



HAL
open science

Impact de l'infection à *Staphylococcus aureus* sur le microenvironnement osseux

Jérôme Josse

► **To cite this version:**

Jérôme Josse. Impact de l'infection à *Staphylococcus aureus* sur le microenvironnement osseux. Sciences pharmaceutiques. Université de Reims - Champagne Ardenne, 2016. Français. NNT : 2016REIMP204 . tel-01643706

HAL Id: tel-01643706

<https://theses.hal.science/tel-01643706>

Submitted on 21 Nov 2017

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : PHARMACIE

Spécialité : Microbiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Jérôme JOSSE

Le 29 avril 2016

IMPACT DE L'INFECTION À STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUR LE MICROENVIRONNEMENT OSSEUX

Thèse dirigée par **Sophie GANGLOFF**

JURY

M. Frédéric LAURENT,	, Professeur – Praticien HOSP,	à l'Université de Lyon 1 Claude Bernard,	, Président
M. Alain HAZIOT,	, Directeur de Recherche,	à l'Université de Paris 7 Paris DIDEROT,	, Rapporteur
Mme. Sophie GANGLOFF,	, Professeur,	à l'Université Reims Champagne-Ardenne,	, Examineur
M. Xavier OHL,	, Docteur,	à l'Université Reims Champagne-Ardenne,	, Examineur



REMERCIEMENTS

Je remercie Monsieur le **Docteur Alain HAZIOT**, *Directeur de Recherche à l'INSERM UMRS-1160 à Paris* et Monsieur le **Professeur Frédéric LAURENT**, *Professeur au Centre international de Recherche en Infectiologie à Lyon*, qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de ce travail de thèse.

Je remercie Monsieur le **Docteur Xavier OHL**, *Maitre de Conférence au sein de l'EA 4691 BIOS*, d'avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Madame le **Professeur Sophie GANGLOFF**, pour m'avoir permis de réaliser mes travaux de thèse au sein de l'EA 4691 BIOS et d'en avoir assuré la codirection. Vous m'avez donné goût à la recherche et à l'enseignement il y a quelques années maintenant et je vous en remercie. Merci pour votre confiance, votre disponibilité et votre soutien. Merci aussi d'avoir canalisé « mon énergie » pour permettre à ce projet d'aboutir.

Je remercie aussi Monsieur le **Docteur Bouchaib LAMKHIOUED** pour avoir codirigé cette thèse et pour m'avoir permis d'effectuer une mobilité doctorale à l'Université Laval de Québec.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au **Docteur Frédéric VELARD** pour avoir, entre autre, supervisé la partie technique de ces travaux de thèse. Tu as toujours été là quand j'en ai eu besoin, que ce soit pour le travail de laboratoire, les brainstormings endiablés ou l'exploration des terroirs belges, bordelais et écossais.

Je remercie Monsieur le **Professeur Olivier GRAESSLIN** et l'ensemble du personnel du service de Gynécologie Obstétrique du CHU de Reims pour nous avoir fourni les cordons ombilicaux. Je tiens aussi à remercier Monsieur le **Docteur Christophe MENSA** et l'ensemble du personnel du service de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique du CHU de Reims pour nous avoir fourni les explants osseux.

Je remercie sincèrement les membres de l'Ecole Doctorale STS de l'URCA pour leur implication dans le bon déroulement de ma thèse mais aussi pour l'organisation des Doctoriales et du challenge MT180.

Pour finir, je tiens à remercier Mimi ma moitié, ma famille, mes amis, tous les membres de l'EA 4691 et les collègues des autres laboratoires. Vous avez tous contribué à votre manière au bon déroulement de ces quelques années si importantes pour moi.

J'espère que vous avez tous conscience du Respect, de l'Amour et de l'Amitié que je vous porte. Si vous en doutez, venez me voir, je me ferais un plaisir de vous le rappeler.

Bisous.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABBREVIATIONS	1
LISTE DES ILLUSTRATIONS	4
CONTEXTE	7
INTRODUCTION.....	9
1 LE TISSU OSSEUX	9
1.1 Classification histologique du tissu osseux.....	9
1.2 Les cellules du microenvironnement osseux	13
2 LES INFECTIONS OSTEO-ARTICULAIRES A <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ...	24
2.1 Critères généraux de classification des infections ostéo-articulaires.....	24
2.2 Principales origines des infections ostéo-articulaires	28
2.3 <i>Staphylococcus aureus</i> et les bactéries responsables d'infections ostéo-articulaires.....	32
2.4 La réponse immunitaire lors d'une l'infection à <i>Staphylococcus aureus</i>	38
2.5 Persistance intracellulaire et chronicité des infections osseuses à <i>Staphylococcus aureus</i>	40
2.6 <i>Staphylococcus aureus</i> versus l'ostéoblaste, interaction et conséquences : état de l'art.....	42
3 LES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES	60
3.1 Généralités sur les cellules souches mésenchymateuses	60
3.2 Utilisation des cellules souches mésenchymateuses en ingénierie tissulaire osseuse.....	63
3.3 Cellules souches mésenchymateuses et infection bactérienne.....	67
OBJECTIFS DU TRAVAIL	72
RESULTATS	73
1 ^{ere} partie : impact de la maturation de cellules osseuses primaires sur leur comportement dans des modèles d'infection à <i>Staphylococcus aureus</i> aiguë et persistante	73

2 ^{ème} partie: Internalisation croissante de <i>Staphylococcus aureus</i> et expression de cytokines par les cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton	109
DISCUSSION GENERALE	121
CONCLUSION & PERSPECTIVES	127
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	129
BIBLIOGRAPHIE PERSONNELLE	150

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide désoxyribonucléique messenger
BMP : *Bone morphogenetic protein*
BSP : *Bone sialoprotein*
CAR : *CXCL12-abundant reticular*
CD : *Cluster of Differentiation*
Clf : *Clumping factor*
Cna : *Collagen adhesin*
COX2 : *Cyclooxygenase 2*
CSF1R : *Colony Stimulating Factor 1 Receptor*
DMP1 : *Dental matrix protein 1*
E. coli: *Escherichia coli*
FACIT : *Fibril-associated collagens with interrupted triple helix*
FnBP : *Fibronectin binding protein*
GRO- α : *Melanoma growth stimulating activity alpha*
GRO- β : *Melanoma growth stimulating activity beta*
HIF- α : *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*
hpBC : *Human primary bone-forming cell*
HSC : *Hematopoietic stem cell*
ICS : *Infection Callus Stability*
IL: Interleukine
IOA : Infection ostéo-articulaire
IOAM : Infection ostéo-articulaire sur matériel
ITO : Ingénierie tissulaire osseuse
KYN : *Kynurenine*
LRP 5/6 : *Lipoprotein receptor-related protein 5/6*
MCP-1 : *Macrophage chemoattractant protein 1*
M-CSF : *Macrophage colony stimulating factor*
MEO : Matrice extracellulaire osseuse

MEPE : *Matrix extracellular phosphoglycoprotein*
MITF : *Microphthalmia-associated Transcription Factor*
MMP : *Matrix metalloproteinase*
MSC : *Mesenchymal stem cell*
MSCRAMM : *Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule*
NFATc1 : *Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1*
NF- κ B : *Nuclear factor kappa-B*
NO : *Nitric oxide*
OM : *Osteogenic medium*
OPG : *Osteoprotegerin*
P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*
PAL : *Phosphatase alkaline*
PAMP: *Pathogen-associated molecular pattern*
PGE₂ : *Prostaglandin E₂*
PRR : *Pathogen recognition receptor*
RANK : *Receptor activator of nuclear factor kappa-B*
RANKL : *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*
RGD : *Arginylglycylaspartic acid*
RUNX2 : *Runt related transcription factor 2*
S. aureus : *Staphylococcus aureus*
SEB : *Staphylococcal enterotoxin B*
S. epidermidis : *Staphylococcus epidermidis*
SDF-1 : *Stromal cell-derived factor 1*
SLRP : *Small leucin rich proteoglycan*
SOST : *Sclerostin*
SP7 : *Osterix*
SpA : *Staphylococcal protein A*
SM : *Standard medium*
TGF- β : *Transforming growth factor β*
Th : *T helper*
TLR : *Toll-like receptor*
TNFR-1 : *Tumor necrosis factor receptor 1*
TNF- α : *Tumor necrosis factor alpha*
TRAP : *Tartrate-resistant acid phosphatase*

TSP : *Thrombospondin*

TSST-1 : *Toxic shock syndrome toxin 1*

WJ : *Wharton jelly*

WJ-MSC : *Wharton jelly mesenchymal stem cell*

LISTE DES ILLUSTRATIONS

SCHEMAS :

Schéma 1 : Anatomie d'un os long et d'un os plat.....	9
Schéma 2 : Schéma de l'os compact.....	10
Schéma 3 : Schéma de l'os spongieux.....	11
Schéma 4 : Périoste et endoste.....	12
Schéma 5 : Tête de fémur contenant de la moelle osseuse rouge et de la moelle jaune.....	12
Schéma 6 : La différenciation ostéoblastique.....	14
Schéma 7 : La différenciation ostéoclastique.....	19
Schéma 8 : La résorption ostéoclastique.....	21
Schéma 9 : La niche hématopoïétique.....	23
Schéma 10 : Pourcentage d'IOA hématogènes chez l'enfant pré-pubère en fonction du site d'infection.....	29
Schéma 11 : Infections ostéo-articulaires sur matériel.....	31
Schéma 12 : Prévisions mondiales du nombre d'arthroplasties (hanche et genou) en 2030....	32
Schéma 13 : Agents bactériens impliqués dans les différents types d'IOA.....	33
Schéma 14 : Prévalence des 5 agents pathogènes les plus fréquents en fonction de l'origine de l'infection orthopédique.....	34
Schéma 15 : Structure de <i>Staphylococcus aureus</i>	37
Schéma 16 : Issues possibles lors d'une interaction entre <i>Staphylococcus aureus</i> et le polynucléaire neutrophile.....	39
Schéma 17 : Les étapes de progression d'une infection ostéo-articulaire chronique.....	41

Dans la revue :

Figure 1: <i>Staphylococcus aureus</i> interaction with BEM.....	45
Figure 2: <i>Staphylococcus aureus</i> signaling mechanism after contact and internalization by osteoblasts.....	47
Figure 3: <i>Staphylococcus aureus</i> induction of inflammatory mediator production by osteoblasts and participation in the recruitment / activation of innate and adaptive immune cells.	51
Figure 4: <i>Staphylococcus aureus</i> induction of osteoblast death.....	52
Figure 5: Induction of osteoclastogenesis by <i>Staphylococcus aureus</i> -challenged osteoblasts..	53

Figure 6: Summary diagram of the osteoblasts responses in presence of <i>Staphylococcus aureus</i>	55
---	----

Schéma 18 : Critères de définition des MSC.....	61
--	----

Schéma 19 : Le concept du diamant.....	64
---	----

Schéma 20 : Approche clinique généralisée basée sur l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses pour la régénération des défauts crânio-maxillo-faciaux importants.....	65
--	----

Schéma 21 : Principe du bioréacteur qui permet la culture de MSC sur des biomatériaux avant leur implantation.....	66
---	----

Schéma 22 : Les MSC et les cellules phagocytaires interagissent de manière étroite pendant les réponses inflammatoires.....	70
--	----

Dans le premier article :

Figure 1: Osteogenic differentiation.....	83
--	----

Figure 2: Internalization and survival of <i>S. aureus</i> and effect of <i>S. aureus</i> on cell death.....	85
---	----

Figure 3: Representative SEM micrographs of interaction between <i>S. aureus</i> and SM-hpBCs or OM-hpBCs after 9 h at the MOI of 10:1 in acute infection model.....	86
---	----

Figure 4: Effect of <i>S. aureus</i> on IL-6, IL-1 β and TNF- α mRNAs expressions by SM-hpBCs and OM-hpBCs.....	88
---	----

Figure 5: Effect of <i>S. aureus</i> on CCL2, CXCL1 and CXCL8 mRNAs expressions by SM-hpBCs and OM-hpBCs.....	91
--	----

Figure 6: Effect of <i>S. aureus</i> on OPG and RANKL mRNAs expressions by SM-hpBCs and OM-hpBCs.....	93
--	----

Supplementary Figure 1: Effect of LPS stimulation on IL-6, IL-1 β and TNF- α mRNAs expressions by SM-hpBCs and OM-hpBCs.....	103
--	-----

Supplementary Figure 2: Effect of LPS stimulation on CCL2, CXCL1 and CXCL8 mRNAs expressions by SM-hpBCs and OM-hpBCs.....	104
---	-----

Supplementary Figure 3: Effect of LPS stimulation on OPG and RANKL mRNAs expressions by SM-hpBCs and OM-hpBCs.....	105
---	-----

Dans le second article:

Fig. 1: Interaction between <i>S. aureus</i> and WJ-MSCs following three hours in vitro challenge.....	114
---	-----

Fig. 2: Internalization of <i>S. aureus</i> by WJ-MSCs.....	115
--	-----

Fig. 3: <i>Effect of S. aureus on cell viability</i>	115
Fig. 4: <i>Effect of S. aureus on expression and on release of IL-6 and TNF-α by WJ-MSCs</i> ...	116
Schéma 23 : Le microenvironnement osseux.....	121
Schéma 24 : Impact d'une IOAM à <i>Staphylococcus aureus</i> sur le microenvironnement osseux, le matériel étant un fixateur.....	125
Schéma 25 : Représentation de l'implantation d'un dispositif d'ingénierie tissulaire osseuse en site infecté par <i>S. aureus</i>	126

TABLEAUX

Tableau 1 : Les sept critères de la classification des IOA.....	24
Tableau 2 : Facteurs de risque systémiques et locaux pris en compte dans le système <i>Cierny-Mader</i>	27
Tableau 3 : Pourcentage d'IOA en fonction de la gravité des fractures ouvertes.....	30
Tableau 4 : Etiologie des infections orthopédiques.....	35

Dans la revue :

Table 1: <i>Staphylococcus aureus</i> internalization by cultured osteoblasts.....	46
Table 2: <i>In vitro</i> consequences of <i>Staphylococcus aureus</i> / osteoblast interaction.....	49

Dans le premier article :

Table 1: Primers' nucleotide sequence for each primer couple.....	82
Table 2: <i>Effect of S. aureus on IL-6 protein release by SM-hpBCs and OM-hpBCs</i>	87
Table 3: <i>Effect of S. aureus on CCL2, CXCL1 and CXCL8 protein release by SM-hpBCs and OM-hpBCs</i>	90
Table 4: <i>Effect of S. aureus on OPG protein release by SM-hpBCs and OM-hpBCs</i>	92
Supplementary Table 1: <i>Effect of LPS stimulation on IL-6 protein release by SM-hpBCs and OM-hpBCs</i>	106
Supplementary Table 2: <i>Effect of LPS stimulation on CCL2, CXCL1 and CXCL8 protein releases by SM-hpBCs and OM-hpBCs</i>	106
Supplementary Table 3: <i>Effect of LPS stimulation on OPG protein release by SM-hpBCs and OM-hpBCs</i>	107

Dans le second article :

Table 1: Primers' nucleotide sequences and efficiency reaction for each primer couple.....	113
---	-----

CONTEXTE

En dépit des progrès thérapeutiques, les infections ostéo-articulaires (IOA) restent des pathologies fréquentes. Elles concernent toutes les classes de la population que ce soit les enfants suite à une infection par voie hématogène, les personnes âgées lors d'infections associées à du matériel prothétique ou les patients diabétiques qui sont sujets à une infection du pied. Ces infections sont majoritairement bactérienne, en particulier le genre *Staphylococcus* et plus spécifiquement l'espèce *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).

Au niveau du microenvironnement osseux, l'ostéoblaste est reconnu comme un acteur important dans les IOA. En situation aseptique, il est responsable de la formation de la matrice osseuse extracellulaire (MEO) et régule l'homéostasie osseuse en interagissant avec l'ostéoclaste, cellule responsable de la résorption osseuse. En situation septique, notamment lors d'infections par *S. aureus*, l'ostéoblaste devient un réservoir bactérien favorable à l'installation d'infections chroniques mais peut aussi être acteur des réponses inflammatoire et antibactérienne.

Avec le vieillissement de la population, deux nécessités se font face : le besoin accru d'innovation dans le domaine de la réparation du tissu osseux par des biomatériaux et la nécessité de nouvelles thérapies pour lutter contre les infections bactériennes, notamment les IOA. De ce fait, un intérêt grandissant s'est développé à l'égard des cellules souches mésenchymateuses (MSC), en particulier celles issues de sources alternatives à la moelle osseuse. Néanmoins, l'utilisation de MSC pour la régénération du tissu osseux en site infecté ou en post-infection est encore peu étudiée.

Le but de ce travail a été d'étudier l'impact d'une infection à *S. aureus* sur les cellules du microenvironnement osseux. Il a notamment été question d'étudier l'impact de la différenciation et de la maturation sur la réponse de cellules à potentiel ostéogénique face à une infection par *S. aureus*. Ce manuscrit s'organise autour d'une introduction bibliographique, d'une partie expérimentale exposant les résultats obtenus sous forme d'articles publiés ou soumis dans des revues internationales à comité de lecture, d'une discussion générale et d'une conclusion incluant des perspectives.

L'introduction bibliographique débute avec une présentation du microenvironnement osseux et des cellules qui le composent, notamment l'ostéoblaste. Elle se poursuit par un état de l'art sur les IOA et plus spécifiquement celles causées par *S. aureus*. Cette seconde partie ouvre sur une revue concernant la relation entre *S. aureus* et l'ostéoblaste intitulée « *Staphylococcus aureus vs. Osteoblast : Relationship and Consequences in Osteomyelitis* » publiée dans *Frontiers in cellular and infection microbiology*. La troisième partie de l'introduction est consacrée aux MSC et aborde leur utilisation pour la régénération du tissu osseux mais aussi leur potentiel dans la lutte contre les infections bactériennes.

La partie expérimentale présente, au travers de deux articles, les résultats obtenus au cours de cette thèse.

Une première partie est consacrée à l'impact de la maturation cellulaire sur le comportement de cellules osseuses humaines primaires lors d'une infection à *S. aureus*. Ces résultats obtenus dans deux modèles d'infection *in vitro*, font l'objet d'un article intitulé « *Impact of human primary bone-forming cells maturation on their behavior in acute or persistent Staphylococcus aureus infection models* » en cours de soumission au journal *Frontiers in cellular and infection microbiology*.

Une seconde partie porte sur les résultats obtenus lors de l'étude de l'interaction entre *S. aureus* et des MSC dérivées de la gelée de Wharton (WJ-MSC). Ces résultats ont fait l'objet d'un article intitulé « *Increased internalization of Staphylococcus aureus and cytokine expression in human Wharton's jelly mesenchymal stem cells* » publié dans *Bio-Medical Materials and Engineering*.

Une discussion générale fait suite à la partie expérimentale. Les différents résultats obtenus sont discutés de manière synthétique et les perspectives en découlant sont proposées dans le but de compléter ces travaux de thèse.

INTRODUCTION

1 LE TISSU OSSEUX

Le tissu osseux est une entité complexe. Histologiquement, il est constitué de plusieurs compartiments, à savoir les tissus osseux compact et spongieux, le périoste, l'endoste et la moelle osseuse.

1.1 Classification histologique du tissu osseux

Qu'ils soient longs, courts, plats ou irréguliers, les os ont une construction élaborée, composée d'une partie externe dense formée d'os compact entourant un noyau d'os spongieux. L'extérieur et l'intérieur de l'os sont tapissés de couches cellulaires respectivement appelées périoste et endoste. Au sein des os, on trouve la moelle osseuse. Elle peut être rouge ou jaune en fonction du site choisi et de l'âge (Schéma 1).

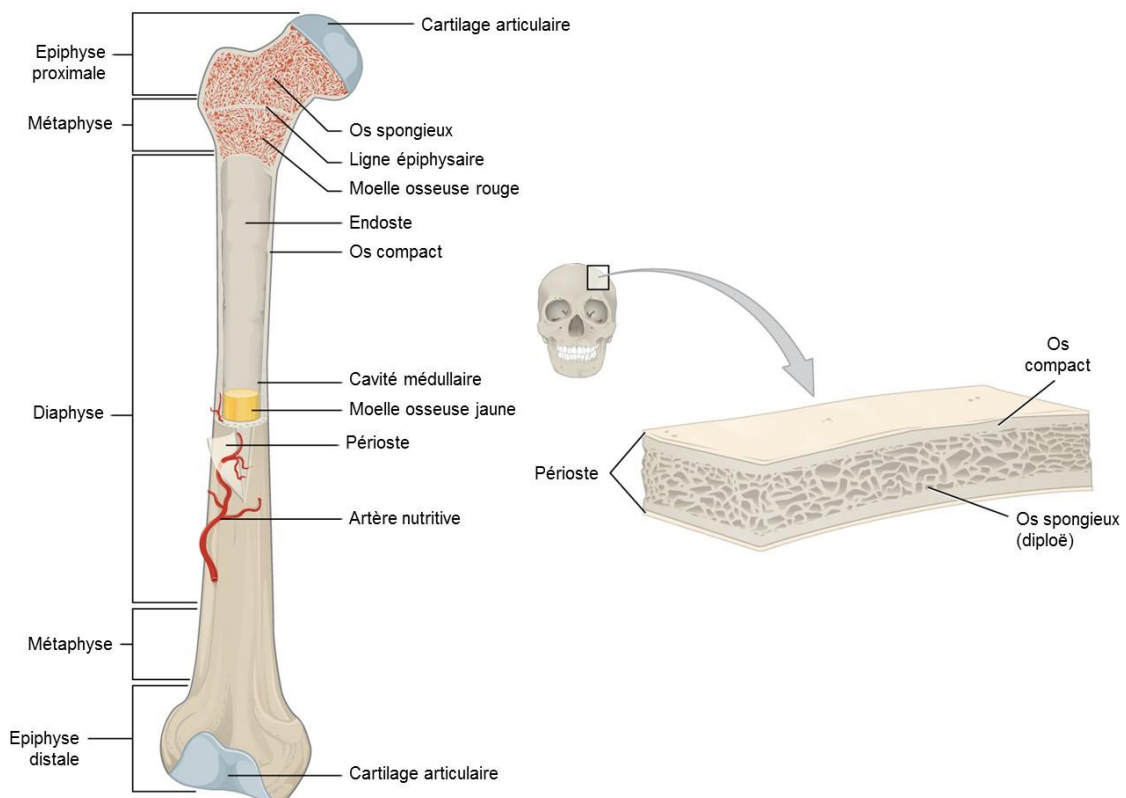
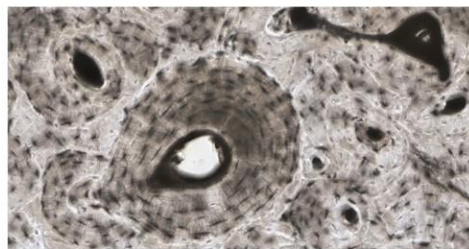
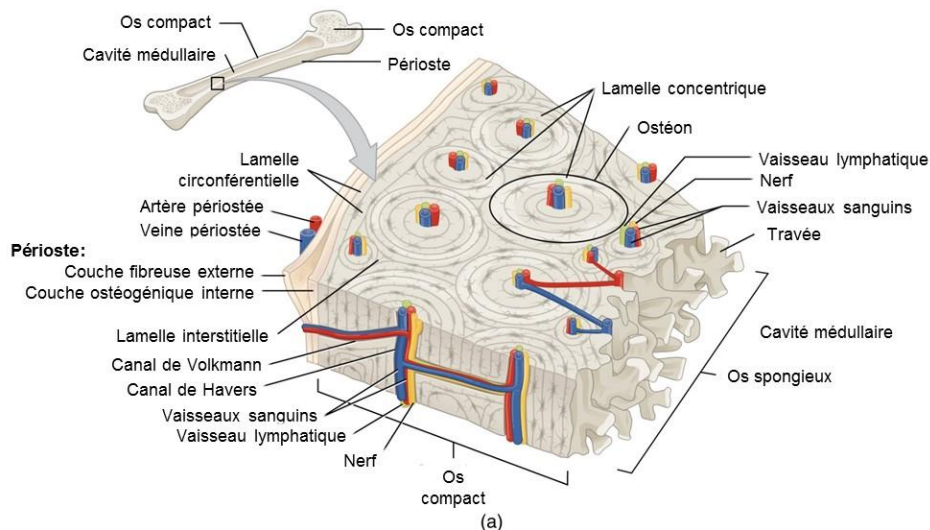


Schéma 1 : Anatomie d'un os long et d'un os plat, adapté d'*Anatomy & Physiology* (1).

1.1.1 Os compact (ou cortical) et os spongieux (ou trabéculaire)

Les différences entre os compact et os spongieux sont principalement structurelles. L'os compact est dense et peut résister aux forces de compression alors que l'os spongieux comporte des lacunes permettant d'alléger la masse du squelette (1).

L'os compact est présent en périphérie des os, d'où son nom d'os cortical. L'unité de base de l'os compact est l'ostéon ou système haversien. Il est composé de lamelles concentriques formant des structures tubulaires à paroi épaisse. La partie centrale de l'ostéon est cavernueuse, elle est nommée canal de *Havers* (Schéma 2). Ce canal contient des vaisseaux sanguins, des vaisseaux lymphatiques et des nerfs qui parcourent tout le tissu osseux compact grâce à des canaux perforants (appelés aussi canaux de *Volkman*) émanant perpendiculairement au canal principal (1). A l'interface entre les lamelles de l'ostéon, il existe des lacunes contenant des ostéocytes, type cellulaire le plus différencié de la lignée ostéoblastique (2).



(b)

Schéma 2 : Schéma de l'os compact. **(a)** Cette vue en coupe de l'os compact montre l'unité structurale de base, l'ostéon ou système haversien. **(b)** Structure microscopique de l'ostéon (image de microscopie électronique fournie par "the Regents of University of Michigan Medical School" © 2012). LM \times 40. Adapté d'*Anatomy & Physiology* (1).

L'os spongieux, quant à lui, dérive de l'arrangement des lamelles en travées d'où son nom d'os trabéculaire. Il est situé au cœur des os haversiens. Dans ce cas, les lamelles sont plates et forment une structure tubulaire. L'os spongieux est alors constitué d'un réseau interconnecté de tiges ou de plaquettes (Schéma 3). Des ostéocytes contenus dans des lacunes sont aussi présents au niveau de l'os trabéculaire (2).

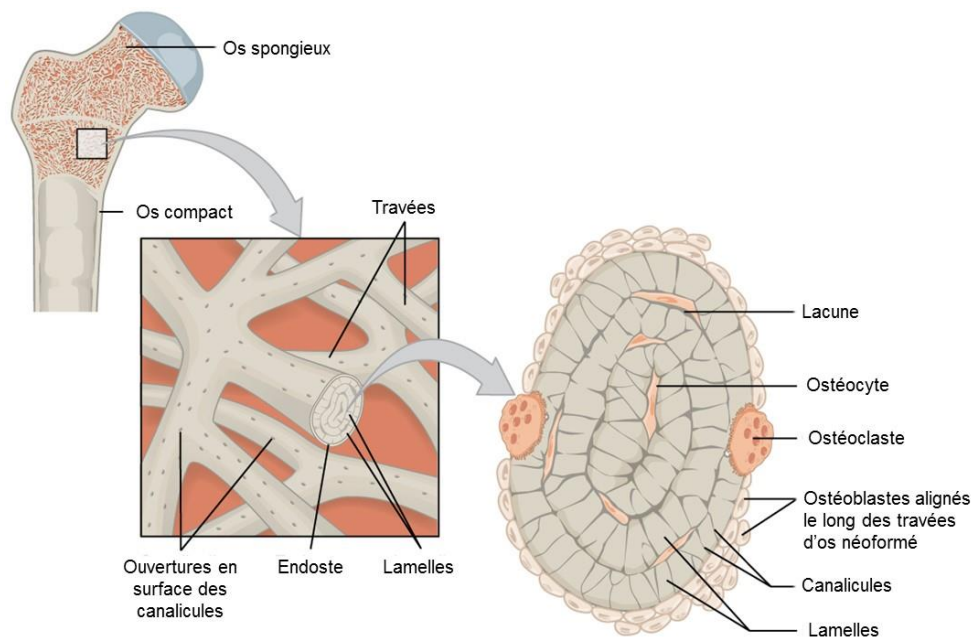


Schéma 3 : Schéma de l'os spongieux. L'os spongieux est composé de travées qui contiennent des ostéocytes. Les espaces inter-trabéculaires de certains os contiennent de la moelle osseuse rouge. Adapté d'*Anatomy & Physiology* (1).

1.1.2 Périoste et endoste

Le périoste est un tissu conjonctif fibreux qui tapisse la partie extérieure de l'os cortical à l'exception des articulations où l'os est recouvert de cartilage articulaire (Schéma 4). Il contient des vaisseaux sanguins qui nourrissent l'os compact et des vaisseaux lymphatiques ainsi que des fibres nerveuses. Le périoste contient aussi des ostéoblastes (cellules formant le tissu osseux) et des ostéoclastes (cellules résorbant le tissu osseux) qui assurent le renouvellement de l'os. Il joue un rôle crucial dans l'expansion en épaisseur des os et dans la réparation des fractures osseuses (2,3).

L'endoste est une structure membranaire qui tapisse l'intérieur de l'os cortical (endoste cortical), les travées osseuses de l'os spongieux qui bordent la moelle osseuse (endoste trabéculaire) ainsi que les canaux de *Havers* et les canaux de *Volkman* (Schéma 4). L'endoste

contient des vaisseaux sanguins, des ostéoblastes et des ostéoclastes (2,3). Des cellules bordantes ainsi que des *OsteoMacs*, un type de macrophages résidents spécifiques de l'os, sont également retrouvés au niveau de l'endoste (4).

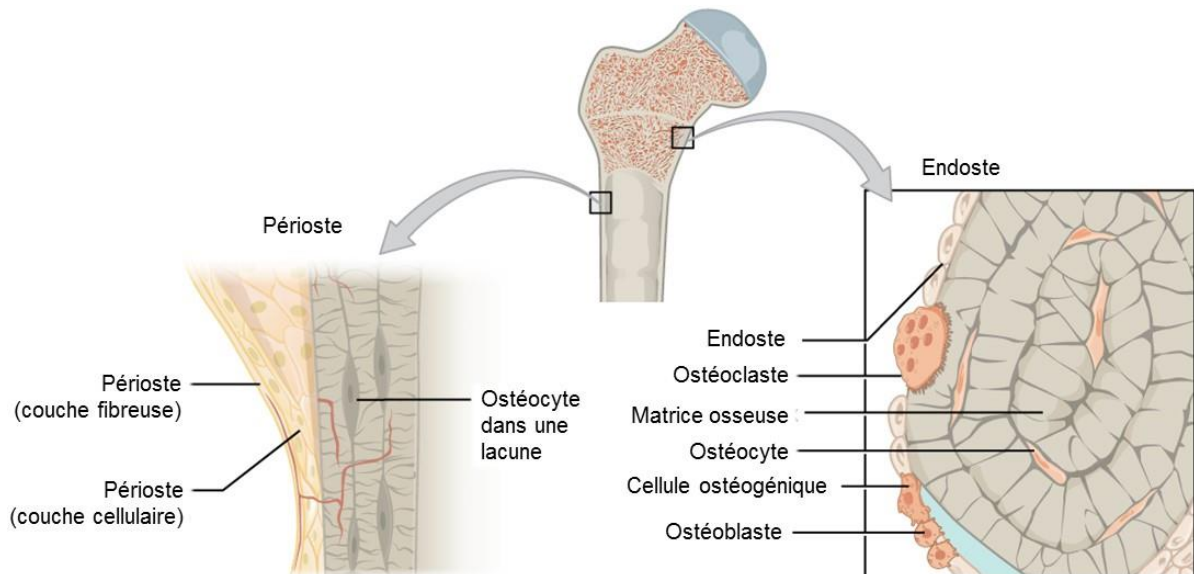


Schéma 4 : Périoste et endoste. Le périoste forme la surface externe de l'os et l'endoste délimite la cavité médullaire. Adapté d'*Anatomy & Physiology* (1).

1.1.3 Moelle osseuse

La moelle osseuse est un tissu conjonctif mou qui se situe à l'intérieur des os, elle est le siège de l'hématopoïèse. En plus des précurseurs des cellules sanguines, la moelle osseuse est composée d'un stroma de soutien nécessaire au bon déroulement de l'hématopoïèse.

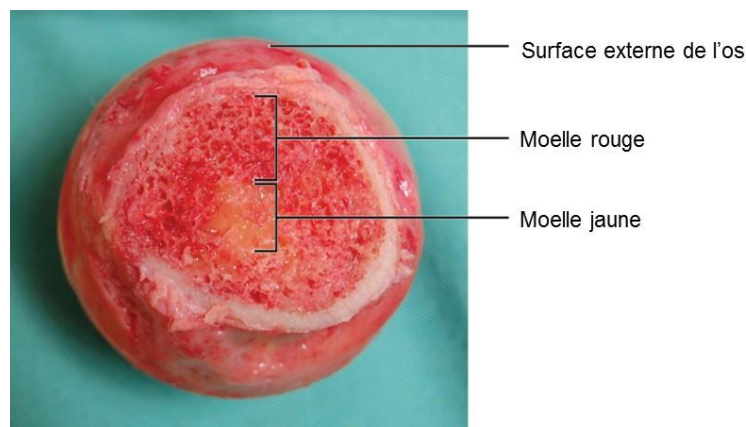


Schéma 5 : Tête de fémur contenant de la moelle osseuse rouge et de la moelle jaune. La moelle osseuse rouge est responsable de l'hématopoïèse, la moelle osseuse jaune est composée de tissu adipeux (1). Adapté d'*Anatomy & Physiology* (1).

Le stroma contient, entre autre, des MSC et des progéniteurs ostéoclastiques (3). Chez l'enfant, cette moelle osseuse rouge est présente à l'intérieur de tous les os. Au cours de la vie, la moelle osseuse rouge est remplacée par une moelle osseuse jaune majoritairement composée de tissu adipeux (Schéma 5). Chez l'adulte, la moelle osseuse rouge subsiste au niveau des épiphyses des os longs comme le fémur ou au niveau des os plats comme le bassin (5).

1.2 Les cellules du microenvironnement osseux

Le terme « microenvironnement osseux » désigne un système biologique complexe qui contient à la fois des cellules issues des lignées mésenchymateuses et hématopoïétiques, un approvisionnement sinusoidal en sang, le stroma de la moelle osseuse et la matrice extracellulaire osseuse. Ces différents éléments forment un complexe en interaction constante (6). Au sein du microenvironnement osseux, les ostéoblastes et les ostéoclastes jouent des rôles primordiaux.

1.2.1 L'ostéoblaste et la différenciation ostéoblastique

L'ostéoblaste est un des acteurs majeurs du microenvironnement osseux. Il est responsable de la formation de la MEO et régule l'homéostasie osseuse en interagissant avec l'ostéoclaste qui est responsable de la résorption de la MEO. Il a pour origine une cellule multipotente indifférenciée qui peut se différencier jusqu'au stade ultime d'ostéocyte (Schéma 6).

L'ostéogénèse, et plus particulièrement la différenciation de la lignée ostéoblastique, est contrôlée par l'expression coordonnée de facteurs de transcription majeurs et peut être sous-divisée en trois parties :

- Les stades précoces de la différenciation, allant de la cellule indifférenciée au pré-ostéoblaste. Les gènes régulateurs précoces sont exprimés et permettent l'expression de marqueurs protéiques précoces tels que le collagène de type I et la phosphatase alcaline (PAL).
- Le stade ostéoblaste (immature et mature) durant lequel a lieu la majorité de la production de la MEO et sa minéralisation.
- Les stades terminaux de la différenciation : ostéocyte ou cellules bordantes.

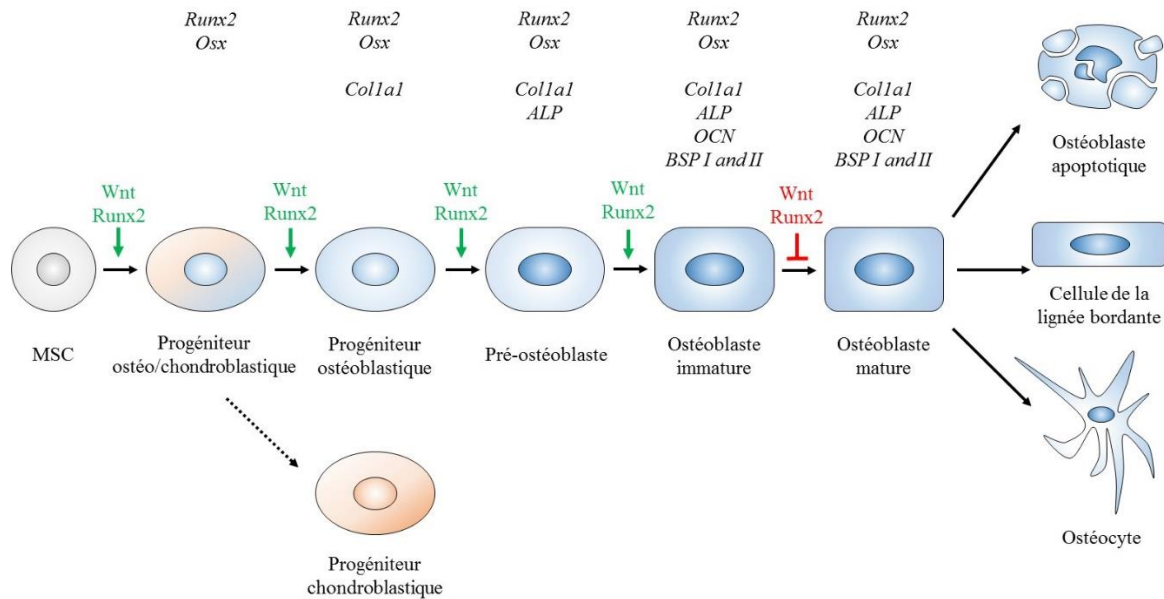


Schéma 6 : La différenciation ostéoblastique.

1.2.1.1 Stades précoces de la différenciation ostéoblastique

Comme de nombreuses autres cellules des tissus conjonctifs (fibroblastes, chondrocytes, adipocytes et myoblastes), les cellules de la lignée ostéoblastique ont pour origine des MSC. L'orientation de ces cellules vers une voie de différenciation particulière est déterminée par différents facteurs de transcription. Les facteurs de transcription RUNX2, SP7 et la voie Wnt canonique régulent majoritairement la différenciation ostéoblastique (7).

