figure 10 : Modèle cellulaire in vitro utilisé dans le cadre du projet *Staphylococcus non-aureus*. Etude de l'adhésion, l'internalisation, la cytotoxicité, la réponse inflammatoire et la persistance de différentes espèces de staphylocoques au sein des ostéoblastes MG-63 (LDH : Lactate DesHydrogenase, IL-6 : Interleukine 6, GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor).

III.5.a. Adhésion

Après 2 h d'infection, les puits ont été lavés deux fois avec du tampon *Tampon Phosphate Sodium* (PBS) afin d'éliminer les bactéries non adhérentes. Les cellules présentes dans les puits destinés à mesurer l'adhésion ont ensuite été lysées par choc osmotique avec deux fois 1 mL d'eau pure et les lysats cellulaires ont été ensemencés avec l'automate easy Spiral® (Interscience) sur gélose TSA par technique de dilution en série. La numération des UFC après 24h d'incubation à 37° C a ensuite été réalisée à l'aide du logiciel Easycount 2® (Interscience) après capture des images des boîtes avec l'automate Easyscan 1200® (Interscience).

Les puits destinés à la mesure (i) de l'internalisation à 3 h post-infection (pi) et (ii) de la persistance intracellulaire ont ensuite été incubés pendant 1 h dans un milieu contenant 10 µg/mL de lysostaphine (projet VISA) ou de 200 µg/mL de gentamicine (projet SNA), afin de tuer et éliminer les bactéries non internalisées sans altérer les bactéries intracellulaires.

III.5.b. Internalisation

Après avoir de nouveau rincé les puits à 3 h post-infection (pi) (2 h d'infection + 1h de traitement par la gentamicine ou la lysostaphine). Les puits destinés à mesurer l'internalisation à 3 h ont été lysés et le nombre d'UFC a été déterminé de la même façon que pour l'adhésion. Ceux destinés à la mesure de la persistance, ont quant à eux de nouveau été incubés dans un milieu contenant 10 µg/mL de lysostaphine additionné de 40 µg/mL de gentamicine pendant tout le reste de l'expérimentation afin d'éliminer les bactéries potentiellement libérées (par la mort des cellules encore infectées) dans le milieu de culture au cours de l'incubation et ainsi empêcher toute réinfection des cellules encore vivantes.

L'internalisation a été réalisée de façon identique pour les deux projets VISA et SNA.

III.5.c. Persistance intracellulaire

Afin d'évaluer la persistance intracellulaire, les ostéoblastes mis au contact des différentes bactéries pendant un certain temps (24 h, 48 h, 72 h, 7 j et 14 j pi dans le cadre du projet VISA et 24 h, 72 h, 7 j pi pour le projet SNA) ont été lysés. Le lysat a ensuite été étalé sur TSA et compté après 24h d'incubation à 37° C de la même façon que lors de l'adhésion et de l'internalisation.

III.5.d. Mécanismes d'internalisation

Afin d'étudier la dépendance du mécanisme d'internalisation à l'intégrine β1, un anticorps anti-intégrine β1 (CD29 Hu - Purified - clone mAb13, Becton Dickinson, Le pont de Claix) a été utilisé dans le cadre du projet SNA pour différentes souches de *S. argenteus* (*S. argenteus 1*, *S. argenteus 2* et *S. argenteus 4*) et pour la souche de référence *S. aureus* 8325-4. L'anticorps anti-intégrine a été appliqué à la concentration de 10 µg/mL dans du PBS sur un tapis cellulaire de MG-63 dans une plaque 24 puits. Après une incubation d'1 h à 37°C, une suspension bactérienne préparée dans du PBS a été ajoutée à une MOI de 100. Après une incubation de 2 h à 37°C, les cellules ont été rincées puis lysées par choc osmotique. Le lysat a ensuite été

ensemencé sur milieu gélosé TSA et numéré de la même façon que pour l'adhésion, l'internalisation et la persistance.

III.5.e. Etude de l'efficacité de molécules contre les staphylocoques intracellulaires

Afin d'améliorer l'antibiothérapie existante contre le réservoir de staphylocoques intracellulaires après internalisation, deux études ont été réalisées avec différents partenaires industriels pour tester l'efficacité de nouvelles molécules.

Ces études ont été réalisées sur la lignée cellulaire d'ostéoblastes humains MG-63. Les conditions de culture ont été identiques aux projets précédant (Cf. III.5.). Les protocoles d'infection des ostéoblastes diffèrent suite à la demande des partenaires mais aussi à une mise au point spécifique dépendante de la molécule à étudier. Un modèle *in vitro* basé sur celui mis en place lors de l'étude VISA et SNA a été utilisé et réajusté afin d'étudier l'activité intracellulaire des différentes molécules. Après 3 h pi (2 h d'infection + 1h de traitement avec la lysostaphine), un milieu de culture neuf contenant de la lysotaphine à 10 µg/mL ainsi que les différentes molécules à différentes concentrations a été ajouté aux cellules (Figures 11 et 12).

III.5.e.1. Activité intracellulaire antibactérienne à 24 h, 48 h et 72 h

Pour le projet en partenariat avec Sanofi, 3 concentrations de la molécule Sar1 ont été évaluées (0.32 mg/L, 3.2 mg/L et 10.6 mg/L) ainsi que 3 concentrations de la molécule Sar2 (0.032 mg/L, 0.32 mg/L et 3.2 mg/L) sur la souche de *S. aureus* HG001 après internalisation. La rifampicine, utilisée comme témoin positif, a été évaluée à sa concentration osseuse (6 mg/L) (Valour et al. 2015b). Le nombre de bactéries intracellulaires/puits a ensuite été évalué à 24 h pi en utilisant la lyse cellulaire et le dénombrement sur gélose TSA (Figure 11).

L'activité de la molécule Debio 1452 a été évaluée toutes les 24 h jusqu'à 72 h pi. La molécule Debio 1452 ainsi que la vancomycine (témoin négatif) ont été évaluées à quatre concentrations différentes (0.1xCMI, 1xCMI, 10xCMI et 100xCMI). Le nombre de bactéries/puits a été évalué toutes les 24 h par lyse cellulaire et par dénombrement sur gélose TSA (Figure 12).

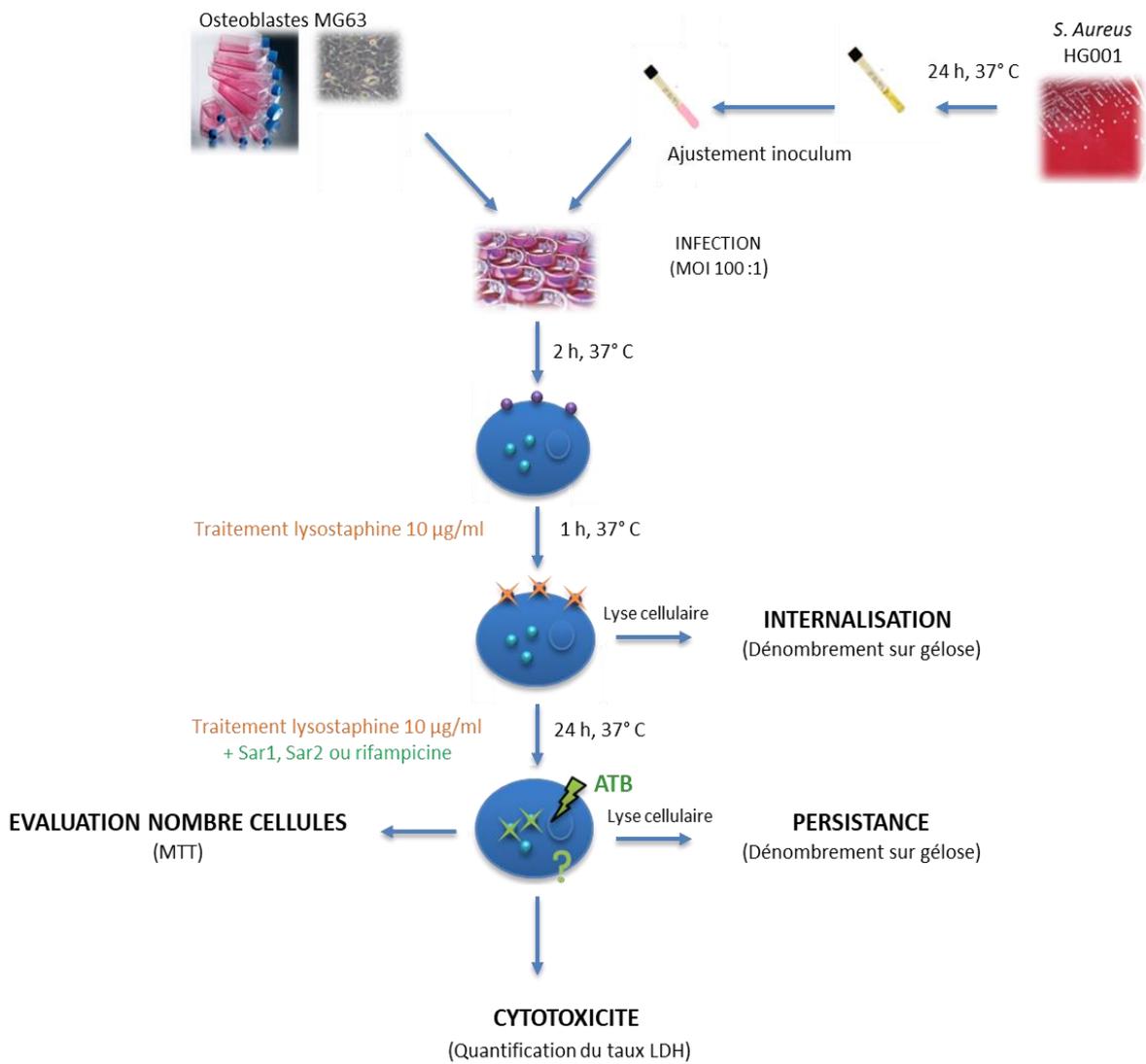


Figure 11 : Modèle cellulaire in vitro utilisé dans le cadre de l'étude Sanofi afin d'étudier l'activité antibactérienne intracellulaire des molécules Sar1 et Sar2 à 24 h post-infection. Etude de l'internalisation, la persistance, la cytotoxicité et l'évaluation du nombre de cellules ostéoblastes MG-63 à 24 h (ATB : Antibiotiques, LDH: Lactate DesHydrogenase, MTT : Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide).

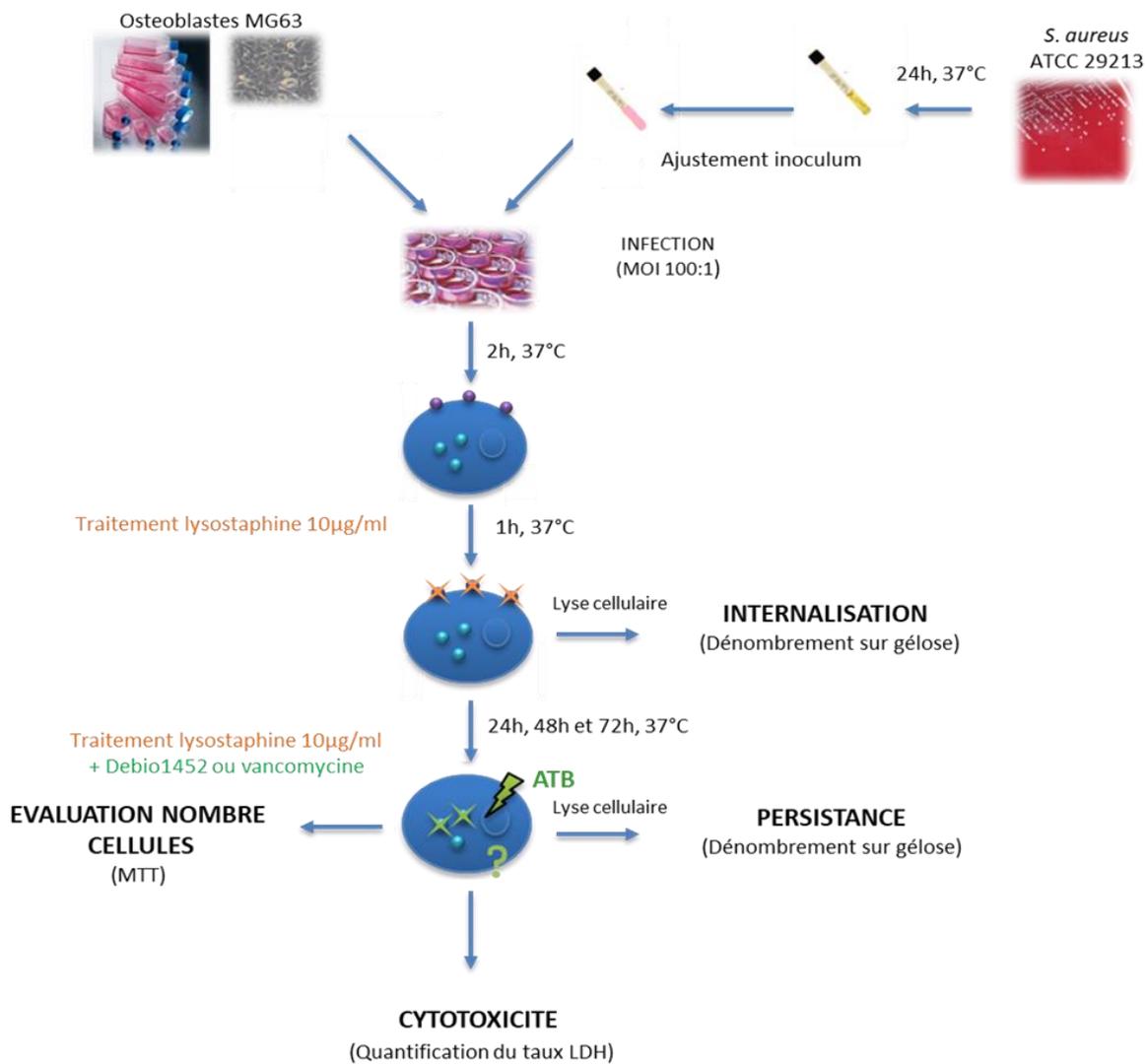


Figure 12 : Modèle cellulaire in vitro utilisé dans le cadre de l'étude Debiopharm afin d'étudier l'activité antibactérienne intracellulaire de la molécule Debio 1452 à 24 h, 48 h et 72 h post-infection. Etude de l'internalisation, la persistance, la cytotoxicité et l'évaluation du nombre de cellules ostéoblastes MG-63 à 24 h, 48 h et 72 h (ATB : Antibiotiques, LDH: Lactate DesHydrogenase, MTT : Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide).

III.5.e.2. Activité intracellulaire antibactérienne à 48 h avec ajout de la molécule à 24 h pi

Dans un second modèle expérimental, la molécule Sar2 a été ajoutée non plus à 3 h post-infection mais à 24 h pi et son activité intracellulaire a, cette fois-ci, été évaluée à 48 h pi pour plusieurs concentrations (Figure 13 ; 0.032 mg/L, 0.32 mg/L et 3.2 mg/L).

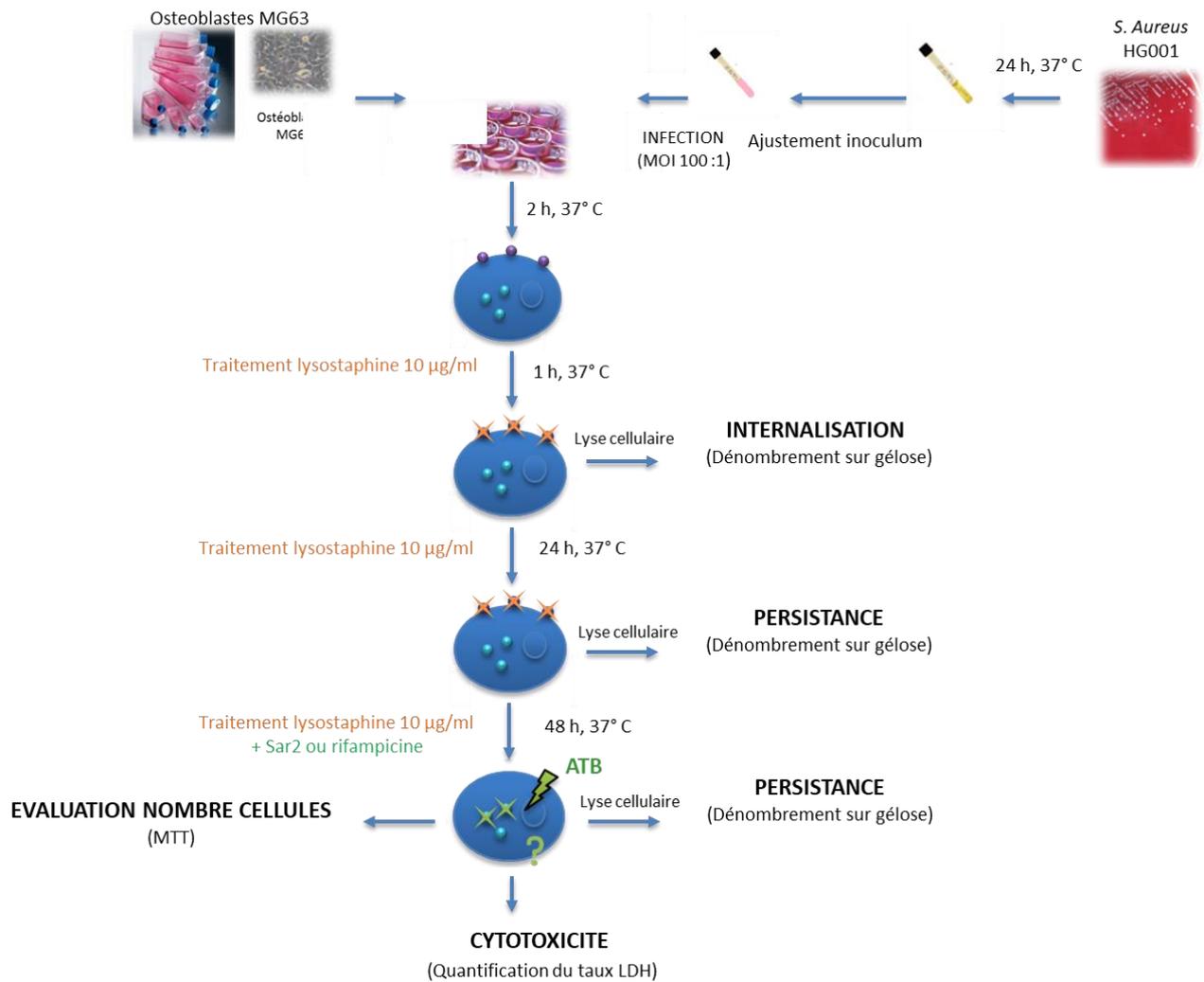


Figure 13 : Modèle cellulaire *in vitro* utilisé dans le cadre de l'étude Sanofi afin d'étudier l'activité antibactérienne intracellulaire de la molécule Sar2 à 48h post-infection. Etude de l'internalisation, la persistance, la cytotoxicité et l'évaluation du nombre de cellules ostéoblastes MG-63 à 48 h (ATB : Antibiotiques, LDH: Lactate DesHydrogenase, MTT : Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide).

III.5.e.3. Activité antibactérienne intracellulaire avec ajout de la molécule toutes les 24 h

Dans un second temps, afin d'évaluer une potentielle perte d'activité de la molécule Debio 1452 au fil du temps et de se rapprocher d'un schéma de traitement clinique, le protocole (Figure 12) a été adapté : la molécule, ainsi que la vancomycine, ont été ajoutées toutes les 24 h pendant 72 h, pour les 4 concentrations testées. L'activité intracellulaire a de nouveau été évaluée par lyse

cellulaire et comptage de bactéries intracellulaires viables sur gélose TSA comme décrit précédemment.

III.5.f. Evaluation de la quantité de cellules vivantes

La méthode standard *du Methylthiazolyldiphenyl-TeTrazolium bromide* (MTT, Sigma Aldrich, UK) a été réalisée afin d'évaluer les effets des différentes molécules sur la quantité de cellules vivantes infectées ou non par *S. aureus*. Le principe de cette méthode repose sur la quantification de l'activité mitochondriale cellulaire (réduction du réactif MTT par les mitochondries des cellules vivantes qui forme un précipité de couleur violette qui est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes). Après la période d'exposition souhaitée, le surnageant a été éliminé puis 400 µl de solution de réactif MTT ont été ajoutés dans chaque puits pour une incubation à 37°C sous 5 % de CO₂ pendant 1 h. Le surnageant a été éliminé et remplacé par 200 µl d'isopropanol acide afin de dissoudre les cristaux de formazan formés. L'absorbance à 450nm (A_{450}) a été mesurée pour chaque puits. Les résultats ont été normalisés par rapport au témoin « cellules non-infectées et non traitées » utilisé comme référence (100 %).

Cette méthode a été utilisée pour quantifier la quantité de cellules vivantes dans les projets avec Sanofi (Figures 11 et 13) et Debiopharm (Figure 12).

III.5.g. Mesure de la cytotoxicité induite

La cytotoxicité induite par les différentes souches et/ou traitements a été évaluée par la mesure de la concentration de la *Lactate DesHydrogenase* (LDH) dans les surnageants de culture cellulaire. Cette enzyme est libérée par les cellules quand leur membrane est altérée. La quantité est donc proportionnelle au niveau de mort cellulaire. Leur concentration a ainsi été utilisée pour estimer la virulence (cytotoxicité) des différentes souches bactériennes. Les valeurs obtenues pour chaque souche ont été normalisées par rapport au témoin « cellules non-infectées et non traitées » utilisé comme référence (100 %).

Dans le cadre du projet VISA, la concentration de LDH a été évaluée sur un automate Vista® 3000 (Siemens, Health care, France). Dans le cadre du projet SNA, la concentration de LDH a été évaluée à l'aide d'un kit commercial basé sur une méthode colorimétrique selon les recommandations du fournisseur (cytotoxicity detection kit, Roche, USA). L'absorbance à 490 nm (A_{490}) a ensuite été mesurée. Cette méthode a aussi été utilisée pour quantifier la cytotoxicité

induite par les différentes molécules dans les projets avec Sanofi (Figures 10 et 12) et Debiopharm (Figure 11).

III.5.h. Production de cytokines

La sécrétion de cytokines en réponse à l'infection a été évaluée à l'aide de différents kits ELISA selon les recommandations des fabricants. Les valeurs obtenues pour chaque souche ont été normalisées par rapport au témoin « cellules non-infectées » utilisé comme référence (quantité de médiateurs protéiques des cellules non-infectées = 1).

Dans le cadre du projet VISA, la concentration en IL-6 a été évaluée dans le surnageant à 72 h pi (Figure 9). Dans le cadre du projet SNA, 2 types de cytokines ont été évalués : IL-6 (Human IL-6 DuoSet ELISA, DY206, R&D System, Canada) et GM-CSF (Human GM-CSF DuoSet ELISA, DY215, R&D System, Canada) dans le surnageant à 72 h pi (Figure 9).

III.6. Analyses statistiques

Les résultats numériques présentés sont les moyennes \pm l'erreur standard sur la moyenne (*Standard Error of the Mean*, SEM) issues de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicatas techniques sauf exception précisée. Un test bilatéral de Mann-Whitney avec un seuil de significativité de 0.05 a été utilisé pour comparer deux à deux les résultats obtenus entre les différentes conditions. L'ensemble de ces analyses a été réalisé avec le logiciel GRAPHPAD (version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA).