Le facteur de transcription lié à Runt (RUNX2) est un gène régulateur de la différenciation ostéoblastique. Il appartient à la famille des facteurs de transcription RUNX qui inclut également RUNX1 et RUNX3. RUNX2 régule l'expression des protéines majeures de la MEO durant les étapes précoces de la différenciation ostéoblastique (7). Il inhibe aussi la différenciation des MSC en chondrocyte et adipocyte (8).

A un stade plus avancé, les progéniteurs ostéoblastiques expriment RUNX2 et SP7. SP7, aussi connu sous le nom de OSX (Osterix) est un gène cible de RUNX2 (9). Leur expression est liée à l'activation de différentes voies de transduction.

La famille des glycoprotéines Wnt joue un rôle important dans la régulation de la différenciation des cellules de la lignée ostéoblastique. Grâce à la stimulation de plusieurs récepteurs

membranaires, les ligands Wnt activent des voies de signalisation intracellulaires qui sont soit dépendantes soit indépendantes de la β -caténine (9). Plus spécifiquement, la voie canonique est dépendante d'une stabilisation de la β -caténine. La β -caténine est constitutivement produite, ubiquitinyllée et dégradée par le protéasome. Les ligands Wnt, en se fixant sur les récepteurs Frizzled et leurs co-récepteurs LRP5 et 6 empêchent la phosphorylation de la β -caténine. La β -caténine ainsi hypophosphoryllée est plus stable. Son accumulation dans le cytosol favorise sa translocation nucléaire et permet de réguler la transcription des gènes dépendants de la voie Wnt cruciaux dans l'acquisition ordonnée de la masse osseuse (10). La β -caténine serait notamment nécessaire pour la différenciation des cellules positives pour RUNX2 vers le phénotype RUNX2 et SP7 positives. Il en serait de même pour la différenciation des progéniteurs RUNX2 et SP7 positifs vers le stade ostéoblaste (9).

D'autres facteurs sont impliqués dans la régulation de la différenciation ostéoblastique, notamment les protéines osseuses morphogénétiques (BMP) qui appartiennent à la superfamille du facteur de croissance transformant β (TGF- β). Les BMP existent sous différentes isoformes, parmi lesquelles les BMP-2, -4, -5, -6 et -7 sont clairement impliquées dans l'ostéogénèse. Elles interviennent dans la phase précoce de la différenciation ostéoblastique grâce à leur capacité à stimuler l'expression de RUNX2 et SP7 (9).

Le stade précoce « progéniteur ostéoblastique » marque le début de la sécrétion de collagène de type I sous contrôle de RUNX2 et SP7 (Schéma 6, (11,12)). Il est le composant majoritaire de la phase organique de la MEO (2). Il se structure en fibrille et forme le cadre de base de la MEO. En association avec les minéraux, ce collagène gouverne les propriétés biomécaniques et l'intégrité fonctionnelle du tissu osseux (13). C'est un site de nucléation pour les minéraux (3). D'autres formes de collagènes sont présentes au niveau du tissu osseux dans des quantités moindres. On peut citer les collagènes de type II et V mais aussi les collagènes FACIT (*fibril-associated collagens with interrupted triple helix*), qui sont importants pour l'organisation et la stabilité de la MEO (2).

A partir du moment où il existe un groupe de progéniteurs exprimant des marqueurs ostéoblastiques précoces (RUNX2 et le collagène de type I), une phase de prolifération s'enclenche, couplée à l'apparition d'une activité enzymatique de la PAL (Schéma 6). La PAL est une enzyme capable d'hydrolyser les esters monophosphates à pH physiologique. Au niveau sérique, la PAL est retrouvée sous différentes isoformes issues de l'os, du foie, de l'intestin, des reins, du placenta et des cellules germinales. Ces PAL sont appelées PAL non spécifiques.

Issues du même gène, elles divergent uniquement par leurs modifications post-traductionnelles (14). Au niveau osseux, la PAL est ancrée à la surface des ostéoblastes grâce à une liaison phosphoinositol mais elle peut également être libérée dans la matrice extracellulaire lors du bourgeonnement des vésicules de minéralisation (15). La PAL favorise la minéralisation en hydrolysant les pyrophosphates, des inhibiteurs de la déposition minérale, ce qui permet la libération de phosphate inorganique essentielle pour la structuration des minéraux (2, 15).

Le passage de précurseur ostéoblastique à pré-ostéoblaste induit des changements morphologiques. Les cellules deviennent plus larges, cuboïdes, ont une forte activité PAL et commencent à sécréter les protéines de la MEO (10).

1.2.1.2 Stade « ostéoblaste » et production de la matrice extracellulaire osseuse

Le stade « ostéoblaste » peut être subdivisé en un stade « immature » (finalisant la MEO organique) et un stade « mature » (minéralisant la MEO). Les principales protéines exprimées et sécrétées par l'ostéoblaste, qu'il soit immature ou mature, sont des glycoprotéines et des protéoglycanes qui ont des rôles : i) de structuration des fibrilles de collagène, ii) de molécules d'adhésion pour les cellules osseuses et iii) d'inducteur de la minéralisation notamment *via* la nucléation de l'hydroxyapatite, le principal composé minéral de la MEO (10).

A ce stade, RUNX2 induit la formation de la MEO immature mais inhibe la maturation de la MEO. RUNX2 doit être réprimé pour observer une maturation de la MEO (7). Il semblerait que SP7 et la voie de régulation Wnt aient aussi des effets inhibiteurs dans les dernières étapes de la maturation des cellules de la lignée ostéoblastique (16,17).

Concernant la structure de la MEO, la décorine et le biglycane, des protéoglycanes de petite taille qui possèdent une séquence riche en leucine (SLRP), sont capables de se fixer au collagène préalablement produit et d'en réguler le diamètre des fibrilles. De plus, elles peuvent se lier au TGF- β , un agent pro-ostéoblastique qui existe sous forme libre ou liée aux protéines matricielles. En se liant au TGF- β , la décorine et le biglycane régulent sa biodisponibilité (2,3). La régulation du diamètre des fibrilles de collagène serait aussi assurée par l'ostéonectine, une des premières glycoprotéines identifiée au niveau du tissu osseux. Elle a été nommée ainsi pour sa capacité à se fixer aux ions calcium, à l'hydroxyapatite et/ou au collagène (18). C'est aussi un agent de nucléation lors de la déposition de l'hydroxyapatite (19). Au niveau

osseux, l'ostéonectine pourrait aussi influencer la croissance et/ou la prolifération des ostéoblastes (2).

A la différence de l'ostéonectine, certaines glycoprotéines de la MEO possèdent la séquence d'acides aminés arginine-glycine-aspartate (RGD) qui leur confèrent la capacité de se lier aux intégrines présentes à la surface des ostéoblastes (20). C'est notamment le cas des thrombospondines et plus spécifiquement des thrombospondines 1 et 2 (TSP-1 et 2) qui sont les plus présentes au niveau osseux (21). La TSP-2 peut se lier à différentes protéines de la MEO et favoriser l'attachement des ostéoclastes *via* sa séquence RGD (2,3). Comme la décorine et le biglycane cités précédemment, la TSP-2 joue aussi un rôle dans la mise à disposition du TGF- β latent. TSP-2 séquestre le TGF- β alors que la TSP-1 est plutôt un activateur du TGF- β (3).

La fibronectine, autre glycoprotéine produite pendant les phases précoces de la formation osseuse est fortement exprimée par les ostéoblastes. Elle permet également de favoriser l'attachement des ostéoclastes à la MEO (22). Dans ce cas, la liaison se fait indépendamment de la séquence RGD notamment *via* l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ (20). Cette interaction entre les ostéoclastes et la fibronectine inhiberait l'ostéoclastogénèse mais favoriserait leur activité (23).

A leur maturité les ostéoblastes expriment et produisent d'autres protéines qui interviennent dans la régulation de la minéralisation, notamment l'ostéopontine, la sialoprotéine osseuse et l'ostéocalcine.

La minéralisation de la MEO résulte de la concentration de calcium et de phosphate dans des vésicules synthétisées par les ostéoblastes matures mais aussi par les chondrocytes hypertrophiques. Ces vésicules vont permettre la formation d'une phase minérale de la MEO, principalement composée d'hydroxyapatite de formule chimique $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ (2). L'hydroxyapatite est structurée sous forme de cristaux qui se déposent initialement dans les « trous » formés entre les fibrilles de collagène. Le rôle des vésicules dans la déposition de l'hydroxyapatite à des sites précis n'a pas encore été élucidé. Cette phase minérale représente 50 à 70 % du tissu osseux.

L'ostéopontine (ou *Bone Sialoprotein I* ou BSP-I) est produite par l'ostéoblaste mature. Cette protéine est considérée comme un inhibiteur de la minéralisation (24). Elle jouerait aussi un rôle dans la résorption osseuse en favorisant la survie des ostéoclastes (25).

La sialoprotéine osseuse (ou *Bone Sialoprotein II* ou BSP-II), quant à elle, est généralement associée au phénomène de minéralisation. L'expression de cette protéine marque la fin de la différenciation de l'ostéoblaste et le début de la minéralisation de la matrice. La sialoprotéine osseuse a plusieurs fonctions dans le métabolisme ostéoblastique. Elle est suspectée d'initier la minéralisation de la matrice et de réguler le métabolisme du phosphate (2,3). Elle apparaît en même temps que les minéraux et peut se lier aux ions calcium. Comme les thrombospondines ou la fibronectine, la sialoprotéine osseuse permet également l'attachement cellulaire de manière dépendante ou indépendante du motif RGD (19).

L'ostéocalcine est une petite protéine contenant de l'acide γ -carboxyglutamique, vitamine K dépendante, capable de se lier aux ions calcium et à l'hydroxyapatite (26). Elle est synthétisée par les ostéoblastes matures, ce qui lui donne le statut de marqueur tardif de la différenciation ostéoblastique (3).

1.2.1.3 Stades « ostéocyte » et « cellule de la lignée bordante »

A l'issue de la différenciation ostéoblastique et de la minéralisation, l'ostéoblaste mature peut avoir trois destins différents. Premièrement, l'ostéoblaste mature peut mourir par apoptose. Sa mort est programmée à l'issue de son travail de minéralisation, permettant d'assurer le « *turnover* » cellulaire (27,28). Deuxièmement, l'ostéoblaste mature peut devenir une cellule de la lignée bordante. Ce type de cellule recouvre la matrice osseuse aux endroits où il n'y a ni formation osseuse, ni résorption osseuse. Elles peuvent participer à la régulation de la différenciation des ostéoclastes en produisant de l'ostéoprotégérine (OPG) mais aussi le ligand au récepteur activateur du facteur nucléaire κ B (RANKL) (29). Ces médiateurs seront détaillés dans le prochain paragraphe.

Troisièmement, l'ostéoblaste mature peut s'emmurer dans sa propre MEO et devenir un ostéocyte. Les ostéocytes représentent la plus grande proportion de cellules au niveau du tissu osseux. Ces cellules expriment notamment la protéine matricielle dentinaire 1 (DMP1) et la phosphoglycoprotéine de la matrice extracellulaire (MEPE), considérées toutes deux comme des marqueurs ostéocytaires (30). Les ostéocytes ont un rôle de mécano-senseurs. En réponse à la charge mécanique du corps, ces cellules sont capables de réguler la formation et la résorption de la matrice osseuse *via* la voie Wnt (31). En effet, les ostéocytes participent activement au remodelage osseux notamment en produisant notamment de la sclérostine (SOST), un inhibiteur de LRP 5 qui va réguler négativement la différenciation des ostéoblastes

mais aussi favoriser la formation des ostéoclastes (32). Comme les cellules de la lignée bordante et les ostéoblastes, les ostéocytes peuvent aussi produire les médiateurs OPG et RANKL afin de moduler la résorption de la MEO par les ostéoclastes, l'autre cellule importante de l'homéostasie osseuse (33,34).

1.2.2 L'ostéoclaste

Le remodelage osseux est un processus physiologique qui implique la résorption du tissu osseux par les ostéoclastes et la resynthèse de la MEO par les ostéoblastes.

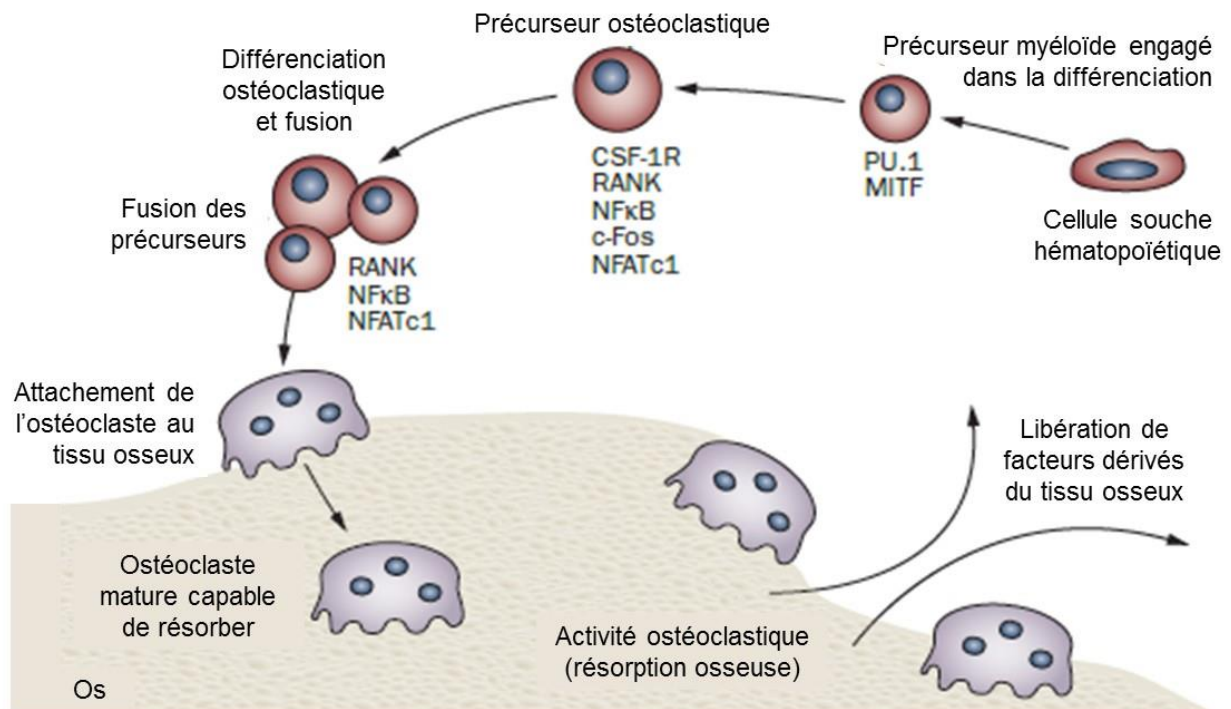


Schéma 7 : La différenciation ostéoclastique, adapté d'Edward et Mundy (35).

Les ostéoclastes ont pour origine des cellules souches hématopoïétiques (HSC) qui vont s'engager dans la voie myéloïde en devenant des précurseurs ostéoclastiques (Schéma 7). A partir de ces précurseurs, une différenciation s'opère afin d'obtenir des pré-ostéoclastes. Puis plusieurs de ces pré-ostéoclastes vont fusionner afin de former une cellule multi-nucléée. Considérée comme un ostéoclaste immature, cette cellule multi-nucléée va être activée pour former un ostéoclaste mature (35).

Comme la différenciation ostéoblastique, la différenciation ostéoclastique est régulée par l'apparition de différents marqueurs (Schéma 7). Le facteur de transcription PU.1 a été la

première molécule identifiée comme jouant un rôle dans l'engagement des précurseurs myéloïdes sur la voie ostéoclastique (35). Il régule notamment l'expression du récepteur au facteur de croissance des macrophages (CSF1R) et de l'intégrine CD11b (36,37).

M-CSF est un facteur de croissance qui favorise le développement des cellules de la lignée monocyte/macrophage. Il est, entre autre, produit par les ostéoblastes et est essentiel pour la formation des ostéoclastes (38). PU.1 régule aussi l'expression de deux facteurs de transcription, MITF et c-Fos, impliqués dans les étapes précoces de la différenciation des ostéoclastes. Un autre facteur de transcription, NFATc1 est aussi important pour la génération d'ostéoclastes (39). Il est responsable de la transcription des gènes codant pour des protéines essentielles à la dégradation de la MEO comme la phosphatase résistante à l'acide tartrique (TRAP), la métalloprotéinase matricielle 13 (MMP-13) et la cathepsine K (35).

A la fin des années 1990, l'identification de la famille des protéines « *TNF-like* » a permis la mise en évidence de l'OPG, une protéine soluble capable de bloquer la différenciation des précurseurs ostéoclastiques *in vitro* et d'inhiber la résorption osseuse *in vivo* (40). Par la suite, l'identification du RANKL comme ligand de l'OPG et de RANK comme récepteur transmembranaire de RANKL à la surface des ostéoclastes a été réalisée (41). RANKL est majoritairement produit à la surface des ostéoblastes mais peut se retrouver sous forme soluble dans des proportions moindres. L'interaction RANK/RANKL permet la formation et l'activation des ostéoclastes. L'OPG module cette activation en agissant comme un récepteur leurre. La présence de M-CSF favorise la production de RANK au niveau membranaire puis la stimulation de RANK par RANKL va induire la fusion des précurseurs ostéoclastiques (42).

Grâce à l'activation par M-CSF et RANKL, les précurseurs vont pouvoir exprimer les gènes essentiels de la lignée ostéoclastique : la cathepsine K, TRAP, le récepteur à la calcitonine et l'intégrine $\alpha_4\beta_3$ (Schéma 8).

L'activité lytique de l'ostéoclaste nécessite tout d'abord l'attachement de la cellule à la MEO. L'intégrine $\alpha_4\beta_3$ forme un complexe avec les filaments d'actine, connu sous le nom de podosome, qui est capable de reconnaître les protéines de la MEO possédant une séquence RGD (43).

Après l'attachement de l'ostéoclaste à la surface de la MEO, une résorption efficace est dépendante de l'acidification de l'espace lacunaire. Pour obtenir le faible pH nécessaire à l'activation des enzymes de dégradation et la dissolution de la phase minérale de la MEO, des ions H^+ et Cl^- sont envoyés à travers le bord renflé vers la zone de résorption (44). Ces flux

ioniques sont générés grâce au fonctionnement d'un complexe ATPase et de l'anhydrase carbonique 2 (45,46).

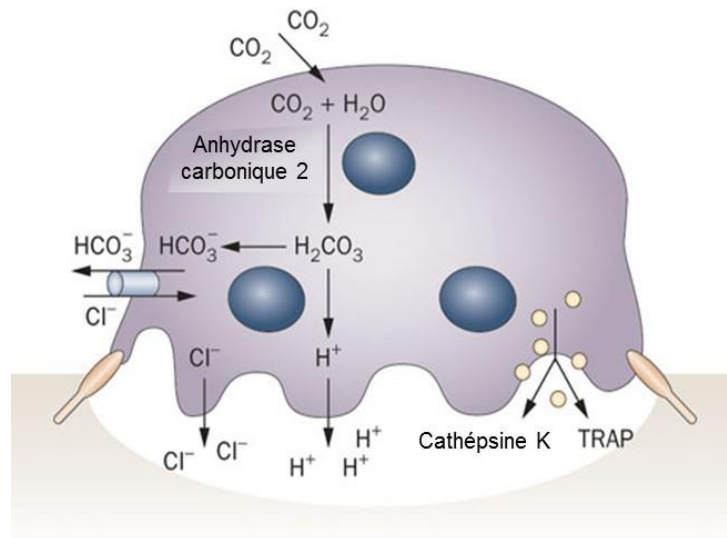


Schéma 8 : La résorption ostéoclastique, adapté d'Edward et Mundy (35).

La lyse de la matrice minérale engendrée par la diminution du pH est accentuée par l'apport d'enzymes qui dégradent la matrice organique au niveau du puits de résorption appelé lacune d'Howship. La cathépsine K et les MMP agissent en dégradant les collagènes de la MEO, notamment son composant majoritaire, le collagène de type I (47,48). L'action de TRAP accroît aussi la résorption osseuse mais sa fonctionnalité précise n'a pas été identifiée (49). Pour preuve, l'absence d'expression de TRAP dans un modèle murin mène à une ostéopétrose, c'est-à-dire une masse osseuse anormalement augmentée due à un déficit d'activité ostéoclastique (50). L'association de tous ces mécanismes permet une résorption efficace de la MEO par les ostéoclastes.

L'homéostasie osseuse peut être déséquilibrée dans un environnement pro-inflammatoire, favorisant une hyperactivité des ostéoclastes. Lors d'une réponse inflammatoire, un large panel de médiateurs pro-inflammatoires est produit et peut influencer la différenciation et la fonction des ostéoclastes.

Les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α peuvent toutes stimuler l'ostéoclastogénèse et sont produites par une multitude de cellules. Elles favorisent l'ostéoclastogénèse soit en stimulant la production de RANKL, soit de manière indépendante (51–54). Il semblerait notamment que l'IL-6 ait un rôle prédominant dans la formation et l'activation des ostéoclastes (54). Cette cytokine peut, entre autre, être produite par les ostéoblastes (55). Le système immunitaire adaptatif pourrait également influencer

l'ostéoclastogénèse et la résorption osseuse (56). Cet effet serait notamment médié par l'IL-17, une cytokine produite par les lymphocytes Th 17 et reconnue comme un des inducteurs les plus importants de RANKL (57). A noter que d'autres cellules immunes peuvent produire de l'IL-17, notamment les polynucléaires neutrophiles (PNN) (58).

D'autres médiateurs pro-inflammatoires appelés chimiokines sont aussi capables de favoriser l'ostéoclastogénèse notamment CCL2 (MCP-1), CXCL1 (GRO- α), CXCL2 (GRO- β) et CXCL8 (IL-8) (59–63).

Au-delà des ostéoblastes et des ostéoclastes, d'autres cellules sont présentes au niveau du microenvironnement osseux. Ces cellules font partie de la niche hématopoïétique.

1.2.3 Les autres cellules de la niche hématopoïétique

La niche hématopoïétique, qui correspond à l'interface entre la moelle osseuse et l'endoste, est un compartiment important du tissu osseux. Elle a plusieurs fonctions dont les principales sont la production des éléments figurés du sang, l'entretien des HSC et le remodelage du tissu osseux. Cette niche contient une multitude de types cellulaires interagissant les uns avec les autres comme les cellules de la lignée ostéoblastique, des cellules immunes, des cellules nerveuses, des adipocytes ou des cellules endothéliales (Schéma 9).

Les HSC sont des cellules multipotentes, pourvues d'une capacité d'auto-renouveau intense et capables d'entrer en phase de quiescence (64). Cette quiescence des HSC est régulée par les cellules de la lignée ostéoblastique et les cellules endothéliales.

Les MSC présentes au niveau de la niche hématopoïétique ont pour rôle de réguler la quiescence des HSC mais sont aussi un *pool* cellulaire pour l'obtention de progéniteurs ostéoblastiques et des futures cellules de la lignée ostéoblastique (65). On retrouve les MSC à proximité des cellules endothéliales formant les vaisseaux sinusoides.

A proximité des vaisseaux sanguins, on retrouve aussi les cellules réticulaires abondantes en CXCL12 (CAR) et les péricytes. Les cellules CAR sont des progéniteurs mésenchymateux capables de se différencier en adipocytes et en ostéoblastes. Elles sont la source majoritaire de CXCL12 (SDF-1), une chimiokine cruciale dans le maintien des fonctions des HSC.

Des adipocytes sont aussi présents au sein de cette niche hématopoïétique. Longtemps considérés comme des cellules de comblement, leur rôle serait plus complexe. Elles participeraient également à la régulation de la quiescence des HSC (66).

Au sein de la niche hématopoïétique, il existe des macrophages tissulaires, appelés *OsteoMacs*. Ces cellules sont retrouvées au niveau de l'endoste, intercalées entre les cellules de la lignée bordante. Au cours du remodelage osseux, les *OsteoMacs* développent une structure en forme de canopée au-dessus des ostéoblastes matures. Ceci pourrait entre-autre leur permettre de réguler la minéralisation (4,67,68). De plus, il a été démontré dans un modèle *in vivo* murin que les *OsteoMacs* favorisent la réparation tissulaire osseuse (69).

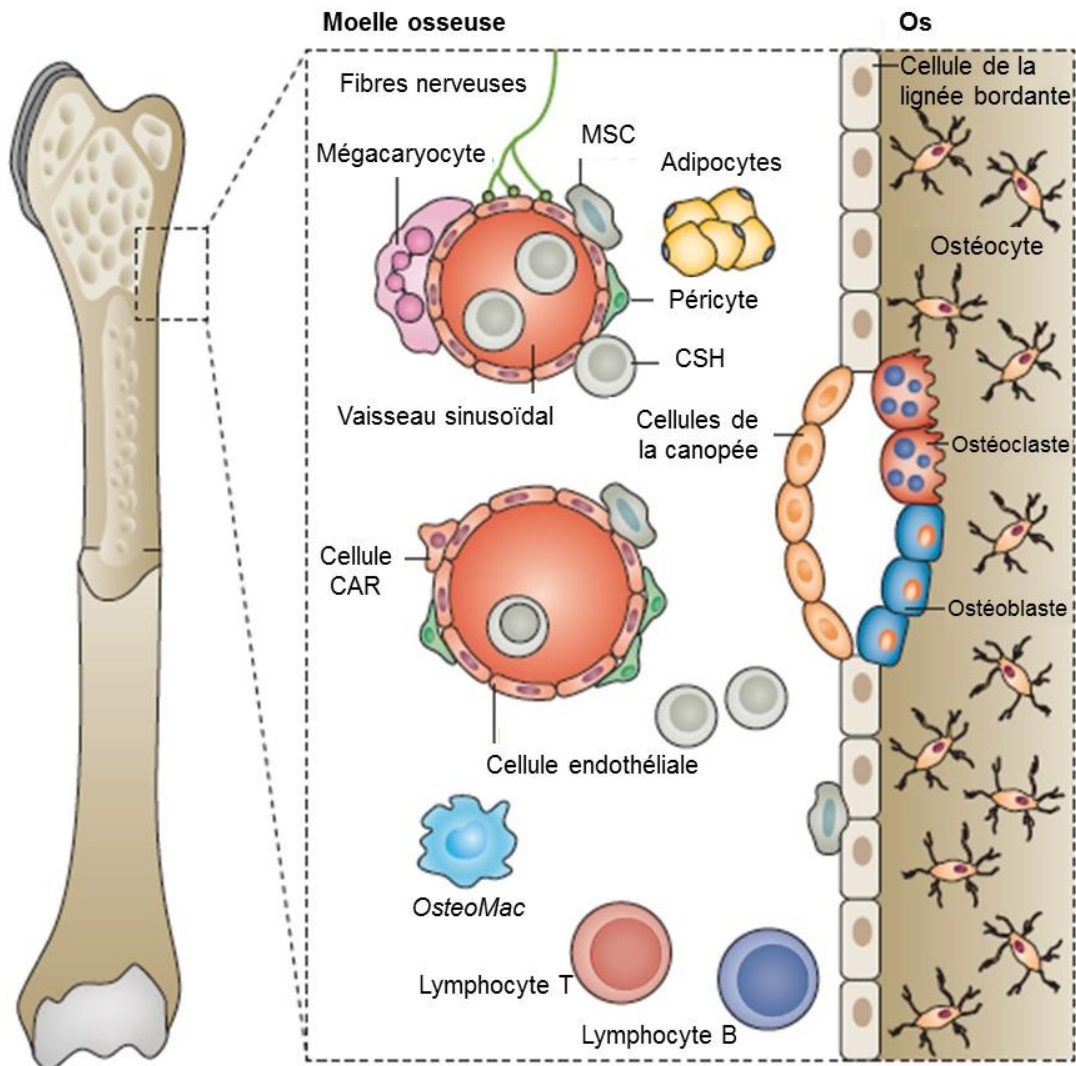


Schéma 9 : La niche hématopoïétique, adapté de *Reagan et Rosen* (65).

De manière générale, le bon fonctionnement du microenvironnement osseux résulte d'un équilibre entre les différents phénomènes dont il est le théâtre. C'est notamment le cas du remodelage osseux, équilibre entre la formation de MEO par les ostéoblastes et la résorption de celle-ci par les ostéoclastes. Cet équilibre peut être rompu et mener à une destruction du tissu osseux, notamment lors de la survenue d'IOA.

2 LES INFECTIONS OSTEO-ARTICULAIRES A

STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Les IOA regroupent les infections qui affectent le tissu osseux uniquement mais également celles qui atteignent les tissus articulaires comme l'arthrite septique. Les IOA sont caractérisées par un processus inflammatoire résultant de l'infection, accompagné d'une destruction progressive des tissus osseux et cartilagineux.

2.1 Critères généraux de classification des infections ostéo-articulaires

Afin de classer les IOA, plusieurs systèmes de classification ont été mis en place, notamment le système *Waldvogel* (70,71) et le système *Cierny-Mader* (72). Le système *Waldvogel* a été élaboré dans les années 1970. Il classe les IOA des os longs selon 3 grands types : les IOA hématogènes, les IOA par contiguïté et les IOA consécutives à une insuffisance vasculaire. Le système *Cierny-Mader* a fait son apparition en 1984. Ce nouveau système prend cette fois-ci en compte la gravité de l'infection et l'état général du patient (73). D'autres systèmes ont aussi été publiés, s'appuyant sur des critères supplémentaires et/ou différents pour classer les IOA. On y retrouve notamment la sévérité de la plaie lors des IOA par fractures (74), la distinction entre fracture unie et fracture désunie (75) ou encore la taille du défaut osseux associé à l'IOA (76).

En 2011, *Romano et al.* ont proposé une nouvelle classification. Celle-ci s'appuie sur 7 critères faisant la synthèse des classifications précédentes (77).

Tableau 1 : Les sept critères de la classification des IOA, adapté de *Romano et al.* (77).

Présentation clinique	Etiopathogénèse	Anatomo-pathologie	Statut et âge du patient	Microorganisme	Défaut osseux	Défaut des tissus mous	
Aigüe	Précoce	Hématogène	Rachis	A _{a,e,n}	Gram +	1	0
Subaigüe	Retardée	Vasculopathie / neuropathie	Main	B _{a,e,n}	Gram -	2	cm ²
Chronique	Tardive	Traumatisme	Os longs	C _{a,e,n}	Flore mixte et/ou multirésistante	3A, 3B, 3C	cm ² Os
		Implant temporaire	Niveau 1		<i>Mycobacterium</i>		
		Classification ICS	Niveau 2		Champignon		
		Type I	Niveau 3		Négatif		
		Type II	Niveau 4				
		Type III	Pied				
		Implant permanent	Cheville				

Présentation clinique de l'IOA

Ce premier critère concerne le moment d'apparition de l'IOA (Tableau 1). Si les premiers symptômes surviennent dans les deux premières semaines après le début de l'infection, l'IOA est considérée comme aiguë. Si les premiers symptômes surviennent entre un et plusieurs mois après le début de l'infection, l'IOA est considérée comme subaiguë. Enfin, l'IOA est chronique si les premiers signes d'infection apparaissent plusieurs mois après la date supposée de contamination.

Dans le cas des IOA sur matériel (IOAM), l'infection est définie comme précoce, retardée ou tardive. L'IOAM est précoce si les symptômes d'infection sont observés dans un délai de 4 à 12 semaines après la chirurgie, elle est considérée comme retardée si les premiers signes d'infection surviennent entre 3 mois et 2 ans après la chirurgie et l'IOAM est considérée comme tardive si l'infection se déclare plus de 2 ans après la chirurgie.

Etiopathogénèse

Selon la classification de *Romano et al.*, les différentes origines pour une IOA sont soit hématogènes, soit liées à une vasculopathie et/ou une neuropathie, soit liées à un traumatisme ou enfin liées à l'implantation de matériel (Tableau 1).

Dans ce dernier cas, les auteurs proposent plusieurs sous-classes d'IOAM : liées à l'implantation permanente de matériel (exemple d'une prothèse totale de hanche) ou liées à l'implantation temporaire de matériel (exemple des plaques d'ostéosynthèse, des vis ou des tiges métalliques). Dans le cas d'implantations temporaires, *Romano* a proposé en 2006 une classification dédiée appelée ICS, acronyme pour Infection, Cal, Stabilité. Cette classification s'appuie sur la stabilité de l'ostéosynthèse et sur la présence d'un cal lors de la réparation osseuse.

Trois types d'IOAM temporaires sont définis :

- Type I : infection en présence d'une ostéosynthèse stable avec un développement du cal. Dans ce cas, le traitement est conservatif et permet de contrôler l'infection grâce à des procédures médico-chirurgicales. Le retrait du matériel non résorbable est réalisé après la guérison complète de l'os.
- Type II : infection en présence d'une ostéosynthèse stable avec un développement faible ou l'absence de cal. Dans ce cas, l'ostéosynthèse peut être maintenue, contrôlant l'infection comme pour le type I, accélérant la guérison de l'os grâce à des stimulations physiques, des facteurs biologiques et des procédures chirurgicales limitées.

- Type III : présence d'une infection, pas de développement de cal et développement d'une ostéosynthèse instable. Dans ces cas, le matériel doit être retiré et le matériel de fixation doit être modifié.

Anatomo-pathologie

Le troisième critère de la classification de *Romano et al* concerne les identifications anatomo-pathologiques, c'est-à-dire les sites où l'infection a été observée. La classification de *Romano et al.* propose de distinguer les infections des os longs, du rachis, de la main, du pied et les infections articulaires (Tableau 1).

Les infections des os longs sont subdivisées selon les 4 niveaux du système *Cierny-Mader* (72):

- Le niveau I ou infection médullaire : correspond à une infection confinée aux surfaces intramédullaires de l'os.
- Le niveau II ou infection superficielle : correspond à une véritable infection par contiguïté où la surface de l'os nécrosé est exposée au niveau de la plaie du tissu mou.
- Le niveau III ou infection localisée : correspond à une infection avec séquestres (débris osseux corticaux) qui peut être résolue par chirurgie sans atteindre la stabilité osseuse.
- Le niveau IV ou infection diffuse : correspond à une infection où la résection du tissu osseux est nécessaire afin de stopper la propagation de l'infection. Ce type d'infection inclut les infections où il y a une perte de la stabilité osseuse avant ou après le débridement chirurgical.

Statut et âge du patient

Pour ce critère, la classification appliquée par *Romano et al.* s'appuie sur celle de *Cierny-Mader* (72).

Le patient peut être classé selon trois stades :

- Le type A correspond à un patient normal sans facteur de risque.
- Le type B correspond à un patient à risque, sensible aux infections, avec 1 ou 2 facteurs de risque systémiques ou locaux.
- Le type C correspond à un patient fortement sensible aux infections avec plus de 2 facteurs de risque.

Tableau 2 : Facteurs de risque systémiques et locaux pris en compte dans le système Cierny-Mader, adapté de Mader *et al.* (72).

Risque	Facteurs de risque
Systémique (Bs)	Malnutrition Insuffisance rénale, hépatique Diabète Hypoxie chronique Maladie immunitaire Cancer Âges extrêmes Immunosuppression ou immunodéficience
Local (Bl)	Lymphoedème chronique Stase veineuse Atteinte des vaisseaux majeurs Artérite Cicatrice étendue Fibrose suite à des radiations Maladies des petits vaisseaux Neuropathie Abus de tabac (> 2 paquets / jour)

Parmi les facteurs de risques, on peut par exemple citer le diabète, la consommation de tabac, les neuropathies et l'hypoxie chronique (Tableau 2). Romano *et al.* prennent également en compte l'âge du patient : adulte de plus de 14 ans (a), enfant de moins de 14 ans (e) et nourrisson de moins de 2 ans (n).

Type de microorganisme

Les microorganismes rencontrés au cours d'un IOA sont classés en bactéries à Gram positif, bactéries à Gram négatif, mycobactéries, champignons et examen aux cultures négatives. Une section particulière regroupe les infections polymicrobiennes et les bactéries résistantes. Chaque catégorie nécessite une approche médico-chirurgicale spécifique et peut avoir un pronostic particulier.

Défaut osseux

Le sixième critère correspond à la caractérisation du défaut osseux provoqué par l'IOA ou par un traumatisme antérieur, une chirurgie, le retrait d'un implant, etc.... Les différentes catégories de défauts osseux reprennent celles publiées par Romano *et al.* en 2006 :

- Le type 1 correspond aux défauts cavitaires, qui peuvent varier de quelques mm² à plusieurs cm².

- Le type 2 correspond aux défauts épiphysaires, c'est-à-dire une perte osseuse partielle ou totale au niveau articulaire.
- Le type 3 correspond aux défauts osseux segmentaires. Cette catégorie est subdivisée en 3 : l'écart entre les deux extrémités est soit inférieur à 1 cm (3A), soit supérieur à 1 cm et inférieur à 3 cm (3B) soit le défaut provoque une perte de la stabilité osseuse (3C). Pour cette dernière catégorie, l'utilisation de fixateurs externes associée à un comblement du défaut osseux sera nécessaire.

Défaut des tissus mous

Le septième et dernier critère de la classification de *Romano et al.* correspond à l'atteinte des tissus mous lors des IOA. Les 3 catégories sont :

- Pas d'atteinte des tissus mous (0).
- Atteinte des tissus et superficie de l'atteinte (cm²).
- Atteinte de tissus mous, superficie et exposition du tissu osseux à l'extérieur (cm² Os).

Cette classification très complète permet une caractérisation théorique des IOA. Néanmoins, le système proposé par *Romano et al.* apparaît comme difficile à utiliser dans la pratique clinique quotidienne (73).

2.2 Principales origines des infections ostéo-articulaires

2.2.1 Les infections ostéo-articulaires hématogènes ou ostéomyélites

Comme expliqué par *JP Rasigade* dans la *Lettre de l'Infectiologue* : « Dans le vocabulaire français, l'ostéomyélite désigne classiquement une infection osseuse d'origine hématogène sans corps étranger. Cette terminologie peut être source de confusion, car le terme « osteomyelitis », dans la littérature anglo-saxonne, désigne l'ensemble des infections osseuses » (78).

Les IOA hématogènes sont causées par des microorganismes véhiculés *via* la circulation sanguine vers le tissu osseux, et ce à partir d'un foyer infectieux distant comme la peau, le tractus urinaire ou autre (73). Ce type d'infections représente environ 20% du nombre total d'IOA (79) et touche principalement les enfants pré-pubères.