IV. Résultats

IV.1. Compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la chronicisation des infections à staphylocoques par l'étude des souches VSSA/VISA

Le premier axe de ce projet a eu pour objectif de comprendre l'impact du phénotype VISA dans la chronicisation des infections à *S. aureus*, en particulier son rôle dans la persistance intracellulaire. Deux couples de souches cliniques VISA/VSSA ont été étudiés : la souche VSSA était la souche initiale et la souche VISA obtenue chez un même patient après traitement antibiotique par vancomycine lors de la rechute (un couple de souche correspondant à un patient). D'autre part, une souche isogénique de la souche VSSA 1 inactivée *in vitro* pour le gène *stp1* a également été testée dans ces modèles. Pour chacune des souches, nous avons étudié *in vitro* leurs capacités à adhérer aux cellules, à être internalisées dans un modèle d'infection cellulaire et à persister dans le compartiment intracellulaire au cours du temps.

IV.1.a. Impact du phénotype VISA sur la croissance bactérienne

Une cinétique de croissance a été effectuée pour chacune des souches issues des 2 patients.

Les résultats obtenus ont montré que les souches VISA avaient une croissance plus lente que les souches VSSA. En effet, les temps de générations minimales pour les souches VSSA étaient en moyenne 1.4 fois inférieurs à ceux obtenus pour les souches VISA (Figure 14).

Enfin, aucune différence ne semble se présenter entre la souche VSSA 1 et la souche isogénique invalidée pour *stp1* (le temps de génération de la souche VSSA 1 étant 1.11 fois inférieur à celui de la souche VSSA 1 Δ *stp1*) (Figure 14A).

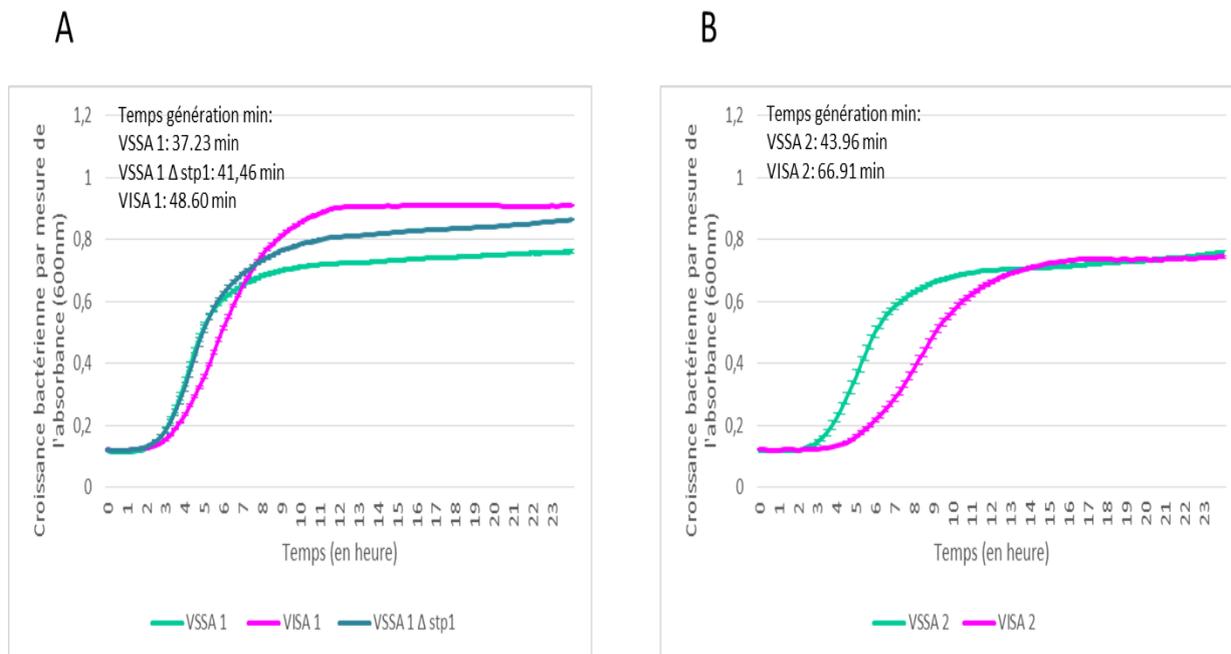


Figure 14 : Courbe de croissance de *S. aureus* (moyennes \pm écart type obtenues pour chacune des souches) qui ont permis de calculer les temps de générations. (A : patient 1, B : patient 2). Mesure De l'absorbance à 600nm jusqu'à 24 h d'incubation. Données issues de 2 expériences réalisées en duplicat (VISA : Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus* ; VSSA : Vancomycin Susceptible *Staphylococcus aureus*).

IV.1.b. Impact du phénotype VISA dans le modèle d'infection cellulaire

Après avoir établi les courbes de croissance, les couples de souches VSSA/VISA issues des deux patients ont été étudiées dans le modèle d'infection cellulaire (Matériels et Méthodes, Figure 8)

Dans un premier temps, la capacité d'adhésion des différentes souches aux ostéoblastes MG-63 a été évaluée à 2 h post infection.

Pour chaque couple, les résultats normalisés par rapport à la souche VSSA (100 %, figure 15) ont montré que les souches VISA avaient une capacité d'adhésion 3 fois inférieure aux souches VSSA avec 40 % et 32 % respectivement pour les souches VISA 1 et VISA 2 ($p < 0.001$, figure 15). Quant à la souche invalidée pour *stp1*, elle présentait un phénotype intermédiaire avec une capacité d'adhésion de 67 % par rapport à la souche parentale VSSA 1 ($p < 0.001$, figure 15A).

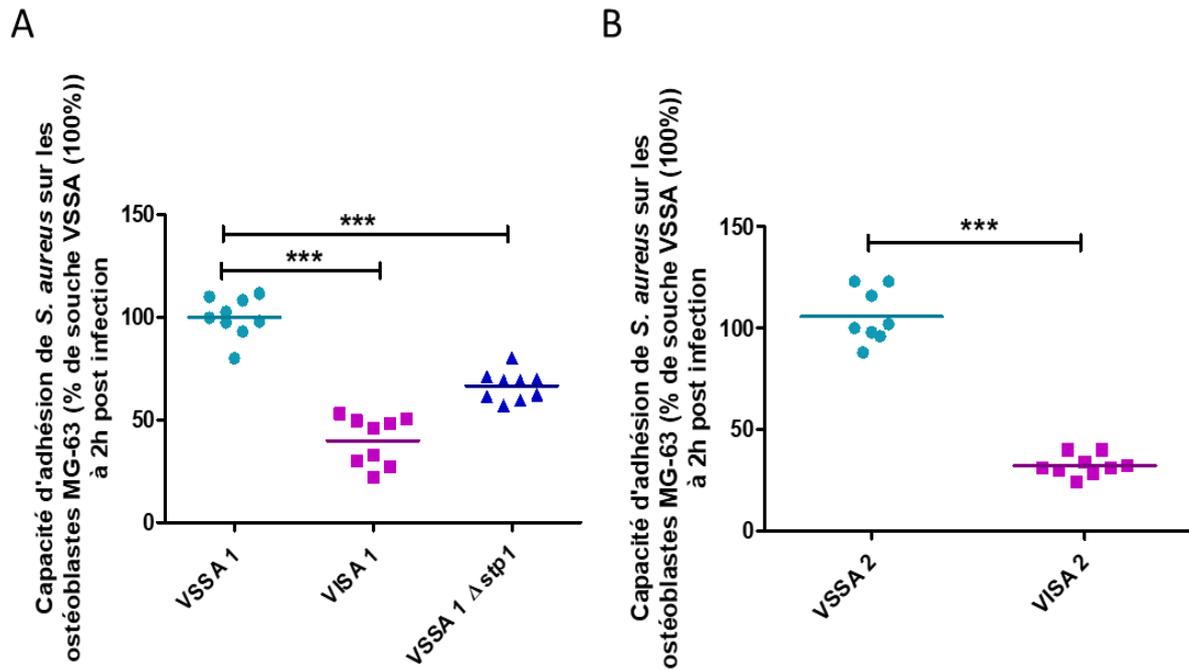


Figure 15 : Capacité d'adhésion de *S. aureus* sur les ostéoblastes MG-63 à 2 h post infection (A : patient 1, B : patient 2). Résultats normalisés en fonction de la souche VSSA (100 %). Les expériences ont été réalisées trois fois en triplicat. Evaluation statistique réalisée entre les différentes souches à l'aide du test bilatéral de Mann-Whitney avec un risque $\alpha=0.05$ (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$) (VISA : Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus ; VSSA : Vancomycin Susceptible Staphylococcus aureus).

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'internalisation et la persistance intracellulaire. Après 2 h d'infection et un traitement d'1 heure avec de la lysostaphine pour éliminer tous les staphylocoques restés extracellulaires, nous avons pu quantifier le nombre de bactéries intracellulaires. Les résultats représentés ont été normalisés sur la souche VSSA de chacun des patients (100 %, figure 16).

Les dénombrements des bactéries intracellulaires contenues dans les lysats cellulaires ont montré que les souches VISA de chacun des 2 couples présentaient une capacité d'internalisation inférieure aux souches VSSA. En effet, les souches VISA 1 et VISA 2 présentaient une capacité d'internalisation de 22 % ($p<0.001$), et 71 % ($p<0.01$) respectivement en comparaison à celles mesurées pour les souches VSSA correspondantes (100 %, figure 16). Il est intéressant de noter que la délétion du gène *stp1* a entraîné à nouveau un phénotype intermédiaire avec une capacité d'internalisation de seulement 42 % ($p<0.001$, figure 16A).

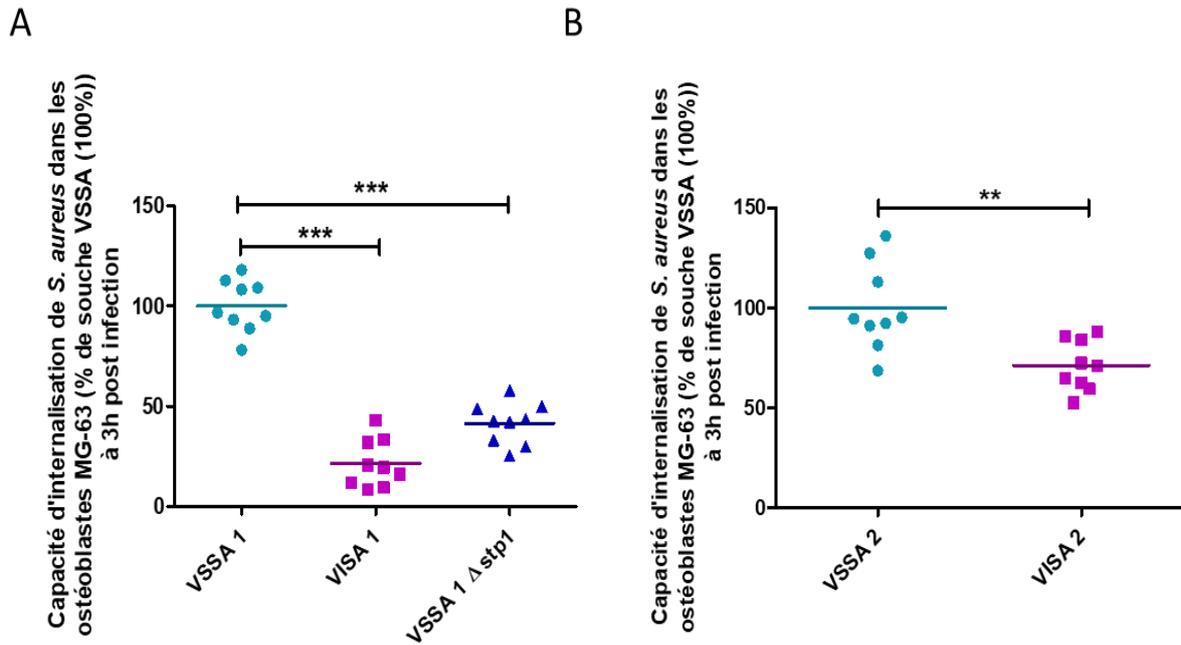


Figure 16 : Capacité d'internalisation de *S. aureus* dans les ostéoblastes MG-63 à 3 h post infection (A : patient 1, B : patient 2). Résultats normalisés en fonction de la souche VSSA (100 %). Les expériences ont été réalisées trois fois en triplicat. Evaluation statistique réalisée entre les différentes souches à l'aide du test bilatéral de Mann-Whitney avec un risque $\alpha=0.05$ (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$) (VISA : Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus* ; VSSA : Vancomycin Susceptible *Staphylococcus aureus*).

Après avoir évalué l'adhérence et l'internalisation, nous avons cherché à déterminer la capacité des bactéries à persister dans le compartiment intracellulaire. Pour cela, la quantité de bactéries internalisées à 3 h pi a été utilisée comme contrôle (100 %). Ainsi au fil du temps le résultat exprimé en pourcentage représentait la proportion de bactéries restantes par rapport à la quantité de bactéries internalisées à 3 h (Figure 17).

Les résultats ont montré que les souches VISA persistaient plus dans le compartiment intracellulaire des ostéoblastes que les souches VSSA correspondantes pour les deux couples et cela jusqu'à 14 j post infection. Ainsi à 14 jours pi pour la souche VISA 1, 0.21 % de l'inoculum internalisé à 3 h pi se trouvait encore dans les ostéoblastes contre 0.01 % pour la souche VSSA 1 ($p<0.05$, figure 17A). Dans les mêmes conditions, les mêmes résultats ont été obtenus pour le second couple avec 0.28 % pour la souche VISA 2 contre 0.09 % pour la souche VSSA 2 ($p<0.001$, figure 17B).

Concernant la souche VSSA 1 mutée pour *stp1*, aucune différence de persistance intracellulaire à 14 jours n'a pu être observée par rapport à la souche VSSA 1 (0.07 % pour la souche mutée pour *stp1* vs. 0.01 % pour la souche VSSA 1, figure 17A).

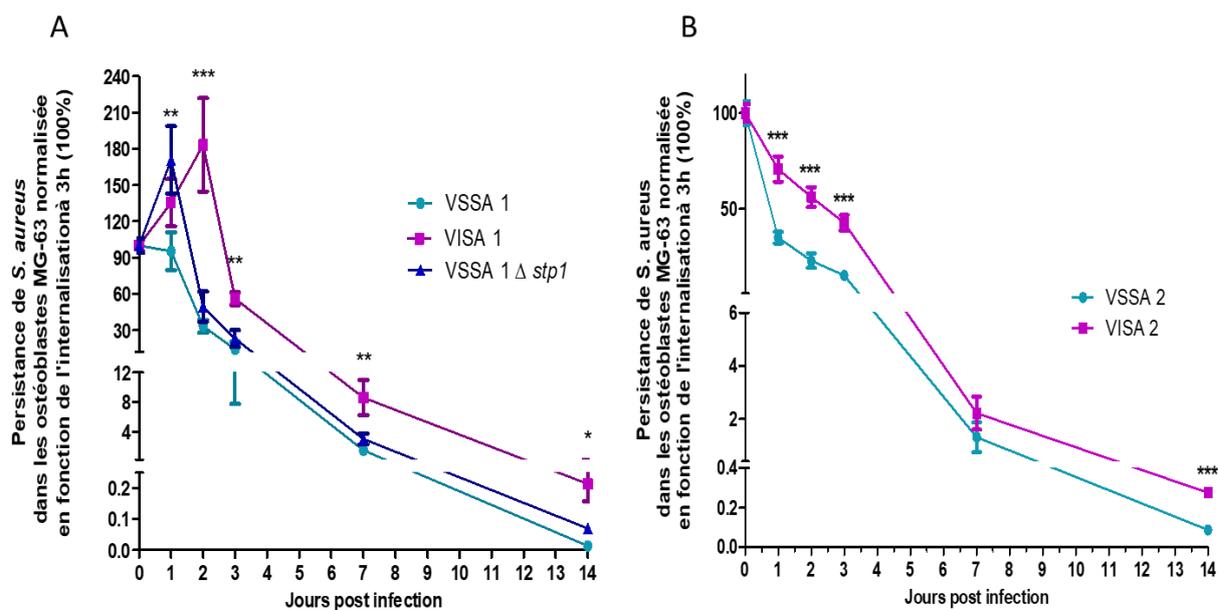


Figure 17 : Persistence de *S. aureus* dans les ostéoblastes MG-63 (A : patient 1, B : patient 2). Résultats normalisés en fonction de l'internalisation à 3 h 100 %. Les expériences ont été réalisées trois fois en triplicat. Evaluation statistique réalisée entre les souches VISA et VSSA à l'aide du test bilatéral de Mann-Whitney avec un risque $\alpha=0.05$ (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$) (VISA : Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus*; VSSA : Vancomycin Susceptible *Staphylococcus aureus*).

La cytotoxicité induite par la persistance intracellulaire a aussi été évaluée à 24 h, 48 h et 72 h pi par dosage de l'activité LDH cellulaire dans le surnageant. Les résultats représentés en figure 18 ont été normalisés sur les résultats obtenus avec les cellules seules non infectées (100 %).

Les données obtenues ont montré que les souches VISA étaient significativement moins cytotoxiques que les souches VSSA à 24 h, 48 h et 72 h pi excepté pour le couple VSSA/VISA 2 à 48 h pi (Figure 18B). Ainsi à 72 h, la cytotoxicité était de 122 % pour la souche VSSA 1 contre 98 % pour la souche VISA 1 ($p<0.01$) et 151 % pour la souche VSSA 2 contre 119 % pour la souche VISA 2 ($p<0.05$, figure 18).

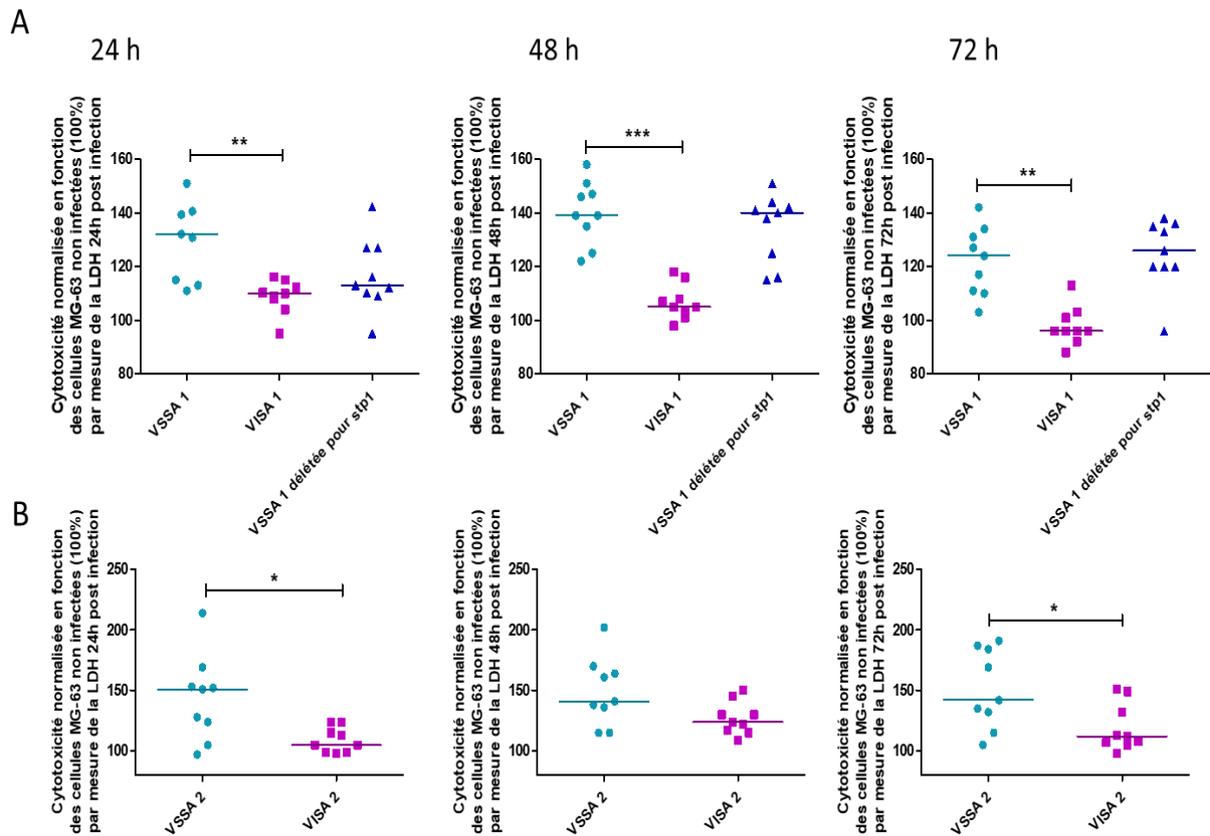


Figure 18 : Cytotoxicité induite par *S. aureus* sur les ostéoblastes MG-63 à 24 h, 48 h et 72 h post infection

(A : patient 1, B : patient 2). Résultats normalisés en fonction du témoin « cellules non infectées » 100 %. Les expériences ont été réalisées trois fois en triplicat. Evaluation statistique réalisée entre les différentes souches à l'aide du test bilatéral de Mann-Whitney avec un risque $\alpha=0.05$ (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$) (VISA : Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus ; VSSA : Vancomycin Susceptible Staphylococcus aureus ; LDH : Lactate DesHydrogenase).

Pour finir, la sécrétion d'IL-6 dans le surnageant cellulaire en réponse à l'infection intracellulaire a été évaluée à 72 h pi. Les résultats présentés figure 19 ont été normalisés sur la souche VSSA de chacun des couples (100 %).

Les données obtenues ont montré que les souches VISA induisaient une production d'IL-6 significativement plus faible que les souches VSSA. Aussi, la concentration d'IL-6 était de 14 % pour VISA 1 ($p<0.001$) et 39 % pour VISA 2 ($p<0.001$) contre 100 % pour VSSA 2 (Figure 19).

Concernant la production d'IL-6 en réponse à la souche VSSA invalidée pour *stp1*, les valeurs étaient une fois de plus intermédiaires entre celles des phénotypes VISA et VSSA pour le couple 1 avec un taux de production de cytokines IL-6 de représentant que 50 % ($p<0.001$, figure 19A).

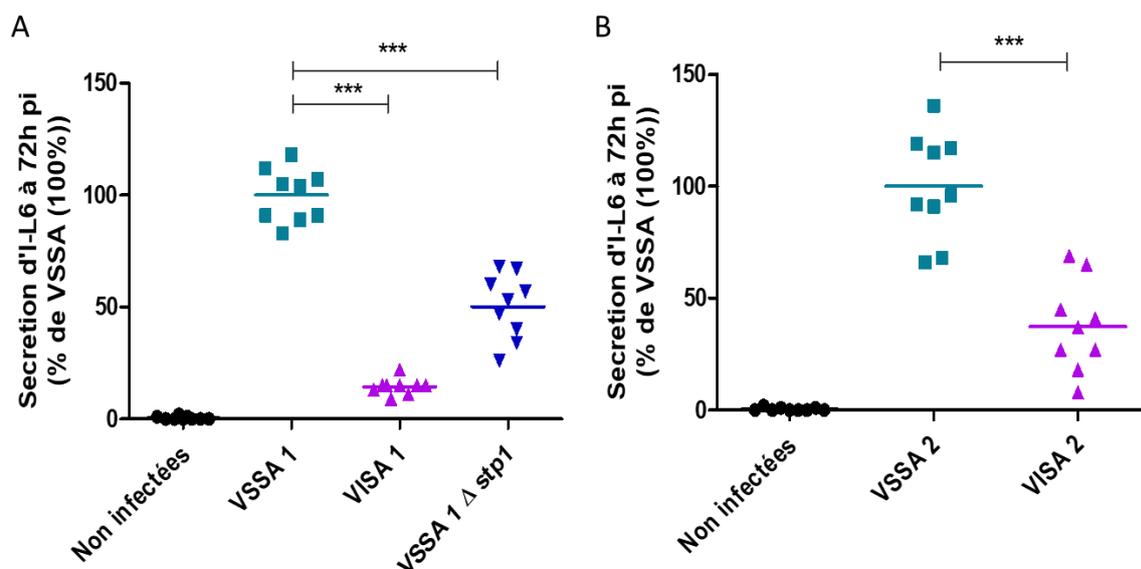


Figure 19 : Réponse inflammatoire induite par *S. aureus* sur les ostéoblastes MG-63 à 72 h post infection (A : patient 1, B : patient 2). Résultats normalisés en fonction de la souche VSSA (100 %). Les expériences ont été réalisées trois fois en triplicat. Evaluation statistique réalisée entre les différentes souches à l'aide du test bilatéral de Mann-Whitney avec un risque $\alpha=0.05$ (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$) (VISA : Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus* ; VSSA : Vancomycin Susceptible *Staphylococcus aureus*, pi : post-infection).

IV.1.c. Impact du phénotype VISA dans le modèle expérimental adapté

Les résultats précédents indiquaient une moindre capacité d'internalisation et de cytotoxicité pour les souches VISA par rapport aux souches VSSA. La question s'est donc posée de savoir si la mesure du pouvoir cytotoxique des bactéries internalisées avait donc pu être biaisée par les capacités d'internalisation différentes entre les souches. Afin de s'affranchir de ce biais, les mesures ont donc été répétées en utilisant des MOI différentes pour les souches VISA et VSSA mais permettant d'avoir le même nombre de bactéries en intracellulaire à 3 h pi : MOI plus forte pour les souches avec le taux d'internalisation le plus bas (indiqué sur les graphiques par *) (Tableau 5) afin de viser une internalisation identique à 3 h entre les différentes souches.

Les MOI visées pour les différentes souches indiquées sur le tableau 5 ont ainsi permis d'obtenir un même nombre de bactéries internalisées à 3 h pi, ainsi les capacités de cytotoxicité et de persistance intracellulaire ont pu être de nouveau établies à inoculum intracellulaire identique.

Tableau 5: Conditions d'infection afin d'obtenir la même capacité d'internalisation à 3 h post-infection entre les souches testées (MOI : Multiplicity of infection ; VISA : Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus ; VSSA : Vancomycin Susceptible Staphylococcus aureus).

	Souches	MOI visées
Patient 1	VSSA 1	100
	VISA 1 *	500
	VSSA 1 Δ <i>stp1</i> *	250
Patient 2	VSSA 2	100
	VISA 2 *	200

Ces nouvelles expériences présentées dans le tableau 6 avec des conditions d'infection permettant d'obtenir un nombre de bactéries intracellulaires identique à 3 h pi entre les souches ont confirmé que les souches VISA persistaient davantage que les souches VSSA (11 % pour VISA 1* contre seulement 4 % pour VSSA 1 ($p < 0.05$), 36 % pour VISA 2* contre seulement 15 % pour VSSA 2 ($p < 0.001$)). En revanche, une différence non significative a été observée entre les souches VSSA 1 et VSSA 1 Δ *stp1** avec 5 % de bactéries intracellulaires pour la souche VSSA 1 invalidée pour *stp1** à 72 h ($p = 0.48$).

Tableau 6 : Persistance dans les ostéoblastes MG-63 à 72 h post infection. (*avec une capacité d'internalisation identique à 3 h). Résultats normalisés en fonction de l'internalisation à 3 h (100 %). Les expériences ont été réalisées trois fois pour le patient 1 et deux fois pour le patient 2 et en triplicat. Evaluation statistique réalisée entre les différentes souches et VSSA à l'aide du test bilatéral de Mann-Whitney avec un risque $\alpha = 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) ((VISA : Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus ; VSSA : Vancomycin Susceptible Staphylococcus aureus).

	Souches	Persistance à 72h (%)
Patient 1	VSSA 1	4 \pm 3
	VISA 1 *	11 \pm 4
	VSSA 1 Δ <i>stp1</i> *	5 \pm 1
Patient 2	VSSA 2	15 \pm 7
	VISA 2 *	36 \pm 10

Ces nouvelles expériences en standardisant les inocula en intracellulaire confirment les tendances observées précédemment montrant des souches VISA moins cytotoxiques que les souches VSSA (Figure 17). Il est toutefois intéressant de noter que les différences de cytotoxicité étaient d'une moins grande amplitude entre les souches VISA et VSSA dans ces nouvelles conditions (Figure 20). En effet, ces différences restent significatives pour le patient 1 (à 48 h, 126 % pour VSSA 1 contre 104 pour VISA 1 ($p < 0.001$, figure 20A) mais non statistiquement significatives pour le patient 2 (à 48 h, 149 % pour VSSA 2 contre 131 % pour VISA 2* ($p=0.16$)) (Figure 20B) avec toutefois une tendance similaire au patient 1.

D'autre part, dans ces nouvelles conditions, la souche parentale VSSA 1 et son mutant isogénique invalidé pour *stp1** présentait des capacités cytotoxiques similaires à 48 h et 72 h mais non significatives au-delà de 24 h (Figure 20).

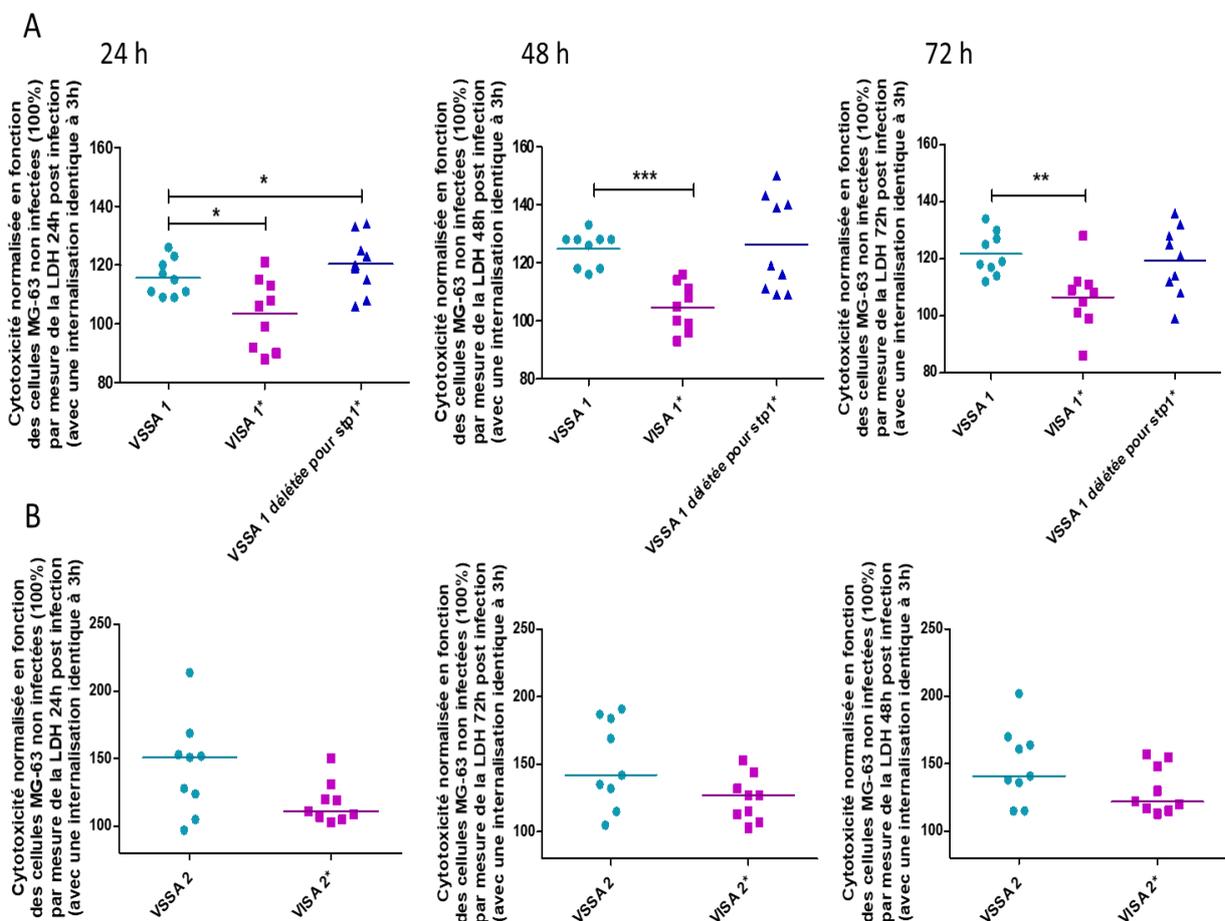


Figure 20 : Cytotoxicité induite par *S. aureus* sur les ostéoblastes MG-63 à 24 h, 48 h et 72 h post infection (*avec une capacité d'internalisation identique à 3 h) (A : patient 1, B : patient 2). Résultats normalisés en fonction du témoin « cellules non infectées » 100 %. Les expériences ont été réalisées deux fois pour le couple 1 et trois fois pour le couple 2 en triplicat. Evaluation statistique réalisée entre les différentes souches à l'aide du test bilatéral de Mann-Whitney avec un risque $\alpha=0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) (VISA : Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus* ; VSSA : Vancomycin Susceptible *Staphylococcus aureus* ; LDH : Lactate DesHydrogenase).

Concernant la production d'IL-6, nous avons pu observer des résultats similaires entre le modèle expérimental adapté (standardisation du taux d'internalisation) présenté sur la figure 21 et le modèle expérimental classique présenté sur la figure 18). Comme précédemment, les souches VISA induisaient une production d'IL-6 plus faible que celle induite par les souches VSSA. En effet, la réponse IL-6 cellulaire induite avec la souche VISA 1* ne représentait que 64 % de celle observée avec la souche VSSA 1 ($p < 0.001$). Cependant, contrairement à ce qui avait été observé sans ajustement de la MOI sur la figure 18, la souche invalidée pour *stp1** induit la même réponse IL-6 que la souche parentale VSSA (Figure 21).

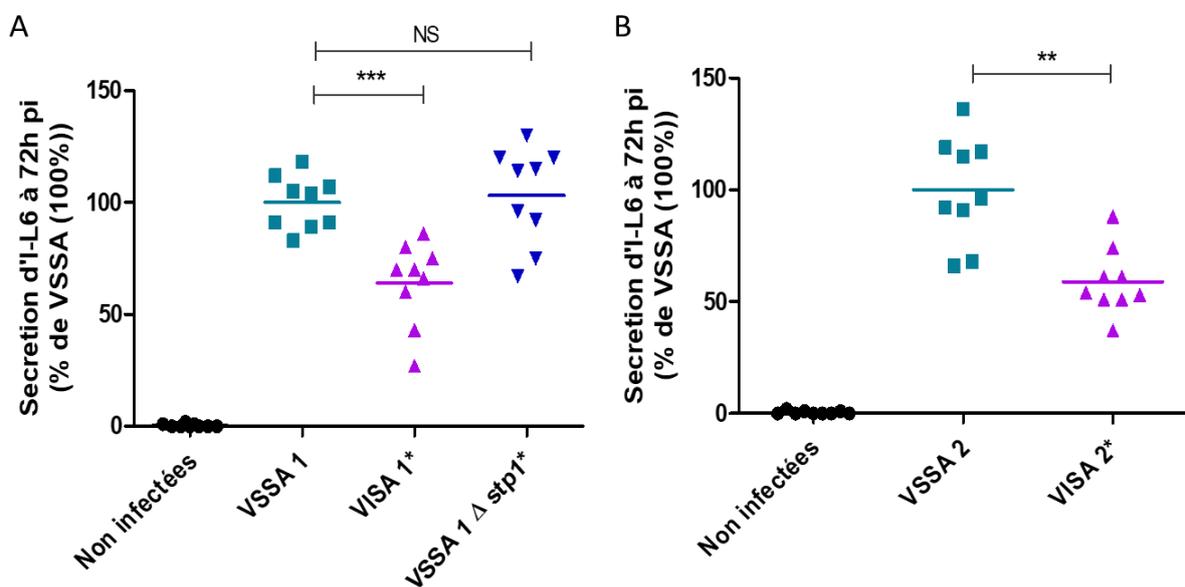


Figure 21 : Réponse inflammatoire induite par *S. aureus* sur les ostéoblastes MG-63 à 72 h post infection (*avec une capacité d'internalisation identique à 3 h) (A : patient 1, B : patient 2). Résultats normalisés en fonction de la souche VSSA (100 %). Les expériences ont été réalisées trois fois en triplicat. Evaluation statistique réalisée entre les différentes souches à l'aide du test bilatéral de Mann-Whitney avec un risque $\alpha = 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) (VISA : Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus* ; VSSA : Vancomycin Susceptible *Staphylococcus aureus* ; pi : post-infection, IL-6 : Interleukine 6).

IV.1.d. Conclusion pour le projet VISA

Les résultats de ce premier axe ont montré que les souches VISA adhéraient et s'internalisaient moins dans les cellules phagocytaires non professionnelles que la souche initiale VSSA correspondante. Malgré une internalisation moins importante, les souches VISA ont montré une persistance plus importante que les souches VSSA. Les souches VISA se sont également révélées moins cytotoxiques que les souches correspondantes VSSA et engendraient une réponse inflammatoire moins intense que les souches parentales. Concernant la souche VSSA invalidée pour *stp1*, seule une baisse de l'adhésion et de l'internalisation a été détectée par

rapport à la souche parentale VSSA, mais aucune différence significative n'a été mise en évidence pour ce qui est de la persistance, la cytotoxicité ou la réponse inflammatoire cellulaire.

IV.2. Efficacité de nouvelles molécules anti-staphylococques à visée intracellulaire

CONFIDENTIEL

CONFIDENTIEL

CONFIDENTIEL

CONFIDENTIEL

CONFIDENTIEL

CONFIDENTIEL

CONFIDENTIEL

CONFIDENTIEL

CONFIDENTIEL

IV.3. Caractérisation des *Staphylococcus non-aureus*

Le dernier axe de notre travail a consisté à caractériser un panel de différentes espèces de SNA afin de déterminer leur capacité d'invasion cellulaire et leur pouvoir cytotoxique. Pour cela nous avons évalué leurs résistances aux antibiotiques ainsi que leurs mécanismes d'internalisation dans les CPNP ainsi que leur capacité à persister dans les cellules CPNP (*S. simiae*, *S. schleiferi*, *S. argenteus* et *S. schweitzeri*).

IV.3.a. Antibiogramme

Les résultats de l'antibiogramme (Tableau 8) semblent indiquer que les souches *S. argenteus* possèdent pour la plupart plusieurs résistances aux antibiotiques. *S. simiae* et *S. schweitzeri* ont montré quelques résistances cependant *S. schleiferi* n'a aucune résistance aux antibiotiques administrés principalement pour traiter une infection à *S. aureus*.

Tableau 8 : Antibiogramme des différentes souches de *Staphylococcus non-aureus* étudiées (arg : *S. argenteus* ; schl : *S. schleiferi*, sim : *S. simiae*, schw : *S. schweitzeri*) (I : intermédiaire, R : Résistant, S : Sensible).

Abreviations	Antibiotiques	29213	8325-4	arg1	arg2	arg3	arg4	schl1	schl2	schl3	schl4	sim1	sim2	sim3	sim4	schw
FA	Acide fusique	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	I	S
LNZ	Linezolide	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	I	S
CN	Gentamicine	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
TOB	Tobramycine	I	I	I	I	I	I	S	S	S	S	S	S	S	I	I
OFX	Ofloxacin	S	I	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S
SXT	Triméthoprine+sulfaméthoxazole	R	I	R	I	I	I	S	I	I	I	I	I	R	R	I
SYN	Quinupristine+dalfopristine	I	R	R	R	I	S	S	S	S	S	I	I	I	I	I
KAN	Kanamycine	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
RA	Rifampicine	I	I	I	I	I	S	I	S	S	S	I	I	I	I	I
E	Erythromycine	S	I	I	I	R	R	S	S	S	S	I	I	S	I	I
CTX	Céfoxitine	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	I	S	R
NOR	Norflaxine	I	S	R	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S	I	S
DA	Clindamycine	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S
P	Peni G	I	S	R	R	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S

IV.3.b. Adhésion, internalisation et persistance

La capacité d'adhésion aux ostéoblastes MG-63 a été évaluée à 2 h pi pour 4 espèces de *Staphylococcus non-aureus* (Figure 9). Les résultats ont été normalisés sur la souche 8325-4 (100 %).

Nous avons pu observer que les souches *S. argenteus*, *S. schleiferi* 2 et 3 et *S. schweitzeri* avaient une capacité d'adhésion supérieure à la souche 8325-4 (Figure 29). En effet, elle était de 288 % (p<0.001), 350 % (p<0.001) et 407 % (p< 0.001) pour les souches *S. argenteus* 3, *S. schleiferi*

3 et *S. schweitzeri* 1 respectivement vs. 100% pour 8325-4. Concernant les souches *S. schleiferi* 1 et 4, leurs capacités d'adhésion étaient équivalentes à celle de *S. aureus* 8325-4. Quant aux souches *S. simiae*, elles présentaient toutes une capacité d'adhésion plus faible que la souche de référence 8325-4 avec des taux de 11.78 % ($p < 0.001$), 19.33 % ($p < 0.001$), 17.5 6% ($p < 0.001$) et 13.89 % pour *S. simiae* 1, 2, 3 et 4 respectivement vs. 100 % pour la souche *S. aureus* 8325-4. A noter que *S. argenteus*, *S. schleiferi* et *S. schweizeri* semblent présenter une capacité d'adhésion équivalente à la souche 29213, une souche de *S. aureus* avec une forte capacité d'adhésion aux ostéoblastes (Figure 29).

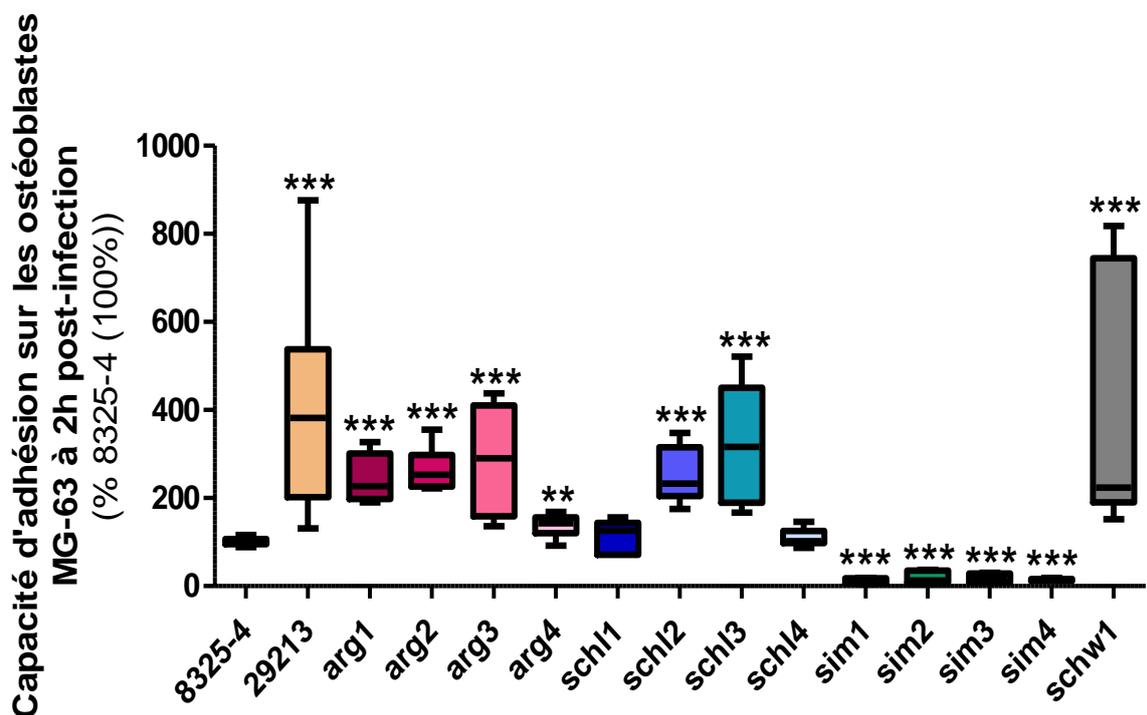


Figure 28 : Capacité d'adhésion des différentes espèces de staphylocoques sur les ostéoblastes MG-63 à 2 h post infection. *S. aureus* utilisé comme souches de référence (29219 et 8325-4). Résultats normalisés en fonction de la souche *S. aureus* 8325-4 (100 %). Les expériences ont été réalisées trois fois en triplicat. Evaluation statistique réalisée entre les différentes souches et la souche 8325-4 à l'aide du test bilatéral de Mann-Whitney avec un risque $\alpha = 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) (UFC : Unité Formant Colonies ; arg : *argenteus* ; schl : *S. schleiferi* ; sim : *S. simiae* ; schw : *S. schweitzeri*).

Dans un second temps, nous avons analysé la capacité d'internalisation dans les ostéoblastes MG-63 à 3 h post infection (Figure 30). Les résultats ont été normalisés sur la souche de référence 8325-4 (100 %).

Les dénombrements des bactéries intracellulaires contenues dans les lysats cellulaires à 3 h pi ont montré que *S. argenteus*, *S. schleiferi* et *S. schweitzeri* présentaient toutes une capacité d'internalisation très significativement supérieure à la souche 8325-4. En effet, *S. argenteus* 1, *S. schleiferi* 3 et *S. schweitzeri* 1 ont indiqué un taux d'internalisation de 2009 % ($p < 0.001$), 979 % ($p < 0.001$) et 784 % ($p < 0.001$) respectivement contre 100 % pour *S. aureus* 8325-4.

D'une manière concordante aux résultats obtenus pour l'adhésion, les souches de *S. simiae* présentaient des niveaux d'internalisation très faibles (Figure 30, 0.25 % d'internalisation en moyenne vs. 100 % pour 8325-4, $p < 0.001$). Il est à noter que toutes les souches semblent présenter une capacité d'internalisation équivalente ou inférieure à la souche 29213 (souche de *S. aureus* connue pour présenter une forte capacité d'internalisation dans les ostéoblastes).