Une IOA hémotogène chez l'enfant ne présente souvent qu'un seul foyer infectieux et est majoritairement localisée au niveau de la métaphyse des os longs comme le fémur et le tibia et (Schéma 10). A ce niveau, le flux sanguin est ralenti et plus désordonné ce qui facilite l'adhésion des micro-organismes, la colonisation du tissu et le développement d'une réaction inflammatoire (71). De plus, les traumatismes mineurs arrivent souvent durant l'enfance. Ils peuvent facilement endommager les fins vaisseaux sanguins de la diaphyse, créer une thrombose et ralentir le débit sanguin. Un traumatisme mineur est souvent recensé préalablement à l'apparition d'une IOA hémotogène mais le lien entre les deux événements est difficile à établir (73).

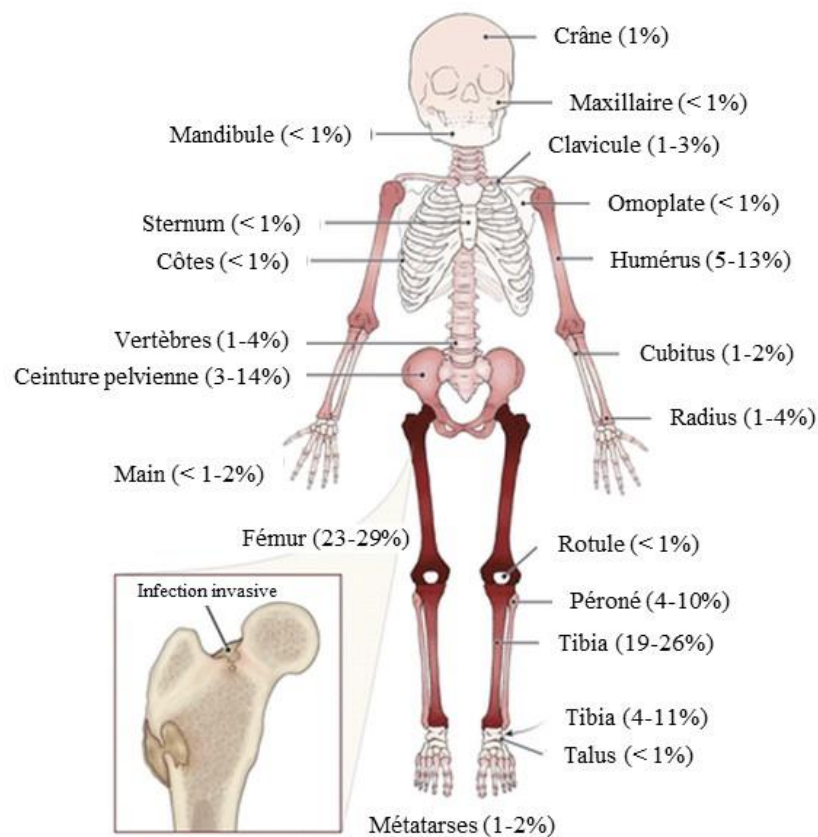


Schéma 10 : Pourcentage d'IOA hémotogènes chez l'enfant pré-pubère en fonction du site d'infection, adapté de *Peltola et Pääkkönen* (80).

Les cas d'IOA hémotogènes sont plus rares chez l'adulte. Dans ce cas, l'infection se déclare majoritairement au niveau des vertèbres dorsales ou lombaires (71). Ce type d'IOA résulte de la contamination par voie hémotogène de l'espace intervertébrale à partir d'un foyer infectieux à distance car les disques intervertébraux sont avasculaires (81). L'incidence de ce type d'IOA est grandissante. Ceci est notamment dû au vieillissement de la population, à l'utilisation fréquente de dispositifs intravasculaires et à l'usage de drogues par intraveineuse (73).

2.2.2 Les infections ostéo-articulaires par inoculation directe

Lors d'un traumatisme ou d'une intervention chirurgicale avec rupture d'asepsie, le tissu osseux peut se retrouver en contact avec l'extérieur et être sujet à une infection par des microorganismes exogènes. Les IOA par contamination directe sont plus communes chez les adultes. Elles regroupent les IOA liées à des traumatismes et celles consécutives à l'implantation de dispositifs médicaux orthopédiques. Les IOA par inoculation directe sont plutôt liées à des fractures ouvertes chez les jeunes adultes alors qu'elles sont principalement relatives à des chirurgies implantaires chez les personnes âgées (73). Selon *Hogan et al.*, les pourcentages d'IOA dans les cas de fractures ouvertes varient de 1 à 55% en fonction du degré de gravité de la fracture et de l'étude concernée (Tableau 3, (82)).

Selon la classification des fractures ouvertes de *Gustilo-Anderson* (83), le degré I° correspond à une fracture avec une plaie propre de longueur inférieure à 1 cm, le degré II° correspond à une plaie propre dont la longueur est comprise entre 1 cm et 10 cm, sans lacération, sans lambeau de tissu et sans avulsions. Le degré III° de la classification *Gustilo-Anderson* correspond à une fracture avec lacération des tissus mous, supérieure à 10 cm et associée à un défaut osseux segmentaire ou à une perte osseuse. La gravité d'une fracture ouverte est donc proportionnelle au pourcentage d'infection.

Tableau 3 : Pourcentage d'IOA en fonction de la gravité des fractures ouvertes, adapté d'*Hogan et al.* (82).

Fractures ouvertes	
Grade	Taux d'infection
I°	0-9
II°	1-12
III°	9-55

2.2.3 Les infections ostéo-articulaires par contiguïté

Ce type d'IOA regroupe les IOA secondaires à un ulcère de décubitus, les IOA secondaires à un abcès dentaire et les IOA secondaires à une infection des tissus mous. L'infection se propage à partir d'un tissu adjacent au tissu osseux. Le diabète, les vasculopathies et les neuropathies sont des facteurs de risque pour ce type d'IOA (71,73).

Il est estimé qu'environ 15% des personnes atteintes de diabète vont développer un problème infectieux au niveau du pied durant leur vie et, dans un petit nombre de cas, une amputation sera nécessaire éviter la propagation de l'infection. Chez les patients diabétiques, la suspicion d'atteinte osseuse au niveau du pied est envisagée en cas d'inflammation des tissus mous ou d'ulcérations cutanées présentes depuis une semaine ou plus, particulièrement si les lésions se trouvent au niveau de proéminences osseuses (84).

2.2.4 Les infections ostéo-articulaires sur matériel

Les IOAM peuvent concerner les infections liées à la pose d'un implant prothétique comme une prothèse totale de hanche, de genou ou d'épaule mais aussi les infections liées aux dispositifs utilisés pour consolider les fractures, c'est-à-dire les fixateurs externes et les fixateurs internes (vis, plaques d'ostéosynthèse, clous, Schéma 11).

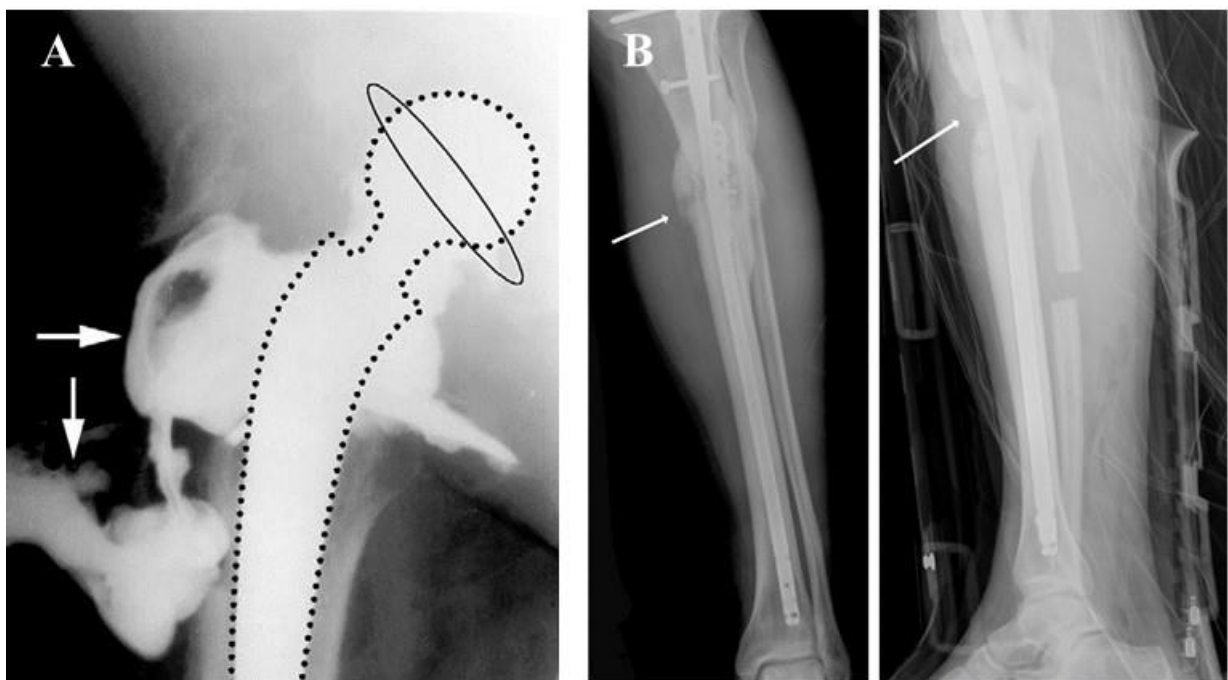


Schéma 11 : Infections ostéo-articulaires sur matériel (IOAM). **A** : infection d'une prothèse totale de hanche. L'arthrographie montre un large abcès péri prothétique (flèches blanches). **B**: infection après la fixation d'une fracture tibiale proximale par des fixateurs internes. La partie infectée a été réséquée après irrigation et débridement. Adapté de *Lew et Waldvogel* (71) et *Calhoun et al.* (85).

Ce type d'IOA est en constante augmentation à cause du vieillissement de la population et d'une demande croissante en chirurgie prothétique orthopédique. Il est estimé qu'en 2030, le nombre d'implantations de prothèse totale de hanche dans le monde sera de 572 000 unités par an, soit une augmentation de 174% par rapport aux chiffres établis en 2005 (Schéma 12). Concernant les prothèses totales de genou, 3,48 millions d'implantations sont envisagées en 2030, soit une augmentation de 643% entre 2005 et 2030 (86).

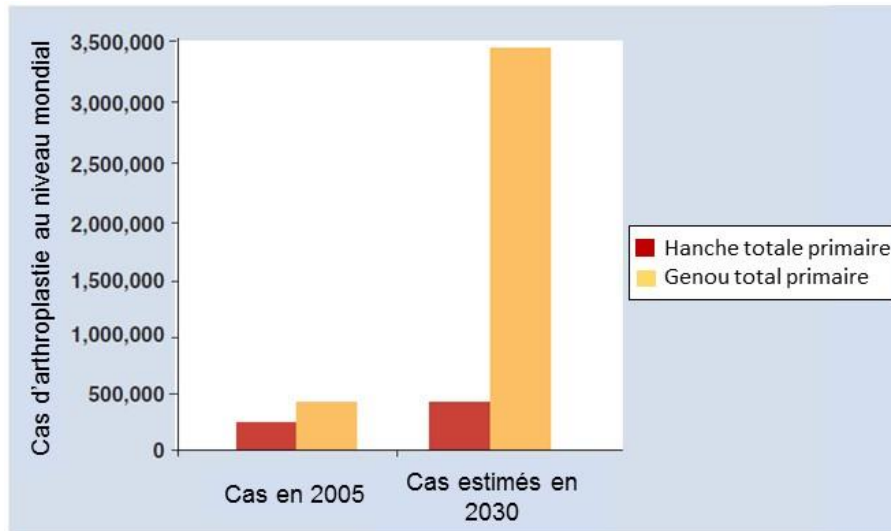


Schéma 12 : Prévisions mondiales du nombre d'arthroplasties (hanche et genou) en 2030, adapté de *Montanaro et al.* (86).

L'IOAM peut survenir lors de l'implantation du matériel. Elle peut aussi se déclarer lors d'une reprise de prothèse ou encore être relative à une contamination par voie hématogène, avec une dissémination à partir d'un foyer infectieux distant vers le dispositif médical implanté (87).

2.3 *Staphylococcus aureus* et les bactéries responsables d'infections ostéo-articulaires

2.3.1 Les bactéries responsables d'infections ostéo-articulaires

Les IOA sont des infections majoritairement bactériennes qui peuvent toucher toute la population, avec une variété d'origines et de sites d'infection (Schéma 13).

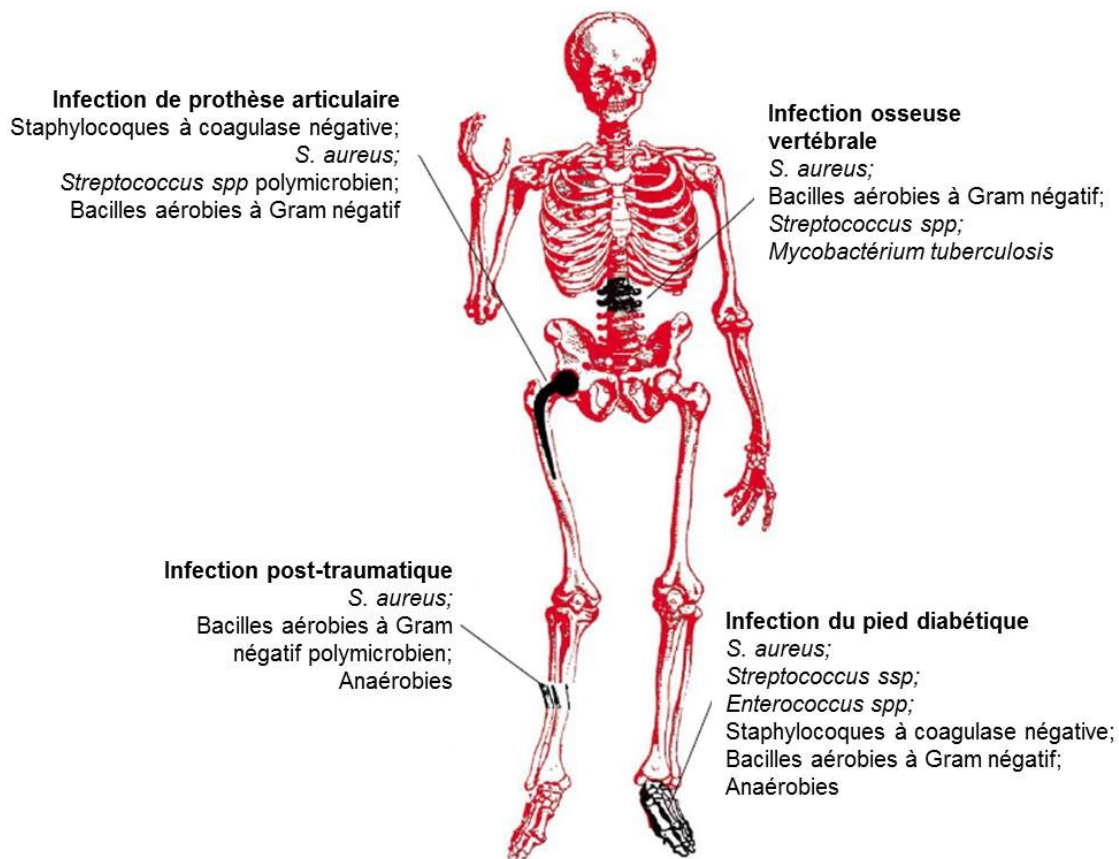


Schéma 13 : Agents bactériens impliqués dans les différents types d'IOA, adapté de *Lew et Waldvogel* (71).

Le genre bactérien le plus incriminé dans les IOA est le genre *Staphylococcus*, principalement l'espèce *S. aureus*. Cet agent pathogène est fréquemment isolé à partir du sang ou du pus chez les patients atteints d'IOA hémotogène (73). Il est aussi majoritairement impliqué dans les infections contiguës au niveau du pied chez les patients diabétiques (84).

Cependant, les staphylocoques à coagulase négative sont plus souvent identifiés que *S. aureus* pour les IOAM, plus particulièrement *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) (73,86). D'autres types de staphylocoques à coagulase négative sont aussi régulièrement impliqués dans les IOAM comme par exemple *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus warneri* et *Staphylococcus capitis* (Tableau 4).

Néanmoins, *Montanaro et al.* ont observé que les IOAM étaient majoritairement dues à *S. aureus* en présence de fixateurs internes et externes (Schéma 14, (86)).

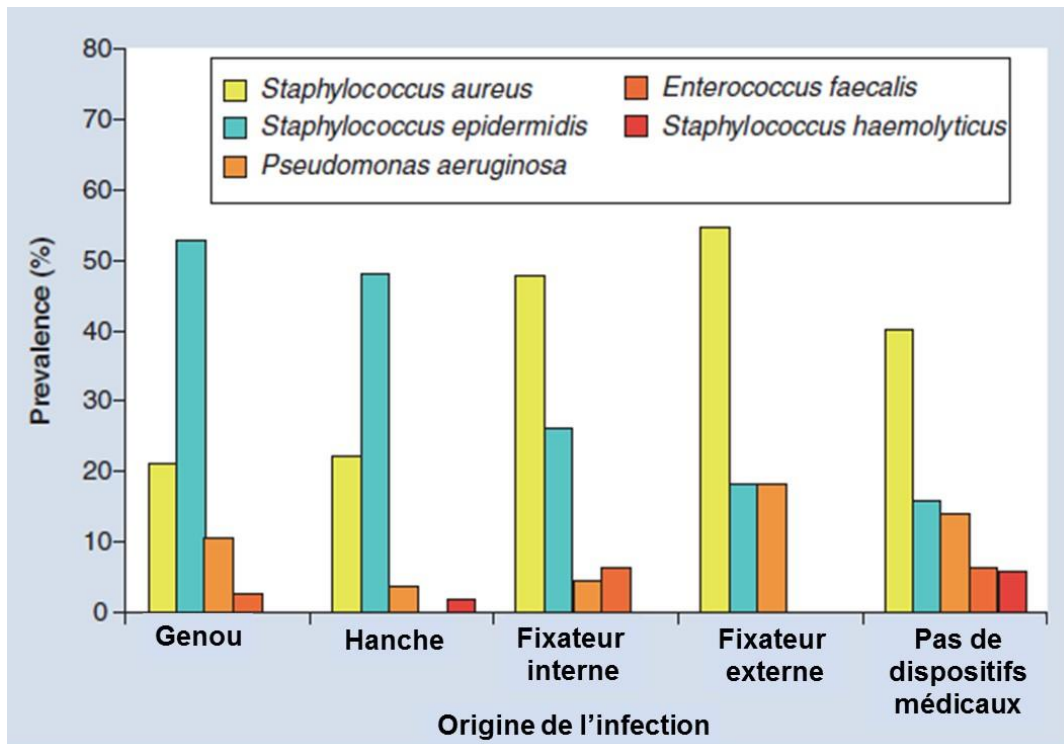


Schéma 14 : Prévalence des 5 agents pathogènes les plus fréquents en fonction de l'origine de l'infection orthopédique. Evaluation à partir de 272 isolats cliniques obtenus de 242 patients entre 2007 et 2011. Adapté de *Montanaro et al.* (86).

Parmi les autres agents pathogènes incriminés dans les IOA, on retrouve des bacilles aérobies à Gram négatif comme par exemple *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella spp.* ou *Acinetobacter baumannii*. Dans l'étude réalisée par *Montanaro et al.*, les infections à *P. aeruginosa* et à *E. coli* représentent respectivement 9,2% et 3,0% des IOA étudiées (86). *Enterococcus faecalis* et *Streptococcus agalactiae*, des cocci à Gram positif font également parties des pathogènes atypiques identifiés dans les IOA (Tableau 3).

Les bactéries anaérobies peuvent aussi être responsables d'IOA. *Propionibacterium sp.* est notamment identifié dans les cas d'IOAM de l'épaule (71).

On peut aussi noter *Mycobacterium tuberculosis* dans les cas d'IOA secondaires à une tuberculose, *Kingella kingae* lors d'infections chez l'enfant ou encore *Aspergillus spp.* ou *Candida albicans* lors d'IOA fongiques chez les patients immunodéprimés (71,73,85).

Tableau 4 : Etiologie des infections orthopédiques(souches échantillonnées entre 2007 et 2011), adapté de *Montanaro et al.* (86).

Microorganisme	Tous		Dispositifs médicaux		Pas de dispositifs médicaux	
	n	%	n	%	n	%
<i>Staphylococcus aureus</i>	95	35,1	52	31,7	43	40,2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	81	29,9	64	39	17	15,9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25	9,2	10	6,1	15	14
<i>Enterococcus faecalis</i>	11	4,1	4	2,4	7	6,5
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	9	3,3	3	1,8	6	5,6
<i>Escherichia coli</i>	8	3	4	2,4	4	3,7
<i>Staphylococcus warneri</i>	8	3	8	4,9	0	0
<i>Staphylococcus hominis</i>	5	1,8	4	2,4	1	0,9
<i>Streptococcus agalactiae</i>	4	1,5	1	0,6	3	2,8
<i>Proteus mirabilis</i>	4	1,5	2	1,2	2	1,9
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	3	1,1	2	1,2	1	0,9
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3	1,1	1	0,6	2	1,9
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	1,1	2	1,2	1	0,9
<i>Staphylococcus capitis</i>	3	1,1	1	0,6	2	1,9
<i>Enterococcus faecium</i>	2	0,7	1	0,6	1	0,9
<i>Morganella morganii</i>	2	0,7	2	1,2	0	0
<i>Staphylococcus cohnii</i>	1	0,4	1	0,6	0	0
<i>Corynebacterium striatum</i>	1	0,4	0	0	1	0,9
<i>Serratia spp.</i>	3	1,1	2 ^φ	1,2	1 [‡]	0,9
Total	271		164		107	

^φ *Serratia marcescens* et une autre espèce de *Serratia* non identifiée
[‡] *Serratia liquefaciens*
DM : dispositifs médicaux

2.3.2 *Staphylococcus aureus*

S. aureus est un membre de la famille des *Micrococcaceae*. C'est un coccus à Gram positif qui s'organise sous forme de grappe. La distinction entre *S. aureus* et les autres staphylocoques se base entre autre sur un résultat positif au test de coagulase, sur la capacité à fermenter le mannitol et sur une pigmentation dorée des colonies. Cet agent pathogène possède un tropisme ubiquitaire et peut provoquer des infections telles que des IOA, des pneumonies, des abcès cutanés, des toxi-infections alimentaires ou des otites (88).

2.3.2.1 La paroi de *Staphylococcus aureus*

La paroi de *S. aureus* est composée majoritairement de peptidoglycane. Le peptidoglycane est constitué d'une alternance de sous-unités polysaccharidiques de N-acétylgulcosamine et d'acide N-acétylmuramique. Les chaînes de peptidoglycane sont liées entre elles par des chaînes térapeptidiques et un pont pentaglycine spécifique de *S. aureus*. Le peptidoglycane peut avoir une activité de type endotoxine et stimuler la production de médiateurs pro-inflammatoires par les macrophages. Les autres composants majoritaires de la paroi de *S. aureus* sont les acides téichoïques-ribitol et l'acide lipotéichoïque. Les premiers sont liés de manière covalente au peptidoglycane alors que le second est ancré dans la membrane cytoplasmique de *S. aureus* via un glycolipide. Selon la souche de *S. aureus* étudiée, celle-ci peut être encapsulée. Cette capsule est de composition polysaccharidique et minimise la phagocytose de *S. aureus* (88).

2.3.2.2 Les protéines de surface de *S. aureus*

S. aureus peut adhérer à des surfaces biotiques comme les composants de la matrice extracellulaire et la surface des cellules, ou à des surfaces abiotiques comme des dispositifs médicaux. De cette phase résulte le pouvoir pathogène de *S. aureus*. En effet, *S. aureus* possède à sa surface un certain nombre de protéines, ancrées dans la paroi, et regroupées sous le terme de MSCRAMM, acronyme anglais pour « *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* » (20). Parmi ces molécules, la protéine de liaison au collagène (Cna), la protéine de liaison à la sialoprotéine osseuse (Bbp), les protéines de liaison à la fibronectine (FnBP A et B), la protéine A (SpA) et le facteur d'agglutination (Clf A) présentent un intérêt dans les IOA (Schéma 15).

Le collagène, majoritairement présent au sein de la MEO, représente un site d'adhésion de choix pour *S. aureus*. Il a été démontré que la présence de Cna à la surface de *S. aureus* est un paramètre favorisant les IOA (89). La sialoprotéine osseuse, autre composant de la MEO, est également une protéine cible pour l'adhésion de *S. aureus* via Bbp. Cette dernière a également été identifiée comme un facteur favorisant les IOA (90). Les FnBP permettent à *S. aureus* de se lier à la fibronectine avec une forte affinité. Au-delà du rôle de molécule d'adhérence, les FnBP favorisent l'internalisation de *S. aureus* au sein des cellules. SpA est la protéine de surface la mieux caractérisée de *S. aureus*. Elle est présente sur 90% des souches cliniques de *S. aureus*.

Elle peut être sécrétée ou bien liée au peptidoglycane. Cette protéine peut se lier aux immunoglobulines et inhiber ainsi l'opsonisation des bactéries par les PNN. SpA est aussi un ligand du récepteur du facteur nécrosant tumoral 1 (TNFR-1) et permet de stimuler la libération de médiateurs pro-inflammatoires lors d'interaction avec des cellules épithéliales pulmonaires ou des ostéoblastes (91,92). Enfin, il a été démontré que le Clf A dans un modèle murin était un facteur de virulence d'arthrite septique (93,94). Le Clf A est notamment identifié comme une protéine de liaison au fibrinogène et favorise l'agrégation plaquettaire (95).

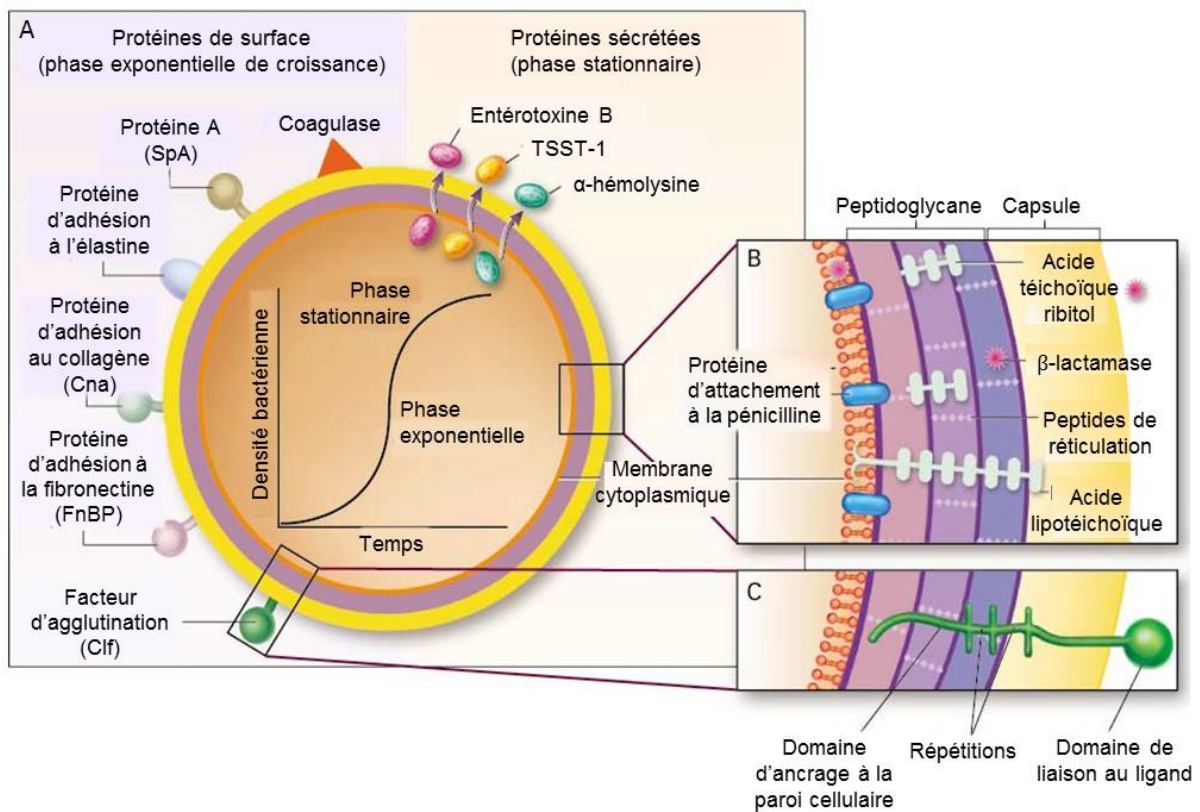


Schéma 15 : Structure de *Staphylococcus aureus* : **A** : protéines de surface et protéines sécrétées. **B** et **C** : coupes de l'enveloppe bactérienne de *S. aureus*. Adapté de Lowy (88).

2.3.2.3 Les exotoxines sécrétées de *Staphylococcus aureus*

S. aureus peut sécréter une grande variété d'exotoxines, notamment un groupe de composés polypeptidiques capables d'endommager la membrane plasmique des cellules de l'hôte. Parmi ces polypeptides, on identifie notamment des toxines qui forment des pores comme l' α -hémolysine, la γ -hémolysine ou la leucocidine de Pantan-Valentine. Il existe aussi la β -hémolysine, qui avec son activité sphingomyélinase, hydrolyse la sphingomyéline, un lipide

présent dans la membrane des cellules de l'hôte. La β -hémolysine est responsable de l'activité hémolytique de *S. aureus*. Une troisième catégorie d'exotoxines est composée des modulines phénol-solubles (PSM). Ces petites molécules cytotoxiques sont classées en deux groupes : les PSM α qui regroupent la δ -hémolysine, les PSM α 1 à 4 ainsi que la PSM-mec et le groupe des PSM β composé de la PSM β 1 et de la PSM β 2 (96).

D'autres exotoxines peuvent être sécrétées par *S. aureus* notamment l'entérotoxine B (SEB) et la toxine du syndrome de choc toxique (TSST-1). Ces deux toxines sont des super-antigènes pyrogènes capables d'induire une prolifération importante de lymphocytes T et une production de médiateurs pro-inflammatoires (88).

2.4 La réponse immunitaire lors d'une infection à *Staphylococcus aureus*

Lorsque les agents pathogènes passent la barrière épithéliale et envahissent des territoires normalement stériles de l'organisme, ils font face aux mécanismes de défense antimicrobiens. Une infection peut être contrôlée soit par une réponse innée soit par une réponse adaptative. La réponse immunitaire adaptative reconnaît les antigènes présents sur les agents pathogènes grâce à des récepteurs présents à la surface des lymphocytes T et B. Cependant, ce type de réaction met plusieurs jours à se mettre en place avant l'éradication des agents pathogènes (97). La réponse immunitaire innée permet quant à elle une réponse plus rapide. Ce système est capable de reconnaître les bactéries et de fournir une première ligne de défense à l'hôte.

La première étape est la reconnaissance du pathogène par les cellules du tissu infecté. Ce rôle peut être rempli par les macrophages résidents dans le tissu, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les thrombocytes ou les cellules des tissus conjonctifs comme les fibroblastes ou les ostéoblastes (98). Cette reconnaissance se fait par l'intermédiaire de motifs, notamment les motifs moléculaires associées aux pathogènes (PAMP), détectés *via* des récepteurs de reconnaissance de pathogènes (PRR) présents sur les cellules. Lors d'une infection par *S. aureus*, les PRR qui vont être mis en jeu sont notamment le récepteur toll-like 2 (TLR-2) et le TNFR-1 qui peuvent interagir respectivement avec l'acide lipotéichoïque et la protéine SpA présents sur la paroi de *S. aureus* (91,92,99). Cette interaction aboutit à la production et la sécrétion d'un large panel de médiateurs inflammatoires dont des cytokines et des chimiokines.

Les cytokines que l'on retrouve majoritairement après une infection à *S. aureus* sont le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6 (98,100). Elles vont permettre de stimuler les différentes cellules qui interviennent dans la réponse immunitaire innée. Les chimiokines quant à elles, sont de petites molécules capables d'initier le recrutement des leucocytes. Les chimiokines CXCL1 et CXCL8 recrutent majoritairement les PNN alors que CCL2, CCL3 et CCL4 ont plutôt un pouvoir attractant vis-à-vis des monocytes et macrophages (101).

Lors d'une infection à *S. aureus*, on observe un recrutement important de PNN (102,103). Après opsonisation des pathogènes, les PNN sont capables de phagocyter *S. aureus* pour le détruire (Schéma 16).

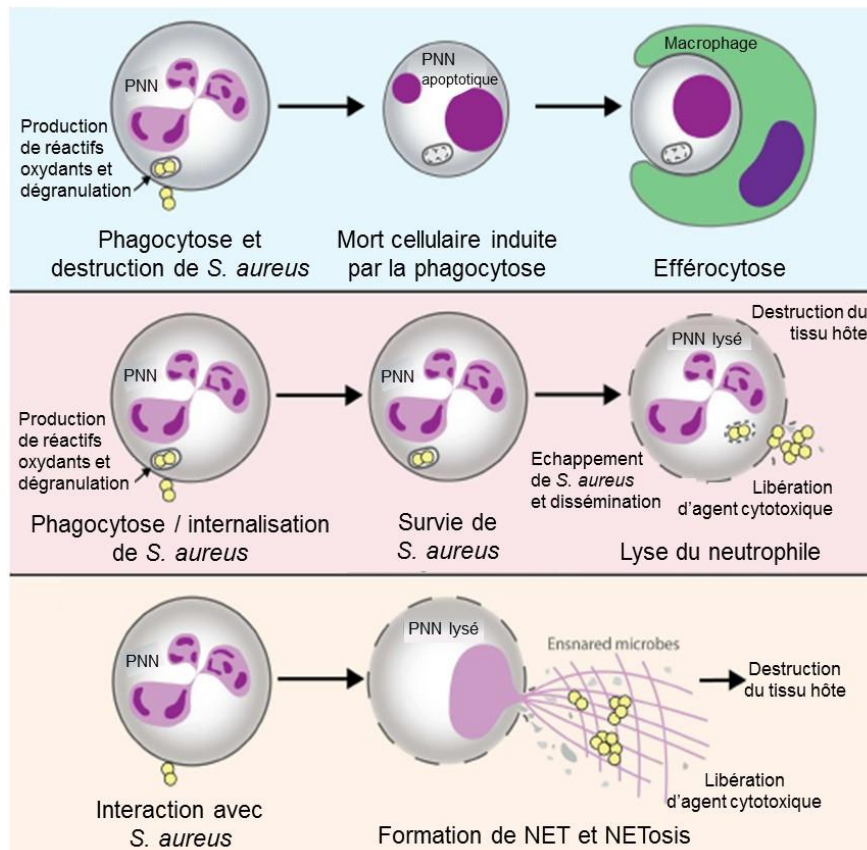


Schéma 16 : Issues possibles lors d'une interaction entre *Staphylococcus aureus* et le polynucléaire neutrophile, adapté de Lu et al. (104).

En effet, après sa phagocytose par les PNN, *S. aureus* est emprisonné au sein d'une vacuole et est dégradé par la libération de réactifs oxydants et de composés antimicrobiens (105). Une fois la lyse des pathogènes réalisée, les PNN entrent en apoptose. Néanmoins après phagocytose, certains *S. aureus* peuvent s'échapper du phagosome et ainsi éviter la lyse. Selon la souche de

S. aureus, ceci peut, d'une part, aboutir à la lyse du PNN, favorisant la libération de *S. aureus* mais aussi la libération du contenu lysosomal, susceptible d'induire un effet néfaste sur l'environnement tissulaire (104,106). D'autre part, *S. aureus* peut aussi persister au sein des PNN. Ceci va lui permettre d'être véhiculé dans tout l'organisme *via* la circulation sanguine puis d'être libéré à distance du foyer primaire. Dans ce cas, le PNN agit comme un cheval de Troie pour *S. aureus* (107). Pour éliminer *S. aureus*, le PNN est aussi capable de déployer des pièges extracellulaires (NET) composé en partie d'ADN. Ce mécanisme, appelé « *NETosis* », permet l'immobilisation et la dégradation de *S. aureus* mais le déploiement du NET entraîne un effet cytolytique sur le PNN (108). Toutefois, ce mécanisme n'est pas encore totalement élucidé (106).

Les cellules de la lignée monocytaire sont les autres cellules primordiales de la réponse immunitaire innée. Elles remplissent trois rôles : comme précisé précédemment, les monocytes circulants ou les macrophages tissulaires peuvent produire des cytokines et chimiokines en réponse à la présence de *S. aureus* afin d'induire le recrutement des PNN, respectivement dans la circulation sanguine et dans le tissu infecté (101). Les macrophages peuvent également phagocyter les PNN apoptotiques après qu'ils aient eux-mêmes phagocytés *S. aureus*. Ce phénomène s'appelle l'efférocytose et marque la résolution de l'infection (106). Enfin, les macrophages peuvent directement phagocyter *S. aureus* même si ce phénomène est moins étudié que la phagocytose par les PNN (109). Toutefois, comme observé précédemment pour les PNN, *S. aureus* est capable de persister au sein des macrophages sans qu'ils ne soient lysés pour être véhiculés dans l'organisme (110).

2.5 Persistance intracellulaire et chronicité des infections osseuses à *Staphylococcus aureus*

Une des caractéristiques de *S. aureus* est sa capacité à développer une infection chronique. D'un point de vue clinique, les IOA peuvent être définies selon le degré de persistance de l'infection. Les IOA aiguës évoluent sur plusieurs jours ou plusieurs semaines alors que les IOA chroniques évoluent sur plusieurs mois ou plusieurs années (71). Au niveau systémique, les IOA chroniques sont caractérisées par la présence de plages de nécrose osseuse appelées « séquestres » (Schéma 17).