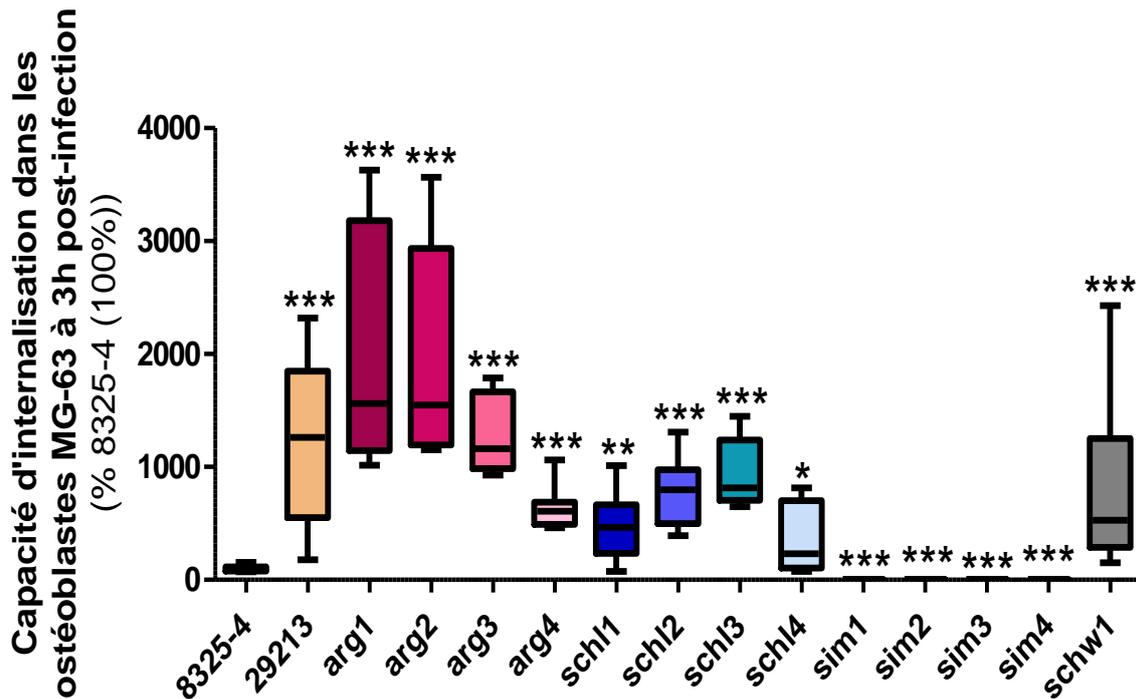


Figure 29 : Capacité d'internalisation de différentes espèces de staphylocoques dans les ostéoblastes MG-63 à 3 h post-infection. *S. aureus* utilisé comme souches de référence (29219 et 8325-4). Résultats normalisés en fonction de la souche *S. aureus* 8325-4 (100 %). Les expériences ont été réalisées trois fois en triplicat. Evaluation statistique réalisée entre les différentes souches et la souche 8325-4 à l'aide du test bilatéral de Mann-Whitney avec un risque $\alpha = 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) (UFC : Unité Formant Colonies ; arg : argenteus ; schl : *S. schleiferi* ; sim : *S. simiae* ; schw : *S. schweitzeri*).

La capacité de persistance intracellulaire des différentes espèces a ensuite été évaluée à différents temps (24 h, 72 h et 7 j pi, Figure 31).

Les résultats obtenus montrent que les souches appartenant à l'espèce *S. schleiferi* pouvaient persister jusqu'à 7 jours post infection dans le compartiment intracellulaire des ostéoblastes avec un inoculum intracellulaire significativement plus important que les souches *S. aureus*. En effet, à 7 jours pi en moyenne 1.25×10^4 UFC de *S. schleiferi* se trouvait encore dans les cellules, notamment 3.56×10^4 UFC pour *S. schleiferi* 2 contre 2.60×10^2 UFC pour la souche de *S. aureus* 8325-4 (Tableau 9, $p < 0.001$). De plus, la souche *S. schweitzeri* a aussi montré une capacité de persistance importante à 7 jours pi avec 8.98×10^2 UFC contre 2.60×10^2 UFC pour la souche

8325-4 ($p < 0.05$). Les souches de *S. argenteus* ont montré une persistance intermédiaire entre *S. schleiferi* et *S. aureus* avec une persistance en moyenne de 8.04×10^4 UFC pour les 4 souches de *S. argenteus* (8.60×10^2 UFC par exemple pour *S. argenteus* 2, $p < 0.01$ contre la souche de *S. aureus* 8325-4). De manière similaire à l'internalisation, la persistance intracellulaire des souches de *S. simiae* était quasi inexistante avec une moyenne de 3.73 UFC.

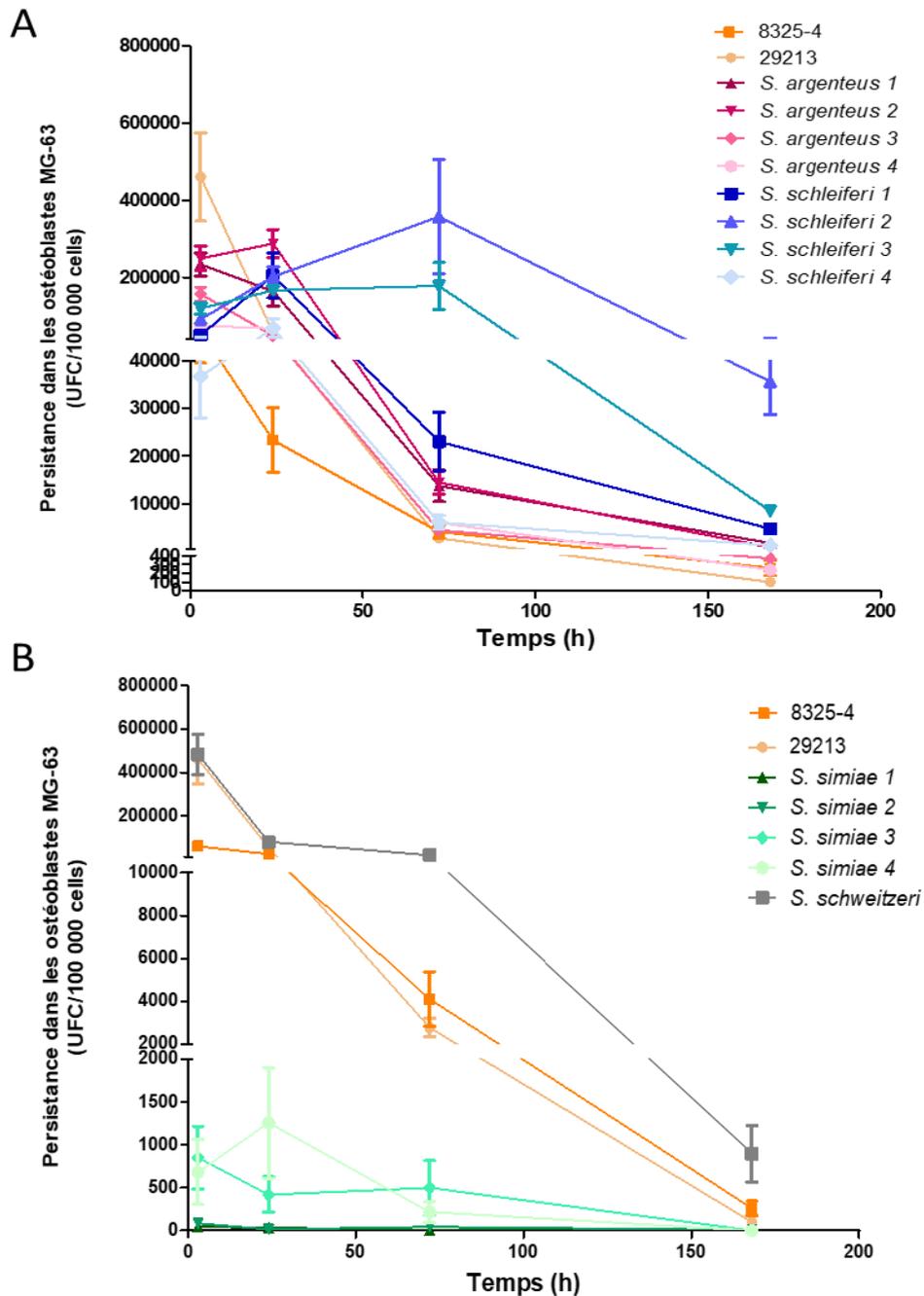


Figure 30 : Persistence de différentes espèces de staphylocoques dans les ostéoblastes MG-63. (A : *S. argenteus* et *S. schleiferi*, B : *S. simiae* et *S. schweitzeri*). *S. aureus* utilisé comme souches de référence (29219 et 8325-4). Résultats représentés en UFC/100 000 cellules. Les expériences ont été réalisées trois fois en triplicat

Tableau 9 : Persistance à 7j post-infection suivant les souches. Les expériences ont été réalisées trois fois en triplicat. Evaluation statistique réalisée à l'aide du test bilatéral de Mann-Whitney avec un risque $\alpha=0.05$ (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$) entre les différentes souches et la souche de référence 8325-4.

Souches	Persistance 7j (CFU/100 000 cellules)
29213	100,42
8325-4	260,05
<i>S. argenteus1</i>	1 748,90 (**)
<i>S. argenteus2</i>	859,92 (**)
<i>S. argenteus3</i>	366,32
<i>S. argenteus4</i>	239,40
<i>S. schleiferi1</i>	4 765,73 (***)
<i>S. schleiferi2</i>	35 622,79 (***)
<i>S. schleiferi3</i>	8 482,22 (***)
<i>S. schleiferi4</i>	1 308,99 (**)
<i>S. simiae1</i>	7,94 (***)
<i>S. simiae2</i>	5,46 (***)
<i>S. simiae3</i>	0,00 (***)
<i>S. simiae4</i>	1,50 (***)
<i>S. schweitzeri1</i>	898,03 (*)

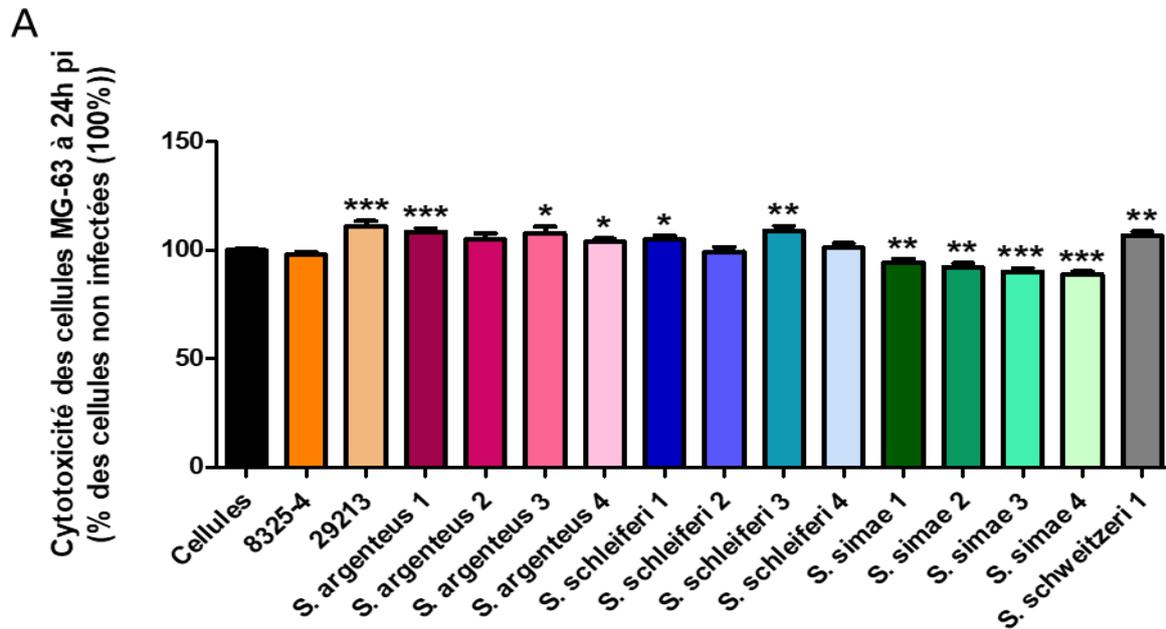
IV.3.c. Cytotoxicité induite par la persistance intracellulaire

La cytotoxicité a été évaluée à 24 h, 72 h et 7 j post infection par mesure de LDH dans le surnageant (Figure 32). Les résultats ont été normalisés sur la condition « cellules non-infectées » (100 %).

Concernant les souches de référence, aucune cytotoxicité n'a été observée pour la souche 8325-4 alors qu'elle a été observée à 24 h et 72 h pi pour la souche 29213. Aucune de ces 2 souches n'a induit de cytotoxicité après 7j de persistance intracellulaire (Figure 32).

Les données obtenues ont montré que *S. argenteus* présentait une cytotoxicité significative à tous les temps, notamment à 72 h pi. La cytotoxicité s'élevait par exemple à 109.55 % à 72 h pi pour *S. argenteus 3* ($p<0.001$). La souche de *S. schweitzeri* a aussi montré une cytotoxicité significative à tous les temps, jusqu'à 117.56 % à 72 h pi par exemple ($p<0.001$) contre 100 % pour la condition « cellules » correspondant aux cellules non infectées. Les résultats ont indiqué que les souches *S. schleiferi* étaient cytotoxiques seulement à 24 h et 7 j pi. En effet, de façon inattendue, il semblerait que 3 des 4 souches de *S. schleiferi* aient la capacité à persister plus longtemps et à induire une cytotoxicité tardive à 7 j pi avec 119 % pour *S. schleiferi2* ($p<0.001$).

Quant aux souches *S. simiae*, elles ont montré une absence de cytotoxicité voire une amélioration de la viabilité. En effet, à 24 h et 72 h pi, les valeurs d'activité LDH obtenues étaient 88.94 % ($p < 0.001$) et 102.78 % ($p = 0.1793$) respectivement pour *S. simiae4* (Figure 32).



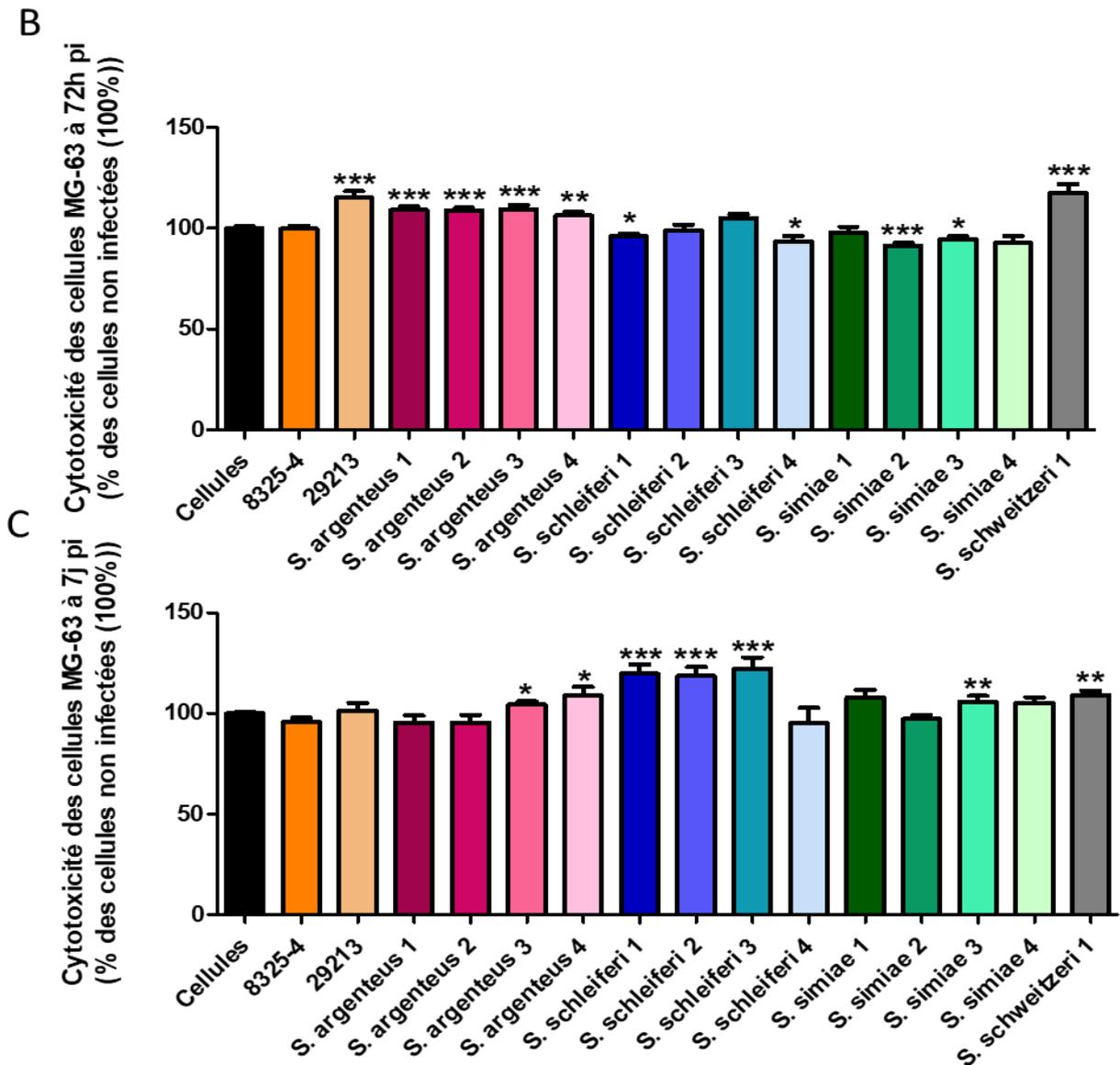


Figure 31 : Cytotoxicité induite par différentes espèces de staphylocoques sur les ostéoblastes MG-63 à 24 h (A), 72 h (B), et 7 j (C) post infection. *S. aureus* utilisé comme souches de référence (29219 et 8325-4). Résultats normalisés en fonction du témoin « cellules » 100 %. Les expériences ont été réalisées trois fois en triplicat. Evaluation statistique réalisée entre les différentes souches et le témoin « cellules » à l'aide du test bilatéral de Mann-Whitney avec un risque $\alpha=0.05$ (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$) (pi : post-infection).

IV.3.d. Production de cytokines induite par la persistance intracellulaire

Pour la suite de cette étude, la production de cytokines pro-inflammatoires a été évaluée à 72 h pi dans le surnageant des cellules infectées par les souches de SNA testées (Figure 33). Les résultats ont été normalisés sur la condition « cellules non-infectées » (quantité de médiateurs protéiques des cellules non infectées = 1).

Les espèces testées dans ce modèle ont induit une augmentation significative de la sécrétion de GM-CSF produit par les cellules. Ces hausses de sécrétion étaient équivalentes pour *S. argenteus* et *S. schleiferi* à celle induite par la souche de référence 29213 (en moyenne 20 fois plus que pour les cellules non-infectées). Deux exceptions sont néanmoins à noter : pour *S. argenteus 4* et pour *S. schleiferi 4* pour lesquelles les augmentations n'étaient respectivement que de 5.4 et 6.58 fois supérieures ($p < 0.001$), avec une induction de GM-CSF intermédiaire entre celles induites par les souches de référence de *S. aureus* 8325-4 (faible induction) et 29213 (forte induction). La souche *S. schweitzeri* semble elle aussi induire une augmentation de la sécrétion de GM-CSF intermédiaire entre 8325-4 et 29213 avec une induction 8 fois supérieure aux cellules non-infectées (Figure 33, $p < 0.001$).

Concernant la production d'IL-6, l'augmentation induite par *S. aureus* 8325-4 était non significative par rapport aux cellules non-infectées ($p = 0.2206$) alors que celle induite par 29213 était 100 fois supérieure ($p < 0.001$). La production d'IL-6 induite par les souches des espèces *S. argenteus* et *S. schleiferi* étaient équivalentes à celle induite par 29213. Les exceptions étaient : *S. argenteus 4* et *S. schleiferi 4* avec une production d'IL-6 intermédiaire par rapport à celles induites par les souches de référence avec des taux 10 et 4 fois supérieurs aux cellules non-infectées (Figure 33, $p < 0.001$ pour les deux conditions).

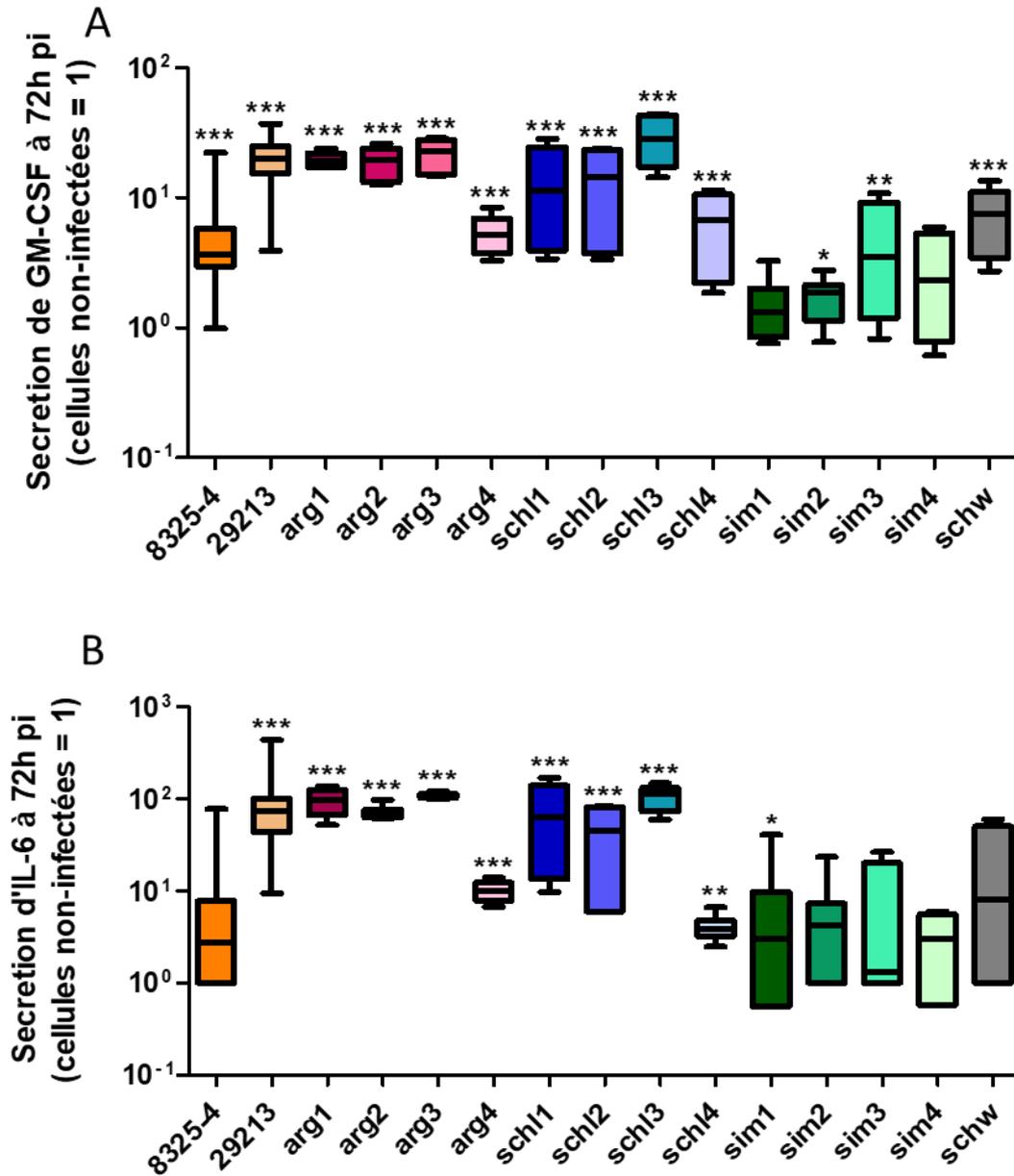


Figure 32 : Réponse inflammatoire induite par différentes espèces de staphylocoque sur les ostéoblastes MG-63 à 72 h post-infection (A : GM-CSF, B : IL-6). *S. aureus* utilisé comme souches de référence (29219 et 8325-4). Résultats normalisés en fonction du témoin « cellules » (10^0). Les expériences ont été réalisées deux fois en triplicat pour *S. argenteus* et *S. schleiferi* et trois fois en triplicat pour *S. simiae* et *S. schweitzeri*. Evaluation statistique réalisée entre les différentes souches et la condition « cellules non-infectées » à l'aide du test bilatéral de Mann-Whitney avec un risque $\alpha=0.05$ (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$) (pi : post-infection, IL-6 : interleukine 6 ; GM-CSF : granulocyte macrophage colony stimulating factor, arg : *argenteus* ; schl : *S. schleiferi*, sim : *simiae*, schw : *schweitzeri*).

IV.3.e. Mécanisme d'internalisation de *S. argenteus*

Afin de savoir si le mécanisme d'internalisation des souches de *S. argenteus* était commun à celui de l'espèce *S. aureus*, un anticorps anti-intégrine $\beta 1$ a été testé. Les résultats ont été normalisés sur la condition « sans traitement » (100 %).

De manière similaire à *S. aureus*, l'utilisation de l'anticorps anti-intégrine $\beta 1$ a provoqué une perte significative de l'internalisation avec une diminution en moyenne de 96 % du taux d'internalisation pour les souches *S. argenteus*. En moyenne, les souches de *S. argenteus* ont présenté un taux d'internalisation de 4.41 % en présence de l'anticorps anti-intégrine ($p < 0.01$) en comparaison à la condition sans anticorps (Figure 34).

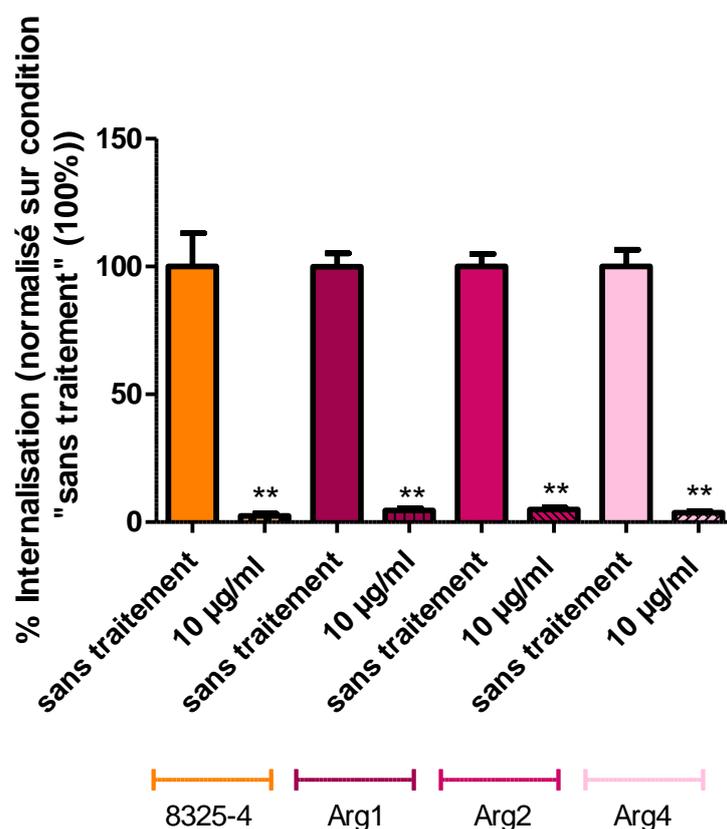


Figure 33 : Capacité d'internalisation de différentes souches de *S. argenteus* après pré-traitement des ostéoblastes MG-63 avec l'anti-intégrine 10 µg/mL. *S. aureus* utilisé comme souche de référence (8325-4). Résultats normalisés en fonction de la condition « sans traitement » 100 %. Les expériences ont été réalisées deux fois en triplicat. Evaluation statistique réalisée entre la condition « sans traitement » et « traitement à 10 µg/mL » à l'aide du test bilatéral de Mann-Whitney avec un risque $\alpha = 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). (Arg : *S. argenteus*).

IV.3.f. Conclusion projet Staphylococcus non-aureus

Les résultats obtenus avec les souches de SNA testées ont permis de montrer que les espèces *S. argenteus*, *S. schleiferi* et *S. schweitzeri* ont une capacité importante d'adhésion aux cellules et d'internalisation dans les CPNP. Ces souches ont aussi montré une capacité de persistance dans le compartiment intracellulaire plus importante que la plupart des souches de *S. aureus* jusqu'à 7 jours pi. *S. argenteus* et *S. schweitzeri* ont montré une cytotoxicité importante à plusieurs temps testés. Cependant les souches *S. schleiferi* ont révélé peu de cytotoxicité hormis une cytotoxicité tardive à 7 jours post infection. Les souches *S. argenteus* et *S. schleiferi* ont montré une induction des cytokines pro-inflammatoires assez importante comparée aux souches de *S. schweitzeri* et *S. simiae*. Les souches de *S. simiae* n'ont, quant à elles, pas montré de capacité d'adhésion, d'internalisation ni de persistance. Elles n'ont pas montré non plus de cytotoxicité ni d'induction de la réponse pro-inflammatoire. Les résultats obtenus ont indiqué que les souches *S. argenteus* utilisaient principalement le mécanisme $\alpha 5\beta 1$ pour l'internalisation dans les CPNP de type cellulaire de lignée ostéoblastes.

V. Discussion

L'internalisation et la persistance intracellulaire sont des mécanismes majeurs de la chronicisation des infections à *S. aureus*, notamment dans les infections ostéo-articulaires. Le but de ce travail a donc été (i) d'approfondir les connaissances actuelles sur ce mécanisme et son rôle pour les souches présentant un phénotype VISA, (ii) de tester de nouvelles molécules anti-staphylococciques à visée intracellulaire et (iii) de déterminer les capacités d'internalisation et de persistance intracellulaire des autres espèces appartenant au genre *Staphylococcus*.

Dans la première partie de nos travaux, nous avons pu démontrer que l'acquisition d'un phénotype de résistance pouvait de façon concomitante avoir un impact sur les mécanismes physiopathologiques. En effet, nos résultats suggèrent que les souches de *S. aureus* de sensibilité diminuée pour la vancomycine (VISA) ont une virulence réduite en termes de capacités d'adhésion, d'internalisation, de persistance intracellulaire et de cytotoxicité induite dans un modèle *in vitro* d'infection cellulaire. Les cinétiques de croissance sur les 2 paires de souches ont mis en évidence que les souches VISA présentent une croissance plus lente par rapport aux souches VSSA et confirment les données décrites par Nelson et *al.* (Nelson et *al.* 2007).

Le modèle d'infection cellulaire utilisé a permis de mettre en évidence des comportements hétérogènes entre les différentes souches testées des 2 couples VSSA/VISA. Les souches VISA ont montré des capacités d'adhésion et d'internalisation, dans les ostéoblastes MG-63 significativement inférieures aux souches VSSA. Malgré une capacité d'internalisation moindre à 3 h pi. Ces souches VISA ont montré à l'inverse, une persistance dans les ostéoblastes jusqu'à 14 jours avec des inocula résiduels intracellulaires supérieurs à ceux des souches VSSA. Ce modèle a aussi permis de montrer que les souches VISA induisaient moins de cytotoxicité et induisaient une sécrétion de cytokines inflammatoires réduite par rapport aux souches VSSA. Ces capacités de persistance intracellulaire associées à une baisse de la virulence (cytotoxicité et réponse inflammatoire) pourraient expliquer la chronicisation décrite *in vivo* chez des patients présentant une infection due à des souches VISA (Cameron *et al.* 2011) mais aussi expliquer la réduction de virulence observée chez ces mêmes souches sur un modèle invertébré de *Galleria mellonella* (Peleg *et al.* 2009).

Si notre approche nous a permis d'observer des différences entre les souches VISA et VSSA, celle-ci présente certaines limites. Le faible nombre de souches utilisées lors de cette étude ne nous permet pas d'être exhaustif et représentatif du comportement de toutes les souches VISA. De plus, nous avons pu observer des différences entre les 2 couples de souches testées pour notre étude ce qui témoigne de l'existence de cette variabilité. Il serait donc intéressant de poursuivre et compléter cette étude sur davantage de souches cliniques.

Le phénotype testé avec la souche VSSA invalidée pour *stp1* n'a montré que très peu de différences avec la souche sauvage isogénique en terme de croissance. Elle présentait également un phénotype intermédiaire au niveau de l'adhésion, l'internalisation et la cytotoxicité par rapport à ce qui a été observé avec les souches cliniques. Ces résultats seraient en accord avec ceux publiés par Cameron *et al.* qui montraient également un phénotype intermédiaire *in vivo* chez la souris avec la souche invalidée pour *stp1* (Cameron *et al.* 2012b). L'ensemble de nos résultats suggèrent que cette mutation du gène *stp1* n'est pas seule responsable du phénotype VISA et que ce phénotype est bien la résultante d'une accumulation de modifications génétiques portant sur différents gènes (Pfeltz *et al.* 2000).

Plus globalement, nos travaux suggèrent que les phénotypes associés à la résistance aux antibiotiques peuvent aussi impacter les mécanismes physiopathologiques de *S. aureus* tels que l'internalisation et la persistance intracellulaire. Cette piste serait intéressante à explorer pour d'autres phénotypes de résistance comme la résistance à la méticilline *via* l'acquisition de *mecA* ou à la rifampicine *via* les mutations sur le gène *rpoB* (Lim *et al.* 2014).

La persistance de *S. aureus* au niveau intracellulaire permet de sanctuariser la bactérie, la protégeant contre l'action des cellules immunitaires et des molécules antimicrobiennes. Il apparaît donc important de développer de nouvelles molécules anti-staphylococciques capables de cibler et éliminer ces bactéries intracellulaires. Dans cette optique, nous avons réalisé 2 études sur l'efficacité de nouvelles molécules anti-staphylococciques à visée intracellulaire dans le cadre de collaboration avec des sociétés pharmaceutiques : Sar1 et Sar2 dans le cadre d'une collaboration avec Sanofi et Debio 1452 dans le cadre d'une collaboration avec Debiopharm. Ces études soulignent l'intérêt de l'utilisation et le développement de stratégies thérapeutiques ciblant les bactéries intracellulaires afin de combattre les infections chroniques. Les résultats obtenus lors de ces études sont encourageants. Les molécules Sar1 et Sar2 ont montré une efficacité significative à partir de la concentration 3.2 mg/L à 24 h pi sur les *S. aureus* sanctuarisés dans le compartiment intracellulaire. La molécule Sar2 est même apparue plus efficace que la rifampicine, qui est connue étant un des antibiotiques les plus actifs en intracellulaire (Valour et al. 2015b). Cette molécule a également montré des résultats prometteurs sur des souches de *S. aureus* ayant persisté pendant une période de 24 h avant la mise en place du traitement. En effet, certaines molécules sont moins efficaces sur une bactérie sanctuarisée au niveau intracellulaire car celle-ci peut acquérir une tolérance supplémentaire aux antibiotiques en réponse au stress de l'environnement intracellulaire (Tuchscher et al. 2016). Les résultats sont d'autant plus intéressants qu'aucune activité cytotoxique n'a été relevée pour ces deux nouvelles molécules. Cependant, une baisse du signal de MTT a été observée dès la concentration 0.32 mg/L. Ces résultats pourraient être liés à notre modèle expérimental. En effet, les cellules utilisées dans nos modèles, les MG-63, sont une lignée cellulaire d'ostéoblastes issue d'un ostéosarcome. Celles-ci se multiplient de manière non contrôlée (temps de doublement = 24h) et ne sont pas limitées par les phénomènes de sénescence et d'apoptose (Pautke et al. 2004). Le métabolisme exacerbé de ces cellules pourrait rendre les cellules MG-63 plus sensibles aux molécules testées et provoquer un ralentissement de prolifération. Une perte de du nombre de cellules vivantes similaire avait déjà été observée lors d'un traitement à la rifampicine à partir de la concentration 32 mg/L (Zhang et al. 2014). Il serait donc intéressant de réaliser des expériences complémentaires avec des ostéoblastes primaires humains, dont le temps de doublement est lui de l'ordre de 1 semaine, afin de voir si ces molécules impacteraient toujours le nombre de cellules vivantes / activité mitochondriale.

CONFIDENTIEL

Les résultats générés lors de ces projets ont donc montré l'intérêt des trois nouvelles molécules anti-staphylococciques testées dans l'élimination des *S. aureus* intracellulaires, avec une efficacité supérieure à la rifampicine pour Sar1 et Sar2. Ces molécules, en combinaison avec des antibiotiques standards, pourraient constituer une option thérapeutique précieuse pour le traitement des infections ostéo-articulaires.

La dernière partie de ce travail a porté sur les capacités d'internalisation et de persistance intracellulaire des SNA. Notre attention s'est focalisée sur les espèces *S. simiae* et *S. schleiferi* ainsi que *S. argenteus* et *S. schweitzeri* qui ont été décrites plus récemment (Tong et al. 2015) (McDonald et al. 2006). Comme peu de techniques de diagnostic rapide permettent actuellement de différencier *S. argenteus* ou *S. schweitzeri* de *S. aureus* dans les laboratoires de routine, le nombre de cas d'infections par ces espèces pouvant être largement sous-estimé (Zhang et al. 2016). Ainsi, les infections provoquées par *S. argenteus* sont fréquentes chez l'Homme. Selon une étude de Tong et al. de 2013, qui s'est intéressé à la fréquence de *S. argenteus* dans plusieurs collections cliniques du nord de l'Australie, cette espèce serait majoritairement associée à des infections de la peau et des tissus mous mais rarement associée à des bactériémies (Tong et al. 2013). Une autre étude réalisée en Thaïlande a montré que les taux de morbidité et mortalité associés aux infections à *S. argenteus* étaient identiques à ceux des infections à *S. aureus* (Thaipadungpanit et al. 2015). De plus, il a été décrit que *S. argenteus* peut aussi acquérir des facteurs de virulence comme la PVL ou des gènes de résistance aux antibiotiques (Dupieux et al. 2015 ; Moradigaravand et al. 2017). Ce dernier point est en concordance avec les résultats d'antibiogramme que nous avons obtenus lors de notre étude, indiquant plusieurs résistances aux antibiotiques pour *S. argenteus*. Face à ces constatations cliniques, il apparaissait donc intéressant d'étudier les capacités d'internalisation et de persistance intracellulaire de *S. argenteus* afin de déterminer si ses mécanismes pouvaient avoir un rôle dans la physiopathologie de ces infections induites pour cette espèce.

Les 4 souches de *S. argenteus* que nous avons étudiées ont montré un phénotype proche de celui des souches de références de *S. aureus* avec une adhésion, une internalisation ainsi qu'une persistance intracellulaire similaires voire plus importantes que *S. aureus* dans les CPNP. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus récemment par Jiang et al. en juin 2018. Dans leur article, cette équipe compare deux souches de *S. argenteus*, un phénotype SCV et un phénotype "classique", isolées chez un patient souffrant d'une IOA chronique sur prothèse de hanche. Ils ont montré que les 2 souches avaient la capacité d'adhérer et d'être internalisées par des cellules HeLa de manière identique, mais que la souche au phénotype SCV persistait au niveau

intracellulaire dans des proportions plus importantes. (Jiang et al. 2018). Cependant, cette étude n'utilise pas de souche de référence de *S. aureus*, il est donc difficile de comparer plus en détails nos résultats avec ceux présentés. Dans notre étude, nous avons aussi mis en évidence, pour la première fois, que le mécanisme d'internalisation de *S. argenteus* était dépendant de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, comme *S. aureus* (Jevon et al. 1999). Il serait intéressant d'identifier les ligands bactériens à l'origine de l'internalisation de *S. argenteus*, qui sont sûrement des protéines *FnBP-like* comme cela a pu être mis en évidence pour *S. pseudintermedius* (Maali et al. 2018 ; Pietrocola et al. 2015). Concernant la cytotoxicité induite par ces 4 souches de *S. argenteus*, celle-ci était équivalente à celle induite par les souches de référence de *S. aureus*. Il serait intéressant d'analyser les génomes de ces souches afin de savoir si les souches de *S. argenteus* possèdent des PSMs et ainsi évaluer si elles participent à la cytotoxicité de *S. argenteus*, comme c'est le cas pour *S. aureus* et *S. pseudintermedius* (Rasigade et al. 2013 ; Maali et al. 2018).

La seconde espèce qui nous a plus particulièrement intéressé est *S. schleiferi*. Elle se divise en deux sous-espèces : *S. schleiferi coagulans* et *S. schleiferi schleiferi* (Igimi et al. 1990). *S. schleiferi coagulans* est principalement un agent pathogène vétérinaire mais il peut également être à l'origine d'infections opportunistes chez l'Homme. En effet, plusieurs cas d'infections humaines ont été publiés tels qu'une endophtalmie (Tzamalidis et al. 2013), une endocardite (Kumar et al. 2007), une bactériémie (Martiny et al. 2010), une ostéomyélite (Calvo et al. 2000), infections sur site chirurgical (Hernández et al. 2001) et sur pacemaker (Célar et al. 1997). De plus, *S. schleiferi* peut être parfois mal identifié ou identifié à tort comme *S. aureus* (Kluytmans et al. 1998). Quant aux bactéries appartenant à la sous-espèce *S. schleiferi schleiferi*, elles sont principalement retrouvées dans les infections chez l'Homme (Hernández et al. 2001).

Comme pour *S. argenteus*, nous avons souhaité évaluer les capacités d'internalisation et de persistance intracellulaire de *S. schleiferi* afin de déterminer si ces mécanismes pourraient avoir un rôle dans la physiopathologie des infections dont ce pathogène est responsable. Nous avons pu observer que nos 4 souches de *S. schleiferi* avaient une capacité d'internalisation dans les ostéoblastes plus faible que *S. argenteus* mais que la persistance intracellulaire était plus importante. Le même phénomène a été observé (internalisation plus faible et persistance plus forte) pour les souches VISA en comparaison aux souches VSSA. Il est aussi intéressant de noter une quasi absence de cytotoxicité pour *S. schleiferi* à 24 h et 72 h pi alors que les souches de *S. argenteus* induisent une cytotoxicité équivalente à *S. aureus*. Ceci pourrait être expliqué par une capacité d'adaptation plus rapide à l'environnement intracellulaire pour cette espèce

comme nous avons pu l'observer pour les souches VISA en comparaison aux souches VSSA (Cameron et al. 2017). Enfin, de manière surprenante, 3 des 4 souches de *S. schleiferi* ont montré une cytotoxicité importante après 7 j pi. Il serait donc intéressant d'approfondir l'étude pour cette espèce et d'analyser la persistance au-delà de 7 j afin de comprendre cette cytotoxicité retardée.

Concernant *S. schweitzeri*, cette espèce colonise généralement les singes et les chauves-souris. Sa transmission à l'Homme reste encore incertaine même si un cas humain a été décrit au Gabon (Ateba Ngoa et al. 2012). Comme les souches de *S. argenteus* et de *S. schleiferi*, la souche de *S. schweitzeri* que nous avons étudiée est capable d'être internalisée et de persister dans les ostéoblastes. Cette souche est capable d'induire la mort des cellules, à 24 h, 72 h et 7 j. Les souches de *S. simiae*, espèce retrouvée le plus souvent chez le singe (Pantůček et al. 2005), n'ont quant à elles pas montré de capacités d'adhésion, d'internalisation, de persistance et de cytotoxicité.

Pour les espèces de SNA testées, nous nous sommes intéressés à leur capacité à induire une réponse inflammatoire. D'une façon similaire à la cytotoxicité, *S. argenteus* a montré une réponse inflammatoire importante avec production de GM-CSF et d'IL-6 qui sont des cytokines induites par la cellule afin de réguler les fonctions immunitaires. *S. schleiferi* a aussi présenté une réponse importante pour ces deux cytokines à 72 h alors que peu de cytotoxicité avait été retrouvée pour cette espèce à 72 h. Quant à la souche de *S. schweitzeri*, elle induit de façon surprenante une réponse cytokinique importante pour GM-CSF mais inexistante pour IL-6 avec une cytotoxicité importante à 72 h, indiquant qu'il n'y a donc pas de corrélation directe entre la cytotoxicité et la réponse pro-inflammatoire de GM-CSF et IL-6 des souches *S. schleiferi* et *S. schweitzeri*. Cependant, *S. simiae* n'a présenté aucune réponse inflammatoire par les cellules, ce qui était attendu en l'absence d'internalisation de cette souche. La production de ces cytokines est classiquement décrite comme augmentée lors d'une infection à *S. aureus* (Bost et al. 1999 ; Bost et al. 2001). Cela est confirmé dans notre étude par une présence importante des souches *S. argenteus*, *S. schleiferi* et *S. schweitzeri* dans les cellules à 72h pi (lors du dosage de cytokines) et par l'absence de *S. simiae*.

Il est important de noter que nous avons étudié pour la première fois les capacités d'internalisation de *S. schleiferi*, *S. schweitzeri* et *S. schleiferi*, *S. simiae*. Pour approfondir notre travail, est prévu dans un premier temps de regarder si *S. schleiferi* et *S. schweitzeri* utilisent ou non le même mécanisme d'internalisation que *S. aureus* et *S. argenteus*. Nous avons aussi

relevé que les souches de *S. schleiferi* persistant le plus étaient les souches *S. schleiferi coagulans*, correspondant à celle possédant une coagulase.

De plus, *S. aureus*, *S. argenteus*, *S. schleiferi* ainsi que d'autres espèces comme *S. pseudintermedius* possèdent une coagulase et ont la capacité de s'internaliser et de persister dans les CPNP (Maali et al. 2016). Cette observation doit cependant être nuancée car *S. simiae* n'a montré aucune internalisation et possède pourtant la coagulase, comme cela a pu être observé pour *S. intermedius* par Maali et al. (Maali et al. 2016). Par la suite, il serait intéressant d'analyser d'autres espèces possédant ou non une coagulase afin d'observer si des différences au niveau de l'infection cellulaire seraient observées. Une autre option serait de tester un couple de souches isogéniques (sauvage et délétée pour la coagulase).

Enfin, avec les résultats que nous avons obtenus montrant une grande variabilité de comportement en terme d'adhésion, d'internalisation, de persistance et de cytotoxicité combinés à ceux obtenus par Yousef Maali (Maali et al. 2016), il serait intéressant d'effectuer une étude phylogénétique large du genre *Staphylococcus* afin de regarder s'il est possible d'identifier un lien entre la phylogénie de toutes ces espèces et leur capacité d'internalisation, et ainsi de pouvoir prédire le risque de chronicité d'une infection (en lien avec la capacité de persistance intracellulaire) pour une espèce donnée.

VI. Conclusion

Ce travail construit au cours de ces 3 années d'EPHE ont montré l'intérêt de poursuivre les études portant sur l'espèce *S. aureus* afin de comprendre leurs mécanismes de chronicisation pour pouvoir éradiquer le plus efficacement possible le réservoir bactérien. Il est également important de prendre en compte cette persistance intracellulaire bactérienne d'un point de vue clinique et thérapeutique lors du choix des antibiotiques.

Nos résultats montrent aussi l'intérêt d'étudier les autres espèces de la famille des staphylocoques et leurs mécanismes d'infection, notamment en étudiant leur capacité et du mécanisme d'internalisation, afin de comprendre leurs mécanismes de chronicisation. En effet, nos résultats ont montré que *S. argenteus* utilisait l'intégrine $\beta 1$ pour envahir les cellules comme le fait *S. aureus*. De plus, les nouvelles espèces décrites récemment, telles que *S. argenteus* et *S. schweitzeri* ainsi que *S. schleiferi*, demandent une nouvelle vigilance particulière du fait de leur capacité à persister plus que *S. aureus* et donc de leur capacités à induire des infections

chroniques. Une meilleure connaissance de ces différentes espèces de staphylocoques ainsi que leurs mécanismes de persistance permettraient d'adapter les choix thérapeutiques.