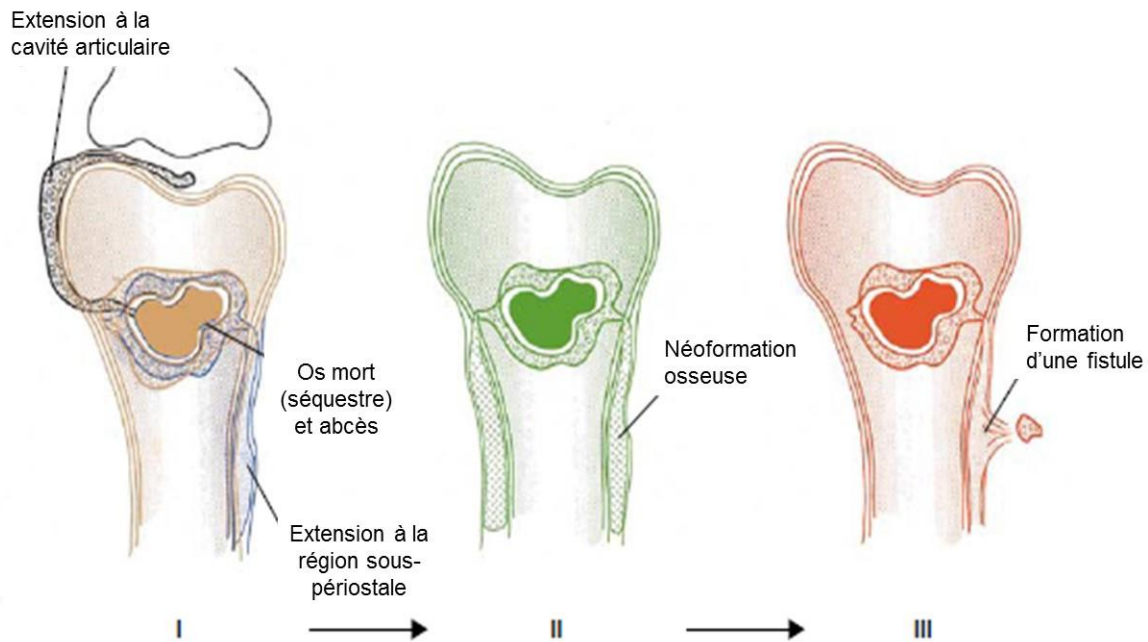


Schéma 17 : Les étapes de progression d'une infection ostéo-articulaire chronique, adapté de *Lew et Waldvogel (71)*.

Les séquestres sont de petits fragments osseux avascularisés et isolés du tissu dont ils sont issus. Cette absence de lien avec le tissu et la circulation sanguine générale crée une sorte de sanctuaire protégeant les microorganismes qui le colonisent contre les cellules du système immunitaire et les antibiotiques (111).

Dans les cas d'IOA chroniques non traitées, les séquestres peuvent avoir deux destins selon leur taille : soit les séquestres de petite taille peuvent être résorbés par un tissu de granulation formé en réponse à l'inflammation, soit une néoformation osseuse va confiner l'extension du séquestre si sa taille est trop importante. Cette néoformation d'os, appelée involucre, permet de maintenir la stabilité mécanique lors de la phase de réparation osseuse. La vascularisation inadéquate suite à la néoformation va favoriser la conservation des séquestres au niveau osseux et le développement de pathologies associées. Le séquestre peut aussi s'étendre au niveau de la corticale osseuse et créer une fistule par effraction de la peau (79). A noter que lorsque le foyer infectieux est proche d'une articulation, l'infection peut se propager au cartilage et favoriser le développement d'une arthrite septique (71).

Au niveau cellulaire, le développement de la chronicité est lié à la capacité de persistance de *S. aureus* au sein des cellules. Traditionnellement considéré comme un pathogène extracellulaire, il est maintenant reconnu que *S. aureus* est capable d'envahir les cellules et de

persister au niveau intracellulaire (112). Ce phénomène est observable dans les cellules phagocytaires professionnelles mais aussi dans les cellules non phagocytaires professionnelles comme par exemple les cellules épithéliales, les cellules endothéliales ou les ostéoblastes (113–115).

Dans le contexte des IOA, l'internalisation de *S. aureus* au sein des ostéoblastes, mais aussi des ostéocytes, favorise la chronicité des infections (116). Les bactéries intracellulaires sont ainsi protégées des cellules immunes et des antibiotiques. Elles peuvent persister au sein du tissu osseux et altérer à long terme l'homéostasie osseuse et la réparation tissulaire (117).

2.6 *Staphylococcus aureus* versus l'ostéoblaste, interaction et conséquences : état de l'art

Tel qu'exposé dans la première partie de cette introduction, les principales cellules osseuses, nommées ostéoblastes et ostéoclastes, interagissent et œuvrent de façon concertée afin d'assurer une formation et une résorption équilibrées de la MEO. Néanmoins, cette homéostasie peut être, en partie, altérée lors des IOA à *S. aureus*, notamment *via* l'induction de plusieurs types de réponse par les ostéoblastes.

En effet, lors d'une infection à *S. aureus*, suite à l'adhérence et/ou l'internalisation de *S. aureus*, les ostéoblastes sont capables d'augmenter leur production de chimiokines, de cytokines et de facteurs de croissance, suggérant que les ostéoblastes pourraient participer aux réponses immunitaires innée et adaptative lors d'une IOA. *S. aureus* est aussi capable de réduire l'activité et la viabilité des ostéoblastes, en induisant des mécanismes dépendants et indépendants de l'apoptose. De plus, l'interaction étroite entre les ostéoblastes et les ostéoclastes est aussi modulée lors d'une infection à *S. aureus*, favorisant une résorption ostéoclastique accrue.

Cette revue, publiée dans *Frontiers in cellular and infection microbiology*, a pour but de fournir un état de l'art de l'interaction entre *S. aureus* et l'ostéoblaste tout en discutant l'impact des traitements antibiotiques et l'utilisation de peptides antimicrobiens.



Staphylococcus aureus vs. Osteoblast: Relationship and Consequences in Osteomyelitis

Jérôme Josse, Frédéric Velard and Sophie C. Gangloff*

EA 4691 Biomatériaux et inflammation en site osseux, Pôle Santé, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France

Bone cells, namely osteoblasts and osteoclasts work in concert and are responsible for bone extracellular matrix formation and resorption. This homeostasis is, in part, altered during infections by *Staphylococcus aureus* through the induction of various responses from the osteoblasts. This includes the over-production of chemokines, cytokines and growth factors, thus suggesting a role for these cells in both innate and adaptive immunity. *S. aureus* decreases the activity and viability of osteoblasts, by induction of apoptosis-dependent and independent mechanisms. The tight relationship between osteoclasts and osteoblasts is also modulated by *S. aureus* infection. The present review provides a survey of the relevant literature discussing the important aspects of *S. aureus* and osteoblast interaction as well as the ability for antimicrobial peptides to kill intra-osteoblastic *S. aureus*, hence emphasizing the necessity for new anti-infectious therapeutics.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, osteoblast, internalization, inflammation, antibiotics, antimicrobial peptide, phenol soluble modulins, small colony variants

OPEN ACCESS

Edited by:

Francois Vandenesch,
University of Lyon, France

Reviewed by:

Silvia T. Cardona,
University of Manitoba, Canada
Sophie Assant,
Centre International de Recherche en
Infectiologie, France

*Correspondence:

Sophie C. Gangloff
sophie.gangloff@univ-reims.fr

Received: 17 September 2015

Accepted: 10 November 2015

Published: 26 November 2015

Citation:

Josse J, Velard F and Gangloff SC
(2015) *Staphylococcus aureus* vs.
Osteoblast: Relationship and
Consequences in Osteomyelitis.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 5:85.
doi: 10.3389/fcimb.2015.00085

INTRODUCTION

Bone is quantitatively the most abundant mineralized tissue in humans. It is composed of cells evolving in a tangle of collagen and non-collagenous proteins, which can be mineralized to form the bone extracellular matrix (BEM). Osteoblasts are the bone forming cells. First, osteoblasts synthesize an organic matrix around themselves and mineralize it to create the mature BEM (Ecarot-Charrier et al., 1983) where they are ultimately integrated as osteocytes (Dallas and Bonewald, 2010). The synthesis of the BEM is balanced by a resorption performed by osteoclasts. Rising from the fusion of monocytic precursors to form giant multinuclear cells, osteoclasts secrete H^+ protons and several proteases to resorb both inorganic and organic parts of the BEM (Edwards and Mundy, 2011). The concomitant bone formation and resorption create perpetual physiological homeostasis.

Osteoblast activity is altered in pathological conditions such as cancers, autoimmune diseases and infections. Osteomyelitis are damaging bone infections, that can lead to sequelae and if uncontrolled, to patients death. During childhood, osteomyelitis are mostly a result of

Abbreviations: *S. aureus*, *Staphylococcus aureus*; BEM, bone extracellular matrix; AMP, antimicrobial peptide; MSCRAMM, microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule; PAMP, pathogen-associated molecular pattern; PRR, pattern recognition receptor; NOD, nucleotide-binding oligomerization domain; NLR, NOD like receptor; TLR, toll like receptor; TNFR-1, tumor necrosis factor receptor 1; TNF- α , tumor necrosis factor α ; NF- κ B, nuclear factor kappa B; MHC, major histocompatibility complex; RANK-L, receptor activator of NF- κ B ligand; OPG, osteoprotegerin; TRAIL, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; DR, death receptor; PGE2, prostaglandin E2; HBD, human β -defensin; MBD, mouse β -defensin.

hematogenous spread from distant infected tissues. In adults, surgical procedures are becoming increasingly responsible for a direct contamination of bone tissue, especially in presence of medical devices (Montanaro et al., 2011). The incidence of osteomyelitis varies from 1 to 55% in open fracture cases as a function of the grade of the fracture (Kim and Leopold, 2012; Hogan et al., 2013). Germ concentration, pathogenicity of the implicated pathogen or systemic factors such as nicotine, obesity or diabetes mellitus can also favor the prognosis of direct osteomyelitis (Hogan et al., 2013). Osteomyelitis are typically of bacterial origin, notably *Staphylococcus* species, where *Staphylococcus aureus* is the most prevalent pathogen (Lew and Waldvogel, 2004), also responsible for various community or hospital-acquired infections like skin abscess, pneumonia or septic arthritis (Lowy, 1998).

Infection of osteoblasts by *S. aureus* is a keystone, a determining element in the development of osteomyelitis in bone tissue and as such this review focuses on the interaction between *S. aureus* and the osteoblasts that play an important role in bone homeostasis. *S. aureus* directly interacts with osteoblasts both in the extracellular and intracellular space following its internalization (Hudson et al., 1995). Each interaction specifically leads to the induction of various and distinct responses from the osteoblasts.

S. aureus possesses on its surface an arsenal of pathogen-associated molecular patterns (PAMP) that interact with osteoblasts to induce the production of chemokines and cytokines that then recruit and activate innate and adaptive immune cells (Heilmann, 2011; Claro et al., 2013). In addition to inflammatory response, *S. aureus* can also induce the death of osteoblasts and increase osteoclastogenesis through osteoblasts stimulation thus resulting in an imbalanced bone homeostasis (Tucker et al., 2000; Widaa et al., 2012). The combination of these effects leads to inflammatory bone loss.

Recent studies have consequently focused on antibiotics and their ability to kill intracellular *S. aureus* as well as on antimicrobial peptides (AMP) that can be produced by osteoblasts (Varoga et al., 2009; Zhu et al., 2014) or chemically synthesized (Choe et al., 2015).

S. aureus embodies a major clinical challenge, as chronic osteomyelitis with *S. aureus* are difficult to treat with antibiotics (Spellberg and Lipsky, 2012). The ability of *S. aureus* to survive in osteoblasts after internalization can protect it from immune cells but also from the antibiotics that may not penetrate the cells (Valour et al., 2015a).

We hereby provide an overview of the relationship and interaction between *S. aureus* and osteoblasts, from the onset of the infection to new therapeutics.

BONE EXTRACELLULAR MATRIX, A NICHE FOR *S. AUREUS*

The capacity of *S. aureus* to infect bone—and more specifically the osteoblast—is tightly correlated to its ability to bind the BEM components, notably *via* multiple adhesins called the MSCRAMMs which stands for microbial surface components

recognizing adhesive matrix molecules (Heilmann, 2011). The proteins and glycans present in the BEM are all potential *S. aureus* binding sites. The most studied of these are type I collagen, bone sialoprotein, osteopontin, and fibronectin because they directly interact with *S. aureus* (Figure 1).

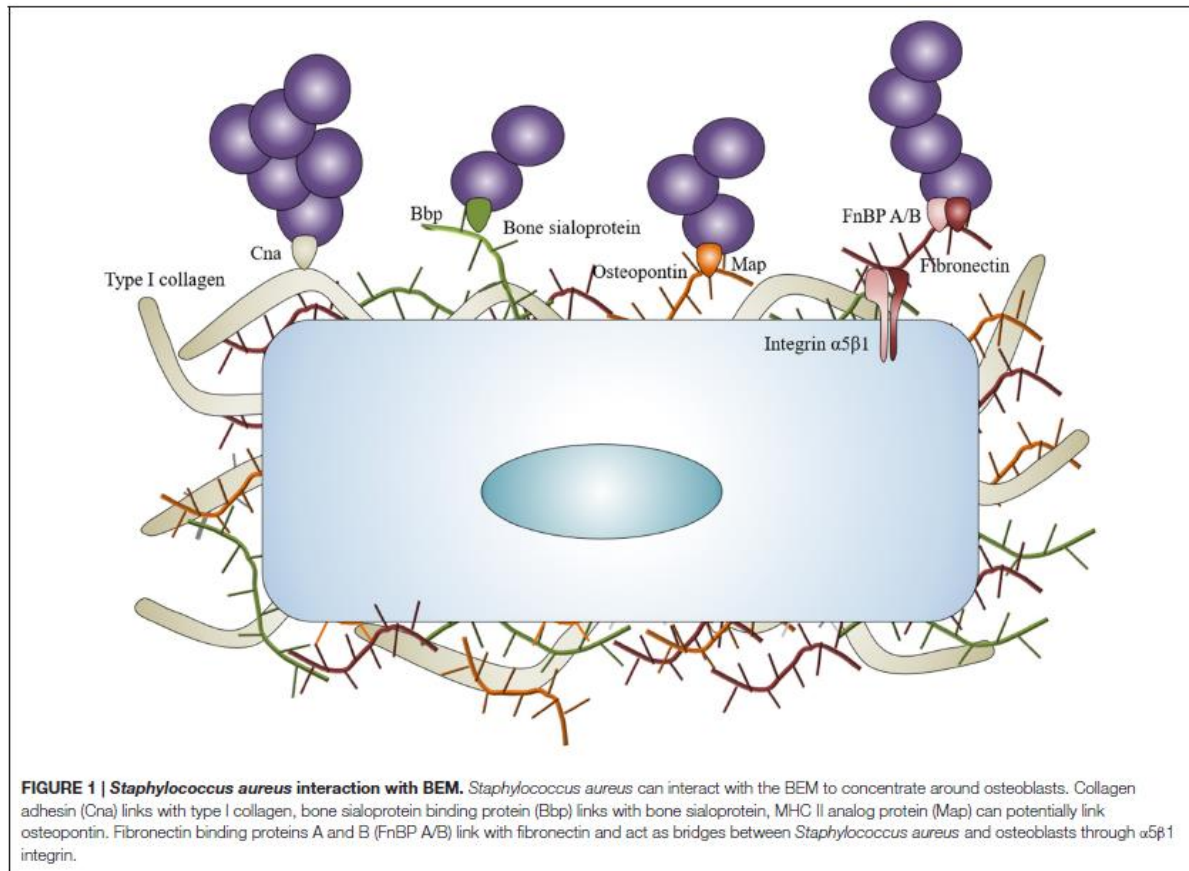
Type I collagen represents approximately 90–95% of the organic fraction of the BEM, thus supporting a major role for the collagen adhesin (Cna) of *S. aureus* in the pathogenesis of osteomyelitis. Cna has resulted in being pivotal for settling osteomyelitis through hematogenous spread in a murine model (Elasri et al., 2002). Cna is highly expressed during the stage of exponential growth of *S. aureus* (Gillaspay et al., 1997) and Cna-positive strains are often associated with a slime formation, a state that enhances the pathogenicity of *S. aureus* in implant-associated osteomyelitis (Montanaro et al., 1999).

The bone sialoprotein represents however another means for *S. aureus* to bind the BEM. This protein constitutes approximately 8% of all non-collagenous proteins found in bone (Fisher et al., 1990). The bone sialoprotein binding protein (bbp) is a member of the staphylococcal serine-aspartate dipeptide repeat (sdr) family (Tung et al., 2000) and is one of the first adhesins studied for its potential role in osteomyelitis caused by *S. aureus* (Rydén et al., 1989). Bbp could be considered as an adhesin with several ligands due to the recognition of fibrinogen in a non-osseous context (Vazquez et al., 2011). The presence of both *cna* and *bbp* genes in *S. aureus* is considered as a major marker of virulence in isolates from implant-associated osteomyelitis (Campoccia et al., 2009).

An involvement of *S. aureus* Map—a functional bacterial analog to mammalian MHC class II molecules—in osteomyelitis is also speculated in regard to its ability to bind recombinant osteopontin (Jönsson et al., 1995). The ability of *S. aureus* to bind to biological osteopontin has nevertheless not been reported yet.

Fibronectin is the most studied component of the extracellular matrix in staphylococcal infection, especially in osteomyelitis. Fibronectin acts as a bridge between *S. aureus* and the osteoblasts. On the one hand, *S. aureus* holds two types of proteins that can bind to fibronectin on its surface: the fibronectin binding proteins A and B (FnBP A/B). On the other hand, fibronectin connects to the osteoblasts through the $\alpha 5\beta 1$ integrin. This “fibronectin bridge” allows the attachment of *S. aureus* and also favors its internalization by non-phagocytic cells like many cell types (Dziewanowska et al., 1999; Peacock et al., 1999; Ahmed et al., 2001; Kintarak et al., 2004).

BEM attachment represents a major step in osteomyelitis onset as 10–60% of studied *S. aureus* clones express *cna*, *bbp*, and *fnbB* genes and 100% express *fnbA* or *clumping factor A and B* genes (Otsuka et al., 2006; Campoccia et al., 2009; Atshan et al., 2012; Post et al., 2014). In specific osteomyelitis case, *cna* and *bbp* genes were more frequently identified in non-implant related infections than in implant-related infections (Post et al., 2014). Of note, expression of *cna* gene is increased in methicillin resistant clones compared with methicillin sensible ones (Atshan et al., 2012). To illustrate this point, the combination of *cna* and *bbp* genes characterizes ST30—a pandemic community-acquired methicillin resistant *S. aureus* that causes osteomyelitis—(Otsuka et al., 2006; Dhanoa et al., 2012).



BEM is therefore an important actor in the first step of *S. aureus* infection as it is produced by and connected to osteoblasts. It allows the bacteria to bind and concentrate around osteoblasts, particularly for staphylococcal clones possessing *cna*, *bbp*, and/or *fnbB* genes.

INVASION/INTERNALIZATION OF *S. AUREUS* INTO OSTEOSTBLASTS

Ogawa et al. were the first to report the capacity of endothelial cells to “engulf” *S. aureus* (Ogawa et al., 1985). It has been shown since this observation that *S. aureus* can adhere to and invade cultured osteoblasts (Table 1), as well as osteoblasts and osteocytes *in vivo* (Hudson et al., 1995; Reilly et al., 2000; Bosse et al., 2005).

The ability of fibronectin to link with $\alpha 5\beta 1$ integrin has currently been considered as the most common pathway for the internalization of *S. aureus* in endothelial cells and osteoblasts (Figure 2). Though this mechanism is specific to *S. aureus* (Khalil et al., 2007), deleting FnBP A/B in *S. aureus* does not completely abrogate its internalization by osteoblasts, suggesting

the involvement of other mechanisms in this process (Ahmed et al., 2001). Cna and Bbp actually favor the FnBP-mediated internalization (Testoni et al., 2011) whereas other MSCRAMMs of *S. aureus* are involved in integrin-mediated internalization (Hirschhausen et al., 2010; Zapotoczna et al., 2013). Other BEM components like collagen or bone sialoprotein, also bind to multiple integrins supporting the possibility of still unknown “MSCRAMM/BEM component/integrin” bridge systems to initiate the internalization of *S. aureus* by osteoblasts (Grzesik and Robey, 1994).

Independently of the extracellular events, the involvement of the cytoskeletal elements, particularly actin microfilaments, has been shown during the internalization of *S. aureus* (Ellington et al., 1999; Jevon et al., 1999; Figure 2). In addition, the internalization process of *S. aureus* can occur with dead bacteria but not dead osteoblasts. This suggests that the internalization process is more an active cellular mechanism rather than an active bacterial mechanism (Hudson et al., 1995).

Internalization of *S. aureus* by osteoblasts is a key element in the spreading of the infection. It allows *S. aureus* to persist inside osteoblasts—protected from the immune system—and it gives to *S. aureus* the opportunity to sustain the infection.

TABLE 1 | *Staphylococcus aureus* internalization by cultured osteoblasts.

Cells	Strains	MOI	Observations	Author/Year
CECOs	Lab	-	Adherence, internalization and intracellular survival of <i>Staphylococcus aureus</i> inside osteoblasts	Hudson et al., 1995
MC3T3-E1	UAMS-1	-	Involvement of actin microfilaments, microtubules and clathrin-coated pits in the internalization of <i>Staphylococcus aureus</i> by osteoblasts	Ellington et al., 1999
MG-63, NHOs	Lab, Clinic	30:1	Role of cytoskeleton of osteoblasts, notably actin microfilaments, in internalization of <i>Staphylococcus aureus</i>	Jevon et al., 1999
MG-63	Lab	300:1	Role of fibronectin binding proteins A/B (FnBP A/B) in the internalization of <i>Staphylococcus aureus</i> in osteoblasts	Ahmed et al., 2001
NHOs	UAMS-1	25:1, 75:1, 250:1	Release of intracellular <i>Staphylococcus aureus</i> by dead osteoblasts and ability to re-infect new osteoblasts	Ellington et al., 2003
MG-63	Lab	300:1	Correlation between SigB expression in <i>Staphylococcus aureus</i> and its capacity for internalization inside osteoblasts	Nair et al., 2003
MG-63	Lab	50:1, 200:1, 500:1	Internalization of <i>Staphylococcus aureus</i> into osteoblasts through a fibronectin bridge to integrin $\alpha 5 \beta 1$	Khalil et al., 2007
MG-63	Clinic	-	Synergistic role of Cna and Bbp adhesins in the initial adhesion of <i>Staphylococcus aureus</i> to osteoblasts, favoring the subsequent FnBPA-mediated internalization.	Testoni et al., 2011
pHOB	Lab, Clinic	50:1	<i>Staphylococcus aureus</i> can persist within osteoblasts for several weeks. Persistence induces bacterial phenotypic diversity, including SCV phenotypes, accompanied by changes in virulence factor expression	Tuchscher et al., 2011
MG-63	Lab	10:1	Evidence of a trafficking of intracellular <i>Staphylococcus aureus</i> into the late endosomal/lysosomal compartment in osteoblasts	Jauregui et al., 2013
UMR-106	Lab	100:1, 500:1, 1000:1	Internalization and survival of <i>Staphylococcus aureus</i> within osteoblasts and macrophages led to differential responses	Hamza and Li, 2014
pHOB	Lab, Clinic	50:1	Chronic osteomyelitis isolates were characterized by a high host cell invasion rate, low cytotoxicity and the ability to persist and adapt within osteoblasts through SCVs formation	Kalinka et al., 2014
pHOB	Lab, Clinic	50:1	Sigma Factor SigB is an essential factor that enables <i>Staphylococcus aureus</i> to switch from the highly aggressive phenotype that settles an acute infection to a silent SCV-phenotype that allows for long-term intracellular persistence	Tuchscher et al., 2015
pHOB	Lab, Clinic	50:1	<i>Staphylococcus aureus</i> continuously upregulated the expression of SigB during intracellular persistence. The increased SigB expression was accompanied by upregulation of adhesins and downregulation of toxins, which are characteristic for SCVs	Tuchscher and Löffler, 2015
MG-63	Clinic	100:1	Lack of delta-toxin production was significantly associated with osteomyelitis chronicity, osteoblast invasion and biofilm formation	Valour et al., 2015b

MOI, Multiplicity of infection (number of bacteria per cell); CECO, Chick embryo calvaria osteoblasts; NHOs, Normal human osteoblasts; pHOB, Primary culture of human osteoblasts; MC3T3-E1, Mouse calvaria cell line; MG-63, Human osteosarcoma cell line; UMR-106, Rat osteosarcoma cell line; Lab, Laboratory strains of *Staphylococcus aureus* (purchased from ATCC, NCTC, ...); Clinic, Strain of *Staphylococcus aureus* isolated from osteomyelitic patients; UAMS-1, Most studied laboratory strain of *Staphylococcus aureus* in bone infection model.

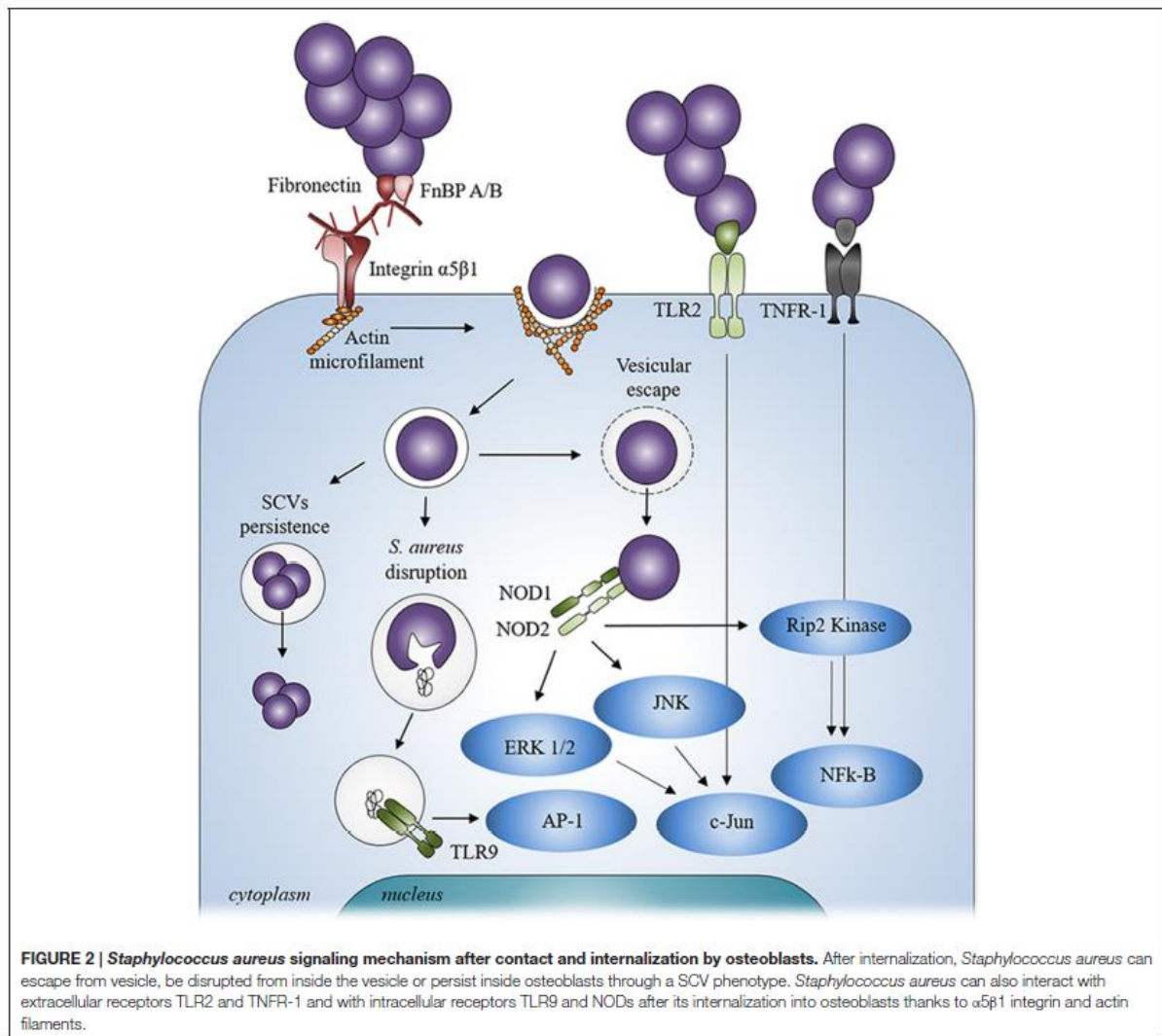
INTRACELLULAR *S. AUREUS* AND PERSISTENCE INTO OSTEOBLASTS

S. aureus can be localized in vesicles once inside the osteoblasts (Figure 2). A co-localization of fluorescent intracellular *S. aureus* and a lysosomal-associated membrane marker highlighted the trafficking of live bacteria into the late endosomal/lysosomal vesicles in osteoblasts. This hints to suggest that *S. aureus* survives inside the vesicles (Jauregui et al., 2013). Moreover, a recent study shows that internalization of *S. aureus* is higher in macrophages—a typical professional phagocytic cells—than in osteoblasts whereas the percentage of intracellularly surviving *S. aureus* was higher in osteoblasts than in macrophages (Hamza

and Li, 2014). As non-professional phagocytic cells, the lack of an effective intracellular bacterial clearance program in osteoblasts may allow *S. aureus* to survive longer inside the latter. The ability to survive inside osteoblasts is nevertheless explained by the exit of *S. aureus* from the vesicles and its release in the cytoplasm to escape proteolytic activity of the lysosome.

There are several types of membrane-damaging factors such as hemolysins, bi-component leukocidins and phenol soluble modulins (PSM) among *S. aureus* arsenal of virulence factors (reviewed by Vandenesch et al., 2012). These factors are involved in the escape of *S. aureus* from intracellular vesicles.

PSM α —a member of the PSM family—has been observed to favor the escape of *S. aureus* from vesicles to the cytoplasm in



different types of cell line (Grosz et al., 2014). In HeLa cells, a similar mechanism of vesicular escaping has been also identified for either PSM β or δ -toxin. These two members of the PSM family make the escape possible from the vesicles in synergy with β -toxin (Giese et al., 2011).

PSM α has been shown to mediate the cytotoxicity for intracellular *S. aureus* in osteoblast/*S. aureus* specific interaction (Cassat et al., 2013; Rasigade et al., 2013). Valour et al. more recently demonstrated that lack of δ -toxin in clinical isolates from *S. aureus* bone and joint infections was correlated with the chronicity of the infection (Valour et al., 2015b).

A tight relationship exists between vesicular escape, cytotoxicity, and membrane-damaging virulence factors. We can easily assume that PSMs allow the escape from the vesicle and then acts on the cell membrane so as jeopardize osteoblasts. This

phenomenon needs some investigations with regards to the *S. aureus*/osteoblast interaction.

In addition to the vesicular escape, intracellular persistence of *S. aureus* inside osteoblasts is also supported by the presence of small colony variants (SCV). SCVs are a slow-growing subpopulation of bacteria with atypical colony morphology on agar plates and unusual biochemical characteristics. SCVs consist of higher capacities for intracellular persistence and are less liable to antibiotics than their wild-type counterparts (Proctor et al., 2006). Involvement of SCVs in intracellular persistence might be due to a better susceptibility to host uptake and/or a selection of SCVs due to intracellular environment properties (Proctor et al., 2014). SCVs were observed in *in vitro* models of osteoblast/*S. aureus* interaction (Valour et al., 2015a,b). A high percentage of SCVs was correlated with less cytotoxicity of

osteoblasts in isolates from chronic osteomyelitis with *S. aureus* (Kalinka et al., 2014). In this context, Sigma Factor SigB of *S. aureus* was shown to be an essential factor that leads to *S. aureus* to switch from the highly aggressive phenotype that settles an acute infection to a silent SCV-phenotype that leads to a long-term intracellular persistence (Tuchscherer et al., 2015). A continuous upregulation of SigB expression during intracellular persistence was correlated with the upregulation of adhesins and downregulation of toxins, which are characteristic for SCVs (Tuchscherer and Löffler, 2015). The impact of SigB in *S. aureus* internalization by osteoblasts was already observed more than a decade ago (Nair et al., 2003). Moreover, SCVs were observed to rapidly revert to the fully virulent wild-type form when leaving the intracellular location and infecting new cells (Tuchscherer et al., 2011).

Membrane-damaging virulence factors and SCVs are major parameters in intracellular persistence of *S. aureus* inside osteoblasts. On the one hand, PSMs make the escape from the intracellular vesicle to the cytoplasm easier but also increase the osteoblast death. On the other hand, SCVs can easily persist inside osteoblasts thanks to their lowered virulence factors.

RECEPTORS INVOLVED IN THE INTERACTION BETWEEN *S. AUREUS* AND OSTEOBLASTS

In addition to binding to the BEM, *S. aureus* can also directly stimulate osteoblasts, mostly through its PAMPs, leading to various cellular responses (summarized in Table 2). The PAMPs can interact with the osteoblasts pattern recognition receptors (PRR) such as Toll-like receptors (TLR) and nucleotide-binding oligomerization domains (NOD) like receptors (NLR), as well as with the tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR-1; Figure 2).

TLR is a family of thirteen membrane-bound PRRs that can interact with different bacterial components (Kawai and Akira, 2010). TLR-2, TLR-4, TLR-5, and TLR-9 have been observed in osteoblasts. TLR-2 is an extracellular receptor that can recognize the PAMPs from *S. aureus* (Fournier, 2012). It induces the release of AMPs as well as the induction of osteoblast apoptosis following its activation by *S. aureus* (Varoga et al., 2009; Chen et al., 2014). TLR-4 and TLR-5 take part in responses toward Gram negative bacteria, by respectively recognizing LPS and flagellin but are not involved in *S. aureus*/osteoblast interaction (Kikuchi et al., 2001; Madrazo et al., 2003).

As opposed to TLRs -2, -4, and -5, TLR-9 is an intracellular member of the TLR family. It is bound to the membrane of intracellular vesicle. TLR-9 recognizes the CpG oligodeoxynucleotides of bacterial DNA and is able to detect the presence of *S. aureus* DNA (Zou et al., 2003). This can however occur but after the disruption or disintegration of *S. aureus* within the intracellular vesicles, leading to the release of its DNA that then binds to TLR-9 and induces the activation of signaling cascades (Wolf et al., 2011; Figure 2).

As above mentioned, intracellular *S. aureus* can also escape from a vesicle and be released into the cytosol of osteoblasts following its internalization. *S. aureus* can induce in this case

a response through the NLRs, a family of 22 intracellular PRRs (Figure 2), NOD1, NOD2, NLRP3, and NLRC4 have been studied in osteoblasts among the latter family. Over-expression of NOD1 and NOD2 was assessed in osteoblasts infected by intracellular *S. aureus* and led intracellular signaling to be activated and to the production of immune molecules (Marriott et al., 2005). Another study focusing on NOD2 backs the idea that this NLR may serve differential roles in osteoblasts, promoting inflammatory responses to invasive bacteria while tempering cell responses to extracellular and/or passively internalized bacterial species, such as *S. aureus* (Chauhan and Marriott, 2010). Two other NLRs, NLRP3, and NLRC4, were also evidenced in osteoblasts. NLRP3 is expressed in osteoblasts whereas NLRC4 expression was not found. The role of NLRP3 in bacteria-related osteoblast death was studied for the invasive bacteria *Salmonella enterica* but not for *S. aureus* (McCall et al., 2008).

It has been recently reported that *S. aureus* can also interact through the extracellular TNFR-1 on epithelial cells and osteoblasts independently from PRRs such as TLRs and NLRs (Gómez et al., 2004; Claro et al., 2013). Originally described as an exclusive receptor for the Tumor Necrosis Factor α (TNF- α), it was shown that TNFR-1 interacts with the protein A of *S. aureus* and may cause the release of cytokines, the apoptosis of osteoblasts, or an unbalanced bone homeostasis (Claro et al., 2011, 2013; Widaa et al., 2012).

It was proved that many signaling pathways are activated in *S. aureus*-infected osteoblasts including ERK 1/2, JNK, c-Jun, AP-1, Rip2 Kinase and NF- κ B following the interaction with PRRs or TNFR-1, (Ellington et al., 2001; Wright and Friedland, 2002; Marriott et al., 2005; Ning et al., 2010; Claro et al., 2013; Figure 2). *S. aureus* can virtually activate different signaling pathways through either extracellular or intracellular receptors. This combination of signaling mechanisms highlights the diversity and the complexity of the osteoblast response to various signals and/or bacterial infections.

IMPLICATION OF THE *S. AUREUS*-CHALLENGED OSTEOBLASTS IN THE IMMUNE RESPONSE

Following contact/internalization of *S. aureus*, the first line of defense of the osteoblasts is to secrete inflammatory factors like cytokines, chemokines and growth factors, all of which are able to activate and recruit immune cells from the innate or adaptive immune systems (Turner et al., 2014; Figure 3).

More specifically, the osteoblast production of IL-6, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), and CCL5 (RANTES) increases following *S. aureus* infection. These mediators are able to recruit and activate macrophages (Bost et al., 1999, 2001; Ning et al., 2011; Dapunt et al., 2014). An over-production of G-CSF and GM-CSF—two growth factors that favor the maturation of leukocytes—has also been demonstrated (Bost et al., 2000). CXCL8 (IL-8) and CXCL2 (MIP-2 α also called GRO- β)—two neutrophil chemoattractants - are also up-regulated during osteoblasts/*S. aureus* interaction (Wright and Friedland, 2002, 2004; Dapunt et al., 2014). Through releasing these mediators,

TABLE 2 | *In vitro* consequences of *Staphylococcus aureus*/osteoblast interaction.