L'importance de l'internalisation à la fois en termes de fréquence au sein des différentes espèces du genre *Staphylococcus* mais aussi en termes d'impact clinique met en lumière qu'il est donc essentiel de continuer à développer de nouvelles molécules antibiotiques anti-staphylococciques à action intracellulaire telles que celles évaluées lors de notre travail en collaboration avec Sanofi et Debiopharm.

Références Bibliographiques

- Alexander EH, Rivera FA, Marriott I, Anguita J, Bost KL, Hudson MC. 2003. *Staphylococcus aureus* - induced tumor necrosis factor - related apoptosis - inducing ligand expression mediates apoptosis and caspase-8 activation in infected osteoblasts. *BMC Microbiol.* 3:5
- Almeida RA, Oliver SP. 2001. Interaction of coagulase-negative *Staphylococcus* species with bovine mammary epithelial cells. *Microb. Pathog.* 31(5):205–12
- Ateba Ngoa U, Schaumburg F, Adegnika AA, Kösters K, Möller T, et al. 2012. Epidemiology and population structure of *Staphylococcus aureus* in various population groups from a rural and semi urban area in Gabon, Central Africa. *Acta Trop.* 124(1):42–47
- Bannoehr J, Ben Zakour NL, Reglinski M, Inglis NF, Prabhakaran S, et al. 2011. Genomic and surface proteomic analysis of the canine pathogen *Staphylococcus pseudintermedius* reveals proteins that mediate adherence to the extracellular matrix. *Infect. Immun.* 79(8):3074–86
- Barber M, Rozwadowska-Dowzenko M. 1948. Infection by penicillin-resistant staphylococci. *Lancet Lond. Engl.* 2(6530):641–44
- Barna JC, Williams DH. 1984. The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. *Annu. Rev. Microbiol.* 38:339–57
- Becker K, Heilmann C, Peters G. 2014. Coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 27(4):870–926
- Beltramini AM, Mukhopadhyay CD, Pancholi V. 2009. Modulation of cell wall structure and antimicrobial susceptibility by a *Staphylococcus aureus* eukaryote-like serine/threonine kinase and phosphatase. *Infect. Immun.* 77(4):1406–16
- Blättner S, Das S, Paprotka K, Eilers U, Krischke M, et al. 2016. *Staphylococcus aureus* exploits a non-ribosomal cyclic dipeptide to modulate survival within epithelial cells and phagocytes. *PLoS Pathog.* 12(9):e1005857
- Bosse MJ, Gruber HE, Ramp WK. 2005. Internalization of bacteria by osteoblasts in a patient with recurrent, long-term osteomyelitis. A case report. *J. Bone Joint Surg. Am.* 87(6):1343–47
- Bost KL, Bento JL, Petty CC, Schrum LW, Hudson MC, Marriott I. 2001. Monocyte chemoattractant protein-1 expression by osteoblasts following infection with *Staphylococcus aureus* or Salmonella. *J. Interferon Cytokine Res.* 21(5):297–304
- Bost KL, Ramp WK, Nicholson NC, Bento JL, Marriott I, Hudson MC. 1999. *Staphylococcus aureus* infection of mouse or human osteoblasts induces high levels of interleukin-6 and interleukin-12 production. *J. Infect. Dis.* 180(6):1912–20
- Calvo J, Hernández JL, Fariñas MC, García-Palomo D, Agüero J. 2000. Osteomyelitis caused by *Staphylococcus schleiferi* and evidence of misidentification of this *Staphylococcus* species by an automated bacterial identification system. *J. Clin. Microbiol.* 38(10):3887–89
- Cameron DR, Howden BP, Peleg AY. 2011. The interface between antibiotic resistance and virulence in *Staphylococcus aureus* and its impact upon clinical outcomes. *Clin. Infect. Dis.* 53(6):576–82

- Cameron DR, Lin Y-H, Trouillet-Assant S, Tafani V, Kostoulias X, et al. 2017. Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates are attenuated for virulence when compared with susceptible progenitors. *Clin. Microbiol. Infect. Microbiol. Infect. Dis.* 23(10):767–73
- Cameron DR, Ward DV, Kostoulias X, Howden BP, Moellering RC, et al. 2012a. Serine/threonine phosphatase Stp1 contributes to reduced susceptibility to vancomycin and virulence in *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 205(11):1677–87
- Cameron DR, Ward DV, Kostoulias X, Howden BP, Moellering RC, et al. 2012b. Serine/threonine phosphatase Stp1 contributes to reduced susceptibility to vancomycin and virulence in *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 205(11):1677–87
- Campoccia D, Testoni F, Ravaioli S, Cangini I, Maso A, et al. 2016. Orthopedic implant infections: Incompetence of *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis*, and *Enterococcus faecalis* to invade osteoblasts. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 104(3):788–801
- Célar M, Vandenesch F, Darbas H, Grando J, Jean-Pierre H, et al. 1997. Pacemaker infection caused by *Staphylococcus schleiferi*, a member of the human preaxillary flora: four case reports. *Clin. Infect. Dis.* 24(5):1014–15
- Chambers HF. 1997. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 10(4):781–91
- Chantratita N, Wikraiphat C, Tandhavanant S, Wongsuvan G, Ariyaprasert P, et al. 2016. Comparison of community-onset *Staphylococcus argenteus* and *Staphylococcus aureus* sepsis in Thailand: a prospective multicentre observational study. *Clin. Microbiol. Infect.* 22(5):458.e11-19
- Charles PGP, Ward PB, Johnson PDR, Howden BP, Grayson ML. 2004. Clinical features associated with bacteremia due to heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* 38(3):448–51
- Cheung GYC, Joo H-S, Chatterjee SS, Otto M. 2014. Phenol-soluble modulins--critical determinants of staphylococcal virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* 38(4):698–719
- Chi C-Y, Lin C-C, Liao I-C, Yao Y-C, Shen F-C, et al. 2014. Panton-Valentine leukocidin facilitates the escape of *Staphylococcus aureus* from human keratinocyte endosomes and induces apoptosis. *J. Infect. Dis.* 209(2):224–35
- Claro T, Widaa A, McDonnell C, Foster TJ, O'Brien FJ, Kerrigan SW. 2013. *Staphylococcus aureus* protein A binding to osteoblast tumour necrosis factor receptor 1 results in activation of nuclear factor kappa B and release of interleukin-6 in bone infection. *Microbiol. Read. Engl.* 159(Pt 1):147–54
- Coates R, Moran J, Horsburgh MJ. 2014. Staphylococci: colonizers and pathogens of human skin. *Future Microbiol.* 9(1):75–91
- Cui L, Murakami H, Kuwahara-Arai K, Hanaki H, Hiramatsu K. 2000. Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44(9):2276–85
- Darlow CA, Paidakakos N, Sikander M, Atkins B. 2017. A spinal infection with *Staphylococcus pseudintermedius*. *BMJ Case Rep.* 2017:

- Deretic V. 2011. Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes. *Immunol. Rev.* 240(1):92–104
- Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13(1):16–34, table of contents
- Dupieux C, Blondé R, Bouchiat C, Meugnier H, Bes M, et al. 2015. Community-acquired infections due to *Staphylococcus argenteus* lineage isolates harbouring the Pantone-Valentine leucocidin, France, 2014. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* 20(23):
- Dupieux C, Trouillet-Assant S, Camus C, Abad L, Bes M, et al. 2017. Intraosteoblastic activity of daptomycin in combination with oxacillin and ceftaroline against MSSA and MRSA. *J. Antimicrob. Chemother.* 72(12):3353–56
- Easmon CS, Crane JP. 1984. Cellular uptake of clindamycin and lincomycin. *Br. J. Exp. Pathol.* 65(6):725–30
- Ellington JK, Harris M, Webb L, Smith B, Smith T, et al. 2003. Intracellular *Staphylococcus aureus*. A mechanism for the indolence of osteomyelitis. *J. Bone Joint Surg. Br.* 85(6):918–21
- Ellington JK, Reilly SS, Ramp WK, Smeltzer MS, Kellam JF, Hudson MC. 1999. Mechanisms of *Staphylococcus aureus* invasion of cultured osteoblasts. *Microb. Pathog.* 26(6):317–23
- Fischetti VA, Pancholi V, Schneewind O. 1990. Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from gram-positive cocci. *Mol. Microbiol.* 4(9):1603–5
- Flanagan RS, Heit B, Heinrichs DE. 2016. Intracellular replication of *Staphylococcus aureus* in mature phagolysosomes in macrophages precedes host cell death, and bacterial escape and dissemination. *Cell. Microbiol.* 18(4):514–35
- Fraunholz M, Sinha B. 2012. Intracellular *Staphylococcus aureus*: live-in and let die. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2:43
- Fridkin SK, Hageman J, McDougal LK, Mohammed J, Jarvis WR, et al. 2003. Epidemiological and microbiological characterization of infections caused by *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin, United States, 1997-2001. *Clin. Infect. Dis.* 36(4):429–39
- Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet J-C, Lina G, et al. 2002. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Pantone-Valentine leucocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet Lond. Engl.* 359(9308):753–59
- Gould IM, Miró JM, Rybak MJ. 2013. Daptomycin: the role of high-dose and combination therapy for Gram-positive infections. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 42(3):202–10
- Gravet A, Colin DA, Keller D, Girardot R, Monteil H, et al. 1998. Characterization of a novel structural member, Luke-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family. *FEBS Lett.* 436(2):202–8

- Grosz M, Kolter J, Paprotka K, Winkler A-C, Schäfer D, et al. 2014. Cytoplasmic replication of *Staphylococcus aureus* upon phagosomal escape triggered by phenol-soluble modulins. *Cell. Microbiol.* 16(4):451–65
- Hassoun A, Linden PK, Friedman B. 2017. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations—a review of recent developments in MRSA management and treatment. *Crit. Care Lond. Engl.* 21(1):211
- Hernández JL, Calvo J, Sota R, Agüero J, García-Palomo JD, Fariñas MC. 2001. Clinical and microbiological characteristics of 28 patients with *Staphylococcus schleiferi* infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20(3):153–58
- Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, et al. 1997. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet Lond. Engl.* 350(9092):1670–73
- Holtfreter S, Bröker BM. 2005. Staphylococcal superantigens: do they play a role in sepsis? *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*. 53(1):13–27
- Howden BP, Stinear TP, Allen DL, Johnson PDR, Ward PB, Davies JK. 2008. Genomic analysis reveals a point mutation in the two-component sensor gene *graS* that leads to intermediate vancomycin resistance in clinical *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52(10):3755–62
- Hudson MC, Ramp WK, Nicholson NC, Williams AS, Nousiainen MT. 1995. Internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured osteoblasts. *Microb. Pathog.* 19(6):409–19
- Huff S, Matsuka YV, McGavin MJ, Ingham KC. 1994. Interaction of N-terminal fragments of fibronectin with synthetic and recombinant D motifs from its binding protein on *Staphylococcus aureus* studied using fluorescence anisotropy. *J. Biol. Chem.* 269(22):15563–70
- Hybiske K, Stephens RS. 2008. Exit strategies of intracellular pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 6(2):99–110
- Igimi S, Takahashi E, Mitsuoka T. 1990. *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* subsp. *nov.*, isolated from the external auditory meatus of dogs with external ear otitis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40(4):409–11
- Jauregui CE, Mansell JP, Jepson MA, Jenkinson HF. 2013. Differential interactions of *Streptococcus gordonii* and *Staphylococcus aureus* with cultured osteoblasts. *Mol. Oral Microbiol.* 28(4):250–66
- Jevon M, Guo C, Ma B, Mordan N, Nair SP, et al. 1999. Mechanisms of internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured human osteoblasts. *Infect. Immun.* 67(5):2677–81
- Jiang B, You B, Tan L, Yu S, Li H, et al. 2018. Clinical *Staphylococcus argenteus* Develops to Small Colony Variants to Promote Persistent Infection. *Front. Microbiol.* 9:1347
- Joh HJ, House-Pompeo K, Patti JM, Gurusiddappa S, Höök M. 1994. Fibronectin receptors from gram-positive bacteria: comparison of active sites. *Biochemistry.* 33(20):6086–92

- Jönsson K, Signäs C, Müller HP, Lindberg M. 1991. Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*. The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. *Eur. J. Biochem.* 202(3):1041–48
- Joo H-S, Otto M. 2012. Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. *Chem. Biol.* 19(12):1503–13
- Josse J, Velard F, Gangloff SC. 2015. *Staphylococcus aureus* vs. osteoblast: relationship and consequences in osteomyelitis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5:85
- Kalinka J, Hachmeister M, Geraci J, Sordelli D, Hansen U, et al. 2014. *Staphylococcus aureus* isolates from chronic osteomyelitis are characterized by high host cell invasion and intracellular adaptation, but still induce inflammation. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM.* 304(8):1038–49
- Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. 2000. A new class of genetic element, *staphylococcus* cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44(6):1549–55
- Khalil H, Williams RJ, Stenbeck G, Henderson B, Meghji S, Nair SP. 2007. Invasion of bone cells by *Staphylococcus epidermidis*. *Microbes Infect.* 9(4):460–65
- Klevens RM, Edwards JR, Tenover FC, McDonald LC, Horan T, et al. 2006. Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units in US hospitals, 1992-2003. *Clin. Infect. Dis.* 42(3):389–91
- Kluytmans J, Berg H, Steegh P, Vandenesch F, Etienne J, van Belkum A. 1998. Outbreak of *Staphylococcus schleiferi* wound infections: strain characterization by randomly amplified polymorphic DNA analysis, PCR ribotyping, conventional ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 36(8):2214–19
- Kulhankova K, King J, Salgado-Pabón W. 2014. Staphylococcal toxic shock syndrome: superantigen-mediated enhancement of endotoxin shock and adaptive immune suppression. *Immunol. Res.* 59(1–3):182–87
- Kumar D, Cawley JJ, Irizarry-Alvarado JM, Alvarez A, Alvarez S. 2007. Case of *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* endocarditis and metastatic infection in an immune compromised host. *Transpl. Infect. Dis.* 9(4):336–38
- Lecomte F, Nouvellon M, Lévesque H. 2001. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *N. Engl. J. Med.* 344(18):1399–1400; author reply 1400-1401
- Lemaire S, Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq M-P, Glupczynski Y, Tulkens PM. 2007. Role of acidic pH in the susceptibility of intraphagocytic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains to meropenem and cloxacillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51(5):1627–32
- Lim K-T, Teh CSJ, Yusof MYM, Thong K-L. 2014. Mutations in *rpoB* and *fusA* cause resistance to rifampicin and fusidic acid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from a tertiary hospital in Malaysia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 108(2):112–18
- Livermore DM. 2000. Antibiotic resistance in staphylococci. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 16 Suppl 1:S3-10

- Löffler B, Tuchscher L, Niemann S, Peters G. 2014. *Staphylococcus aureus* persistence in non-professional phagocytes. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM*. 304(2):170–76
- Lowy FD. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* 339(8):520–32
- Maali Y, Badiou C, Martins-Simões P, Hodille E, Bes M, et al. 2018. Understanding the Virulence of *Staphylococcus pseudintermedius*: A Major Role of Pore-Forming Toxins. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8:221
- Maali Y, Martins-Simões P, Valour F, Bouvard D, Rasigade J-P, et al. 2016. Pathophysiological Mechanisms of *Staphylococcus non-aureus* bone and joint infection: Interspecies homogeneity and specific behavior of *S. pseudintermedius*. *Front. Microbiol.* 7:1063
- Martiny D, Potvliege C, Jonckheer J. 2010. Fatal Bacteremia Due to *Staphylococcus schleiferi* subsp. *schleiferi*. *Clin. Microbiol. Newsl.* 32(11):85–86
- McDevitt D, Francois P, Vaudaux P, Foster TJ. 1994. Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 11(2):237–48
- McDonald M, Dougall A, Holt D, Huygens F, Oppedisano F, et al. 2006. Use of a single-nucleotide polymorphism genotyping system to demonstrate the unique epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in remote aboriginal communities. *J. Clin. Microbiol.* 44(10):3720–27
- Mestre MB, Fader CM, Sola C, Colombo MI. 2010. Alpha-hemolysin is required for the activation of the autophagic pathway in *Staphylococcus aureus*-infected cells. *Autophagy.* 6(1):110–25
- Minhas T, Ludlam HA, Wilks M, Tabaqchali S. 1995. Detection by PCR and analysis of the distribution of a fibronectin-binding protein gene (fbn) among staphylococcal isolates. *J. Med. Microbiol.* 42(2):96–101
- Montange D, Berthier F, Leclerc G, Serre A, Jeunet L, et al. 2014. Penetration of daptomycin into bone and synovial fluid in joint replacement. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58(7):3991–96
- Moradigaravand D, Jamrozy D, Mostowy R, Anderson A, Nickerson EK, et al. 2017. Evolution of the *Staphylococcus argenteus* ST2250 Clone in Northeastern Thailand Is Linked with the Acquisition of Livestock-Associated Staphylococcal Genes. *mBio.* 8(4):
- Mwangi MM, Wu SW, Zhou Y, Sieradzki K, de Lencastre H, et al. 2007. Tracking the in vivo evolution of multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* by whole-genome sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104(22):9451–56
- Nazarali A, Singh A, Moens NMM, Gatineau M, Sereda C, et al. 2015. Association between methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* carriage and the development of surgical site infections following tibial plateau leveling osteotomy in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 247(8):909–16
- Nelson JL, Rice KC, Slater SR, Fox PM, Archer GL, et al. 2007. Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* Strains Have Impaired Acetate Catabolism: Implications for Polysaccharide Intercellular Adhesin Synthesis and Autolysis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51(2):616–22

- Novick RP, Ross HF, Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B, Moghazeh S. 1993. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J.* 12(10):3967–75
- Olsen JE, Christensen H, Aarestrup FM. 2006. Diversity and evolution of bla_Z from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J. Antimicrob. Chemother.* 57(3):450–60
- Otto M. 2009. *Staphylococcus epidermidis*--the “accidental” pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 7(8):555–67
- Oviedo-Boयोso J, Bravo-Patiño A, Cajero-Juárez M, Valdez-Alarcón JJ, Baizabal-Aguirre VM. 2009. TNF-alpha reduces the level of *Staphylococcus epidermidis* internalization by bovine endothelial cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 292(1):92–99
- Pantůček R, Sedláček I, Petrás P, Koukalová D, Svec P, et al. 2005. *Staphylococcus simiae* sp. nov., isolated from South American squirrel monkeys. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55(Pt 5):1953–58
- Pautke C, Schieker M, Tischer T, Kolk A, Neth P, et al. 2004. Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. *Anticancer Res.* 24(6):3743–48
- Peacock SJ, Paterson GK. 2015. Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu. Rev. Biochem.* 84:577–601
- Peleg AY, Monga D, Pillai S, Mylonakis E, Moellering RC, Eliopoulos GM. 2009. Reduced susceptibility to vancomycin influences pathogenicity in *Staphylococcus aureus* infection. *J. Infect. Dis.* 199(4):532–36
- Pfeltz RF, Singh VK, Schmidt JL, Batten MA, Baranyk CS, et al. 2000. Characterization of passage-selected vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains of diverse parental backgrounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44(2):294–303
- Pietrocola G, Gianotti V, Richards A, Nobile G, Geoghegan JA, et al. 2015. Fibronectin Binding Proteins SpsD and SpsL Both Support Invasion of Canine Epithelial Cells by *Staphylococcus pseudintermedius*. *Infect. Immun.* 83(10):4093–4102
- Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, et al. 2006. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat. Rev. Microbiol.* 4(4):295–305
- Queck SY, Khan BA, Wang R, Bach T-HL, Kretschmer D, et al. 2009. Mobile genetic element-encoded cytolysin connects virulence to methicillin resistance in MRSA. *PLoS Pathog.* 5(7):e1000533
- Rasigade JP, Moulay A, Lhoste Y, Tristan A, Bes M, et al. 2011. Impact of sub-inhibitory antibiotics on fibronectin-mediated host cell adhesion and invasion by *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* 11:263
- Rasigade J-P, Trouillet-Assant S, Ferry T, Diep BA, Sapin A, et al. 2013. PSMs of hypervirulent *Staphylococcus aureus* act as intracellular toxins that kill infected osteoblasts. *PLoS One.* 8(5):e63176

- Ruimy R, Armand-Lefevre L, Barbier F, Ruppé E, Coccojaru R, et al. 2009. Comparisons between geographically diverse samples of carried *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 191(18):5577–83
- Rybak MJ, Leonard SN, Rossi KL, Cheung CM, Sader HS, et al. 2008. Characterization of vancomycin-heteroresistant *Staphylococcus aureus* from the metropolitan area of Detroit, Michigan, over a 22-year period (1986 to 2007). *J. Clin. Microbiol.* 46(9):2950–54
- Sakoulas G, Eliopoulos GM, Fowler VG, Moellering RC, Novick RP, et al. 2005. Reduced susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin and platelet microbicidal protein correlates with defective autolysis and loss of accessory gene regulator (*agr*) function. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49(7):2687–92
- Sanchez CJ, Mende K, Beckius ML, Akers KS, Romano DR, et al. 2013. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infect. Dis.* 13:47
- Schaumburg F, Alabi AS, Köck R, Mellmann A, Kremsner PG, et al. 2012. Highly divergent *Staphylococcus aureus* isolates from African non-human primates. *Environ. Microbiol. Rep.* 4(1):141–46
- Schaumburg F, Pauly M, Anoh E, Mossoun A, Wiersma L, et al. 2015. *Staphylococcus aureus* complex from animals and humans in three remote African regions. *Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21(4):345.e1-8
- Schleifer KH, Kandler O. 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* 36(4):407–77
- Schnaith A, Kashkar H, Leggio SA, Addicks K, Krönke M, Krut O. 2007. *Staphylococcus aureus* subvert autophagy for induction of caspase-independent host cell death. *J. Biol. Chem.* 282(4):2695–2706
- Schneewind O, Mihaylova-Petkov D, Model P. 1993. Cell wall sorting signals in surface proteins of gram-positive bacteria. *EMBO J.* 12(12):4803–11
- Schröder A, Kland R, Peschel A, von Eiff C, Aepfelbacher M. 2006. Live cell imaging of phagosome maturation in *Staphylococcus aureus* infected human endothelial cells: small colony variants are able to survive in lysosomes. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)*. 195(4):185–94
- Sievert DM, Rudrik JT, Patel JB, McDonald LC, Wilkins MJ, Hageman JC. 2008. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006. *Clin. Infect. Dis.* 46(5):668–74
- Song L, Hobaugh MR, Shustak C, Cheley S, Bayley H, Gouaux JE. 1996. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science*. 274(5294):1859–66
- Switalski LM, Rydén C, Rubin K, Ljungh A, Höök M, Wadström T. 1983. Binding of fibronectin to *Staphylococcus* strains. *Infect. Immun.* 42(2):628–33
- Switalski LM, Speziale P, Höök M. 1989. Isolation and characterization of a putative collagen receptor from *Staphylococcus aureus* strain Cowan 1. *J. Biol. Chem.* 264(35):21080–86