Cells	Strains	MOI	Observations	Author/Year
MNCOs, NHOs	UAMS-1	25:1, 75:1, 250:1	Upregulation of expression and release of IL-6 and IL-12 in infected osteoblasts	Bost et al., 1999
MNCOs, NHOs	UAMS-1	25:1, 75:1, 250:1	Upregulation of expression and release of GM-CSF and G-CSF in infected osteoblasts	Bost et al., 2000
MC3T3-E1	UAMS-1	250:1	Intracellular <i>Staphylococcus aureus</i> induces apoptosis of osteoblasts	Tucker et al., 2000
MNCOs, NHOs	UAMS-1	25:1, 75:1, 250:1	Induction of expression and release of TRAIL in infected osteoblasts	Alexander et al., 2001
MNCOs, NHOs	UAMS-1	25:1, 75:1, 250:1	Upregulation of expression and release of MCP-1 in infected osteoblasts, but not IL-3	Bost et al., 2001
MNCOs, NHOs	UAMS-1,	25:1, 75:1, 250:1	Increase of phosphorylation of ERK 1 and 2 and activation of c-jun in <i>Staphylococcus aureus</i> -infected osteoblasts	Ellington et al., 2001
MG-63, NHOs	Clinic	10:1, 1:1	Upregulation of expression and release of IL-8, IP-10, RANTES, MCP-1 in infected osteoblasts	Wright and Friedland, 2002
MNCOs, NHOs	UAMS-1	75:1, 250:1	Upregulation of expression and release of IP-10 in infected osteoblasts	Gaspar et al., 2002
MNCOs, NHOs	UAMS-1	25:1, 75:1, 250:1	Upregulation of expression of IL-1 β and IL-18 in infected osteoblasts, but no release of the related proteins in spite of the presence of caspase I	Marriott et al., 2002
MNCOs, NHOs	UAMS-1	25:1, 75:1, 250:1	Expression of TRAIL in infected osteoblasts induces apoptosis and activation of caspase-8	Alexander et al., 2003
MNCOs, NHOs	UAMS-1	25:1, 75:1, 250:1	Upregulation of expression and production of CD40 in infected osteoblasts and mediation of cytokine induction	Schrum et al., 2003b
MNCOs, NHOs	UAMS-1	25:1, 75:1, 250:1	Upregulation of mRNA and surface expression of MHC II in infected osteoblasts	Schrum et al., 2003a
MNCOs	Bacterial DNA	-	Induction of osteoclastogenesis by ligation of bacterial DNA upon TLR-9 in osteoblasts	Zou et al., 2003
MG-63, NHOs	Clinic	10:1, 1:1	Effect of Th2 cytokines, PGE2 and dexamethasone on release and expression of RANTES, MCP-1, IP-10, IL-8 from infected osteoblasts	Wright and Friedland, 2004
MNCOs	UAMS-1	25:1, 75:1, 250:1	Stimulation of Nod1 and Nod2 by intracellular <i>Staphylococcus aureus</i> and related cytokine release	Marriott et al., 2005
MNCOs, NHOs	UAMS-1	125:1	Decrease of sensibility to antibiotics for intracellular established <i>Staphylococcus aureus</i>	Ellington et al., 2006
MNCOs, NHOs	UAMS-1, Lab	25:1, 75:1	Expression of TRAIL is observed in both infected and uninfected osteoblasts in infected cultures	Reott et al., 2008
MNCOs,	UAMS-1, Clinic	25:1, 75:1, 250:1	Upregulation of expression and production of RANK-L and production of PGE2 via COX-2 activation in infected osteoblasts	Somayaji et al., 2008
hFOBs	-	Supernatant	Up-regulation of the production of HBD-2 by osteoblasts challenged with <i>Staphylococcus aureus</i> supernatants	Varoga et al., 2008
SaoS-2, NHOs	-	Supernatant	Production of HBD-3 by osteoblasts via TLR2 after stimulation with <i>Staphylococcus aureus</i> supernatant	Varoga et al., 2009
MNCOs	UAMS-1	25:1, 75:1, 250:1	Modulation of osteoblast response to <i>Staphylococcus aureus</i> through NOD2	Chauhan and Marriott, 2010
SV40 hOBs	UAMS-1	250:1	Release of MCP-1 and IL-6 in infected osteoblasts through NF-kB regulation	Ning et al., 2010
SV40 hOBs	UAMS-1	250:1	Necessity of attachment of <i>Staphylococcus aureus</i> to osteoblasts but not internalization for activation of NF-kB	Ning et al., 2010
MNCOs, NHOs	UAMS-1, Lab	25:1, 75:1, 250:1	Expression of TRAIL death receptors, DR4 and DR5, and decrease of OPG production in infected osteoblasts	Young et al., 2011
MC3T3-E1	Lab	-	Induction of osteoblast apoptosis via Caspase-3 and expression of RANK-L thanks to the binding of SpA from <i>Staphylococcus aureus</i> to TNFR-1 of osteoblasts	Claro et al., 2011
MC3T3-E1	Lab	-	Inhibition of the osteoblast proliferation, induction of the migration of pre-osteoclasts and osteoclastogenesis through SpA from <i>Staphylococcus aureus</i>	Widaa et al., 2012
MC3T3-E1, SaoS-2	Clinic	Supernatant	Dose-dependent cytotoxicity of PSM α of <i>Staphylococcus aureus</i> on osteoblasts	Cassat et al., 2013

(Continued)

TABLE 2 | Continued

Cells	Strains	MOI	Observations	Author/Year
MC3T3-E1	Lab	-	SpA binds to TNFR-1 which activates NF-κB and the release of IL-6	Claro et al., 2013
MC3T3-E1	Lab	100:1	PVL, SpA and Coa of <i>Staphylococcus aureus</i> induce apoptosis and upregulate RANK-L expression in osteoblasts	Jin et al., 2013
MG-63	Lab, clinic	100:1	Killing effect of PSMα secreted by intracellular <i>Staphylococcus aureus</i> on osteoblasts	Rasigade et al., 2013
MC3T3-E1	Lab	Supernatant	Induction of production of MDB-14 (a murine ortholog HDB-3) by <i>Staphylococcus aureus</i> -infected osteoblasts through MAPK and NF-κB pathways	Zhu et al., 2013
NHOs	UAMS-1, clinic	Biofilm supernatant	Decrease of osteoblast viability, inhibition of osteogenic differentiation and increase of RANKL expression by osteoblasts by biofilm components of <i>Staphylococcus aureus</i>	Sanchez et al., 2013
MC3T3-E1	Lab	100:1	Apoptosis and decrease of osteogenic differentiation in response to <i>Staphylococcus aureus</i> through TLR2 expression and JNK activation	Chen et al., 2014
Primary osteoblasts	Lab	20:1, 100:1, 500:1	Production of CCL2 and CXCL3 by osteoblasts following stimulation by <i>Staphylococcus aureus</i>	Dapunt et al., 2014
MC3T3-E1	Lab	100:1	Expression of miR-24 was significantly down-regulated in <i>Staphylococcus aureus</i> -infected osteoblasts compared with untreated control cells. Overexpression of miR-24 could reduce the effects of <i>Staphylococcus aureus</i>	Jin et al., 2015

MOI, Multiplicity of infection (number of bacteria per cell); MNCOs, Mouse neonate calvarial osteoblasts; NHOs, Normal human osteoblasts; MC3T3-E1, Mouse calvaria cell line; MG-63, Human osteosarcoma cell line; SaoS-2, Human osteosarcoma cell line; hFOB3, Human fetal osteoblastic cell line; SV40 hOBs, Human osteoblastic cell line; Lab, Laboratory strains of *Staphylococcus aureus* (purchased from ATCC, NCTC, ...); Clinic, Strain of *Staphylococcus aureus* isolated from osteomyelitic patients; UAMS-1, Most studied laboratory strain of *Staphylococcus aureus* in bone infection models.

infected osteoblasts participate in the innate immune response in an attempt to clear the bacteria.

Osteoblasts are furthermore deemed to take part in the adaptive response to *S. aureus*. Infected osteoblasts up-regulate their release of IL-12 and CXCL10 (IP-10)—two molecules that recruit and activate Th1 lymphocyte—(Bost et al., 1999; Gasper et al., 2002). *S. aureus*-challenged osteoblasts are also able to express CD40 and MHC II, both implicated in the initiation of Th1 lymphocyte response (Schrum et al., 2003a,b). T lymphocytes secrete IFN-γ—a hallmark of their activation—while interacting with *S. aureus*-infected osteoblasts (Bost et al., 1999). There are no reports that confirm or exclude a role of other adaptive immune cells such as Th17 lymphocytes or dendritic cells in the response of osteoblasts to *S. aureus*. This needs to be further investigated to figure out whether if osteoblasts have a real role in adaptive immune responses in osteomyelitis or not.

An over-expression of TNF-α, IL-1β, and IL-18 mRNAs has been proved but the related-protein release has not been observed yet (Littlewood-Evans et al., 1997; Marriott et al., 2002), thus we cannot assess the impact of *S. aureus*-infected osteoblasts on inflammatory processes through these mediators. These findings once combined suggest that osteoblasts infected by *S. aureus* may participate in the innate immune response as well as in the adaptive immune response likely through the initiation of a Th1 lymphocyte response. This is sustained by current studies focusing on the mutual interplay between immune and bone systems designated as “osteimmunology” (reviewed in Takayanagi, 2007, 2015).

In vitro experiments were nonetheless mostly performed using osteoblastic cell lines or marketed normal osteoblasts.

This may lead to an overstatement of the results, as such models diverge from the *in vivo* pathophysiological scenario. As described in Table 2, most of these results were obtained from different *in vitro* studies, with various conditions of cell culture or multiplicity of infection. The high multiplicities of infection or long time periods are globally needed for a release of cytokines/chemokines by osteoblasts. An increase of mRNA expression happens 6 or 8 h after the interaction of *S. aureus* with osteoblasts whereas the relative protein release starts from 24 to 48 h after the interaction. Those results justify the idea that inflammatory response by osteoblasts should not be pivotal in osteomyelitis caused by *S. aureus*. In addition, *in vivo* animal models of osteomyelitis showed that professional immune cells are rapidly recruited after infection (Yoshii et al., 2002; Horst et al., 2012; Niska et al., 2012). Quantifying the release of mediators especially produced by osteoblasts but not from recruited immune cells appears to be a hard thing to do. These recruited immune cells might likewise be more able to release large amounts of IL-1β, IL-6 and, TNF-α than osteoblasts. Thinking this through, we propose the osteal macrophages—also called OsteoMacs—to act as the initiator of inflammation in osteomyelitis. Those bone resident macrophages—which are different from osteoclast precursors—are localized into osteal tissue and play a role in both the bone formation and bone reparation and bone-related diseases as previously observed (Chang et al., 2008; Pettit et al., 2008). OsteoMacs seem to be more likely to initiate an inflammatory response in osteomyelitis than osteoblasts since they are professional resident immune cells.

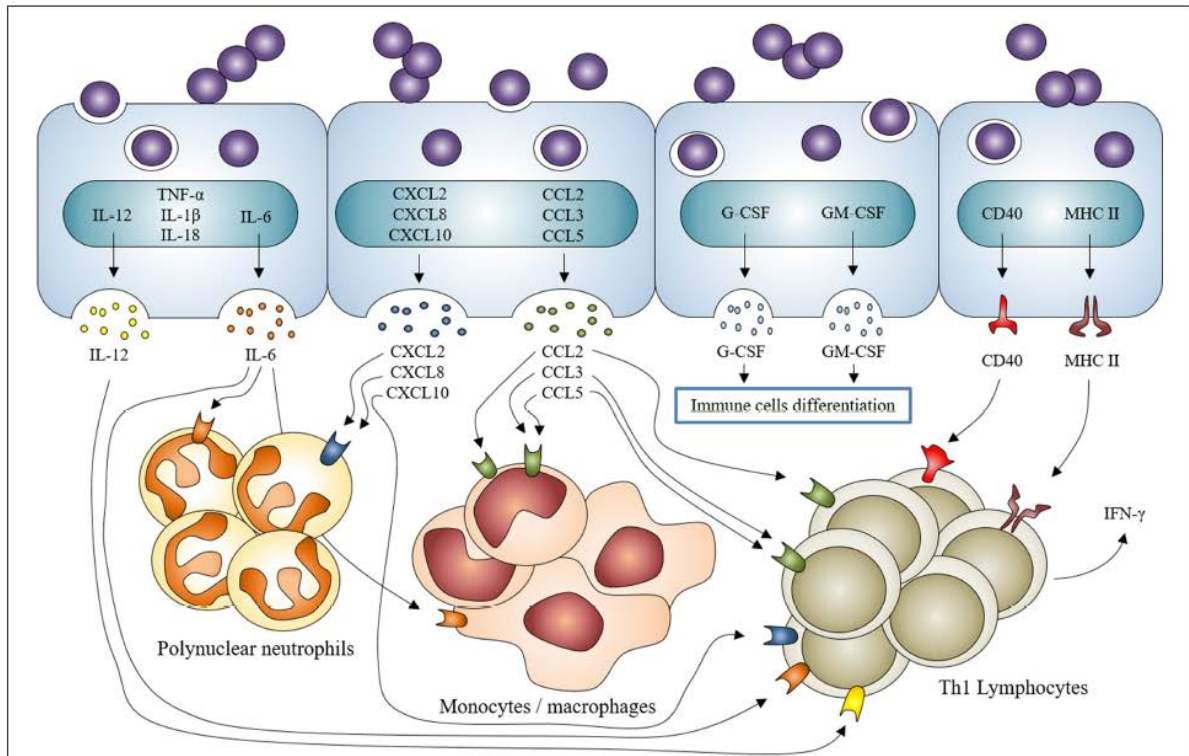


FIGURE 3 | *Staphylococcus aureus* induction of inflammatory mediator production by osteoblasts and participation in the recruitment/activation of innate and adaptive immune cells. *Staphylococcus aureus* interaction with osteoblasts increases the expression of cytokines IL-1 β , IL-18, TNF- α , the production and release of IL-6, IL-12 and the expression and release of chemokines CXCL2, CXCL8, CXCL10, CCL2, CCL3, CCL5 and growth factors G-CSF and GM-CSF. It also increases the expression and production of CD40 and MHC II. All of this participates to the recruitment and activation of innate (neutrophils, monocytes/macrophages) and adaptive (lymphocytes) immune cells.

S. AUREUS IMPACT ON OSTEOBLAST ACTIVITY AND VIABILITY

S. aureus can also induce bone loss as well as a production of inflammatory mediators from osteoblasts. This phenomenon is partially due to a decrease of osteoblast activity and to their death following bacterial insult. *S. aureus* is known to inhibit osteoblast activity and differentiation. Several studies have shown a decrease of proliferation, a decreased alkaline phosphatase activity, and a lower expression of BEM components such as type I collagen, osteocalcin, osteopontin, and osteonectin in *in vitro* models of *S. aureus*/osteoblast interaction (Claro et al., 2011; Widaa et al., 2012; Jin et al., 2013). *S. aureus* is also known to prevent the mineralization process, observed through a lower calcium deposition in infected osteoblast cultures compared to their non-infected counterparts (Claro et al., 2011; Jin et al., 2013; Sanchez et al., 2013; Chen et al., 2014).

Controversies arose from Somayaji et al. work in which they have figured out that UV-killed *S. aureus* coated on titanium alloys favored osteoblast adhesion, osteoblast differentiation and mineralization (Somayaji et al., 2010). These results in opposition

with all the previous statements suggest that the effect of *S. aureus* on osteoblast activity is not totally elucidated. Jin et al. recently highlighted that effects of *S. aureus* on osteoblast activity could be dependent of microRNAs (Jin et al., 2015). Relationship between osteoblast response to *S. aureus* and the microRNAs production could be a new interesting approach to understand osteomyelitis at a cellular level and decipher which components are able to whether decrease or increase osteoblastic activity.

S. aureus can also cause apoptosis of osteoblasts regardless to specific osteoblastic activity. This is observed following *S. aureus* infection of various cell types including endothelial cells, epithelial cells or osteoblasts (Menzies and Kourteva, 1998; Kahl et al., 2000; Tucker et al., 2000). In *S. aureus*-infected osteoblasts, apoptosis appeared to be dependent on the release of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL; Alexander et al., 2001). TRAIL interacts with death receptors DR4 and DR5 expressed in infected osteoblasts (Young et al., 2011), leading to the induction of apoptotic pathways. In the situation of *S. aureus*-infected osteoblasts, an activation of the apoptosis intrinsic pathway through caspase-9 (Jin et al., 2013) and the extrinsic pathway through caspase-8 was observed

(Alexander et al., 2003), both of them leading to activation of caspase-3 and apoptosis (Claro et al., 2011; Figure 4).

Osteoblast death was also associated with above-cited toxins produced by *S. aureus* like PSM α , PSM β , and δ -toxin (Cassat et al., 2013; Rasigade et al., 2013; Valour et al., 2015b). These virulence factors have a membrane-damaging activity which suggests that *S. aureus*-induced osteoblast death can also be independent of apoptosis. Non-apoptotic cell death has been observed in presence of α -toxin—another membrane-damaging virulence factor of *S. aureus*—in an *in vitro* cell line model (Essmann et al., 2003).

Death induction in osteoblasts is an important feature of *S. aureus*-related osteomyelitis. On the one hand, it leads to lowered bone formation activity and on the other hand, the death of osteoblasts may allow the release of the intracellular viable *S. aureus*, which are able to re-infect surviving osteoblasts and exacerbate the infection (Ellington et al., 2003).

S. AUREUS/OSTEOBLASTS INTERACTION AND OSTEOCLASTOGENESIS

Bone loss in osteomyelitis is also caused by an increased formation and activation of osteoclasts in addition to the death of osteoblasts. A tight balance between bone formation by

osteoblasts and bone resorption by osteoclasts is essential for the strength and integrity of bones. We have so far reviewed a role of *S. aureus* in decreasing osteoblast activity and inducing osteoblast death, hinting an impaired osteoblast/osteoclast balance necessary for proper bone formation.

Osteoblasts are producers of receptor activator of NF- κ B ligand (RANK-L) and osteoprotegerin (OPG). RANK-L interacts with its receptor RANK on monocyte/macrophage precursors to drive their differentiation toward osteoclasts. OPG is a soluble decoy receptor that targets RANK-L to limit osteoclastogenesis (Boyle et al., 2003). In the case of *S. aureus* infection, osteoblasts increase their production of membrane-bound RANK-L and sRANK-L—a soluble and minor form of RANK-L—whereas OPG production by osteoblasts decreases following *S. aureus* infection despite an absence of modulation of the OPG mRNA synthesis (Somayaji et al., 2008; Claro et al., 2011; Young et al., 2011; Widaa et al., 2012; Figure 5). It is therefore thought that *S. aureus* is able to indirectly increase osteoclastogenesis as a result of its interaction with osteoblasts. An increase of prostaglandin E2 (PGE2) production has furthermore been demonstrated in *S. aureus*-infected osteoblasts (Somayaji et al., 2008). PGE2—a hormone-like molecule and enzymatic product of the cyclooxygenase 2 (Cox-2)—acts in an autocrine and paracrine manner to upregulate the production of RANK-L through activation of

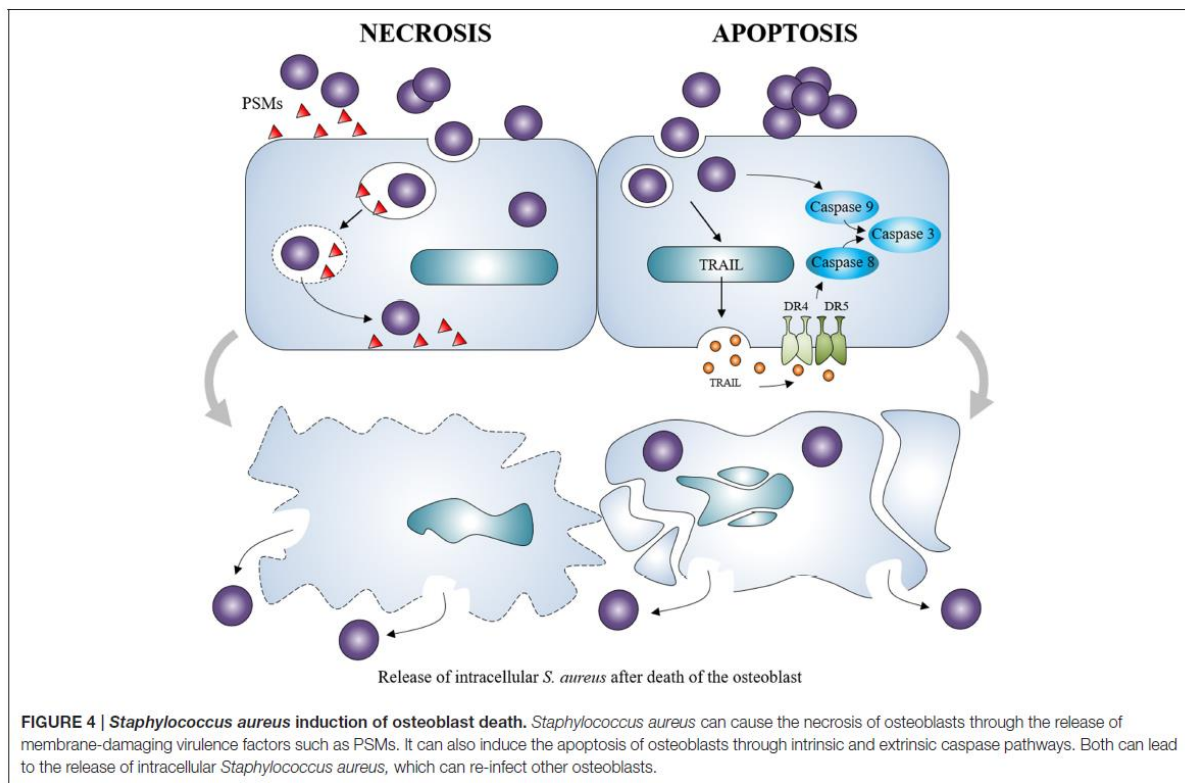
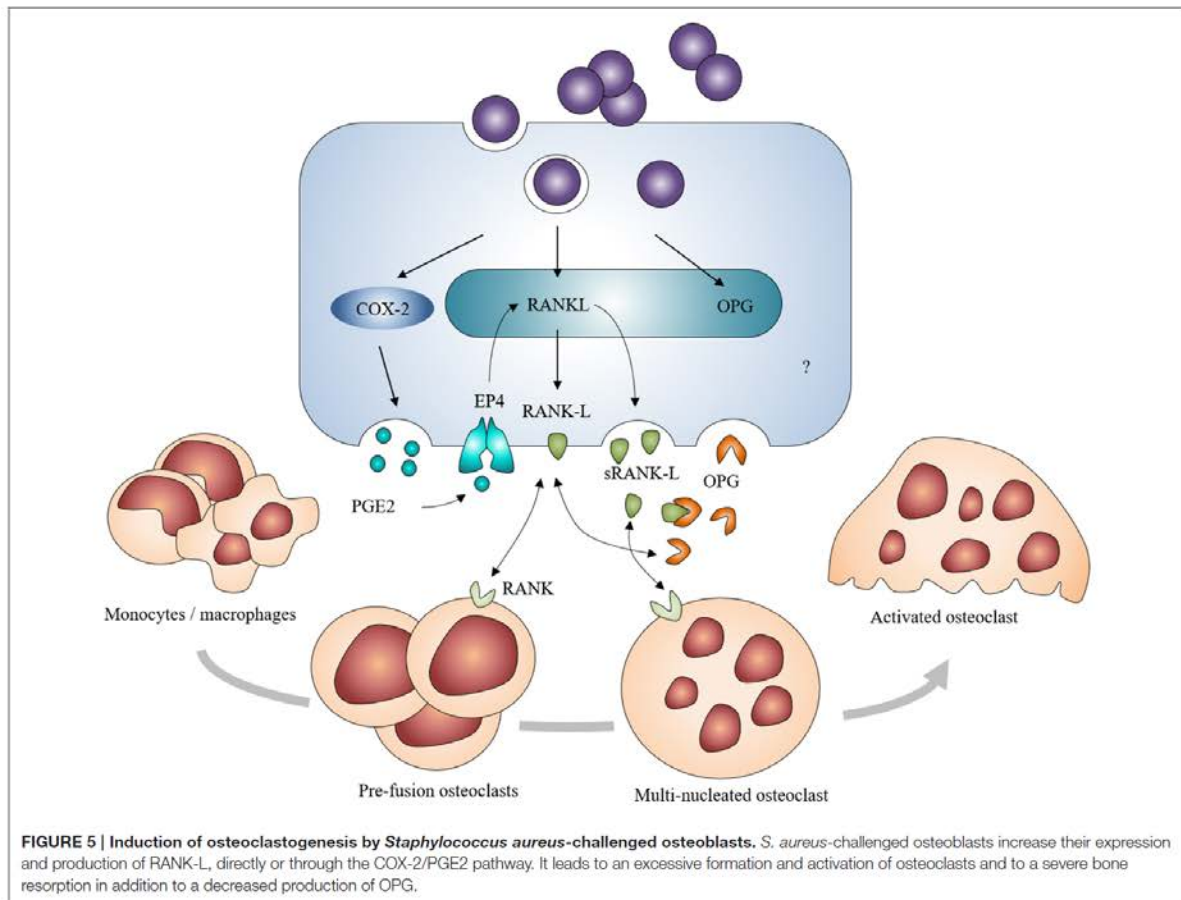


FIGURE 4 | *Staphylococcus aureus* induction of osteoblast death. *Staphylococcus aureus* can cause the necrosis of osteoblasts through the release of membrane-damaging virulence factors such as PSMs. It can also induce the apoptosis of osteoblasts through intrinsic and extrinsic caspase pathways. Both can lead to the release of intracellular *Staphylococcus aureus*, which can re-infect other osteoblasts.



the EP4 receptor in osteoblasts (Figure 5). PGE2 up-regulated by *S. aureus* thus acts as a complementary stimulating effect on osteoblasts to release osteoclastogenic factors (Johansen et al., 2012). Recent studies nevertheless showed that *S. aureus* or its components can also favor bone resorption through interaction with osteoclast cell lineage. *S. aureus* provoked the enhancement of the osteoclast differentiation and the release of pro-inflammatory cytokines (Kim et al., 2013). These cytokines enhanced the bone resorption capacity of uninfected mature osteoclasts and promoted osteoclastogenesis of the uninfected precursors (Trouillet-Assant et al., 2015). Further studies are yet needed to fully fathom the interactions between *S. aureus* and osteoclasts and the mechanisms involved in the latter interactions.

OSTEOBLAST SELF-DEFENSE AGAINST *S. AUREUS*

Infected osteoblasts can release AMPs in order to defend themselves against *S. aureus*. These molecules, mostly cationic,

are secreted by various types of cells and are able to neutralize bacteria. They are classified in three categories: α -defensins, β -defensins and cathelicidin-related molecules—with LL-37 as the only member in humans—(reviewed in Mansour et al., 2014). It was shown that human osteoblasts increase their release of human β -defensin (HBD) 2 and HBD-3 following stimulation by *S. aureus* culture supernatants, (Varoga et al., 2008, 2009). The release of MBD-14—the murine ortholog of HBD-3—was also seen in infected murine osteoblasts (Zhu et al., 2013). A higher expression of HBD-3 and MBD-14 was also found in human interfacial membrane surrounding implants infected by *S. aureus* and in a murine model of osteomyelitis, respectively (Zhu et al., 2014). LL-37 is moreover secreted by the human bone marrow mesenchymal stem cells (Krasnodembskaya et al., 2010) and described to exhibit a killing effect on *S. aureus* inside osteoblasts (Noore et al., 2013). The use of exogenous LL-37 in osteomyelitis is however uncertain as it might have deleterious effects on osteoblasts (Säll et al., 2013; Svensson et al., 2015). As for α -defensins, their production is mostly attributed to neutrophils or Paneth cells, and not to osteoblasts or other stromal cells (Mansour et al., 2014). The use of exogenous AMPs

could be a promising and effective way to treat osteomyelitis. Synthetic compounds similar to AMPs were produced and relevant as treatments toward bacterial infection, and notably in a *S. aureus* infection model (Nijnik et al., 2010). They can be added by the way to supports like titanium alloys, thus enlarging their possible use to fight against implant-associated osteomyelitis (Kazemzadeh-Narbat et al., 2013). Up to now, the emergence of resistance to AMPs was considered low, virtually because of the complexity of their mode of action (Jenssen et al., 2006). A recent review however highlights that *S. aureus* holds mechanisms of resistance to AMPs (Joo and Otto, 2015). As a matter of fact, we deem this moderates the brilliant future for AMPs in anti-staphylococcal treatments be it in bone or elsewhere.

ANTIBIOTIC CHEMOTHERAPIES AT *S. AUREUS*/OSTEOBLASTS SPECIFIC SCALE

Clinical guidelines for the treatment of osteomyelitis with *S. aureus* generally recommend the use of a combination of antibiotics consisting of penicillin M—i.e., oxacillin—combined with an aminoglycoside—i.e., gentamicin—or to rifampicin. The uses of glycopeptide—i.e., vancomycin—combined with linezolid or rifampicin, of clindamycin combined with rifampicin, or of fluoroquinolone—i.e., ofloxacin—combined with rifampicin are considerable options for the treatment of osteomyelitis with methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA; Lew and Waldvogel, 2004; Hatzenbuehler and Pulling, 2011; Osmon et al., 2013; Lima et al., 2014).

The internalization of *S. aureus* inside osteoblasts however represents a major challenge in the treatment of osteomyelitis. The ability of the recommended antibiotics to kill intracellular *S. aureus* is the cornerstone for relevant treatment of osteomyelitis. In this context, studies have assessed the effects of these antibiotics in *in vitro* models of infection. A treatment with gentamicin, vancomycin or daptomycin decrease the number of intra-osteoblastic bacteria, without totally eradicating them, even at high concentrations. The rifampicin used in clinical concentrations has on the contrary resulted to eradicate intracellular *S. aureus* inside cultured osteoblasts (Mohamed et al., 2014; Valour et al., 2015a). The treatment has to start but very early since a 12 h-delayed rifampicin treatment of *S. aureus*-challenged osteoblasts significantly decreased its effectiveness in killing intracellular bacteria by 100-fold (Ellington et al., 2006). In this case, the surface of *S. aureus* is altered after exposure to the intracellular osteoblast environment as Ellington et al. described it. A thick capsular material appears on intra-osteoblastic *S. aureus* that could explain the resistance to rifampicin. Specific mechanisms that describe the alteration of the surface of *S. aureus* by osteoblast intracellular environment have not been determined yet but we can suggest that SCVs may be involved in this phenomenon. One can say that further investigations need to be carried out. Combined therapy using rifampicin and ultrasound has been recently proposed to enhance the intracellular killing relevancy but it seemed that ultrasounds had a negative impact

on the viability of cultured osteoblasts (Shi et al., 2013). This process is even more difficult to transpose to clinical applications.

Recent studies investigated the effect of tigecyclin, teicoplanin, ofloxacin, and linezolid. These antibiotics—which are recommended in the treatment of osteomyelitis—have an intermediate intracellular antimicrobial effectiveness, higher than gentamicin or vancomycin and lower or equivalent to rifampicin (Kreis et al., 2013; Valour et al., 2015a). Ofloxacin, daptomycin, and vancomycin were also deemed to limit intracellular SCVs emergence (Valour et al., 2015a). The concentration however used in antibiotic treatment is also a critical point. Sub-inhibitory concentrations of oxacillin, moxifloxacin, and linezolid increase the fibronectin-mediated binding of *S. aureus* whereas sub-inhibitory concentrations of rifampicin still have decreasing effects on its binding (Rasigade et al., 2011). Radezolid and nafcillin-loaded nanoparticles have also been investigated for their ability to kill *S. aureus* inside cultured osteoblasts (Pillai et al., 2008; Lemaire et al., 2010). Radezolid has shown a higher bactericidal activity compared to linezolid and an effective killing of intracellular bacteria was observed with nafcillin-loaded nanoparticles.

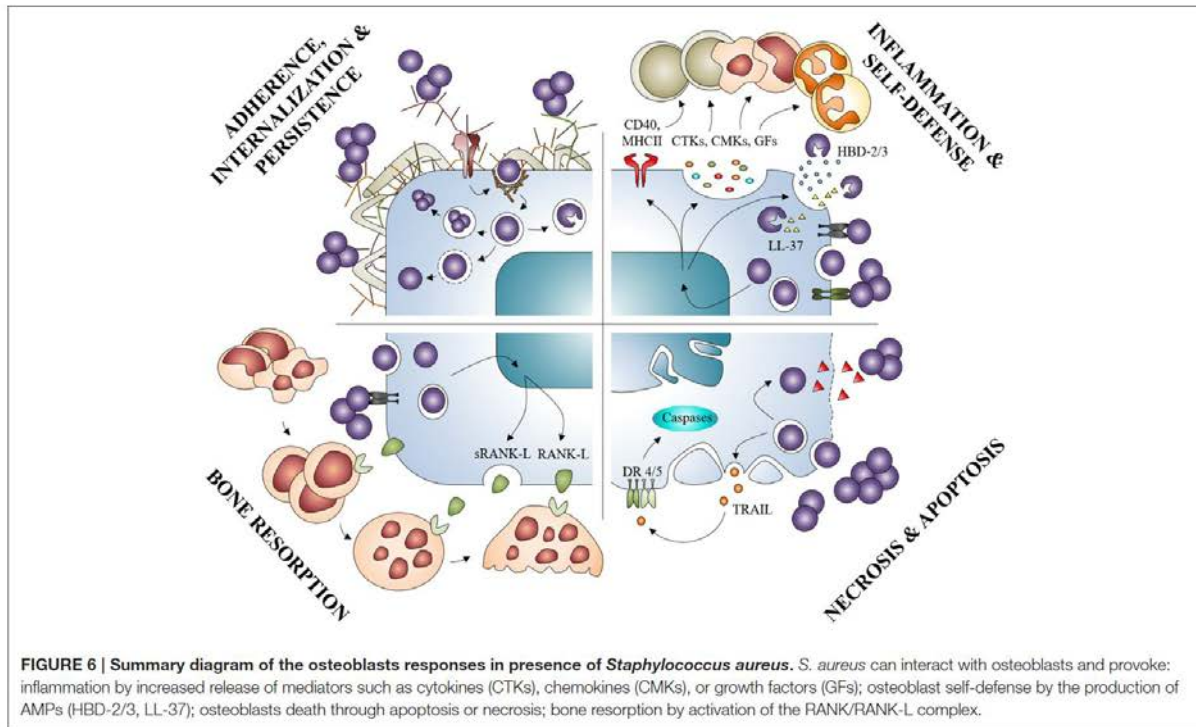
All these recent studies shed light on the importance of intra-osteoblastic penetration of antibiotics. This property is essential for the development of new therapeutics against osteomyelitis caused by *S. aureus*.

CONCLUSION

Osteoblast infection by *S. aureus* can be defined as a 4-step process from mostly *in vitro* models. First, *S. aureus* binds to the BEM and to osteoblasts. Through attachment, *S. aureus* can be internalized and survive within the cell switching notably to a SCV phenotype. Then, *S. aureus* or its components may potentially modulate the production of cytokines, chemokines or AMPs, through binding to extracellular and/or intracellular receptors. Infection with *S. aureus* eventually induces inflammatory cell recruitment, which, combined with increased osteoclastogenesis and osteoblast death, leads to a massive bone loss (Figure 6).

Nevertheless, the defined role of infected osteoblasts in inflammatory response results from *in vitro* experiments that were mostly done with osteoblastic cell lines or marketed normal osteoblasts (Table 2) and diverges from the *in vivo* pathophysiological scenario. Cytokines/chemokines released by infected osteoblasts must only be a drop in the bucket compared to those released by neutrophils and macrophages/monocytes during osteomyelitis caused by *S. aureus*. From this point of view, osteoblasts thought to take part in global inflammatory response but without having a decisive role.

On the other side, internalization and intracellular persistence appears to us as the key stages of *S. aureus*/osteoblast interaction. Escape from intra-osteoblastic vesicle, switching to a SCV phenotype and osteoblast death following membrane damages are important phenomena to understand the evolution from acute to chronic osteomyelitis.



The *S. aureus* infection of the osteoblast is in the end a very complex phenomenon with a myriad of actors (Figure 6). To focus on one specific step allows us to better understand a precise mechanism but does not reflect the complexity of the entire infectious process, in the same way that focusing only on osteoblasts and avoiding other cells from bone tissues limits and biases our understanding. The use of new research models is necessary to complete the information obtained from the previous osteoblast *in vitro* infection models.

It is clear to us that more investigations using patient isolated *S. aureus*/primary osteoblasts *in vitro* models are needed and that systemic *in vivo* models close to the human scenarios of infection need to be optimized to consider new therapeutic approaches for this disease of high morbidity. New treatments or preventive approaches need also to be developed so as to avoid the internalization of *S. aureus* inside osteoblasts, contain the local inflammatory process, and increase the osteoblasts self-defense.

REFERENCES

Ahmed, S., Meghji, S., Williams, R. J., Henderson, B., Brock, J. H., and Nair, S. P. (2001). *Staphylococcus aureus* fibronectin binding proteins are essential for internalization by osteoblasts but do not account for differences in intracellular levels of bacteria. *Infect. Immun.* 69, 2872–2877. doi: 10.1128/IAI.69.5.2872-2877.2001

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JJ compiled the publications and wrote the first drafts of the review under the supervision of his advisors FV and SG. All the authors contributed equally to the final submitted version.

FUNDING

JJ is the recipient of a fellowship from the French Ministry for Higher Education and Research—*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche*.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors warmly thank Prof. S. M. Goyert (CUNY School of Medicine, New York, NY, USA) and D. Al Alam, PhD (Saban Research Institute of Childrens Hospital Los Angeles, Los Angeles, CA, USA) for having carefully proof read this manuscript.

Alexander, E. H., Bento, J. L., Hughes, F. M. Jr., Marriott, I., Hudson, M. C., and Bost, K. L. (2001). *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar dublin induce tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand expression by normal mouse and human osteoblasts. *Infect. Immun.* 69, 1581–1586. doi: 10.1128/IAI.69.3.1581-1586.2001

Alexander, E. H., Rivera, F. A., Marriott, I., Anguita, J., Bost, K. L., and Hudson, M. C. (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. doi: 10.1186/1471-2180-3-5
- Atshan, S. S., Nor Shamsudin, M., Sekawi, Z., Lung, L. T. T., Hamat, R. A., Karunanidhi, A. et al. (2012). Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012:976972. doi: 10.1155/2012/976972
- Bosse, M. J., Gruber, H. E., and Ramp, W. K. (2005). Internalization of bacteria by osteoblasts in a patient with recurrent, long-term osteomyelitis. A case report. *J. Bone Joint Surg. Am.* 87, 1343–1347. doi: 10.2106/JBJS.D.02649
- Bost, K. L., Bento, J. L., Ellington, J. K., Marriott, I., and Hudson, M. C. (2000). Induction of colony-stimulating factor expression following *Staphylococcus* or *Salmonella* interaction with mouse or human osteoblasts. *Infect. Immun.* 68, 5075–5083. doi: 10.1128/IAI.68.9.5075-5083.2000
- Bost, K. L., Bento, J. L., Petty, C. C., Schrum, L. W., Hudson, M. C., and Marriott, I. (2001). Monocyte chemoattractant protein-1 expression by osteoblasts following infection with *Staphylococcus aureus* or *Salmonella*. *J. Interferon Cytokine Res.* 21, 297–304. doi: 10.1089/107999001300177484
- Bost, K. L., Ramp, W. K., Nicholson, N. C., Bento, J. L., Marriott, I., and Hudson, M. C. (1999). *Staphylococcus aureus* infection of mouse or human osteoblasts induces high levels of interleukin-6 and interleukin-12 production. *J. Infect. Dis.* 180, 1912–1920. doi: 10.1086/315138
- Boyle, W. J., Simonet, W. S., and Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423, 337–342. doi: 10.1038/nature01658
- Campoccia, D., Speziale, P., Ravaioi, S., Cangini, I., Rindi, S., Pirini, V., et al. (2009). The presence of both bone sialoprotein-binding protein gene and collagen adhesin gene as a typical virulence trait of the major epidemic cluster in isolates from orthopedic implant infections. *Biomaterials* 30, 6621–6628. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.08.032
- Cassat, J. E., Hammer, N. D., Campbell, J. P., Benson, M. A., Perrien, D. S., Mrak, L. N., et al. (2013). A secreted bacterial protease tailors the *Staphylococcus aureus* virulence repertoire to modulate bone remodeling during osteomyelitis. *Cell Host Microbe* 13, 759–772. doi: 10.1016/j.chom.2013.05.003
- Chang, M. K., Raggatt, L.-J., Alexander, K. A., Kuliwaba, J. S., Fazzalari, N. L., Schroder, K., et al. (2008). Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.* 181, 1232–1244. doi: 10.4049/jimmunol.181.2.1232
- Chauhan, V. S., and Marriott, I. (2010). Differential roles for NOD2 in osteoblast inflammatory immune responses to bacterial pathogens of bone tissue. *J. Med. Microbiol.* 59(Pt 7), 755–762. doi: 10.1099/jmm.0.015859-0
- Chen, Q., Hou, T., Luo, F., Wu, X., Xie, Z., and Xu, J. (2014). Involvement of toll-like receptor 2 and pro-apoptotic signaling pathways in bone remodeling in osteomyelitis. *Cell. Physiol. Biochem.* 34, 1890–1900. doi: 10.1159/000366387
- Choe, H., Narayanan, A. S., Gandhi, D. A., Weinberg, A., Marcus, R. E., Lee, Z., et al. (2015). Immunomodulatory peptide IDR-1018 decreases implant infection and preserves osseointegration. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 473, 2898–2907. doi: 10.1007/s11999-015-4301-2
- Claro, T., Widaa, A., McDonnell, C., Foster, T. J., O'Brien, F. J., and Kerrigan, S. W. (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. *Microbiology* 159(Pt 1), 147–154. doi: 10.1099/mic.0.063016-0
- Claro, T., Widaa, A., O'Seaghda, M., Miajlovic, H., Foster, T. J., O'Brien, F. J., et al. (2011). *Staphylococcus aureus* protein A binds to osteoblasts and triggers signals that weaken bone in osteomyelitis. *PLoS ONE* 6:e18748. doi: 10.1371/journal.pone.0018748
- Dallas, S. L., and Bonewald, L. F. (2010). Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1192, 437–443. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05246.x
- Dapunt, U., Maurer, S., Giese, T., Gaida, M. M., and Hänsch, G. M. (2014). The macrophage inflammatory proteins MIP1 α (CCL3) and MIP2 α (CXCL2) in implant-associated osteomyelitis: linking Inflammation to Bone degradation. *Mediat. Inflamm.* 2014:728619. doi: 10.1155/2014/728619
- Dhanoo, A., Singh, V. A., Mansoor, A., Yusof, M. Y., Lim, K.-T., and Thong, K.-L. (2012). Acute haematogenous community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in an adult: case report and review of literature. *BMC Infect. Dis.* 12:270. doi: 10.1186/1471-2334-12-270
- Dziewanowska, K., Patti, J. M., Deobald, C. F., Bayles, K. W., Trumble, W. R., and Bohach, G. A. (1999). Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect. Immun.* 67, 4673–4678.
- Ecarot-Charrier, B., Glorieux, F. H., van der Rest, M., and Pereira, G. (1983). Osteoblasts isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture. *J. Cell Biol.* 96, 639–643.
- Edwards, J. R., and Mundy, G. R. (2011). Advances in osteoclast biology: old findings and new insights from mouse models. *Nat. Rev. Rheumatol.* 7, 235–243. doi: 10.1038/nrrheum.2011.23
- Elasri, M. O., Thomas, J. R., Skinner, R. A., Blevins, J. S., Beenken, K. E., Nelson, C. L., et al. (2002). *Staphylococcus aureus* collagen adhesin contributes to the pathogenesis of osteomyelitis. *Bone* 30, 275–280. doi: 10.1016/S8756-3282(01)00632-9
- Ellington, J. K., Elhofy, A., Bost, K. L., and Hudson, M. C. (2001). Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in *Staphylococcus aureus* invasion of normal osteoblasts. *Infect. Immun.* 69, 5235–5242. doi: 10.1128/IAI.69.9.5235-5242.2001
- Ellington, J. K., Harris, M., Hudson, M. C., Vishin, S., Webb, L. X., and Sherertz, R. (2006). Intracellular *Staphylococcus aureus* and antibiotic resistance: implications for treatment of staphylococcal osteomyelitis. *J. Orthop. Res.* 24, 87–93. doi: 10.1002/jor.20003
- Ellington, J. K., Harris, M., Webb, L., Smith, B., Smith, T., Tan, K., et al. (2003). Intracellular *Staphylococcus aureus*. A mechanism for the indolence of osteomyelitis. *J. Bone Joint Surg. Br.* 85, 918–921. doi: 10.1302/0301-620X.85B6.13509
- Ellington, J. K., Reilly, S. S., Ramp, W. K., Smeltzer, M. S., Kellam, J. F., and Hudson, M. C. (1999). Mechanisms of *Staphylococcus aureus* invasion of cultured osteoblasts. *Microb. Pathog.* 26, 317–323. doi: 10.1006/mpat.1999.0272
- Essmann, F., Bantel, H., Totzke, G., Engels, I. H., Sinha, B., Schulze-Osthoff, K., et al. (2003). *Staphylococcus aureus* alpha-toxin-induced cell death: predominant necrosis despite apoptotic caspase activation. *Cell Death Differ.* 10, 1260–1272. doi: 10.1038/sj.cdd.4401301
- Fisher, L. W., McBride, O. W., Termine, J. D., and Young, M. F. (1990). Human bone sialoprotein. Deduced protein sequence and chromosomal localization. *J. Biol. Chem.* 265, 2347–2351.
- Fournier, B. (2012). The function of TLR2 during staphylococcal diseases. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2:167. doi: 10.3389/fcimb.2012.00167
- Gasper, N. A., Petty, C. C., Schrum, L. W., Marriott, I., and Bost, K. L. (2002). Bacterium-induced CXCL10 secretion by osteoblasts can be mediated in part through toll-like receptor 4. *Infect. Immun.* 70, 4075–4082. doi: 10.1128/IAI.70.8.4075-4082.2002
- Giese, B., Glowinski, F., Paprotka, K., Dittmann, S., Steiner, T., Sinha, B., et al. (2011). Expression of δ -toxin by *Staphylococcus aureus* mediates escape from phago-endosomes of human epithelial and endothelial cells in the presence of β -toxin. *Cell. Microbiol.* 13, 316–329. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01538.x
- Gillaspay, A. F., Patti, J. M., and Smeltzer, M. S. (1997). Transcriptional regulation of the *Staphylococcus aureus* collagen adhesin gene, *Cna*. *Infect. Immun.* 65, 1536–1540.
- Gómez, M. I., Lee, A., Reddy, B., Muir, A., Soong, G., Pitt, A., et al. (2004). *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nat. Med.* 10, 842–848. doi: 10.1038/nm1079
- Grosz, M., Kolter, J., Paprotka, K., Winkler, A.-C., Schäfer, D., Chatterjee, S. S., et al. (2014). Cytoplasmic replication of *Staphylococcus aureus* upon phagosomal escape triggered by phenol-soluble modulins. *Cell. Microbiol.* 16, 451–465. doi: 10.1111/cmi.12233
- Grzesik, W. J., and Robey, P. G. (1994). Bone matrix RGD glycoproteins: immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells *in vitro*. *J. Bone Miner. Res.* 9, 487–496. doi: 10.1002/jbmr.5650090408
- Hamza, T., and Li, B. (2014). Differential responses of osteoblasts and macrophages upon *Staphylococcus aureus* infection. *BMC Microbiol.* 14:207. doi: 10.1186/s12866-014-0207-5
- Hatzenbuehler, J., and Pulling, T. J. (2011). Diagnosis and management of osteomyelitis. *Am. Fam. Physician* 84, 1027–1033.
- Heilmann, C. (2011). "Adhesion mechanisms of staphylococci," in *Bacterial Adhesion: Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 715, eds D. Linke and A. Goldman (Dordrecht: Springer), 105–123.

- Hirschhausen, N., Schlesier, T., Schmidt, M. A., Götz, F., Peters, G., and Heilmann, C. (2010). A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin Atl and heat shock cognate protein HSC70 as host cell receptor. *Cell. Microbiol.* 12, 1746–1764. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01506.x
- Hogan, A., Heppert, V. G., and Suda, A. J. (2013). Osteomyelitis. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 133, 1183–1196. doi: 10.1007/s00402-013-1785-7
- Horst, S. A., Hoerr, V., Beineke, A., Kreis, C., Tuchscher, L., Kalinka, J., et al. (2012). A novel mouse model of *Staphylococcus aureus* chronic osteomyelitis that closely mimics the human infection: an integrated view of disease pathogenesis. *Am. J. Pathol.* 181, 1206–1214. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.07.005
- Hudson, M. C., Ramp, W. K., Nicholson, N. C., Williams, A. S., and Nousiainen, M. T. (1995). Internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured osteoblasts. *Microb. Pathog.* 19, 409–419. doi: 10.1006/mpat.1995.0075
- Jauregui, C. E., Mansell, J. P., Jepson, M. A., and Jenkinson, H. F. (2013). Differential interactions of *Streptococcus gordonii* and *Staphylococcus aureus* with cultured osteoblasts. *Mol. Oral Microbiol.* 28, 250–266. doi: 10.1111/omi.12022
- Jenssen, H., Hamill, P., and Hancock, R. E. W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 491–511. doi: 10.1128/CMR.00056-05
- Jevon, M., Guo, C., Ma, B., Mordan, N., Nair, S. P., Harris, M., et al. (1999). Mechanisms of internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured human osteoblasts. *Infect. Immun.* 67, 2677–2681.
- Jin, T., Lu, Y., He, Q. X., Wang, H., Li, B. F., Zhu, L. Y., et al. (2015). The role of MicroRNA, miR-24, and Its target CHI3L1 in osteomyelitis caused by *Staphylococcus aureus*. *J. Cell. Biochem.* 116, 2804–2813. doi: 10.1002/jcb.25225
- Jin, T., Zhu, Y. L., Li, J., Shi, J., He, X. Q., Ding, J., et al. (2013). Staphylococcal protein A, Panton-Valentine leukocidin and coagulase aggravate the bone loss and bone destruction in osteomyelitis. *Cell. Physiol. Biochem.* 32, 322–33. doi: 10.1159/000354440
- Johansen, L. K., Iburg, T. M., Nielsen, O. L., Leifsson, P. S., Dahl-Petersen, K., Koch, J., et al. (2012). Local osteogenic expression of cyclooxygenase-2 and systemic response in porcine models of osteomyelitis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 97, 103–108. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2012.01.002
- Jönsson, K., McDevitt, D., McGavin, M. H., Patti, J. M., and Höök, M. (1995). *Staphylococcus aureus* expresses a major histocompatibility complex class II analog. *J. Biol. Chem.* 270, 21457–21460. doi: 10.1074/jbc.270.37.21457
- Joo, H. S., and Otto, M. (2015). Mechanisms of resistance to antimicrobial peptides in staphylococci. *Biochim. Biophys. Acta* 1848(11 Pt B), 3055–3061. doi: 10.1016/j.bbame.2015.02.009
- Kahl, B. C., Goulian, M., van Wamel, W., Herrmann, M., Simon, S. M., Kaplan, G., et al. (2000). *Staphylococcus aureus* RN6390 replicates and induces apoptosis in a pulmonary epithelial cell line. *Infect. Immun.* 68, 5385–5392. doi: 10.1128/IAI.68.9.5385-5392.2000
- Kalinka, J., Hachmeister, M., Geraci, J., Sordelli, D., Hansen, U., Niemann, S., 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.* 304, 1038–1049. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.07.013
- Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 11, 373–384. doi: 10.1038/ni.1863
- Kazemzadeh-Narbat, M., Lai, B. F. L., Ding, C., Kizhakkedathu, J. N., Hancock, R. E. W., and Wang, R. (2013). Multilayered coating on titanium for controlled release of antimicrobial peptides for the prevention of implant-associated infections. *Biomaterials* 34, 5969–5977. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.04.036
- Khalil, H., Williams, R. J., Stenbeck, G., Henderson, B., Meghji, S., and Nair, S. P. (2007). Invasion of bone cells by *Staphylococcus epidermidis*. *Microbes Infect.* 9, 460–465. doi: 10.1016/j.micinf.2007.01.002
- Kikuchi, T., Matsuguchi, T., Tsuboi, N., Mitani, A., Tanaka, S., Matsuoka, M., et al. (2001). Gene expression of osteoclast differentiation factor is induced by lipopolysaccharide in mouse osteoblasts via toll-like receptors. *J. Immunol.* 166, 3574–3579. doi: 10.4049/jimmunol.166.5.3574
- Kim, J., Yang, J., Park, O.-J., Kang, S.-S., Kim, W.-S., Kurokawa, K., et al. (2013). Lipoproteins are an important bacterial component responsible for bone destruction through the induction of osteoclast differentiation and activation. *J. Bone Miner. Res.* 28, 2381–2391. doi: 10.1002/jbmr.1973
- Kim, P. H., and Leopold, S. S. (2012). In brief: Gustilo-Anderson classification. [corrected]. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 470, 3270–3274. doi: 10.1007/s11999-012-2376-6
- Kintarak, S., Whawell, S. A., Speight, P. M., Packer, S., and Nair, S. P. (2004). Internalization of *Staphylococcus aureus* by human keratinocytes. *Infect. Immun.* 72, 5668–5675. doi: 10.1128/IAI.72.10.5668-5675.2004
- Krasnodembskaya, A., Song, Y., Fang, X., Gupta, N., Serikov, V., Lee, J. W., et al. (2010). Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37. *Stem Cells* 28, 2229–2238. doi: 10.1002/stem.544
- Kreis, C. A., Raschke, M. J., Roßlenbroich, S. B., Tholema-Hans, N., Löffler, B., and Fuchs, T. (2013). Therapy of intracellular *Staphylococcus aureus* by tigecyclin. *BMC Infect. Dis.* 13:267. doi: 10.1186/1471-2334-13-267
- Lemaire, S., Kosowska-Shick, K., Appelbaum, P. C., Verween, G., Tulkens, P. M., and Van Bambeke, F. (2010). Cellular pharmacodynamics of the novel biarylloxazolidinone radezolid: studies with infected phagocytic and nonphagocytic cells, using *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes*, and *Legionella pneumophila*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 2549–2559. doi: 10.1128/AAC.01724-09
- Lew, D. P., and Waldvogel, F. A. (2004). Osteomyelitis. *Lancet* 364, 369–379. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16727-5
- Lima, A. L., Oliveira, P. R., Carvalho, V. C., Cimerman, S., Savio, E., and Diretrizes Panamericanas para el Tratamiento de las Osteomielitis e Infecciones de Tejidos Blandos Group (2014). Recommendations for the treatment of osteomyelitis. *Braz. J. Infect. Dis.* 18, 526–534. doi: 10.1016/j.bjid.2013.12.005
- Littlewood-Evans, A. J., Hattenberger, M. R., Lüscher, C., Pataki, A., Zak, O., and O'Reilly, T. (1997). Local expression of tumor necrosis factor alpha in an experimental model of acute osteomyelitis in rats. *Infect. Immun.* 65, 3438–3443.
- Lowy, F. D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* 339, 520–532. doi: 10.1056/NEJM199808203390806
- Madrazo, D. R., Tranguich, S. L., and Marriott, I. (2003). Signaling via toll-like receptor 5 can initiate inflammatory mediator production by murine osteoblasts. *Infect. Immun.* 71, 5418–5421. doi: 10.1128/IAI.71.9.5418-5421.2003
- Mansour, S. C., Pena, O. M., and Hancock, R. E. W. (2014). Host defense peptides: front-line immunomodulators. *Trends Immunol.* 35, 443–450. doi: 10.1016/j.it.2014.07.004
- Marriott, I., Hughes F. M. Jr., and Bost, K. L. (2002). Bacterial infection of osteoblasts induces interleukin-1beta and interleukin-18 transcription but not protein synthesis. *J. Interferon Cytokine Res.* 22, 1049–1055. doi: 10.1089/107999002760624288
- Marriott, I., Rati, D. M., McCall, S. H., and Tranguich, S. L. (2005). Induction of Nod1 and Nod2 intracellular pattern recognition receptors in murine osteoblasts following bacterial challenge. *Infect. Immun.* 73, 2967–2973. doi: 10.1128/IAI.73.5.2967-2973.2005
- McCall, S. H., Sahraei, M., Young, A. B., Worley, C. S., Duncan, J. A., Ting, J. P. Y., et al. (2008). Osteoblasts express NLRP3, a nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat region containing receptor implicated in bacterially induced cell death. *J. Bone Miner. Res.* 23, 30–40. doi: 10.1359/jbmr.071002
- Menzies, B. E., and Kourteva, I. (1998). Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis. *Infect. Immun.* 66, 5994–98.
- Mohamed, W., Sommer, U., Sethi, S., Domann, E., Thormann, U., Schütz, I., et al. (2014). Intracellular proliferation of *Staphylococcus aureus* in osteoblasts and effects of rifampicin and gentamicin on *Staphylococcus aureus* intracellular proliferation and survival. *Eur. Cells Mater.* 28, 258–268.
- Montanaro, L., Arciola, C. R., Baldassarri, L., and Borsetti, E. (1999). Presence and expression of collagen adhesin gene (cna) and slime production in *Staphylococcus aureus* strains from orthopaedic prosthesis infections. *Biomaterials* 20, 1945–1949. doi: 10.1016/S0142-9612(99)00099-X
- Montanaro, L., Speziale, P., Campoccia, D., Ravaoli, S., Cangini, I., Pietrocchia, G., et al. (2011). Scenery of *Staphylococcus* implant infections in orthopedics. *Future Microbiol.* 6, 1329–1349. doi: 10.2217/fmb.11.117
- Nair, S. P., Bischoff, M., Senn, M. M., and Berger-Bächi, B. (2003). The sigma B regulon influences internalization of *Staphylococcus aureus* by osteoblasts. *Infect. Immun.* 71, 4167–4170. doi: 10.1128/IAI.71.7.4167-4170.2003
- Nijnik, A., Madera, L., Ma, S., Waldbrook, M., Elliott, M. R., Easton, D. M., et al. (2010). Synthetic cationic peptide IDR-1002 provides protection against

- bacterial infections through chemokine induction and enhanced leukocyte recruitment. *J. Immunol.* 184, 2539–2550. doi: 10.4049/jimmunol.0901813
- Ning, R., Zhang, X., Guo, X., and Li, Q. (2010). Attachment of *Staphylococcus aureus* is required for activation of nuclear factor kappa B in human osteoblasts. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 42, 883–892. doi: 10.1093/abbs/gmq096
- Ning, R., Zhang, X., Guo, X., and Li, Q. (2011). *Staphylococcus aureus* regulates secretion of interleukin-6 and monocyte chemoattractant protein-1 through activation of nuclear factor kappa B signaling pathway in human osteoblasts. *Braz. J. Infect. Dis.* 15, 189–194. doi: 10.1016/S1413-8670(11)70173-8
- Niska, J. A., Meganck, J. A., Pribaz, J. R., Shahbazian, J. H., Lim, E., Zhang, N., et al. (2012). Monitoring bacterial burden, inflammation and bone damage longitudinally using optical and μ CT imaging in an orthopaedic implant infection in mice. *PLoS ONE* 7:e47397. doi: 10.1371/journal.pone.0047397
- Noore, J., Noore, A., and Li, B. (2013). Cationic antimicrobial peptide LL-37 is effective against both extra- and intracellular *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 1283–1290. doi: 10.1128/AAC.01650-12
- Ogawa, S. K., Yurberg, E. R., Hatcher, V. B., Levitt, M. A., and Lowy, F. D. (1985). Bacterial adherence to human endothelial cells *in vitro*. *Infect. Immun.* 50, 218–224.
- Osmon, D. R., Barbari, E. F., Berendt, A. R., Lew, D., Zimmerli, W., Steckelberg, J. M., et al. (2013). Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america. *Clin. Infect. Dis.* 56, e1–e25. doi: 10.1093/cid/cis803
- Otsuka, T., Saito, K., Dohmae, S., Takano, T., Higuchi, W., Takizawa, Y., et al. (2006). Key adhesin gene in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346, 1234–1244. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.06.038
- Peacock, S. J., Foster, T. J., Cameron, B. J., and Berendt, A. R. (1999). Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of *Staphylococcus aureus* to resting human endothelial cells. *Microbiology* 145, 3477–3486. doi: 10.1099/00221287-145-12-3477
- Pettit, A. R., Chang, M. K., Hume, D. A., and Raggatt, L. J. (2008). Osteal macrophages: a new twist on coupling during bone dynamics. *Bone* 43, 976–982. doi: 10.1016/j.bone.2008.08.128
- Pillai, R. R., Somayaji, S. N., Rabinovich, M., Hudson, M. C., and Gonsalves, K. E. (2008). Nafcillin-loaded PLGA nanoparticles for treatment of osteomyelitis. *Biomed. Mater.* 3:034114. doi: 10.1088/1748-6041/3/3/034114
- Post, V., Wahl, P., Uçkay, I., Ochsner, P., Zimmerli, W., Corvec, S., et al. (2014). Phenotypic and genotypic characterisation of *Staphylococcus aureus* causing musculoskeletal infections. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 565–576. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.03.003
- Proctor, R. A., Kriegeskorte, A., Kahl, B. C., Becker, K., Löffler, B., and Peters, G. (2014). *Staphylococcus aureus* small colony variants (SCVs): a road map for the metabolic pathways involved in persistent infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4:99. doi: 10.3389/fcimb.2014.00099
- Proctor, R. A., von Eiff, C., Kahl, B. C., Becker, K., McNamara, P., Herrmann, M., et al. (2006). Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 295–305. doi: 10.1038/nrmicro1384
- Rasigade, J. P., Moulay, A., Lhoste, Y., Tristan, A., Bes, M., Vandenesch, F., et al. (2011). Impact of sub-inhibitory antibiotics on fibronectin-mediated host cell adhesion and invasion by *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* 11:263. doi: 10.1186/1471-2180-11-263
- Rasigade, J. P., Trouillet-Assant, S., Ferry, T., Diep, B. A., Sapin, A., Lhoste, Y., et al. (2013). PSMs of hypervirulent *Staphylococcus aureus* act as intracellular toxins that kill infected osteoblasts. *PLoS ONE* 8:e63176. doi: 10.1371/journal.pone.0063176
- Reilly, S. S., Hudson, M. C., Kellam, J. F., and Ramp, W. K. (2000). *In vivo* internalization of *Staphylococcus aureus* by embryonic chick osteoblasts. *Bone* 26, 63–70. doi: 10.1016/S8756-3282(99)00239-2
- Reott, M. A., Ritchie-Miller S. L., Anguita, J., and Hudson, M. C. (2008). TRAIL expression is induced in both osteoblasts containing intracellular *Staphylococcus aureus* and uninfected osteoblasts in infected cultures. *FEMS Microbiol. Lett.* 278, 185–192. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00988.x
- Rydén, C., Yacoub, A. L., Maxe, I., Heinegård, D., Oldberg, A., Franzén, A., et al. (1989). Specific binding of bone sialoprotein to *Staphylococcus aureus* isolated from patients with osteomyelitis. *Eur. J. Biochem.* 184, 331–336.
- Säll, J., Carlsson, M., Gidlöf, O., Holm, A., Humlén, J., Ohman, J., et al. (2013). The antimicrobial peptide LL-37 alters human osteoblast Ca^{2+} handling and induces Ca^{2+} -independent apoptosis. *J. Innate Immun.* 5, 290–300. doi: 10.1159/000346587
- Sanchez, C. J. Jr., Ward, C. L., Romano, D. R., Hurtgen, B. J., Hardy, S. K., Woodbury, R. L., et al. (2013). *Staphylococcus aureus* biofilms decrease osteoblast viability, inhibits osteogenic differentiation, and increases bone resorption *in vitro*. *BMC Musculoskelet. Disord.* 14:187. doi: 10.1186/1471-2474-14-187
- Schrum, L. W., Bost, K. L., Hudson, M. C., and Marriott, I. (2003a). Bacterial infection induces expression of functional MHC Class II molecules in murine and human osteoblasts. *Bone* 33, 812–821. doi: 10.1016/S8756-3282(03)00265-5
- Schrum, L. W., Marriott, I., Butler, B. R., Thomas, E. K., Hudson, M. C., and Bost, K. L. (2003b). Functional CD40 expression induced following bacterial infection of mouse and human osteoblasts. *Infect. Immun.* 71, 1209–1216. doi: 10.1128/IAI.71.3.1209-1216.2003
- Shi, S. F., Zhang, X. L., Zhu, C., Chen, D. S., and Guo, Y. Y. (2013). Ultrasonically enhanced rifampin activity against internalized *Staphylococcus aureus*. *Exp. Ther. Med.* 5, 257–262. doi: 10.3892/etm.2012.758
- Somayaji, S. N., Huet, Y. M., Gruber, H. E., and Hudson, M. C. (2010). UV-killed *Staphylococcus aureus* enhances adhesion and differentiation of osteoblasts on bone-associated biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 95, 574–579. doi: 10.1002/jbm.a.32890
- Somayaji, S. N., Ritchie, S., Sahraei, M., Marriott, I., and Hudson, M. C. (2008). *Staphylococcus aureus* induces expression of receptor activator of NF-kappaB ligand and prostaglandinE2 in infected murine osteoblasts. *Infect. Immun.* 76, 5120–5126. doi: 10.1128/IAI.00228-08
- Spellberg, B., and Lipsky, B. A. (2012). Systemic antibiotic therapy for chronic osteomyelitis in adults. *Clin. Infect. Dis.* 54, 393–407. doi: 10.1093/cid/cir842
- Svensson, D., Westman, J., Wickström, C., Jönsson, D., Herwald, H., and Nilsson, B. O. (2015). Human endogenous peptide p33 inhibits detrimental effects of LL-37 on osteoblast viability. *J. Periodont. Res.* 50, 80–88. doi: 10.1111/jre.12184
- Takayanagi, H. (2007). Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 292–304. doi: 10.1038/nri2062
- Takayanagi, H. (2015). Osteoimmunology in 2014: two-faced immunology—from osteogenesis to bone resorption. *Nat. Rev. Rheumatol.* 11, 74–76. doi: 10.1038/nrrheum.2014.219
- Testoni, F., Montanaro, L., Poggi, A., Visai, L., Campoccia, D., and Arciola, C. R. (2011). Internalization by osteoblasts of two *Staphylococcus aureus* clinical isolates differing in their adhesin gene pattern. *Int. J. Artif. Organs* 34, 789–798. doi: 10.5301/ijao.5000058
- Trouillet-Assant, S., Gallet, M., Nauroy, P., Rasigade, J. P., Flammier, S., Parroche, P., et al. (2015). Dual impact of live *Staphylococcus aureus* on the osteoclast lineage, leading to increased bone resorption. *J. Infect. Dis.* 211, 571–581. doi: 10.1093/infdis/jiu386
- Tuchscher, L., Bischoff, M., Lattar, S. M., Noto Llana, M., Pflörtner, H., Niemann, S., et al. (2015). Sigma factor SigB is crucial to mediate *Staphylococcus aureus* adaptation during chronic infections. *PLoS Pathog.* 11:e1004870. doi: 10.1371/journal.ppat.1004870
- Tuchscher, L., and Löffler, B. (2015). *Staphylococcus aureus* dynamically adapts global regulators and virulence factor expression in the course from acute to chronic infection. *Curr. Genet.* doi: 10.1007/s00294-015-0503-0. [Epub ahead of print].
- Tuchscher, L., Medina, E., Hussain, M., Völker, W., Heitmann, V., Niemann, S., 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, 129–141. doi: 10.1002/emmm.201000115
- Tucker, K. A., Reilly, S. S., Leslie, C. S., and Hudson, M. C. (2000). Intracellular *Staphylococcus aureus* induces apoptosis in mouse osteoblasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 186, 151–156. doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09096.x
- Tung, H., Guss, B., Hellman, U., Persson, L., Rubin, K., and Rydén, C. (2000). A bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal sdr family. *Biochem. J.* 345(Pt 3), 611–619. doi: 10.1042/bj3450611
- Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., and Pennington, D. J. (2014). Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory

- disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 2563–2582. doi: 10.1016/j.bbamer.2014.05.014
- Valour, F., Rasigade, J. P., Trouillet-Assant, S., Gagnaire, J., Bouaziz, A., Karsenty, J., et al. (2015b). 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, 568.e1–568.e11. doi: 10.1016/j.cmi.2015.01.026
- Valour, F., Trouillet-Assant, S., Riffard, N., Tasse, J., Flammier, S., Rasigade, J. P., et al. (2015a). Antimicrobial activity against intra-osteoblastic *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chem.* 59, 2029–2036. doi: 10.1128/AAC.04359-14t
- Vandenesch, F., Lina, G., and Henry, T. (2012). *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2:12. doi: 10.3389/fcimb.2012.00012
- Varoga, D., Tohidnezhad, M., Paulsen, F., Wruck, C. J., Brandenburg, L., Mentlein, R., et al. (2008). The role of human beta-defensin-2 in bone. *J. Anat.* 213, 749–757. doi: 10.1111/j.1469-7580.2008.00992.x
- Varoga, D., Wruck, C. J., Tohidnezhad, M., Brandenburg, L., Paulsen, F., Mentlein, R., et al. (2009). Osteoblasts participate in the innate immunity of the bone by producing human beta defensin-3. *Histochem. Cell Biol.* 131, 207–218. doi: 10.1007/s00418-008-0522-8
- Vazquez, V., Liang, X., Horndahl, J. K., Ganesh, V. K., Smeds, E., Foster, T. J., et al. (2011). Fibrinogen is a ligand for the *Staphylococcus aureus* microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM) bone sialoprotein-binding protein (bbp). *J. Biol. Chem.* 286, 29797–29805. doi: 10.1074/jbc.M110.214981
- Widaa, A., Claro, T., Foster, T. J., O'Brien, F. J., and Kerrigan, S. W. (2012). *Staphylococcus aureus* protein a plays a critical role in mediating bone destruction and bone loss in osteomyelitis. *PLoS ONE* 7:e40586. doi: 10.1371/journal.pone.0040586
- Wolf, A. J., Arruda, A., Reyes, C. N., Kaplan, A. T., Shimada, T., Shimada, K., et al. (2011). Phagosomal degradation increases TLR access to bacterial ligands and enhances macrophage sensitivity to bacteria. *J. Immunol.* 187, 6002–6010. doi: 10.4049/jimmunol.1100232
- Wright, K. M., and Friedland, J. S. (2002). Differential regulation of chemokine secretion in tuberculous and staphylococcal osteomyelitis. *J. Bone Miner. Res.* 17, 1680–1690. doi: 10.1359/jbmr.2002.17.9.1680
- Wright, K. M., and Friedland, J. S. (2004). Regulation of chemokine gene expression and secretion in *Staphylococcus aureus*-infected osteoblasts. *Microbes Infect.* 6, 844–852. doi: 10.1016/j.micinf.2004.04.008
- Yoshii, T., Magara, S., Miyai, D., Nishimura, H., Kuroki, E., Furudoi, S., et al. (2002). Local levels of interleukin-1beta, -4, -6 and tumor necrosis factor alpha in an experimental model of murine osteomyelitis due to *Staphylococcus aureus*. *Cytokine* 19, 59–65. doi: 10.1006/cyto.2002.1039
- Young, A. B., Cooley, I. D., Chauhan, V. S., and Marriott, I. (2011). Causative agents of osteomyelitis induce death domain-containing TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor expression on osteoblasts. *Bone* 48, 857–863. doi: 10.1016/j.bone.2010.11.015
- Zapotoczna, M., Jevnikar, Z., Miajlovic, H., Kos, J., and Foster, T. J. (2013). Iron-regulated surface determinant b (isdB) promotes *Staphylococcus aureus* adherence to and internalization by non-phagocytic human cells. *Cell. Microbiol.* 15, 1026–1041. doi: 10.1111/cmi.12097
- Zhu, C., Qin, H., Cheng, T., Tan, H. L., Guo, Y. Y., Shi, S. F., et al. (2013). *Staphylococcus aureus* supernatant induces the release of mouse beta-defensin-14 from osteoblasts via the p38 MAPK and NF-κB pathways. *Int. J. Mol. Med.* 31, 1484–1494. doi: 10.3892/ijmm.2013.1346
- Zhu, C., Wang, J., Cheng, T., Li, Q., Shen, H., Qin, H., et al. (2014). The potential role of increasing the release of mouse beta-defensin-14 in the treatment of osteomyelitis in mice: a primary study. *PLoS ONE* 9:e86874. doi: 10.1371/journal.pone.0086874
- Zou, W., Amcheslavsky, A., and Bar-Shavit, Z. (2003). CpG oligodeoxynucleotides modulate the osteoclastogenic activity of osteoblasts via toll-like receptor 9. *J. Biol. Chem.* 278, 16732–16740. doi: 10.1074/jbc.M212473200

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Josse, Velard and Gangloff. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

3 LES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES

Actuellement, la greffe osseuse autologue représente le « *gold standard* » pour la réparation osseuse, suite au débridement d'une IOA par exemple. Cependant, cette approche regroupe de nombreux inconvénients notamment une morbidité du site donneur, une disponibilité limitée de tissu à greffer et une qualité d'os insuffisante dans le cas des patients atteints d'ostéoporose. Pour pallier à ces problèmes, des allogreffes et xélogreffes peuvent être entreprises avec ici encore des risques non négligeables de rejet et/ou transmission de maladies (118).

Aussi, l'ingénierie tissulaire osseuse (ITO) a donc été développée comme une alternative potentielle pour contourner les inconvénients liés aux greffes. En général, l'ITO implique l'utilisation de biomatériaux associés à des MSC. Ces cellules multipotentes possèdent la capacité de se différencier en plusieurs types de cellules, notamment en ostéoblastes. De ce fait, elles représentent un outil intéressant dans la réparation du tissu osseux (119). De plus, les MSC possèdent des propriétés immuno-modulatrices et sont donc capables de prendre part aux processus antimicrobiens et inflammatoires en réponse à une infection bactérienne (120,121). Cette double compétence, régénération et immuno-modulation, apparaît comme intéressante dans un contexte de réparation osseuse en site infecté.

3.1 Généralités sur les cellules souches mésenchymateuses

3.1.1 Définition des cellules souches mésenchymateuses

Les MSC sont des cellules non hématopoïétiques isolées pour la première fois par *Friedenstein* à partir de la moelle osseuse où elles représentent environ 0,001 à 0,01 % des cellules nucléées (122). *In vitro*, les MSC sont qualifiées d'unités fibroblastiques formant des colonies (CFU-F) en lien avec leur morphologie similaire aux fibroblastes et de leur organisation en foyers cellulaires *in vitro* (120). Il est désormais reconnu que les MSC se trouvent dans tous les tissus de soutien. Actuellement, à des fins de recherche ou de thérapie, les sources de MSC les plus communément utilisées sont la moelle osseuse, le tissu adipeux et les tissus périnataux (118,123,124).

Face à la multiplication des sources et au scepticisme de certains chercheurs à considérer les MSC comme des cellules souches, l'ISCT (*International Society for Cellular Therapy*) a établi un consensus en 2006 (118,120,123).

Ce consensus définit les MSC comme des cellules stromales multipotentes sur la base des critères suivants (Schéma 18) :

- Capacité d'adhésion au plastique et le pouvoir d'auto-renouvellement *in vitro*.
- Marquage positif pour les marqueurs CD73, CD90 et CD105 et un marquage négatif pour CD11b ou CD14, CD19 ou CD79a, CD34, CD45 et HLA-DR (MHC II humain).
- Capacité de différenciation adipocytaire, chondrocytaire ou ostéoblastique.

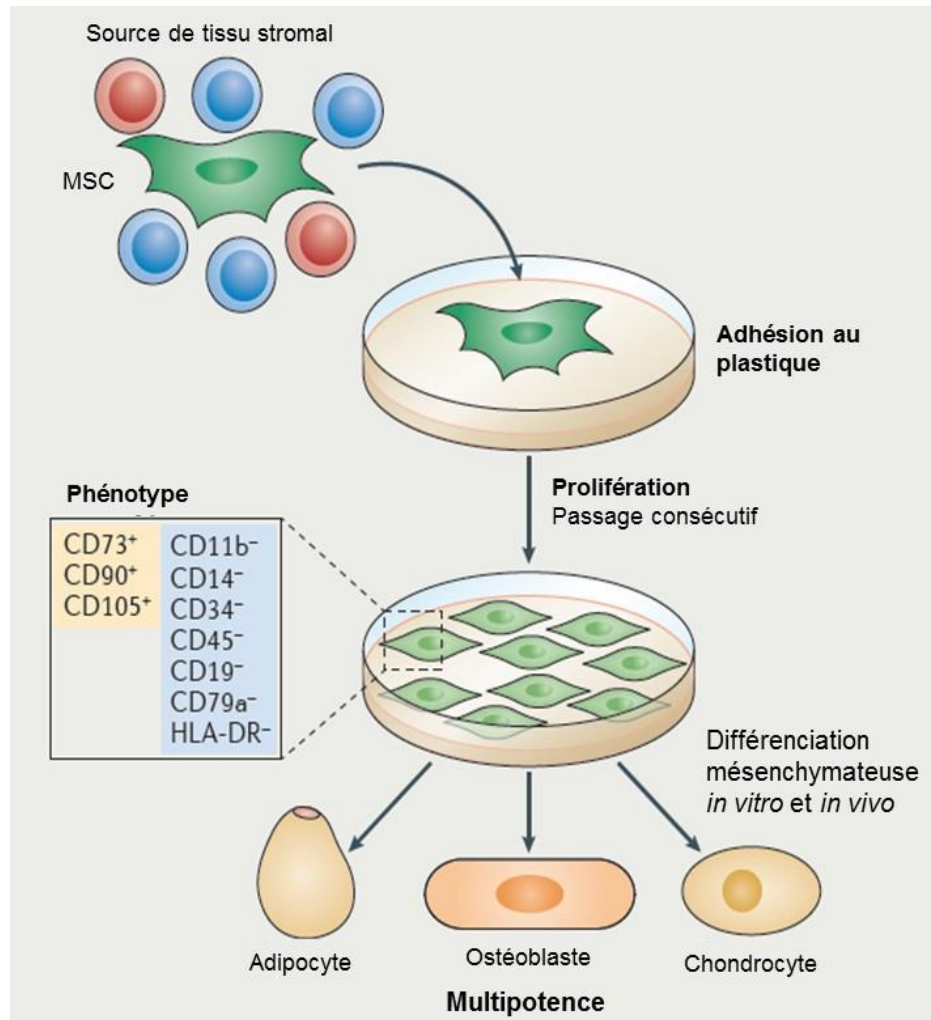


Schéma 18 : Critères de définition des MSC, adaptée de *Le Blanc and Mougiakakos* (120).