- Thaipadungpanit J, Amornchai P, Nickerson EK, Wongsuvan G, Wuthiekanun V, et al. 2015. Clinical and molecular epidemiology of *Staphylococcus argenteus* infections in Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 53(3):1005–8
- Thakker M, Park JS, Carey V, Lee JC. 1998. *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. *Infect. Immun.* 66(11):5183–89
- Tong SYC, Lilliebridge RA, Bishop EJ, Cheng AC, Holt DC, et al. 2010. Clinical correlates of Panton-Valentine leukocidin (PVL), PVL isoforms, and clonal complex in the *Staphylococcus aureus* population of Northern Australia. *J. Infect. Dis.* 202(5):760–69
- Tong SYC, Schaumburg F, Ellington MJ, Corander J, Pichon B, et al. 2015. Novel staphylococcal species that form part of a *Staphylococcus aureus*-related complex: the non-pigmented *Staphylococcus argenteus* sp. nov. and the non-human primate-associated *Staphylococcus schweitzeri* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65(Pt 1):15–22
- Tong SYC, Sharma-Kuinkel BK, Thaden JT, Whitney AR, Yang S-J, et al. 2013. Virulence of endemic nonpigmented northern Australian *Staphylococcus aureus* clone (clonal complex 75, *S. argenteus*) is not augmented by staphyloxanthin. *J. Infect. Dis.* 208(3):520–27
- Tuchscher L, Heitmann V, Hussain M, Viemann D, Roth J, et al. 2010. *Staphylococcus aureus* small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. *J. Infect. Dis.* 202(7):1031–40
- Tuchscher L, Kreis CA, Hoerr V, Flint L, Hachmeister M, et al. 2016. *Staphylococcus aureus* develops increased resistance to antibiotics by forming dynamic small colony variants during chronic osteomyelitis. *J. Antimicrob. Chemother.* 71(2):438–48
- Tuchscher L, Medina E, Hussain M, Völker W, Heitmann V, et al. 2011. *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Mol. Med.* 3(3):129–41
- Tucker KA, Reilly SS, Leslie CS, Hudson MC. 2000. Intracellular *Staphylococcus aureus* induces apoptosis in mouse osteoblasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 186(2):151–56
- Tzamalīs A, Chalvatzis N, Anastasopoulos E, Tzetzis D, Dimitrakos S. 2013. Acute postoperative *Staphylococcus schleiferi* endophthalmitis following uncomplicated cataract surgery: first report in the literature. *Eur. J. Ophthalmol.* 23(3):427–30
- Ubukata K, Nonoguchi R, Matsuhashi M, Konno M. 1989. Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the *mecA* gene, which encodes a methicillin-resistant *S. aureus*-specific penicillin-binding protein. *J. Bacteriol.* 171(5):2882–85
- Uçkay I, Pittet D, Vaudaux P, Sax H, Lew D, Waldvogel F. 2009. Foreign body infections due to *Staphylococcus epidermidis*. *Ann. Med.* 41(2):109–19
- Valour F, Rasigade J-P, Trouillet-Assant S, Gagnaire J, Bouaziz A, et al. 2015a. Delta-toxin production deficiency in *Staphylococcus aureus*: a diagnostic marker of bone and joint infection chronicity linked with osteoblast invasion and biofilm formation. *Clin. Microbiol. Infect.* 21(6):568.e1-11

- Valour F, Trouillet-Assant S, Rasigade J-P, Lustig S, Chanard E, et al. 2013. *Staphylococcus epidermidis* in orthopedic device infections: the role of bacterial internalization in human osteoblasts and biofilm formation. *PLoS One*. 8(6):e67240
- Valour F, Trouillet-Assant S, Riffard N, Tasse J, Flammier S, et al. 2015b. Antimicrobial Activity against Intraosteoblastic *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59(4):2029–36
- van Heijenoort J. 2001. Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. *Nat. Prod. Rep.* 18(5):503–19
- von Eiff C, Peters G, Becker K. 2006. The small colony variant (SCV) concept -- the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. *Injury*. 37 Suppl 2:S26-33
- Walsh C. 2000. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*. 406(6797):775–81
- Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, et al. 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect. Dis.* 5(12):751–62
- Widaa A, Claro T, Foster TJ, O'Brien FJ, Kerrigan SW. 2012. Staphylococcus aureus protein A plays a critical role in mediating bone destruction and bone loss in osteomyelitis. *PLoS One*. 7(7):e40586
- Wieland BW, Marcantoni JR, Bommarito KM, Warren DK, Marshall J. 2012. A retrospective comparison of ceftriaxone versus oxacillin for osteoarticular infections due to methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* 54(5):585–90
- Williams RJ, Henderson B, Sharp LJ, Nair SP. 2002. Identification of a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* 70(12):6805–10
- Wright JA, Nair SP. 2010. Interaction of staphylococci with bone. *Int. J. Med. Microbiol.* 300(2–3):193–204
- Zhang D-F, Xu X, Song Q, Bai Y, Zhang Y, et al. 2016. Identification of *Staphylococcus argenteus* in Eastern China based on a nonribosomal peptide synthetase (NRPS) gene. *Future Microbiol.* 11:1113–21
- Zhang Z, Wang X, Luo F, Yang H, Hou T, et al. 2014. Effects of rifampicin on osteogenic differentiation and proliferation of human mesenchymal stem cells in the bone marrow. *Genet. Mol. Res. GMR.* 13(3):6398–6410
- Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. 2004. Prosthetic-joint infections. *N. Engl. J. Med.* 351(16):1645–54



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Microbiology and Infection

journal homepage: www.clinicalmicrobiologyandinfection.com

Original article

Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates are attenuated for virulence when compared with susceptible progenitorsD.R. Cameron^{1,8}, Y.-H. Lin^{2,8}, S. Trouillet-Assant³, V. Tafani³, X. Kostoulas¹, E. Mouhtouris⁴, N. Skinner⁵, K. Visvanathan⁵, S.L. Baines², B. Howden², I.R. Monk², F. Laurent³, T.P. Stinear², B.P. Howden^{2,6,*}, A.Y. Peleg^{1,7,*}¹ Infection and Immunity Program, Monash Biomedicine Discovery Institute and Department of Microbiology, Monash University, Australia² Department of Microbiology and Immunology, The University of Melbourne at the Doherty Institute of Infection & Immunity, Australia³ Department of Microbiology, French National Reference Centre for Staphylococci, Hospices Civils de Lyon, International Centre of Infectology Research, France⁴ Department of Surgery, The University of Melbourne, Australia⁵ Department of Medicine, The University of Melbourne, Australia⁶ Infectious Diseases and Microbiology Departments, Austin Health, Australia⁷ Department of Infectious Diseases, The Alfred Hospital and Central Clinical School, Monash University, Australia

ARTICLE INFO

Article history:
Received 26 October 2016
Received in revised form
29 March 2017
Accepted 30 March 2017
Available online 7 April 2017

Editor: P. Tassios

Keywords:

Accessory gene regulator
agr
 α toxin
Persistence
Staphylococcus aureus
Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*
Virulence

ABSTRACT

Objectives: Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) is associated with genetic changes that may also impact upon pathogenicity. In the current study, we compared the virulence of clinical VISA strains with their isogenic vancomycin-susceptible progenitors (VSSA).

Methods: Production of the critical virulence protein, α toxin, was assessed using Western blot analysis and was correlated to *agr* activity using a bioluminescent *agr*-reporter. Cytotoxicity and intracellular persistence were compared *ex vivo* for VSSA and VISA within non-professional phagocytes (NPP). Virulence and host immune responses were further explored *in vivo* using a murine model of bacteraemia.

Results: VISA isolates produced up to 20-fold less α toxin compared with VSSA, and this was corroborated by either loss of *agr* activity due to *agr* mutation, or altered *agr* activity in the absence of mutation. VISA were less cytotoxic towards NPP and were associated with enhanced intracellular persistence, suggesting that NPP may act as a reservoir for VISA. Infection with VSSA strains produced higher mortality in a murine bacteraemia model ($\geq 90\%$ 7-day mortality) compared with infection with VISA isolates (20% to 50%, $p < 0.001$). Mice infected with VISA produced a dampened immune response (4.6-fold reduction in interleukin-6, $p < 0.001$) and persistent organ bacterial growth was observed for VISA strains out to 7 days.

Conclusions: These findings highlight the remarkable adaptability of *S. aureus*, whereby, in addition to having reduced antibiotic susceptibility, VISA alter the expression of pathogenic factors to circumvent the host immune response to favour persistent infection over acute virulence. **D.R. Cameron, Clin Microbiol Infect 2017;23:767**

© 2017 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Staphylococcus aureus is a major opportunistic human pathogen that causes a wide spectrum of disease, ranging from mild skin infections to life-threatening diseases such as endocarditis and bacterial sepsis. The clinical significance of *S. aureus* infection is compounded by its propensity to develop antibiotic resistance. Since the emergence of methicillin-resistant *S. aureus*, vancomycin

* Corresponding authors: B. Howden, Microbiological Diagnostic Unit Public Health Laboratory, Department of Microbiology and Immunology, University of Melbourne, Victoria, 3010, Australia and A.Y. Peleg, Department of Infectious Diseases, The Alfred Hospital and Central Clinical School, Monash University, Melbourne VIC 3004, Australia.

E-mail addresses: bhowden@unimelb.edu.au (B.P. Howden), an@n.peleg@monash.edu (A.Y. Peleg).

⁸ D.R. Cameron and Ya-Hsun Lin are joint first authors of this article.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2017.03.027>

1198-743X/© 2017 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

has been relied upon as the mainstay treatment for serious *S. aureus* infections. The *in vivo* development of strains with reduced vancomycin susceptibility, termed vancomycin-intermediate *S. aureus* (VISA) has led to treatment failures and prolonged hospitalization [1]. Despite the association with persistent bacteraemia, VISA strains are not typically associated with acute clinical instability or lethal sepsis, suggesting that reduced vancomycin susceptibility may impact upon *S. aureus* pathogenicity [2].

VISA commonly develops from vancomycin-sensitive *S. aureus* (VSSA) via cumulative mutations in diverse regulatory loci including two-component regulatory systems [3,4]. These mutations contribute to the altered cellular architecture associated with VISA, including thickened peptidoglycan, increased capsule and reduced protein A, each of which probably culminates in an altered host innate immune response [5].

The accessory gene regulator (*agr*) is an important virulence regulator in *S. aureus*. RNAIII is the effector of the system, known to up-regulate the expression of toxins, as well as down-regulate genes encoding cell surface-associated proteins [6]. The *agrCA* mutation is commonly reported for VISA and *agr* dysfunction in the absence of mutation has also been described, although the molecular mechanism for this down-regulation remains to be elucidated [7].

In the present study, we have examined the consequences of reduced vancomycin susceptibility in *S. aureus*. To date, studies addressing the virulence of VISA have used the invertebrate *Galleria mellonella* model [8,9] or have relied on laboratory-generated VISA strains [10]. Here, we found that clinically derived VISA isolates were less virulent than their VSSA progenitors using a murine bacteraemia model, and had the ability to persist *in vivo*. These data provide insights that help to explain the clinical relationship between VISA and treatment failure (persistent infection) with no increase in mortality [11,12].

Materials and methods

For more detailed methods, see [Supplementary material \(Text S1\)](#).

Strains and growth conditions

Staphylococcus aureus strains used in this study are listed in the [Supplementary material \(Table S1\)](#). The strains were isolated from patients with persistent bloodstream infections during prolonged antibiotic therapy [5,13–15]. Strains of *S. aureus* were subcultured onto brain–heart infusion agar (Oxoid, Basingstoke, UK) or in heart infusion broth (Oxoid) and were grown at 37°C. When required, chloramphenicol was added to a final concentration of 10 mg/L.

α toxin Western immunoblotting and *agr* induction assays

α toxin (Hla) Western immunoblotting was performed in biological triplicate using a polyclonal rabbit anti-Hla antibody (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) as described previously [16]. Blots were quantified using a GS800 Calibrated Densitometer (BioRad, Hercules, CA, USA) and *lmwcz* J. The *S. aureus* isolates harbouring a plasmid reporter (pSB2035) containing an *agr*-P3 promoter fused to a bacterial luciferase operon (*luxABCDE*) [17] were first assessed on brain–heart infusion agar (chloramphenicol 10 mg/L) after overnight incubation. Bioluminescence was captured using an *in vivo* imaging system (IVIS100; Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) with 2-minute exposure. To assess *agr* activity throughout the growth cycle, cells were grown to an optical density at 600 nm of 0.2, washed and resuspended in heart infusion broth, then 180- μ L aliquots were placed into 96-well flat-bottomed plates

in triplicate. Cell density and bioluminescence were determined at 11.6-minute intervals for 10 hours using FLUOstar OMEGA microplate readers at 37°C (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). To examine the impact of exogenous *agr* inducers on bacterial strains, filter-sterilized supernatants containing autoinducing peptides (AIP) were prepared as described previously and were added at a final concentration of 10% (volume/volume) [18].

Infection of osteoblasts

Human osteoblast-like cells (MG-63) were infected at MOIs of 100:1 (unless otherwise specified) for 2 h at 37°C and adhesion and internalization of bacteria were quantified as described previously using a lysostaphin protection assay [19]. To evaluate cytotoxicity, lactate dehydrogenase released from damaged cells was quantified using a Dimension Vista automated clinical chemistry analyser (Siemens Healthcare Diagnostics, Erlangen, Germany). Interleukin-6 (IL-6) was quantified in cell culture supernatants at 72 h post infection (hpi) by ELISA (eBioscience, San Diego, CA) following the manufacturer's instructions.

Murine virulence model

Female, 6-week-old BALB/c mice were injected intravenously with 1×10^8 CFU of *S. aureus* as described previously [15]. At 15 hpi, five mice were euthanized, and bacterial densities within the liver were quantified [20]. Remaining animals ($n = 10$) were monitored for illness at least three times daily. Those showing signs of illness were euthanized via CO₂ inhalation. After 7 days, surviving animals were euthanized and bacterial densities within the kidney were determined ($n = 3$). All murine experiments were performed in accordance with the Animal Research Platform Ethics Committees at Monash University and the University of Melbourne, Australia. Blood was collected from infected mice ($n = 9$) 8 hpi and serum was collected by centrifugation. Interleukin-6, IL-10, monocyte chemoattractant protein-1, interferon- γ , tumour necrosis factor and IL-12p70 levels were compared using a Cytometric Bead Array Mouse Inflammation kit (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) as per the manufacturer's specifications.

Statistical analysis

Two-way analysis of variance, Holm–Sidak multiple comparison tests, unpaired *t*-tests with Welch's correction, Kaplan–Meier curves and log-rank tests were performed using [GRAPHPAD PRISM v 6.0](#) (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Differences between VSSA and VISA strains were considered significant when $p \leq 0.05$.

Results

Hla production is reduced in VISA compared with VSSA

Hla is an exotoxin that plays an important role in *S. aureus* pathogenesis [16,21]. We examined the production of Hla in ten VSSA/VISA clinical pairs by Western immunoblotting ([Fig 1a](#), see [Supplementary material, Fig. S1 and Table S1](#)). Overall, Hla levels were significantly lower in VISA strains compared with VSSA ($p < 0.001$, two-way analysis of variance). However, the magnitude of the difference was not consistent across each clinical pair ($p < 0.001$ for interaction). When Hla production was compared between individual pairs using the Holm–Sidak multiple comparisons test, significant reductions were observed for five VISA isolates (JKD6008, JKD6023, A5940, A6226, A8094; $p < 0.05$ for each). Interestingly, only A5940 and A8094 are known to contain an *agr*

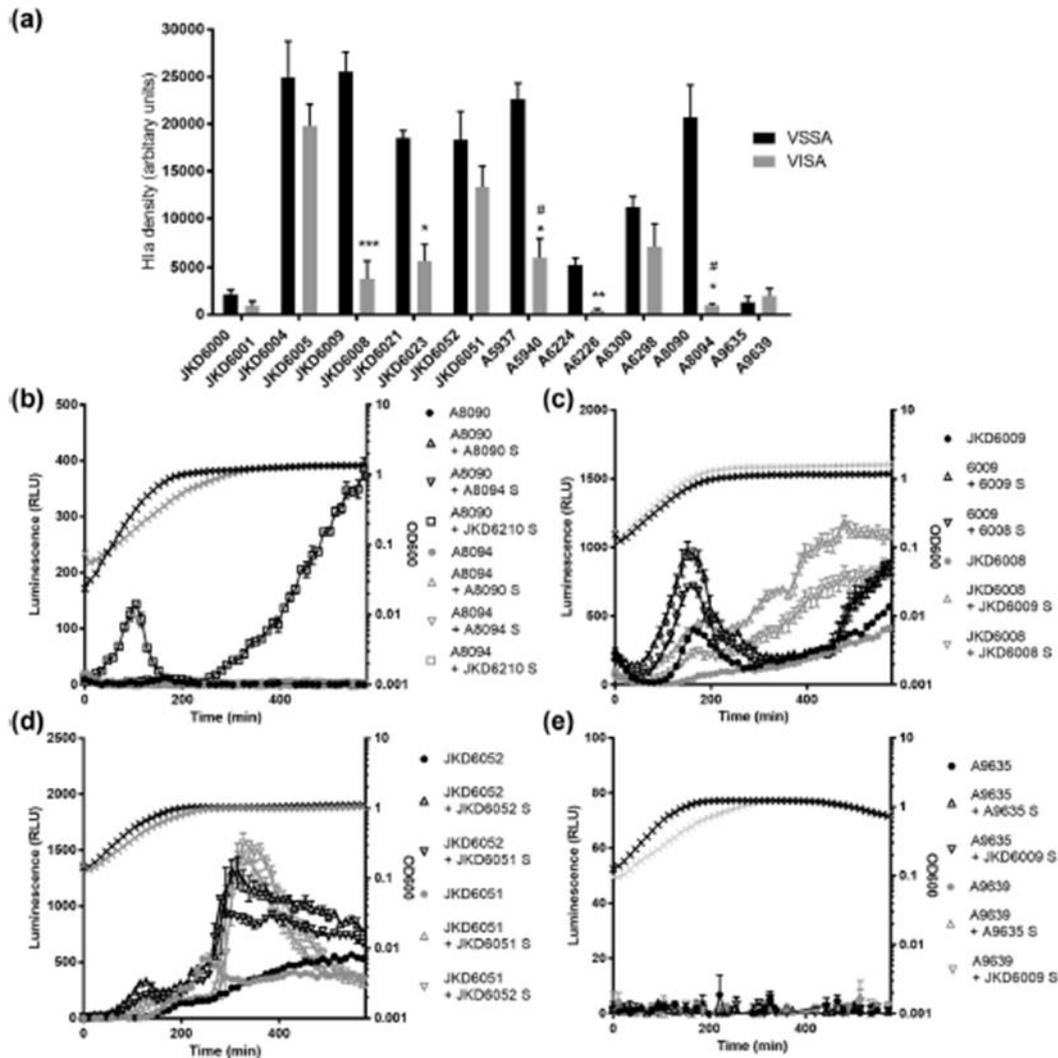


Fig. 1. Production of α toxin (Hla) and temporal expression of *agr*-P3 in clinical pairs of vancomycin-susceptible (VSSA) and vancomycin-intermediate (VISA) *Staphylococcus aureus*. Hla production was measured by quantitative Western blot. VSSA isolates are represented by black bars, VISA isolates are represented by grey bars. VISA strains that harbour an *agr* mutation are marked with # [14]. Data shown are mean band intensities (arbitrary units) and bars represent SEM from at least three biological replicates. Statistical significance was determined by two-way analysis of variance with multiple comparisons using the Holm–Sidak method. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (a) *agr*-P3 activity (bioluminescence, relative light units (RLU)) and growth rate (optical density at 600 nm (OD_{600})) in heart infusion broth grown at 37°C were measured every 11.6 min for 10 h for A8090/A8094 (b), JKD6009/JKD6008 (c), JKD6052/JKD6051 (d) and A9635/A9639 (e). Data represented in black and grey correspond to VSSA and VISA, respectively. Bacterial growth is represented by crosses (x). Closed circles represent native P3 induction of each strain. Open symbols represent strains supplemented with culture supernatant (10% volume/volume) containing exogenous autoinducing peptides from the specified *S. aureus* strain (S). Error bars represent SEM for readings taken from three biological replicates.

mutation [14,15]. For two strain pairs (JKD6000/JKD6001 and A9635/A9639), Hla production was low for both the VSSA and VISA strains (Fig. 1a).

agr expression in paired VSSA and VISA

Given that *hla* is a target of *agr*; we next investigated if the decrease in Hla production in VISA isolates was linked to *agr* dysfunction [6]. We chose a clinical strain pair that contained an

agr mutation (A8090/A8094), a pair that had decreased Hla in the absence of a mutation (JKD6009/JKD6008), a pair that showed no decrease in Hla (JKD6052/JKD6051) and a pair that produced low levels of Hla (A9635/A9639). To monitor *agr* activity, we used a previously described plasmid (pSB2030) containing the RNAlII promoter (*agr*-P3) fused to a bacterial luciferase reporter [17]. We first compared the *agr* activity of A8090 (VSSA) to its VISA derivative A8094, which has a frameshift mutation in *agrC* (see Supplementary material, Table S1). As expected, bioluminescence

on agar plates, which was indicative of *agr* expression, was high for A8090 and low for A8094 (see Supplementary material, Fig. S2a) and this correlated with their respective Hla production profiles (see Supplementary material, Fig. 1a). Surprisingly, despite high bioluminescence for A8090 on agar, in broth culture the expression of *agr* was low throughout the growth cycle (Fig. 1b). To determine if *agr* could be induced by exogenous AIP, we added filter-sterilized supernatants from A8090, A8094, as well as JKD6210, which is a strong AIP producer from the same *agr* group. For A8090, *agr* induction was not detected using supernatants from A8090 or A8094; however, exogenous AIP from JKD6210 increased *agr* expression during the exponential phase (Fig. 1b). Exogenous AIP had no impact on VISA strain A8094 (Fig. 1b) [14].

Despite the absence of an *agr* mutation in VISA strain JKD6008, Hla production was reduced compared with its parental VSSA strain JKD6009 (Fig. 1c). As a corollary, using our *agr* reporter, we found that bioluminescence was lower for JKD6008 compared with JKD6009 when grown on solid media (see Supplementary material, Fig. S2b). Although the *agr* system was functional in JKD6008, *agr* activation was delayed (Fig. 1c). Each strain was responsive to exogenous AIP induction; however, JKD6008 supernatants produced a reduced response when compared with JKD6009 (Fig. 1c). Hla production correlated with *agr* expression for the final VSSA/VISA pairs (JKD6052/JKD6051 and A9635/A9639). JKD6052 and JKD6051 each had functional *agr* systems and produced similar bioluminescence on agar (Fig. S2c) and throughout the growth cycle (Fig. 1d), which was corroborated by similar Hla production (Fig. 1a). In contrast, both A9635 and A9639 were weak Hla producers, and this correlated with undetectable *agr* activities using our reporter system (Fig. 1e, and see Supplementary material, Fig. S2d). In addition, neither strain was responsive to the addition of exogenous AIP (Fig. 1e).