Dans un cadre clinique, l'utilisation des MSC de la moelle osseuse du patient est considérée comme le « *gold standard* ». Leur isolement est majoritairement réalisé par prélèvement au niveau de la crête iliaque, une méthode invasive et douloureuse. Toujours pour une utilisation clinique, il est possible de prélever les MSC du tissu adipeux par liposuction.

Une autre alternative, bien plus prometteuse, consiste en l'isolement de MSC à partir des tissus périnataux. La récupération de MSC à partir de ces tissus représente alors un moyen sûr et non invasif d'obtenir des MSC à potentiel thérapeutique.

3.1.2 Les cellules souches dérivées des tissus périnataux

3.1.2.1 Définition et intérêt des cellules souches dérivées des tissus périnataux

Au-delà de la moelle osseuse et du tissu adipeux, les MSC peuvent aussi être isolées des tissus périnataux. Le terme périnatal désigne la période s'étendant à la 20^{ème} semaine de gestation jusqu'aux 28 premiers jours de vie (125). Les tissus permettent le développement fœtal, tels que le liquide amniotique, la membrane amniotique, le placenta et le cordon ombilical, sont typiquement considérés comme des déchets une fois l'accouchement passé (126). Cependant en France, depuis la révision de la loi bioéthique de 2011, ces tissus ne sont plus assimilés médicalement à des « déchets opératoires » mais sont désormais reconnus comme des réservoirs précieux de cellules pour les thérapies sanguines et régénératives (127).

Les MSC périnatales ne sont ni des cellules souches embryonnaires ni des MSC adultes. Elles forment une alternative à ces 2 types cellulaires qui possèdent tous deux des défauts intrinsèques. Les cellules souches embryonnaires sont issues de la masse interne du blastocyste et sont des cellules pluripotentes. Le principal frein à leur utilisation est la formation de tératomes après leur transplantation (128). De plus, l'utilisation de cellules souches embryonnaires est controversée dans un certain nombre de pays.

Les MSC adultes sont des cellules multipotentes isolées à partir de tissus postnataux. Elles possèdent de ce fait un potentiel de prolifération plus limité, sont plus rares *in vivo* et difficiles à amplifier *ex vivo*. Enfin, l'obtention de MSC adultes nécessite une intervention invasive créant un risque non négligeable pour le patient (125).

Face à ces limitations, l'utilisation de MSC issues des tissus périnataux semble être une alternative intéressante. Contrairement aux cellules souches embryonnaires, ces MSC sont immunotolérées et ne développent pas de tératomes lors d'une transplantation. Une récente étude clinique portant sur le traitement de l'infarctus aigu a notamment démontré que l'injection intra-coronaire de MSC dérivées du cordon ombilical améliorerait la viabilité du myocarde et la fonction cardiaque sans induire de réaction inflammatoire (129,130).

3.1.2.2 Les cellules souches dérivées de la gelée de Wharton

Les MSC peuvent être isolées à partir de plusieurs compartiments du cordon ombilical. Elles peuvent être obtenues à partir du sang de cordon, de la zone péri-vasculaire ou encore à partir de la gelée de Wharton (WJ), le tissu de soutien contenu au sein du cordon ombilical (131).

Les WJ-MSC sont des cellules multipotentes, elles possèdent à leur surface les marqueurs spécifiques des MSC et expriment quelques marqueurs de pluripotence (123,132). Les WJ-MSC se différencient plus lentement en adipocytes, ont un temps de doublement plus rapide et un nombre de passage en culture *in vitro* avant la sénescence plus grand en comparaison aux MSC de la moelle osseuse (125). De plus, les WJ-MSC peuvent être isolées dans 100% des échantillons, jusqu'à 48 h après l'accouchement (131).

Cependant il reste une limite à l'utilisation clinique des WJ-MSC qui est l'absence de procédure standardisée pour leur isolement et leur amplification (126).

3.2 Utilisation des cellules souches mésenchymateuses en ingénierie tissulaire osseuse

Dans le cadre de la réparation du tissu osseux, l'ITO représente une alternative intéressante aux greffes. Cette pratique repose en partie sur l'utilisation de MSC associées à un biomatériau ostéoconducteur voire ostéoinducteur (118). L'utilisation de MSC est déjà entrée dans la pratique clinique, que ce soit pour la réparation de défauts cranio-maxillo-faciaux ou orthopédiques (133–135).

3.2.1 Principes de l'ingénierie tissulaire osseuse

Le « Diamond concept » définit les quatre critères nécessaires à la réussite d'une réparation d'un défaut osseux par ITO (Schéma 19, (119,136)) :

- La présence de cellules à potentiel ostéogénique comme des MSC.
- L'ajout de facteurs de croissance comme par exemple les BMP-2 et BMP-7 largement utilisées en ITO.
- L'élaboration d'un biomatériau ostéoconducteur qui favorise le développement des MSC. En ITO, les biomatériaux sont majoritairement composés de biocéramiques phosphocalciques comme par exemple l'hydroxyapatite et/ou de polymères comme le chitosane ou le polycaprolactone.
- L'assurance d'une stabilité mécanique pour le produit d'ITO. Dans le cas d'un défaut osseux important, la stabilité mécanique peut être assurée *via* l'utilisation de fixateurs internes et externes qui maintiennent l'alignement et favorisent l'intégration du dispositif.

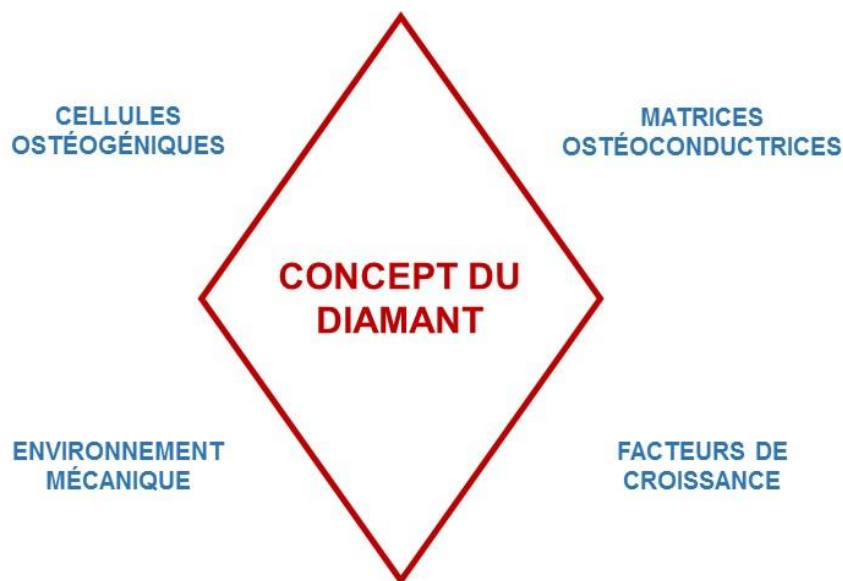


Schéma 19 : Le concept du diamant, adapté de *Giannoudis et al.* (136)

3.2.2 Exemple d'approche clinique pour la réparation cranio-maxillo-faciale

Dans ce type d'approche, des MSC autologues issues de la moelle osseuse (135) ou du tissu adipeux (134) sont couplées à des facteurs de croissance type BMP et des composés minéraux type hydroxyapatite. Dans l'étude de *Warnke et al.*, les éléments précédents sont introduits dans

un hydrogel de collagène de type I bovin (135). L'ensemble est par la suite associé à une armature en titane de forme identique à la zone à combler. Puis, ce produit d'ITO est implanté *in vivo* au niveau d'un muscle squelettique comme le *latissimus dorsi* (Schéma 20). Cette implantation dans une zone ectopique permet la vascularisation de la structure. Le patient est alors son propre bioréacteur. Une fois vascularisé, le dispositif est extrait du muscle et implanté dans la zone osseuse déficiente (118). Dans l'étude de *Mesimäki et al.*, il est rapporté que quatre mois après l'implantation du produit d'ITO, l'os néoformé a acquis une intégrité structurale suffisante pour supporter l'installation d'implants dentaires (134).

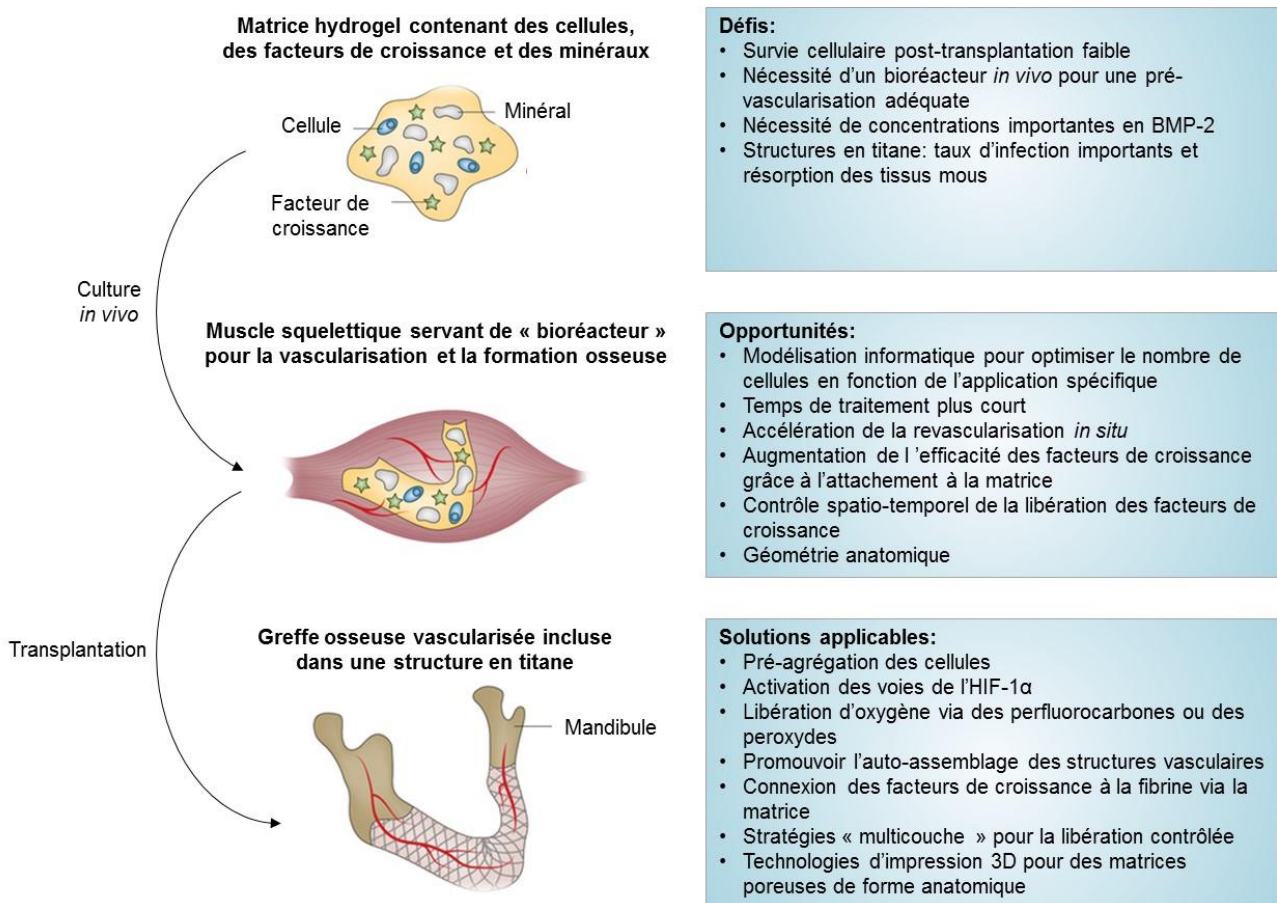


Schéma 20 : Approche clinique généralisée basée sur l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses pour la régénération des défauts crânio-maxillo-faciaux importants, adapté de *Grayson et al.* (118).

3.2.2.1 Approche clinique pour la réparation osseuse orthopédique

Les défauts osseux orthopédiques sont un défi thérapeutique. Contrairement à la réparation crânio-maxillo-faciale, la stabilité mécanique du dispositif est primordiale au regard des contraintes liées à l'activité locomotrice. Le principe consiste à aspirer un échantillon de la moelle osseuse du patient receveur et à le réinjecter au niveau de la fracture. Le prélèvement peut, d'une part, être concentré et/ou amplifié afin d'augmenter la densité cellulaire et, d'autre part, être combiné à un biomatériau avant d'être implanté au niveau de la fracture (Schéma 21, (137,138)).

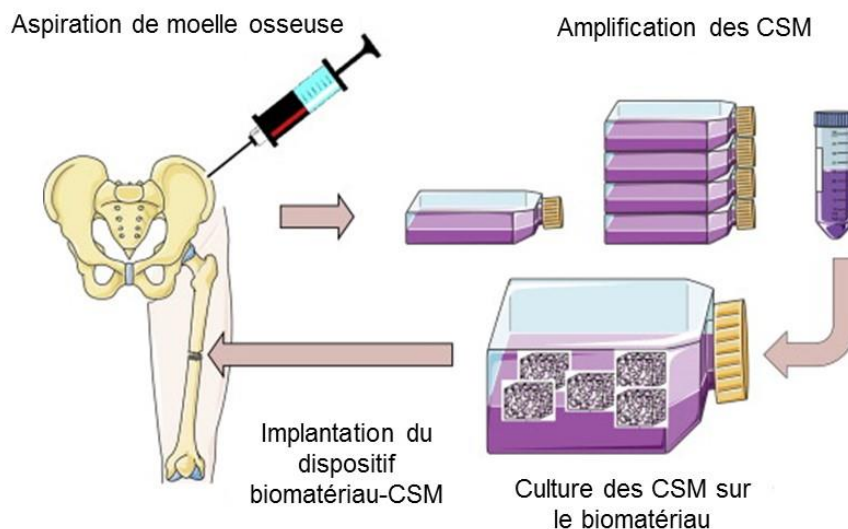


Schéma 21 : Principe du bioréacteur qui permet la culture de MSC sur des biomatériaux avant leur implantation, adapté de *Rosset et al.* (137)

Dans le cas d'une fracture au niveau du tibia, l'injection d'un dispositif d'ITO composé de MSC autologues de la moelle osseuse, d'un concentré de plaquettes issu du sang périphérique, de facteurs de croissance et d'une allogreffe osseuse déminéralisée, a permis de réduire le temps de cicatrisation de 3 mois à 1 mois et demi. L'injection en sous-cutané de ce produit d'ingénierie à des souris immunodéprimées a aussi permis une formation d'os ectopique. Cependant les auteurs ont été dans l'impossibilité de déterminer l'origine de l'os nouvellement formé *in vivo*. Le rôle précis des MSC dans ce processus reste donc incertain (118,139).

Dans le cas d'un traitement de défauts osseux importants, *Quarto et al.* ont été les premiers à rapporter l'utilisation de MSC dérivées de la moelle osseuse. Des MSC amplifiées *in vitro* ont été combinées à des pièces d'hydroxyapatite *in situ* pour combler des défauts de 4 à 7 cm. Ils

ont traités avec succès 3 patients avec des défauts au niveau du tibia, de l'humérus et du cubitus (133,137). Le suivi régulier de ces cicatrises osseuses a été réalisé par radiographie et tomographie assistée par ordinateur puis rapporté dans une nouvelle étude publiée quelques années après (140).

Toutefois, des études sont encore nécessaires avant que l'ITO ne devienne une routine clinique. Des innovations sont encore à apporter afin de maximiser la rétention des cellules et leur viabilité au sein du biomatériau, la formation du réseau vasculaire ou encore la capacité de différenciation ostéoblastique (118).

3.3 Cellules souches mésenchymateuses et infection bactérienne

Au-delà de leur potentiel pour la réparation tissulaire, les MSC sont de plus en plus étudiées pour la lutte contre les infections bactériennes (121,141). D'une part, les MSC peuvent interagir directement avec les bactéries et participer aux phénomènes de défense par la production de peptides antimicrobiens comme le LL-37 (142). D'autre part, les MSC minimiseraient l'exacerbation inflammatoire liée à l'infection (143).

3.3.1 Interaction entre les cellules souches mésenchymateuses et les bactéries

L'adhérence et l'internalisation de bactéries par les MSC est un phénomène qui a été observé pour différents types tels que *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *E. coli* ou les bactéries pathogènes de la cavité bucco-dentaire (144,145). A la suite de l'internalisation, la question du devenir des bactéries intracellulaires au sein des MSC est posée. *Gorbunov et al.* ont décrit une lyse des bactéries au niveau intracellulaire lors d'interactions *in vitro* entre des MSC murines et *S. epidermidis* (146).

Les bactéries peuvent également diminuer la viabilité des MSC *in vitro*. Ce phénomène a notamment été observé lors d'infection par *S. aureus*, *S. epidermidis* et *P. aeruginosa* (146,147).

Les bactéries peuvent aussi influencer la prolifération et la différenciation des MSC *in vitro* (145,148). Cependant, les résultats des quelques études sur le sujet sont contradictoires. Une première étude a montré que la stimulation de MSC de la moelle osseuse par des surnageants issus de cultures de *S. aureus* et *S. epidermidis* favorisait une diminution de la prolifération (148). A l'opposé, une seconde étude a démontré que la stimulation de MSC issues du tissu

adipeux par *E. coli* inactivé à la chaleur favorisait la prolifération cellulaire ainsi qu'une différenciation ostéoblastique mais réduirait la différenciation adipocytaire. Dans la même étude, une stimulation des MSC par des bactéries à Gram positif inactivées à la chaleur favoriserait également la prolifération et minimise la différenciation adipocytaire (145).

Dans le cadre d'une infection bactérienne, les MSC peuvent aussi se défendre *via* la sécrétion de peptides antimicrobiens. *Krasnodembskaya et al.* ont observé que des MSC dérivées de la moelle osseuse sont capables de sécréter du LL-37, une molécule qui minimise la croissance de *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *E. coli* (142). Cette sécrétion de LL-37 a aussi été observée dans d'autres études (149,150).

3.3.2 Rôle des cellules souches mésenchymateuses dans la réponse inflammatoire aux infections bactériennes

La majorité des résultats concernant l'effet bénéfique des MSC lors d'une infection bactérienne ont été obtenus grâce à des modèles *in vivo* de sepsis d'origine polymicrobienne ou d'infections pulmonaires causées par *E. coli*. Peu d'études se sont intéressées aux infections à *S. aureus*. Cependant, les résultats de ces études convergent tous vers le fait que l'effet bénéfique observé serait majoritairement dû à l'interaction entre les MSC et les cellules immunes, favorisant une augmentation de la clairance bactérienne et une réduction du phénomène inflammatoire (121,141).

En réponse à un stimulus bactérien, les MSC sont capables de produire une importante variété de molécules inflammatoires comme par exemple les cytokines et les chimiokines (144,149,150). Elles produisent aussi du monoxyde d'azote (NO), de la prostaglandine E₂ (PGE₂) *via* l'activité de la cyclo-oxygénase 2 (COX2), ou de la kynurénine (KYN) *via* l'activité indoleamine 2,3-dioxygénase (120,151,152). La production de ces différents médiateurs leur permet d'interagir avec les cellules immunes, comme par exemple les PNN et les macrophages (153).

L'une des premières observations dans le domaine fut que les MSC de la moelle osseuse pouvaient inhiber la prolifération des lymphocytes T (154). Par la suite, il a été observé que les MSC avaient la capacité d'orienter la polarisation des macrophages, des cellules dendritiques et des lymphocytes vers un profil à tendance anti-inflammatoire (143,151,155).

En effet, les MSC provoquent une diminution de la sécrétion de TNF- α par les cellules dendritiques matures conventionnelles CD1⁺ alors qu'elles favorisent la production d'IL-10 par les cellules dendritiques plasmocytoïdes (151).

De plus, l'induction d'un profil anti-inflammatoire par les MSC est aussi visible avec les lymphocytes T. Les MSC favorisent la diminution de la production d'IFN- γ pro-inflammatoire par les Th1 alors qu'elles provoquent une augmentation de la sécrétion d'IL-4 anti-inflammatoire en co-culture avec des lymphocytes Th2. Elles provoquent aussi l'augmentation du nombre de lymphocyte T régulateurs, la diminution de production d'IFN- γ par les cellules NK (*natural killer*) et l'inhibition de la différenciation des lymphocytes Th17 (151,155–157).

Les macrophages peuvent être classiquement polarisés par leur microenvironnement en macrophages activés M1 ou de manière plus alternative en macrophages activés M2. Cette dichotomie est simplifiée en relation avec le classement des lymphocytes en Th1 et Th2. Les molécules sécrétées par les lymphocytes Th1 favoriseraient un type d'activation (M1) alors que celles produites par les lymphocytes Th2 favoriseraient l'activation des macrophages M2 (158). De manière simple, les macrophages M1 sont considérés comme pro-inflammatoires et comme possédant une activité antimicrobienne. Il est attribué aux macrophages M2 des propriétés de résolution de l'inflammation et de réparation tissulaire, *via* la sécrétion d'IL-10, de facteurs trophiques ou par l'élimination des cellules apoptotiques (120,159).

Les MSC sont capables de recruter des macrophages sur un site inflammatoire en sécrétant différentes chimiokines comme le CCL3, le CCL12 ou le CXCL2 (Schéma 22, (160)). Elles influencent la formation de macrophages M2 et minimisent la formation de macrophages M1 pro-inflammatoires. Cette activité serait notamment liée à la PGE2 et à la KYN dont la sécrétion par les MSC peut être stimulée par le LPS, le TNF- α ou l'IFN- γ (120,161,162).

En 2009, *Nemeth et al.* ont démontré l'effet positif des MSC dans un modèle de sepsis murin (143). Cet effet est dû à la production de PGE₂ par les MSC. La PGE₂ stimule les récepteurs EP2 et EP4 des macrophages qui produisent à leur tour de l'IL-10. L'IL-10 a pour effet de réduire la migration des neutrophiles et les dommages oxydatifs qui en sont dépendants. L'observation d'une diminution des concentrations sériques des médiateurs pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α a confirmé cet effet anti-inflammatoire (143). Les MSC minimisent aussi l'activité des macrophages M1 notamment *via* la production de TSG6 (*TNF-stimulated gene 6 protein*), une molécule qui peut interférer avec la voie de signalisation TLR2 / NF- κ B (163).

Récemment, *Seebach et al.* ont démontré que les MSC pourraient être responsable du recrutement de macrophages M1 dans la phase précoce de la réparation tissulaire après l'implantation d'un dispositif d'ITO (164).

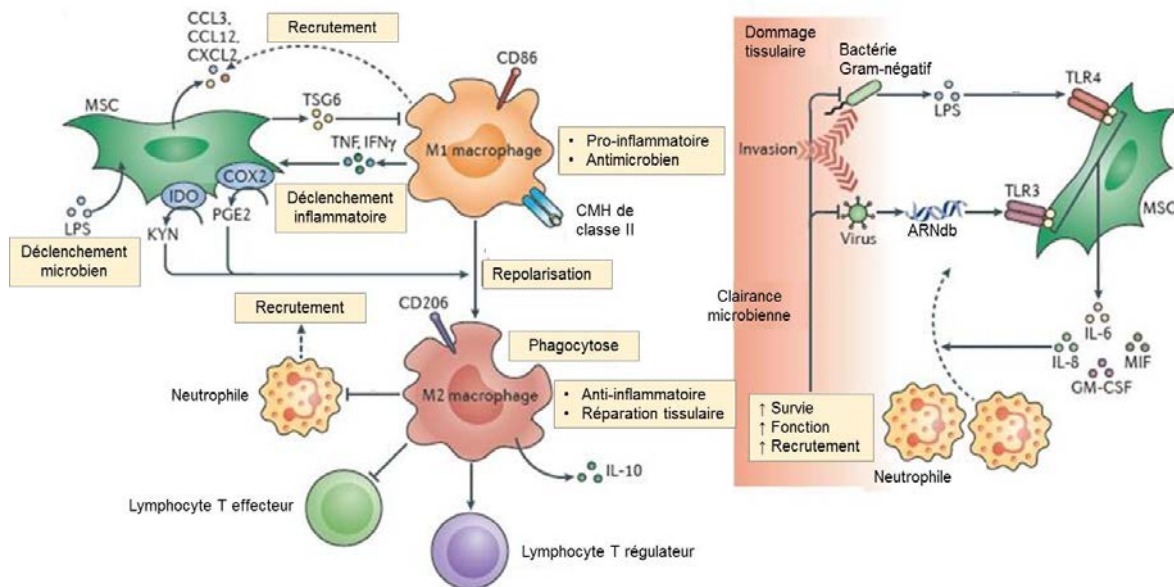


Schéma 22 : Les MSC et les cellules phagocytaires interagissent de manière étroite pendant les réponses inflammatoires, adapté de *Le Blanc and Mougiakakos* (120).

Les MSC tissulaires sont aussi capables de recruter directement les neutrophiles, d'accroître leurs propriétés pro-inflammatoires et leur durée de vie (165). Elles peuvent notamment protéger les neutrophiles de l'apoptose en produisant de l'IL-6 (166). Ceci permet d'augmenter les propriétés antibactériennes des neutrophiles et de favoriser une meilleure réponse contre une potentielle attaque bactérienne (167).

Les MSC seraient donc capables de favoriser la défense antimicrobienne par un effet bénéfique sur les neutrophiles, d'induire la réparation tissulaire et de favoriser la résolution de l'inflammation en interagissant avec les macrophages. Néanmoins, il est important de garder à l'esprit que les propriétés immunomodulatrices et la capacité de réponse des MSC peuvent varier en fonction de leur source (168–170). De plus, *Waterman et al.* ont apporté une nouvelle pierre à l'édifice en décrivant la capacité de polarisation des MSC. Suite à une stimulation spécifique des TLR, les MSC peuvent évoluer vers un profil plutôt pro-inflammatoire MSC1 ou au contraire vers un profil à tendance anti-inflammatoire MSC2 (171).

3.3.3 Approche *in vivo* dans le traitement des infections à *Staphylococcus aureus* par les cellules souches mésenchymateuses.

A notre connaissance, seules trois études *in vivo* sont actuellement disponibles concernant le rôle des MSC lors d'une infection par *S. aureus*.

Kim et al. ont élaboré un modèle murin de syndrome de choc toxique causé par l'entérotoxine B de *S. aureus*. Dans ce cas, l'injection de MSC permet de minimiser les concentrations sériques des médiateurs pro-inflammatoires IL-2, IL-6 et TNF- α mais pas celle de l'IFN- γ . Néanmoins, l'apport de MSC ne permet pas d'augmenter le taux de survie dans ce modèle de syndrome de choc toxique fatal (172).

Une autre étude de *Yuan et al.* a montré des effets similaires dans un modèle de rat mimant une infection par un biofilm de *S. aureus* résistant à la méthicilline, à savoir une réduction de l'infection bactérienne et de l'expression des médiateurs inflammatoires (173). Cependant, le taux de survie à l'infection et le potentiel fatal de celle-ci ne sont pas évoqués dans l'article.

Dans le cadre d'utilisation de MSC pour la réparation osseuse dans un site infecté par *S. aureus*, l'unique étude disponible actuellement a mis en évidence que l'apport de MSC stimulait l'infection. Dans ce modèle animal, les MSC favorisent la destruction osseuse et la formation d'un abcès. De multiples raisons sont envisagées pour expliquer cet effet néfaste : la capacité d'internalisation de *S. aureus* au sein des MSC, formant une niche protectrice ; la nécrose des MSC et le relargage de substances toxiques favorisant la destruction des tissus ; la modulation des molécules inflammatoires déstabilisant le système immunitaire ; une augmentation du nombre de monocytes circulants, futurs précurseurs de macrophages et/ou d'ostéoclastes. Les auteurs précisent aussi que l'expression de LL-37 n'est pas augmentée en présence de *S. aureus* (174).

Contrairement à ce qui a pu être rapporté pour le sepsis ou les infections pulmonaires, la présence de MSC dans le cadre d'une IOAM à *S. aureus* ne semble pas être bénéfique. Le traitement de l'infection bactérienne au préalable apparaît comme une étape nécessaire avant l'implantation d'un dispositif d'ITO. Néanmoins, ces résultats sont basés sur la seule étude disponible sur le sujet.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Les IOA sont des maladies infectieuses entraînant une destruction du tissu osseux dans un environnement inflammatoire. Ces infections sont majoritairement d'origine bactérienne et *S. aureus* est fréquemment impliqué. Au cours d'une IOA, *S. aureus* interagit avec les cellules formatrices d'os. Il est capable d'adhérer à ces cellules, d'y être internalisé, d'induire une mortalité cellulaire et de favoriser la production de médiateurs pro-inflammatoires et de modulateurs ostéoclastogéniques. La littérature fait aussi état de la capacité de *S. aureus* à réduire la différenciation et la maturation des cellules osseuses, notamment de réduire des marqueurs spécifiques de l'ostéogénèse. Cependant, l'effet de la maturation cellulaire sur le comportement des cellules osseuses lors d'une infection à *S. aureus* reste encore peu étudié.

Nous avons donc souhaité évaluer si la maturation des cellules osseuses pouvait influencer sur leur capacité de réponse face à *S. aureus*.

Dans un premier temps, des interactions entre *S. aureus* et des cellules osseuses humaines primaires (hpBCs) ont été réalisées dans deux modèles d'infection *in vitro*. Nous avons pu observer si l'internalisation de *S. aureus*, la mortalité cellulaire, la production de médiateurs pro-inflammatoires et de modulateurs ostéoclastogéniques étaient influencés par l'état de maturation de ces cellules, à savoir une population de cellules osseuses hétérogènes et peu matures et une population de cellules plus orientées vers la maturation ostéoblastique

Dans un second temps, nous avons étudié l'impact de *S. aureus* sur des cellules souches mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton dans un modèle d'infection précoce *in vitro*. Le but de cette seconde étude était d'étudier le comportement de cellules indifférenciées, à fort potentiel ostéogénique, face à *S. aureus*. Ceci nous a permis d'enrichir nos résultats concernant l'impact de la différenciation et de la maturation cellulaire en contexte infectieux mais aussi de recueillir des premières informations utiles dans le domaine de la régénération osseuse en site infecté.

RESULTATS

1^{ere} partie : impact de la maturation de cellules osseuses primaires sur leur comportement dans des modèles d'infection à *Staphylococcus aureus* aiguë et persistante

Le remodelage osseux est un mécanisme constant qui implique deux populations cellulaires, les ostéoblastes et les ostéoclastes. Alors que les ostéoclastes ont pour rôle de dégrader la MEO, le rôle des ostéoblastes est de former cette matrice. Issues de la différenciation des MSC, les hpBCs se différencient selon plusieurs étapes afin d'aboutir au stade d'ostéoblastes matures. Selon l'étape de différenciation, les cellules ont des rôles spécifiques. La synthèse des protéines de la MEO est par exemple réalisée par les cellules faiblement différenciées alors que la minéralisation de la matrice est exécutée par les ostéoblastes matures.

Au-delà de leur rôle dans la formation et l'homéostasie du tissu osseux, les hpBCs possèdent des fonctions supplémentaires notamment dans les cas d'IOA.

Les IOA sont des infections graves qui peuvent laisser des séquelles et provoquer la mort du patient si elles ne sont pas traitées. *S. aureus* est fréquemment responsable des IOA et des IOAM. Longtemps considérée comme une bactérie strictement extracellulaire, il est maintenant reconnu que celle-ci peut être internalisée par les cellules phagocytaires non professionnelles. Ce phénomène a notamment été observé pour les cellules épithéliales pulmonaires, les cellules endothéliales et les ostéoblastes. La littérature rapporte que l'interaction entre *S. aureus* et les ostéoblastes conduit à trois grands types de réponses néfastes : la mort des ostéoblastes, la production de médiateurs pro-inflammatoires par les ostéoblastes et une augmentation de la formation d'ostéoclastes *via* une sécrétion accrue de RANKL par les ostéoblastes infectés.

Le but de cette étude a été d'évaluer si l'état de maturation cellulaire peut influencer l'interaction entre des hpBCs et *S. aureus*. Pour cela, nous avons cultivé les hpBCs dans un milieu de culture standard, pour conserver une population cellulaire hétérogène, et dans un milieu de culture ostéogénique spécifique, pour obtenir une population de hpBCs majoritairement composée de cellules exprimant les marqueurs de la maturation ostéoblastique.

Ensuite, deux modèles d'infection avec *S. aureus* ont été utilisés afin de mimer le début d'une infection aiguë et une infection persistante des ostéoblastes.

Les résultats de cette étude ont montré une différence de maturation effective entre les deux populations de hpBCs. De plus, nous avons pu observer que même si l'internalisation et la cytotoxicité n'étaient pas influencées par la maturation cellulaire, l'expression des ARNm de cytokines et de chimiokines par les hpBCs infectées était influencée par l'état de maturation des cellules.

Par ces résultats, notre étude suggère que l'état de maturation est un critère à prendre en compte dans le développement de thérapies cellulaires pour la régénération en site infecté.

Impact of human primary bone-forming cells maturation on their behavior in acute or persistent *Staphylococcus aureus* infection models

Jérôme Josse^{1,2}, Christine Guillaume^{1,3}, Camille Bour¹, Flora Lemaire¹, Céline Mongaret^{1,2}, Florence Draux^{1,3}, Frédéric Velard^{1,3} and Sophie C. Gangloff^{1,2}

¹ EA 4691 « Biomatériaux et inflammation en site osseux », Pôle Santé, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France

² UFR Pharmacie, Pôle Santé, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France

³ UFR Odontologie, Pôle Santé, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France

Correspondence:

Prof. Sophie GANGLOFF,

EA 4691 Biomatériaux et inflammation en site osseux, UFR de Pharmacie de Reims,

1 avenue du Maréchal Juin, 51095 Reims Cedex, France

Email: sophie.gangloff@univ-reims.fr

Keywords: *Staphylococcus aureus* – osteoblast – cytokine – chemokine – differentiation - maturation

ABSTRACT

On one hand, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is known as one of the most incriminated pathogens in bacterial infection such as skin abscess, pneumonia, endocarditis, osteomyelitis or implant-associated infection. On the other hand, bone homeostasis is altered during infections by *S. aureus* through the induction of various responses from the osteoblasts, which are the bone forming cells responsible for extracellular matrix synthesis and its mineralization. Nevertheless despite the well described heterogeneity of osteoblasts due to their different stage of maturation, the impact of the maturation on their responses towards bacteria remains unclear. Here we describe the impact of human primary bone-forming cells maturation on their behavior after interaction with *S. aureus* in an acute and a persistent model of interaction. Herein, we

observed that osteoblast maturation did not influence nor the internalization and survival of *S. aureus* inside hpBCs neither the cell death related to the infection. Studying the expression of chemokines, cytokines and osteoclastogenic regulators by hpBCs, we observed different profiles of chemokines expression as a function of osteoblast maturation. Nevertheless, we did not notice any statistical variation of relative proteins release by both SM- and OM-hpBCs in the presence of *S. aureus* compared to the non-infected counterparts.

Our findings support that osteoblast maturation did not impact the behavior of hpBCs infected with *S. aureus* and also suggested that the role of osteoblasts / hpBCs may not be pivotal in the inflammatory response in osteomyelitis.

INTRODUCTION

Bone remodeling is a constant natural mechanism involving the coordinated effort of two major cell populations, osteoblasts and osteoclasts. The role of osteoblasts is to form bone matrix at the opposite of osteoclasts which resorb bone. Originally coming from pluripotent mesenchymal stem cells, bone-forming cells differentiate following several states towards osteoblast and through maturation and terminal differentiation towards mature osteoblast (Aubin, 2001). Specific features are attributed to each steps of osteoblastic lineage: synthesis of extracellular matrix is mainly realized by pre-osteoblasts and immature osteoblasts whereas mature osteoblasts are more involved in the mineralization of the extracellular matrix (Komori, 2006). Several markers of osteoblast development are expressed during the osteoblast maturation. These include alkaline phosphatase, type I collagen and osteopontin that are important for the control of bone matrix deposition and mineralization. At the end of the maturation process, osteoblasts also produce regulators of matrix mineralization such as osteocalcin and bone sialoprotein (Marie, 2008). In *in vitro* culture models, osteoblast differentiation and maturation are mainly realized thanks to the use of specific osteogenic medium containing ascorbic acid, β -glycerophosphate and dexamethasone (Brauer et al., 2016). Although the pivotal roles of osteoblasts are extracellular matrix synthesis, mineralization of the bone matrix and regulation of the bone resorbing activity of osteoclasts, there are growing evidences that osteoblasts have additional functions notably in case of osteomyelitis (Lisignoli et al., 2002).