VISA strains are less invasive and cytotoxic toward human osteoblasts, but show enhanced intracellular survival when compared with VSSA

VISA clinical isolates are often associated with complex and persistent infections. Internalization of bacteria within host cells, which can act as a sanctuary site, is thought to be a key mechanism to explain persistent infection. As such, we used an osteoblast-like

MG-63 cell line model of non-professional phagocytes to compare the adherence, internalization and cytotoxicity of select VISA pairs *in vitro*. We chose two clinical pairs isolated from patients with complicated bacteraemia and osteomyelitis (A5935/A5940, A9635/A9639) [8,15]. Each VISA isolate had reduced capacity to adhere to and invade osteoblasts when compared with their susceptible progenitors (Fig. 2a,b). In addition, each VISA strain was less cytotoxic compared with VSSA as determined by reduced lactate dehydrogenase released by damaged osteoblasts (Fig. 2c). To ensure that the observed reduction in cytotoxicity was not due to impaired internalization, we standardized the initial number of internalized bacteria for VSSA- and VISA-infected cells. After standardization, a significant reduction in cytotoxicity for each VISA strain remained (Fig. 2c). VISA clinical isolates also elicited a subdued osteoblast inflammatory response, with significantly lower IL-6 levels compared with infection with matched VSSA clinical strains (Fig. 2d).

Each of the VISA isolates included in this study was associated with persistent bacteraemia (up to 85 days), a common clinical characteristic of VISA infection [5,14]. To determine if VISA isolates caused more persistent infection within osteoblasts compared with VSSA, we performed lysostaphin-protection assays to select for internalized bacteria. Despite a reduced capacity to adhere to and invade osteoblasts and reduced cytotoxicity, each VISA strain had an enhanced capacity to survive intracellularly (Fig. 3).

Clinical VISA isolates are attenuated for virulence in a murine bacteraemia model and show persistent infection *in vivo*

To corroborate our *in vitro* findings in an *in vivo* system, we next assessed the pathogenic consequences of VISA formation using a murine bacteraemia model. We selected the same four clinical strains that were assessed using our *agr* reporter experiments. In each case, the VISA strain was severely attenuated for virulence compared with its paired susceptible strain (Fig. 4a, $p < 0.001$ for each). To determine if this difference was attributable to *in vivo* fitness, we compared organ bacterial densities within the liver at 15 hpi. This time point was chosen, as it was the time when mice infected with VSSA began to succumb to infection. The number of viable bacteria recovered from the liver was similar for all strains, suggesting that virulence attenuation associated with VISA was not due to impaired *in vivo* fitness (Fig. 4b).

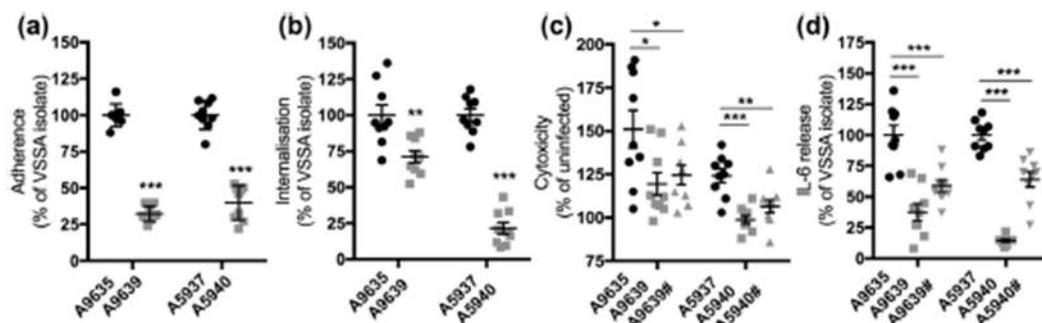


Fig. 2. Intracellular passage and cytotoxicity of vancomycin-susceptible (VSSA) and vancomycin-intermediate (VISA) *Staphylococcus aureus* isolates within infected osteoblasts. Two independent vancomycin-exposed clinical pairs (A9635/A9639 and A5937/A5940) were used to inoculate MG-63 osteoblast cells at MOI of 100:1 unless otherwise stated. Osteoblasts inoculated with VSSA are represented by black circles and those infected with VISA are represented by grey squares for each panel. Error bars represent SEM and significance was determined using unpaired *t* tests with Welch's correction, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Adherence was assessed at 2 h post infection (a). Following lysostaphin treatment, viable intracellular bacteria were quantified 3 h after inoculation (b). Relative cytotoxicity was determined by quantifying lactate dehydrogenase released by damaged MG-63 cells 72 h post infection (c). Interleukin-6 (IL-6) release was determined using ELISA at 72 h post infection (d). To control for initial internalized bacteria, the MOI for A9639 and A5940 were increased to 250:1 and 50:1, respectively. This experimental condition is indicated by # and grey triangles (c and d).

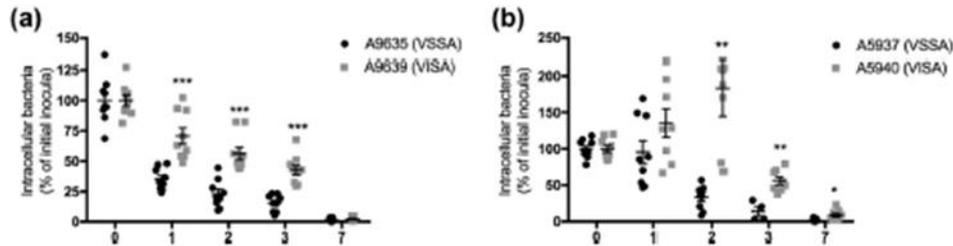


Fig. 3. Vancomycin-susceptible (VSSA) and vancomycin-intermediate (VISA) *Staphylococcus aureus* intracellular persistence within infected osteoblasts. MG-63 osteoblast cells were inoculated with vancomycin-exposed pairs A9635/A9639 (a) and A5937/A5940 (b) and viable bacterial cells were quantified following lysostaphin treatment 1, 2, 3 and 7 days post inoculation to compare intracellular persistence capacities. Osteoblasts inoculated with VSSA are represented in black and those infected with VISA are represented in grey. Error bars represent SEM and significance was determined using unpaired *t* tests with Welch's correction, $n = 9$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

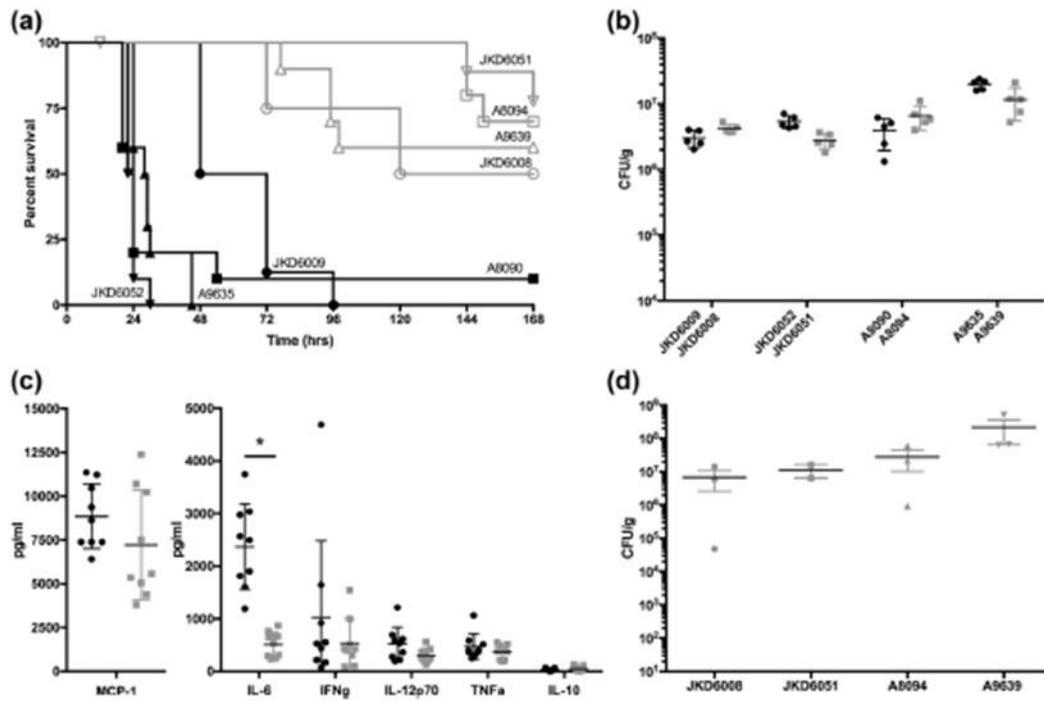


Fig. 4. Pathogenic consequences of vancomycin-susceptible *Staphylococcus aureus* (VSSA) versus vancomycin-intermediate *S. aureus* (VISA) infections in a murine bacteraemia model. (a) Kaplan–Meier curves showing survival of mice infected with vancomycin-exposed clinical pairs ($n = 10$). In all cases, infection with the VSSA parent strains (black lines) produced significantly greater mortality compared with the paired vancomycin-exposed VISA isolates (grey lines; $p < 0.01$ for each, Log-rank test). (b) Colonization of the liver, 15 h post infection for mice infected with VSSA (black bars) and VISA (grey bars) strains ($n = 5$). (c) Cytokine stimulation profiles for mice infected with VSSA (black bars) and VISA (grey bars) 8 h post infection. Stimulation of interleukin-6 (IL-6) was reduced in animals infected with VISA ($p < 0.001$, Holm–Sidak multiple comparison test). (d) Colonization of the kidney, 7 days post infection for mice infected with VISA (grey bars) ($n = 3$).

We have demonstrated that in comparison to VSSA, VISA induces an attenuated pro-inflammatory response in osteoblasts (Fig. 2d). To confirm these data *in vivo*, we determined cytokine stimulation profiles in blood collected from VSSA- and VISA-infected mice 8 hpi (Fig. 4c). When individual cytokines were compared, IL-6 levels were significantly lower in the sera of mice infected with VISA ($p < 0.001$, Holm–Sidak test). To assess for prolonged bacterial survival *in vivo*, we determined the bacterial burden of the kidneys 7 days post infection. In each case, surviving mice infected with VISA showed high bacterial loads (Fig. 4d).

Discussion

The evolution of vancomycin-intermediate *S. aureus* is linked to diverse cellular changes, which appear to provide a selective advantage for the pathogen in the face of antibiotic therapy and the host immune response. In addition to vancomycin therapeutic failure, VISA is associated with prolonged bacteraemia and this relationship is poorly understood [1]. In the current study, we have shown using infected non-professional phagocytes and a murine model of septicaemia that VISA strains are consistently less virulent

compared with their susceptible, antibiotic naive progenitors, and that VISA are well equipped to cause persistent infection *in vivo*, mimicking what is observed clinically.

To understand the molecular mechanisms that contribute to virulence attenuation for these strains, we focused on *agr*. Multiple reports have highlighted *agrCA* loss-of-function mutations in diverse VISA isolates [7,14]. In support of this, the *agr* system of VISA strain A8094 was non-functional due to an *AgrC* truncation and this correlated with low Hla production and virulence attenuation *in vivo*. Intriguingly, recent reports have also described *agr* dysfunction for VISA in the absence of *agrCA* mutation [22]. In the current study, we have shown that VISA strain JKD6008, which does not harbour a mutation in the *agr* locus, produced less Hla when compared with its VSSA progenitor JKD6009, suggesting impaired *agr* function. Reduced Hla production appeared to occur as a result of delayed *agr* activation, which has been shown previously to impact on *agr*-regulated Hla translation [23]. We initially proposed that delayed *agr* activation was the result of alterations in the VISA cell wall. In contrast, the *agr* expression profiles were similar for JKD6052 (VSSA) and JKD6051 (VISA), despite reduced *in vivo* virulence for the latter. This suggests that virulence attenuation for VISA is strain and mutation specific and involves pathways in addition to *agr*.

The VSSA strain A9635, which had a non-functional *agr* locus (Fig. 1e) was equally virulent when compared with *agr*-positive isolates including JKD6052 and JKD6009. These data indicate that *agr* expression is not essential for virulence and *in vivo* fitness in this murine bacteraemia model. Despite *agr* dysfunction and low Hla production for both isolates, A9635 was highly attenuated for virulence when compared with A9639, further suggesting that other virulence regulators are involved. Collectively, our data indicate that *agr* expression is not a consistent predictor of pathogenicity in a murine bacteraemia model, particularly in the context of VISA.

We observed an attenuated pro-inflammatory response for osteoblasts infected with VISA and this correlated with an altered host immune response in mice through a decrease in IL-6. Interleukin-6 is a pro-inflammatory cytokine that is important for both innate and adaptive immunity and is induced by surface protein A [24]. In contrast, capsule has been shown to suppress IL-6 in bacterial pathogens [25]. As such, decreased protein A and enhanced capsule associated with VISA [26] may act synergistically to dampen the IL-6 response. In addition, capsule overproducing strains of *S. aureus* have been associated with impaired bacterial clearance in a murine model [27], and it is plausible that enhanced capsule with an associated dampened host immune response contributes to the persistent infection observed for VISA in this study. We also showed that once internalized by osteoblasts, VISA are well-adapted to the intracellular compartment, suggesting that non-professional phagocytes may act as a bacterial reservoir that could contribute to the chronicity of VISA infection.

This study has important limitations. First, although we observed a clear association between VISA and reduced pathogenicity, we have not addressed the precise contribution of individual genetic mutations. Like the genetic mechanisms underlying reduced vancomycin susceptibility, it is apparent that virulence attenuation is multifactorial and involves diverse pathways in addition to *agr*. Second, given the relative virulence of VSSA in our acute infection model, animals succumbed to disease rapidly and bacterial burden could not be assessed over time. Future experiments should assess the persistence of VSSA using chronic infection models such as those mimicking osteomyelitis [28].

In summary, we have described the pathogenic consequence of VISA formation. It is apparent that *S. aureus* alters the expression of virulence factors in the face of vancomycin treatment, which

impacts host immune responses and promotes persistent infection over virulence.

Acknowledgements

This work was supported by the National Health and Medical Research Council, Australia (GNT1008973), and fellowships to BPH (GNT1105905), TPS (GNT1008549) and AYP (GNT1047916). DRC was supported by an Australian Postgraduate Award and a Monash University Postgraduate Publication Award.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2017.03.027>.

Transparency declaration

No author has any conflict of interest related to the manuscript. This work was presented in part at the International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections (ISSI), Lyon, France, August 2012.

References

- [1] Charles PC, Ward PB, Johnson PD, Howden RP, Grayson ML. Clinical features associated with bacteraemia due to heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2004;38:448–51.
- [2] Soriano A, Marco F, Martinez JA, Pisos E, Almela M, Dimova VP, et al. Influence of vancomycin minimum inhibitory concentration on the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Clin Infect Dis* 2008;46:193–200.
- [3] Neoh HM, Cui L, Yuzawa H, Takeuchi F, Matsuo M, Hinamoto K. Mutated response regulator *graR* is responsible for phenotypic conversion of *Staphylococcus aureus* from heterogeneous vancomycin-intermediate resistance to vancomycin-intermediate resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:45–53.
- [4] Howden RP, Stinear TP, Allen DL, Johnson PD, Ward PB, Davies JK. Genomic analysis reveals a point mutation in the two-component sensor gene *graS* that leads to intermediate vancomycin resistance in clinical *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:3755–62.
- [5] Howden RP, Johnson PD, Ward PB, Stinear TP, Davies JK. Isolates with low-level vancomycin resistance associated with persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:3039–47.
- [6] Novick RP, Ross HF, Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B, Moghazeh S. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J* 1993;12:3967–75.
- [7] Sakoulas G, Eliopoulos GM, Moellering Jr RC, Wennersten C, Venkataraman L, Novick RP, et al. Accessory gene regulator (*agr*) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1492–502.
- [8] Peleg AY, Monga D, Pillai S, Mylonakis E, Moellering Jr RC, Eliopoulos GM. Reduced susceptibility to vancomycin influences pathogenicity in *Staphylococcus aureus* infection. *J Infect Dis* 2009;199:532–6.
- [9] Howden RP, McEvoy CR, Allen DL, Chua K, Gao W, Harrison PF, et al. Evolution of multidrug resistance during *Staphylococcus aureus* infection involves mutation of the essential two component regulator *WalkR*. *PLoS Pathog* 2011;7:e1002359.
- [10] Majcherzyk PA, Barblan JJ, Moreillon P, Entenza JM. Development of glycopeptide-intermediate resistance by *Staphylococcus aureus* leads to attenuated infectivity in a rat model of endocarditis. *Microb Pathog* 2008;45:408–14.
- [11] van Hal SJ, Paterson DL. Systematic review and meta-analysis of the significance of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:405–10.
- [12] Cameron DR, Howden RP, Peleg AY. The interface between antibiotic resistance and virulence in *Staphylococcus aureus* and its impact upon clinical outcomes. *Clin Infect Dis* 2011;53:576–82.
- [13] Sieradzki K, Leski T, Dick J, Borio L, Tomasz A. Evolution of a vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strain *in vivo*: multiple changes in the antibiotic resistance phenotypes of a single lineage of methicillin-resistant *S. aureus* under the impact of antibiotics administered for chemotherapy. *J Clin Microbiol* 2003;41:1687–93.
- [14] Mwangi MM, Wu SW, Zhou Y, Sieradzki K, de Lencastre H, Richardson P, et al. Tracking the *in vivo* evolution of multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* by whole-genome sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:9451–6.

- [15] Cameron DR, Ward DV, Kostoulas X, Howden BP, Moellering Jr RC, Eliopoulos GM, et al. Serine/threonine phosphatase *stp1* contributes to reduced susceptibility to vancomycin and virulence in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 2012;205:1677–87.
- [16] Chua KY, Monk IR, Lin YH, Seeman T, Tuck KL, Porter JL, et al. Hyperexpression of α -hemolysin explains enhanced virulence of sequence type 93 community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol* 2014;14:31.
- [17] Qazi SN, Counil E, Morrissey J, Rees CE, Cockayne A, Wintzer K, et al. *agr* expression precedes escape of internalized *Staphylococcus aureus* from the host endosome. *Infect Immun* 2001;69:7074–82.
- [18] Ji G, Beavis RC, Novick RP. Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:12055–9.
- [19] Trouillet S, Rasigade JP, Lhoste Y, Ferry T, Vandenesch F, Etienne J, et al. A novel flow cytometry-based assay for the quantification of *Staphylococcus aureus* adhesion to and invasion of eukaryotic cells. *J Microbiol Methods* 2011;86:145–9.
- [20] Gao W, Cameron DR, Davies JK, Kostoulas X, Steppell J, Tuck KL, et al. The RpoB H481Y rifampicin resistance mutation and an active stringent response reduce virulence and increase resistance to innate immune responses in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 2013;207:929–39.
- [21] Bubeck-Wastenburg J, Bae T, Otto M, Deleo FR, Schneewind O. Poring over pores: α -hemolysin and Panton–Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Nat Med* 2007;13:1405–6.
- [22] Park C, Shin NY, Byun JH, Shin HH, Kwon EY, Choi SM, et al. Downregulation of RNAII in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strains regardless of the presence of *agr* mutation. *J Med Microbiol* 2012;61:345–52.
- [23] Traber K, Novick R. A slipped-mispairing mutation in *agrA* of laboratory strains and clinical isolates results in delayed activation of *agr* and failure to translate delta- and α -haemolysins. *Mol Microbiol* 2006;59:1519–30.
- [24] Claro T, Widda A, McDonnell C, Foster TJ, O'Brien BJ, Kerrigan SW. *Staphylococcus aureus* protein A binding to osteoblast tumour necrosis factor receptor 1 results in activation of nuclear factor κ B and release of interleukin-6 in bone infection. *Microbiology* 2013;159:147–54.
- [25] Kung E, Coward WR, Neill DR, Malak HA, Muhlemann K, Kadioglu A, et al. The pneumococcal polysaccharide capsule and pneumolysin differentially affect CXCL8 and IL-6 release from cells of the upper and lower respiratory tract. *PLoS One* 2014;9:e92355.
- [26] Howden BP, Smith DJ, Mansell A, Johnson PD, Ward PB, Steiner TP, et al. Different bacterial gene expression patterns and attenuated host immune responses are associated with the evolution of low-level vancomycin resistance during persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *BMC Microbiol* 2008;8:39.
- [27] Liang TT, Lee CY. Overproduction of type 8 capsular polysaccharide augments *Staphylococcus aureus* virulence. *Infect Immun* 2002;70:3389–95.
- [28] Horst SA, Hoerr V, Beineke A, Kreis C, Tuchscherer I, Kalinka J, et al. A novel mouse model of *Staphylococcus aureus* chronic osteomyelitis that closely mimics the human infection: an integrated view of disease pathogenesis. *Am J Pathol* 2012;181:1206–14.

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Dyon-Tafari Virginie

Infections chroniques à staphylocoques: mécanismes de persistance intracellulaire et nouvelles approches thérapeutiques

4 Décembre 2018

RESUME

Staphylococcus aureus, pathogène opportuniste responsable d'un large panel d'infections a motivé l'utilisation intensive d'antibiotique ces dernières décennies, favorisant l'émergence de *S. aureus* résistants notamment à la vancomycine, appelées VISA (Vancomycin Intermediate *S. aureus*). Des études ont mis en évidence un lien entre baisse de virulence et de sensibilité à la vancomycine en associant cette infection au passage à la chronicité. Dans ce contexte, le premier objectif de notre étude a été d'étudier le mécanisme de persistance des souches VISA dans les CPNP (Cellules Phagocytaires Non Professionnelles) *in vitro* dans un modèle de culture cellulaire. Cette première étude a été réalisée sur 2 couples de souches cliniques composés d'une souche VSSA (Vancomycin Susceptible *Staphylococcus aureus*), d'une souche VISA ainsi qu'une souche inactivée pour le gène *stp1* suspecté pour son rôle dans la diminution de la sensibilité à la vancomycine. Les résultats obtenus montraient une homogénéité de phénotypes présentés par les 2 couples de souches, démontrant que les souches VISA étaient moins cytotoxiques, induisaient une réponse inflammatoire amoindrie et persistaient en plus grand nombre jusqu'à 14 jours post-infection dans les ostéoblastes. La souche délétée pour *stp1* a montré quant à elle peu de différences phénotypiques par rapport à la souche parentale VSSA. Nos résultats suggèrent que cette baisse de virulence observée avec les souches VISA serait associée à une plus grande capacité de persistance intracellulaire et à un moindre pouvoir cytotoxique. Ces résultats ont aussi montré l'importance de développer de nouvelles molécules anti staphylococciques à visée intracellulaire.

Dans cette optique, dans un second temps, nous avons réalisé deux études sur l'efficacité de nouvelles molécules anti-staphylococciques à visée intracellulaire dans le cadre de collaboration avec des sociétés pharmaceutiques. Les résultats obtenus lors de ces études ont été encourageants, en effet, nos résultats préliminaires ont montré l'intérêt de ces nouveaux inhibiteurs anti-staphylococciques dans l'élimination des *S. aureus* intracellulaires, avec une efficacité supérieure à la rifampicine pour l'une de ces molécules. Ces molécules, en combinaison avec des antibiotiques standards, pourraient constituer une option thérapeutique précieuse pour le traitement des infections ostéo-articulaires.

La dernière partie de ce travail portait sur les capacités d'internalisation et de persistance intracellulaire de *Staphylococcus non-aureus* (SNA). Nous avons étudié différentes souches de *S. simiae* et *S. schleiferi* ainsi que *S. argenteus* et *S. schweitzeri* qui ont été décrites plus récemment. Les souches *S. argenteus*, *S. schweitzeri* et *S. schleiferi* ont indiqué une capacité à persister dans les CPNP autant voire plus importante que *S. aureus*, exigeant une nouvelle vigilance d'un point de vu clinique sur le choix thérapeutique lors d'une infection à l'un de ces staphylocoques.

Mots clefs : *Staphylococcus aureus*, VISA, internalisation, persistance, intracellulaire, molécules anti-staphylococcique, *Staphylococcus non-aureus*