Osteomyelitis are damaging bone infections, that can lead to sequelae and if uncontrolled, to patients death. During childhood, osteomyelitis are mostly a result of hematogenous spread

from distant infected tissue(s). In adulthood, surgical procedures are becoming increasingly responsible for a direct contamination of bone tissue, especially in presence of medical devices (Montanaro et al., 2011). *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), a gram-positive bacteria, is one of the most incriminated pathogens in osteomyelitis and implant-associated infection (Lowy, 1998). In the past, *S. aureus* was mostly considered as an extracellular pyogenic pathogen, but it is now admitted that it can be internalized and it can persist, protected from the immune system, in non-professional phagocytes (Löffler et al., 2014). The internalization of *S. aureus* was notably observed inside endothelial cells, lung epithelial cells, mesenchymal stem cells and osteoblasts (Ogawa et al., 1985; Jarry and Cheung, 2006; Josse et al., 2014; Hudson et al., 1995). Moreover, osteocytes, which are the last step of osteoblast differentiation, are also able to internalize *S. aureus* (Reilly et al., 2000). Thereby, *S. aureus* osteomyelitis develops very often from acute infection toward chronicity despite the antimicrobial treatments. This leads to a wide spectrum of events, from simple singular cell damages to delay in bone regeneration or excessive inflammatory response. Based on commonly used models three major types of harmful responses for the bone tissue have been described (reviewed in Josse et al., 2015). First, *S. aureus*-infected osteoblasts die through the activation of both apoptosis and necrosis mechanism. Second, *S. aureus* can induce the expression and the release of cytokines and chemokines. Third, among those cytokines *S. aureus* can favor the activation and formation of osteoclasts notably via an increase of RANKL production by osteoblasts. The combination of all these events can lead to a massive inflammatory bone loss (Lew and Waldvogel, 2004). Nevertheless, to date, no data were available regarding the influence of the maturation stage of osteoblasts in such models.

The aim of this study was to investigate if osteoblast maturation can impact the interaction between human primary bone-forming cells (hpBCs) and *S. aureus*.

Herein, we cultured hpBCs in a standard growth medium to conserve a heterogeneous population of hpBCs and in a dexamethasone-free osteogenic growth medium to obtain a population mostly composed of cells expressing maturation markers. Furthermore, two models of interaction with live *S. aureus* were used in order to mimic the onset of an early or a persistent infection of osteoblasts.

Taken together, our data demonstrate that dexamethasone-free osteogenic medium can favor the maturation of hpBCs. Moreover we demonstrated that if internalization and intracellular survival of *S. aureus* or *S. aureus*-related cell death are not influenced by the maturation of hpBCs, looking at their cytokines and chemokines expression revealed some influence of their

maturation. These results suggest that osteoblast differentiation stage could be a parameter to take in account in future cell-based therapy for infected bone repair.

MATERIAL & METHODS

Bacteria culture

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) 8325-4, wild-type laboratory strain (prophage-free NCTC 8325), was a generous gift from T.J. Foster (Department of Microbiology, Trinity College, Dublin, Ireland). Bacteria were maintained at -80°C and streaked onto trypticase soy broth (TSB) agar plates (BioMérieux) to obtain single colonies. After overnight growth in TSB medium at 37°C, *S. aureus* was re-suspended in TSB at a starting OD (620 nm) of 0.1 and cultured at 37°C up to an exponential growth phase ($OD_{620} = 0.4-0.6$). The bacteria were then washed and resuspended in sterile Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, Gibco) for the interaction experiments described below.

Cell culture and osteoblast maturation

Human primary bone cells (hpBCs) used in this study were obtained from patients bone explants and prepared as described previously (Braux et al., 2011; Brun et al., 2014). Bone explants were obtained from the femoral heads of eleven patients in the orthopedic and traumatology department of the University Hospital Center of Reims, France. Samples were collected after written informed consent was given by the donors following the guidelines approved by the University Hospital Center institutional review board. The explants were cut into small pieces, washed in DPBS four times for 5 min, digested in a solution of 0.5% trypsin, 5.3 mM EDTA (Life Technologies) and then in type II collagenase (1.4 mg.mL⁻¹, Sigma Aldrich). The fragments obtained were placed in 25 cm² culture flasks containing Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) supplemented with 20% FCS (Dutscher) and 1% antibiotic solution PenStrep® (Gibco) then incubated at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Cells were amplified for four passages and then divided in 2 cell populations: the first one was cultured in standard medium and the second one in osteogenic differentiation medium (enriched with ascorbic acid (50 µM, Gibco) and β-glycerophosphate (10 µM, Sigma Aldrich). Osteogenic medium did not contained dexamethasone in order to avoid anti-inflammatory effects (Wright and Friedland 2004). At 5th passage, cells were seeded at a density of 1 x 10⁴ cells per cm² in 24-well culture plates (BD Falcon) and cultured up to 28 days in each medium to assess the osteogenic differentiation model. For fluorescent staining procedure, cells

were seeded on glass coverslips or for scanning electron microscopy on Thermanox® coverslips (Thermo Scientific). LPS 0111:B4 (1 µg.mL⁻¹) (Sigma Aldrich) was used to confirm the cells ability to respond to a pro-inflammatory stimulus.

Set of interaction between hpBCs and *S. aureus*

Infection experiments were performed after 14 days of culture of hpBCs. Confluent cell cultures were washed with DPBS and incubated overnight with 1 mL of appropriate medium without antibiotics. The next day, cells were washed with DPBS, appropriate medium without antibiotics (1 mL / well) was renewed and bacteria were added. Cell count per well was determined to optimize the multiplicity of infection (MOI) to get 10:1 and 30:1 (*S. aureus*: cell). Interactions were performed following two models defined as acute infection and persistent infection.

The model of acute infection was performed as previously described (Josse et al., 2014). It allows extracellular and intracellular bacteria to interact with cells. Briefly, infections were performed between bacteria and hpBCs for 1 h, 3 h, 6 h and 9 h at MOI of 10:1 and 30:1 (*S. aureus* / cell).

The model of persistent infection was adapted from *Wright and Friedland* (Wright and Friedland, 2002). After 1 h of interaction between bacteria and cells (MOI of 10:1 and 30:1), co-cultures were first washed twice with DPBS and then incubated with the appropriate growth medium containing 100 µg.mL⁻¹ gentamicin for additional incubations to reach 9 h, 24 h and 48 h of interaction.

Intracellular counting

At the end of each interaction times in the model of acute infection, co-cultures were washed 3 times with DPBS and incubated 1 h with growth medium containing 100 µg.mL⁻¹ gentamicin at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Then, cells were washed 3 times with DPBS and 0.1% Triton X-100 solution was added to each well to harvest intracellular bacteria. Appropriated dilutions of the lysates were plated in triplicate on TSA plates for determination of the recovered colony forming units (CFU) after incubation for 18 h at 37°C.

For the model of persistent infection, co-cultures were washed 3 times with DPBS and the numbers of intracellular bacteria were determined as explained above.

Alkaline phosphatase activity

Determination of alkaline phosphatase activity was performed using the precipitating substrate BCIP®/NBT (SigmaFast™, Sigma). At appropriated times (7, 14, 21 and 28 days), cell cultures were rinsed twice with DPBS and fixed with 4% paraformaldehyde in DPBS. Then, wells were rinsed twice with DPBS and incubated 10 min with BCIP®/NBT. Thereafter, wells were rinsed twice with DPBS and dried in order to reveal by imaging the precipitations in the entire wells (Scanner Epson Perfection 1660 Photo).

Alizarin red staining

At appropriated times (7, 14, 21 and 28 days), cells were rinsed twice with DPBS and fixed with 4% paraformaldehyde in DPBS. Then, wells were rinsed twice with DPBS and distilled water. Cell cultures were incubated 10 min with alizarin red staining solution (Sigma). At the end of incubation period, wells were rinsed twice with DPBS, dried in order to image the entire wells (Scanner Epson Perfection 1660 Photo).

Type I collagen and osteocalcin immunofluorescent staining

Twenty-one days cell cultures were rinsed twice with DPBS and then fixed with 4% (m/v) paraformaldehyde (Agar Scientific LTD) in DPBS containing 0.1 % Triton X-100 (Prolabo) for 5 min at room temperature. After DPBS rinsing and a 3 % bovine serum albumine (BSA, Sigma Aldrich) saturation for 1 h, samples were incubated for 1 h with anti-human type I collagen antibodies (clone H-197, Santa-Cruz) or with anti-human osteocalcin antibodies (clone 190125, R&D Systems) (diluted at 1/400 and 1/50 respectively). After another BSA saturation step, samples were incubated with biotinylated horse anti-rabbit or goat anti-mouse secondary antibodies (diluted at 1/50, Vector) for 30 min, rinse in DPBS and incubated in a solution of streptavidine-Alexafluor®488 (diluted at 1/200, Molecular Probes) for 30 min and rinse in DPBS. After rinsing with dH₂O, cells nuclei were counterstained for 5 min with DAPI (Invitrogen). These cells on glass coverslips were mounted (Fluorescent Mounting Medium Dako) and then visualized with Zeiss Axiovert 200 M inverted microscope (Carl Zeiss).

LDH measurement

Lactate dehydrogenase (LDH) activity in cell supernatant is relevant for cell membrane damage evaluation. At the end of each time period for both models of infection, measurement of LDH activity was performed on conditioned cell culture supernatants (Cytotoxicity detection kit

plus®, Roche Diagnostics) following manufacturer indications. Absorbance was read at 592 nm with correction of non-specific background at 700 nm.

Enzyme-linked immunosorbent assay

Pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and IL-6), chemokines (CCL2, CXCL1 and CXCL8) and OPG concentrations in conditioned supernatants were measured by ELISA, following the provided protocol (Duoset®, R&D Systems). Controls were composed of the non-stimulated cells and media alone.

Real-time PCR analysis

At the end of each infection period for both infection models, total RNA was extracted from osteoblasts using MasterPure™ RNA Purification Kit (Epicentre® Biotechnologies) in accordance with the manufacturer instructions. RNA quantity and purity of the samples were assessed using a Nanodrop® (Thermo Scientific). All samples OD₂₆₀/OD₂₈₀ ratios were between 1.95 and 2.05. Thereafter, RNA was reverse transcribed into cDNA using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit following manufacturer instructions (Applied Biosystems). The cDNA product was amplified by real-time PCR (Step One Plus®, Applied Biosystems) and the mRNA levels for osteogenic genes, inflammatory genes and internal control HPRT-1 were determined using the double strand-specific Power SYBR® Green dye system (Applied Biosystems). Primer sequences of all genes were determined with the Universal Probe Library Assay Design Center (Roche Applied Science). Primers efficiency was also measured (Table 1). Data analysis was performed with the Step One software v2.3 (Applied Biosystems). Results were calculated in accordance with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method and were presented as fold ratios.

Scanning electron microscopy (SEM)

SEM was performed for acute infection. After 9 h of co-cultures, samples were rinsed twice with DPBS and then fixed with 2.5% glutaraldehyde in DPBS for 1 h at room temperature. After graded ethanol dehydration the samples were immersed in HMDS for 5 min, air dried at room temperature and sputtered with a thin gold–palladium film under a JEOL ion sputter JFC 1100 (JEOL). Cells were observed using a LaB6 electron microscope (JEOL JSM-5400 LV).

Graphical representation of data and statistics

Each experiment was performed on cells coming from 4 out of 11 independent donors. Each pool of cells were in both standard medium and osteogenic medium. Data were presented as whiskers plots: black points represent maximum and minimum values, black bars represent 1st and 9th decile, the bottom and top of the box are the 1st and 3rd quartiles, and the red band inside the box the median. Grey box plots were used for hpBCs cultured in standard medium (SM-hpBCs) and black box plots were used for hpBCs cultured in osteogenic medium (OM-hpBCs). In regard with the little number of donors, non-parametric exact Wilcoxon-Mann-Whitney tests with the *p* value fixed at 0.05 were carried out to determine the significance of the results (StatXact 7.0, Cytel Inc.).

Table 1: Primers' nucleotide sequence for each primer couple

Target gene	Sequences	
	Forward primer	Reverse primer
<i>COL1A1</i>	5'-GGGATTCCCTGGACCTAAAG-3'	5'-GGAACACCTCGCTCTCCAG-3'
<i>SPARC</i>	5'-TTCCCTGTACACTGGCAGTTC-3'	5'-AATGCTCCATGGGGATGA-3'
<i>SPP1</i>	5'-GAGGGCTTGGTTGTCAGC-3'	5'-CAATTCTCATGGTAGTGAGTTTTCC-3'
<i>IBSP</i>	5'-GAGGGCTTGGTTGTCAGC-3'	5'-CAATTCTCATGGTAGTGAGTTTTCC-3'
<i>BGLAP</i>	5'-TGAGAGCCCTCACACTCCTC-3'	5'-ACCTTTGCTGGACTCTGCAC-3'
<i>IL-1β</i>	5'-CTGTCCTGCGTGTGAAAGA-3'	5'-TTGGGTAATTTTTGGGATCTACA-3'
<i>IL-6</i>	5'-GGAACAAGCCAGAGCTGTG-3'	5'-GGCTGGCATTGTGGTTGG-3'
<i>TNF-α</i>	5'-CAGCCTCCTCTCCTTCTIGAT-3'	5'-GCCAGAGGGCTGATTAGAGA-3'
<i>CCL2</i>	5'-AGTCTCTGCCGCCCTTCT-3'	5'-GTGACTGGGGCATTGATTG-3'
<i>CXCL1</i>	5'-TCCTGCATCCCCATAGTTA-3'	5'-CTTCAGGAACAGCCACCAGT-3'
<i>CXCL8</i>	5'-AGACAGCAGAGCACACAAGC-3'	5'-CTCCTTGGCAAAACTGCAC-3'
<i>RANKL</i>	5'-TGATTCATGTAGGAGAATTAACAGG-3'	5'-GATGTGCTGTGATCCAACGA-3'
<i>OPG</i>	5'-GAAGGGCGCTACCTTGAGAT-3'	5'-GCAAACGTATTTTCGCTCTGG-3'
<i>HPRT-1</i>	5'-TGACCTTGATTTATTTGCATACC-3'	5'-CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT-3'

RESULTS

Cells maturation is effective even without dexamethasone

To assess the efficiency of dexamethasone-free osteogenic medium to favor the osteoblast maturation, specific osteoblast markers were followed in the hpBCs cultured from the human femoral head explants (Figure 1).

Cells cultured in standard medium - named SM-hpBCs - presented a very low alkaline phosphatase activity and the alizarin red staining remained negative up to day 28 of culture (Figures 1 A and B). Cells cultured in dexamethasone-free osteogenic medium – named OM-hpBCs - exhibited a high alkaline phosphatase activity observed from day 14 to day 28 as well as a positive alizarin red staining after day 28 of culture (Figure 1 A and B). The mRNA

expressions of 5 major bone extracellular matrix proteins were also analyzed to evaluate the commitment in osteogenic differentiation for both populations of hpBCs. As seen in Figure 1 C after 14 days of culture, *COL1A1* expression was statistically lower for the OM-hpBCs compared to the expression by SM-hpBCs. No difference in *SPARC* and *SPP1* expressions could be seen. *IBSP* expression appeared upregulated and *BGLAP* was significantly increased in OM-hpBCs as compared to SM-hpBCs.

Immunofluorescence staining at day 21 confirmed the difference between the cultured cells (Figure 1D). Low production of type I collagen and absence of osteocalcin were observed for SM-hpBCs. At the opposite, type I collagen extracellular fibers as well as the presence of osteocalcin could be detected for OM-hpBCs.

Collectively, these results support that osteogenic medium without dexamethasone favored the osteoblast maturation, defining OM-hpBCs as more mature as compared to SM-hpBCs after 14 days of culture.

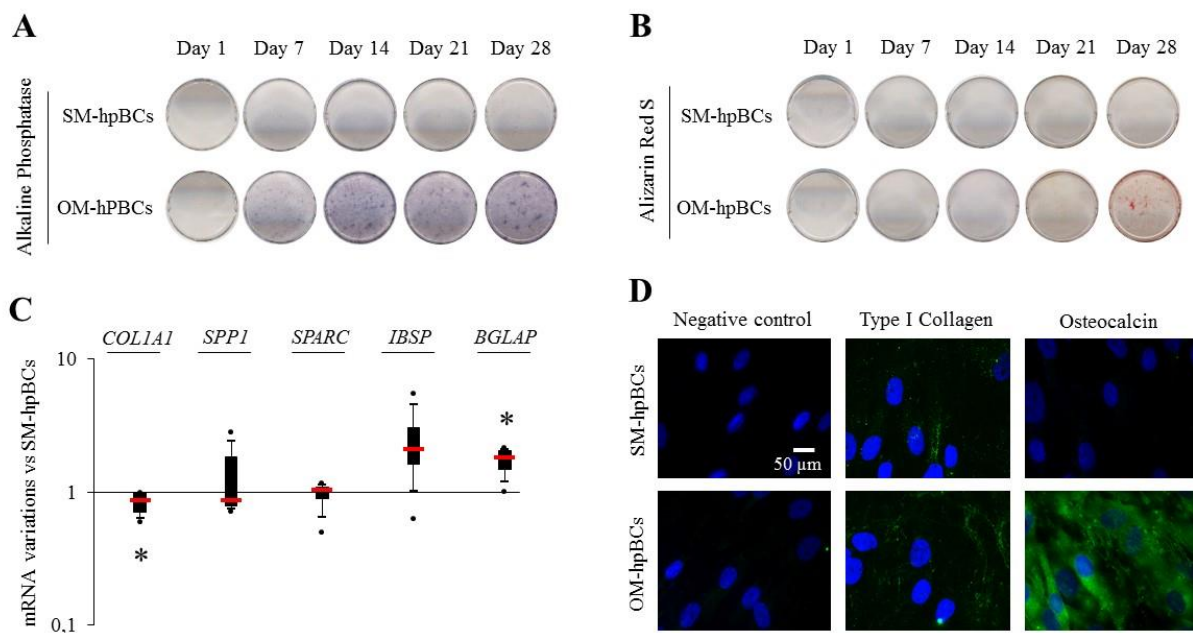


Figure 1: Osteogenic differentiation evidenced by (A) representative photographs of alkaline phosphatase staining of SM and OM-hpBCs after 7, 14, 21 and 28 days of culture, (B) alizarin red staining of SM and OM-hpBCs after 7, 14, 21 and 28 days of culture and (C) expression of osteogenic genes by OM-hpBCs compared to SM-hpBCs after 14 days of culture (mRNA were evaluated by RT-qPCR analysis, data were shown as specific variation of mRNA using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (HPRT-1 was used as internal control), * means $p < 0.05$ vs SM-hpBCs). (D) Representative micrographs of 21 days immunofluorescent stainings of cultured cells: type I collagen and osteocalcin were visualized in green thanks to Alexafluor®488. Nuclei were counterstained in blue by DAPI. Scale bar = 50 μ m. Experiments were performed on 4 independent donors.

S. aureus can survive inside hpBCs

To apprehend the impact of osteoblast maturation on the internalization and the survival of *S. aureus* inside hpBCs, an acute and a persistent infection models were used.

As seen in the acute infection model (Figure 2A), the mean number of intracellular bacteria was lower than 120 bacteria per 1000 cells after 1 h of interaction, independently of the cell differentiation. This number increased regularly with the time up to 9 h. After 9 h of interaction, the mean number of internalized live bacteria reached at least 8350 bacteria per 1000 cells.

In the persistent infection model (Figure 2B), the number of intracellular *S. aureus* seems to slightly decrease from 1 h to 48 h independently of the cell differentiation. Intracellular staphylococci survived inside the cells until 48 h with a mean number of bacteria between 10 and 45 bacteria per 1000 cells depending of the MOI. For each time, the number of bacteria was systematically higher with the MOI of 30:1 as compared to the MOI of 10:1.

Interestingly, comparing both models at 9 h post infection, there is at least a 2 log reduction in the number of intracellular bacteria in the cells after the persistent infection as compared to acute infection (Figures 2 A and B).

Similar results for internalization and survival of *S. aureus* were observed in both SM- and OM-hpBCs, suggesting that osteoblast maturation did not influenced these phenomena, even so a difference in bacterial adhesion could be seen between SM- and OM-hpBCs (Figure 3). Nevertheless, we observed that the ability of hpBCs to contain viable intracellular bacteria is strongly influenced by the presence of extracellular bacteria.

S. aureus induces cell death

To evaluate if osteoblasts maturation can impact *S. aureus*-related cell death, the release of LDH by osteoblasts has been quantified.

In the acute infection model, a low but significant decrease of LDH activity was observed at 1 h for SM-hpBCs. After 6 h of interaction, significant increases of LDH activity were detected in presence of *S. aureus* at the MOIs of 10:1 or 30:1 for both SM and OM-hpBCs (Figure 2 C). At 9 h of infection a more important and significant LDH release was observed without any MOI effect (10:1 or 30:1).

In the persistent infection model, the release of LDH presented more variability in between each time point, with level of LDH even sometimes lower for the infected cells, like for OM-hpBCs at 1 and 9 h post-infection (Figure 2 D). Apart from that, the quantity of LDH released by both populations of hpBCs did not vary in presence of *S. aureus* from 1 h to 48 h.

Similar results were observed for both SM- and OM-hpBCs, suggesting that osteoblast maturation has no influence in the protection towards cell death caused by *S. aureus*. However, the accumulation of extracellular *S. aureus* increased the cell death in the model of acute infection.

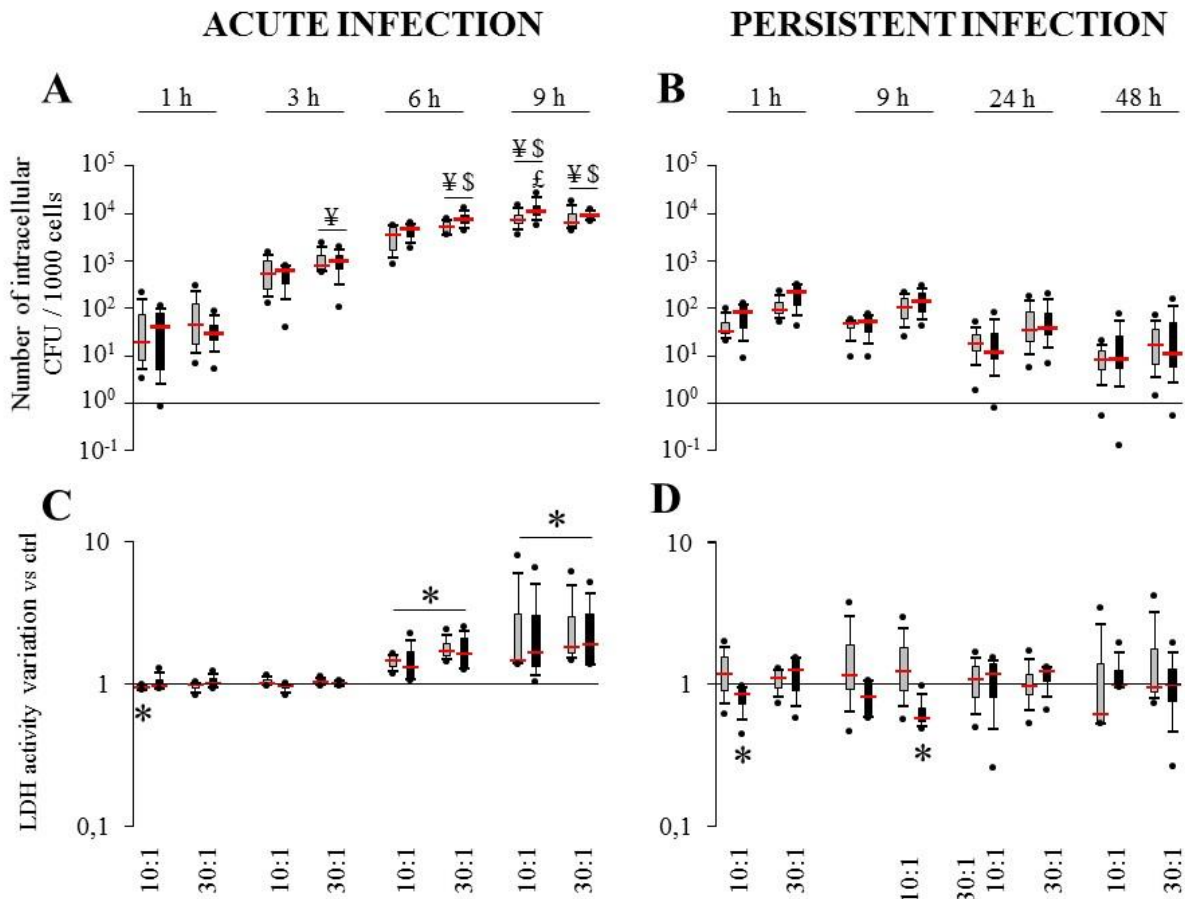


Figure 2: Internalization (A) and survival of *S. aureus* (B) and effect of *S. aureus* on cell death (C, D). SM-hpBCs (grey boxes) and OM-hpBCs (black boxes) were exposed to viable *S. aureus* (MOI of 10:1 and 30:1) for 1 h, 3 h, 6 h and 9 h in acute infection (A, C) and for 1 h, 9 h, 24 h and 48 h in persistent infection (B, D).

For internalization (A) and survival (B), the number of intracellular bacteria was determined after serial plating. ¥ means $p < 0.05$ compared to value at 1 h for the same MOI, \$ means $p < 0.05$ compared to value at 3 h for the same MOI, £ means $p < 0.05$ compared to value at 6 h for the same MOI. For cell viability (C, D), LDH activity was measured in cell supernatants. Data were shown as specific variation of optical density compared to optical density of relative non-infected cells. * means $p < 0.05$ compared to non-infected cells. Experiments were performed on 4 independent donors.

ACUTE INFECTION

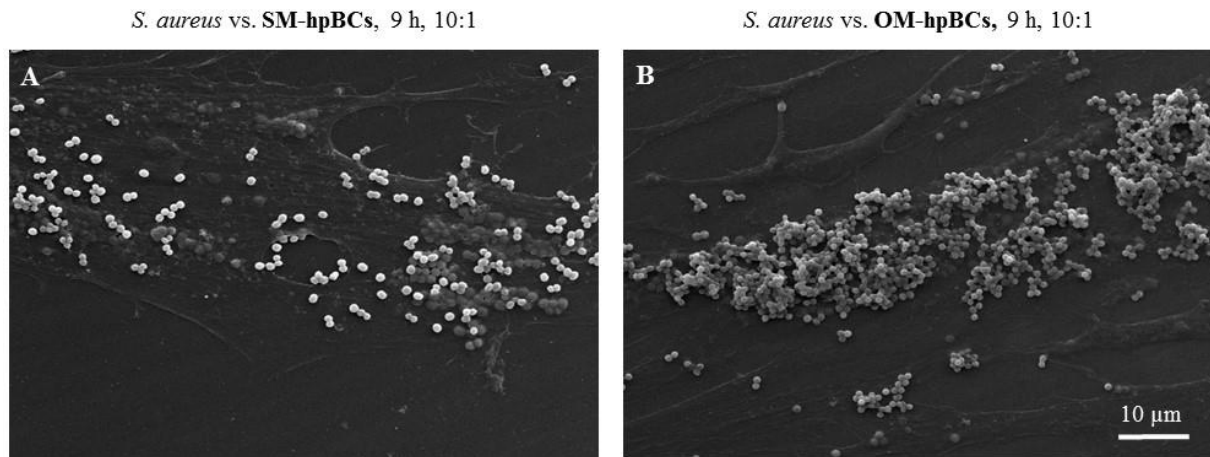


Figure 3: Representative SEM micrographs of interaction between *S. aureus* and SM-hpBCs (A) or OM-hpBCs (B) after 9 h at the MOI of 10:1 in acute infection model. Magnification x1000.

***S. aureus*-related production of pro-inflammatory cytokines by hpBCs**

Pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α are potent activators of osteoclastogenesis. Their presence in bone microenvironment favors the inflammatory processes and the recruitment of pre-osteoclasts and their activation. To further characterize the impact of *S. aureus* on SM- and OM-hpBCs, the expression of these cytokines has been analyzed.

In the acute infection model, *S. aureus* induced an increase of *IL-6* expression by SM-hpBCs that started at 6 h and became significant at 9 h with a 2.7-fold and a 3.9-fold mean increases for the MOIs of 10:1 and 30:1 respectively. For OM-hpBCs, *S. aureus* also induced significant increases of *IL-6* expression at 3 h with means of 1.5-fold for both MOIs and at 9 h with means of 2-fold and 2.5-fold for the MOIs of 10:1 and 30:1 respectively (Figure 4 A). No significant variations were observed for *IL-1 β* and *TNF- α* expressions in the acute infection model even if a trend for increase was observed for both cytokine mRNAs in the presence of *S. aureus* after 9 h (Figures 4 C and E).

Of note, *IL-1 β* , *IL-6* and *TNF- α* expressions were up-regulated from 3 to 9 h by both SM and OM-hpBCs stimulated with LPS (Supplementary Figures 1 A, C and E).

In the persistent infection model, a low but significant 1.2-fold mean increase in *IL-6* mRNA expression was observed for infected SM-hpBCs after 48 h of interaction at both 10:1 and 30:1 MOIs. The same profile has been seen with OM-hpBCs, with a significant 1.9-fold mean

increase for the MOI of 30:1 (Figure 4 B). Concerning *IL-1β*, *S. aureus* only induced a significant 1.7-fold mean increase of mRNA expression in OM-hpBCs after 48 h of infection (Figure 4 D). No significant variation of *TNF-α* expression was observed in the model of persistent infection (Figure 4 F).

Of note, *IL-1β* and *IL-6* expressions were up-regulated in both SM- and OM-hpBCs stimulated with LPS until 48 h whereas *TNF-α* expression only increased at 1 and 9 h (Supplementary Figures 1 B, D and F).

To further investigate the protein release that could correlate with the significant mRNA expression modulations, the IL-6 and IL-1β concentration in cell culture supernatants were measured. IL-6 (Table 2), release was detected in supernatants of the cells of all donors after 3 h in the acute model of infection and after 9 h in the persistent infection model. Thereafter, the release of IL-6 increased regularly in both acute and persistent infection models and being always within the levels of the non-infected control hpBCs. However, LPS stimulation induced an upregulation of IL-6 when compared to the control cells (Supplementary table 1). No protein release of IL-1β by hpBCs was detected whatever the model of infection, even after stimulation with LPS (data not shown).

Table 2: Effect of *S. aureus* on IL-6 protein release by SM-hpBCs and OM-hpBCs (**bold**). Cells were exposed to viable *S. aureus* (MOI of 10:1 and 30:1) for 1 h, 3 h, 6 h and 9 h in acute infection and for 1 h, 9 h, 24 h and 48 h in persistent infection. Data were presented as minimal value, median value and maximal value from 4 independent donors set (- means undetermined).

Acute infection																								
IL-6 pg.ml ⁻¹	1h						3h						6h						9h					
	ctrl		10:1		30:1		ctrl		10:1		30:1		ctrl		10:1		30:1		ctrl		10:1		30:1	
Max	97	209	97	136	75	119	429	442	397	317	375	337	702	604	560	498	647	630	927	924	892	893	894	843
Median	22	5	14	12	15	7	99	73	72	61	111	57	254	153	328	231	347	242	671	717	671	718	667	702
Min	-	-	-	-	-	-	14	29	31	18	30	19	113	120	105	94	173	78	471	571	442	527	419	459

Persistent infection																								
IL-6 pg.ml ⁻¹	1h						9h						24h						48h					
	ctrl		10:1		30:1		ctrl		10:1		30:1		ctrl		10:1		30:1		ctrl		10:1		30:1	
Max	2097	1947	1688	2136	1983	1939	3324	3242	2670	3212	3250	3152	4523	4852	3943	5095	4778	5023	5011	6250	4284	5773	4778	6155
Median	726	895	714	781	683	750	2445	2540	1682	2409	1918	2213	3712	3422	3068	3047	3315	3047	3939	4066	3170	3739	3358	3630
Min	24	-	105	17	-	-	583	82	521	73	424	54	779	85	738	121	612	82	833	94	750	119	810	114

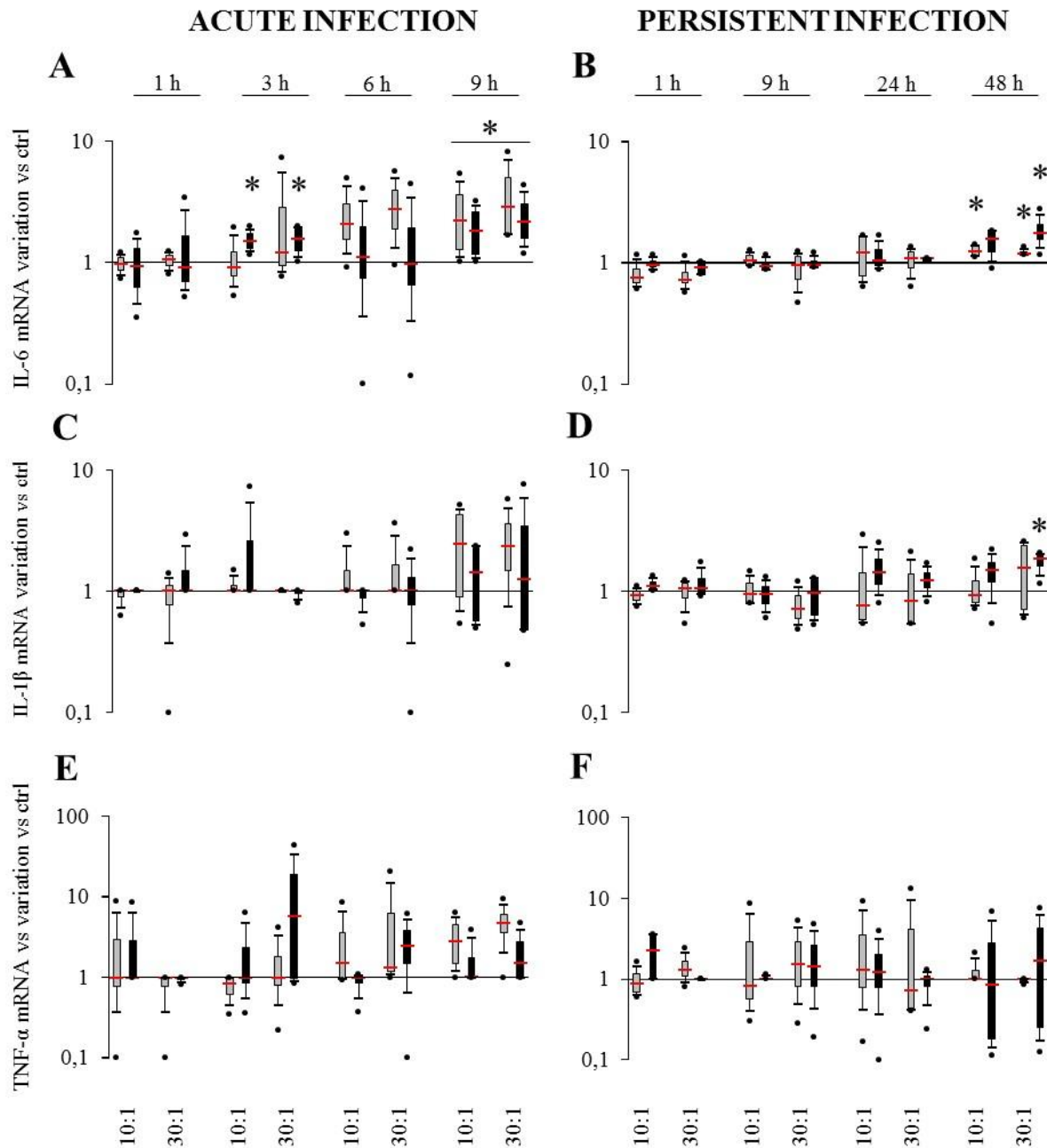


Figure 4: Effect of *S. aureus* on *IL-6* (A, B), *IL-1β* (C, D) and *TNF-α* (E, F) mRNAs expressions by SM-hpBCs (grey boxes) and OM-hpBCs (black boxes). Cells were exposed to viable *S. aureus* (MOI of 10:1 and 30:1) for 1 h, 3 h, 6 h and 9 h in acute infection (A, C, E) and for 1 h, 9 h, 24 h and 48 h in persistent infection (B, D, F). Expressions of *IL-6*, *IL-1β* and *TNF-α* mRNA were evaluated by RT-PCR analysis, data were shown as specific variation of mRNA compared to relative non-infected cells using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (*HPRT-1* was used as internal control). * means $p < 0.05$ vs relative non-infected cells for each time period. Experiments were performed on 4 independent donors.

***S. aureus*-related production of chemokines by hpBCs**

Chemokines are well known for playing a role in antibacterial defense notably through the recruitment of neutrophils and monocytes/macrophages. To further investigate if osteoblast maturation modulates the inflammatory response of infected cells, the expression and the release of CCL2, CXCL1 and CXCL8 by SM- and OM-hpBCs infected with *S. aureus* was evaluated.

In acute infection, no variation of *CCL2* mRNA expression was measured for infected SM-hpBCs compared to their non-infected counterparts. For infected OM-hpBCs, a significant 2-fold decrease of *CCL2* expression was observed at MOIs of 10:1 and 30:1 after 9 h (Figure 5 A). Looking at *CXCL1* expression, the presence of *S. aureus* significantly induced an up-regulation of expression by SM-hpBCs after 6 h of interaction (Figure 5 C). At 6 h, the mean increase of *CXCL1* expression was of 4.5-fold for MOI 10:1 and of 12.3-fold for MOI 30:1. At 9 h post infection, the expression was decreased but still in the upper range as compared to the basal expression by uninfected SM-hpBCs. Even so there were not any significant differences for the OM-hpBCs, levels of *CXCL1* mRNA appeared higher for infected cells at 6 h than in the uninfected cells (Figure 5 C). For *CXCL8*, SM-hpBCs interacting with *S. aureus* exhibited significant increases of mRNA expression (Figure 5 E). At 6 h, a significant 4-fold mean increase was observed for the MOI of 30:1. At 9 h, *S. aureus* significantly upregulated the mean expression of *CXCL8* by 4.2-fold and 5.9-fold for the MOIs of 10:1 and 30:1, respectively. For OM-hpBCs, *S. aureus* did not significantly impact *CXCL8* expression. Nevertheless, a trend for increase was observed after 9 h of interaction between OM-hpBCs and *S. aureus* (Figure 5 E). Of note, *CCL2*, *CXCL1* and *CXCL8* expressions were up-regulated by both SM and OM-hpBCs from 3 h to 9 h after stimulation with LPS (Supplementary Figure 2 A, C and E).

In the persistent infection model, no significant variations of *CCL2* by SM-hpBCs were observed (Figure 5 B). Conversely, OM-hpBCs showed low but significant increases of *CCL2* expression at 24 h and 48 h. A 1.2-fold mean increase was observed for both MOIs of 10:1 and 30:1 at 24 h. At 48 h, *S. aureus*-induced mean increases of 1.2-fold and 1.6-fold for the MOIs of 10:1 and 30:1 respectively (Figure 5 B). Looking at *CXCL1* expression, no significant variations were observed for SM-hpBCs (Figure 5 D). For OM-hpBCs, a significant mean increase of *CXCL1* expression by 2.1-fold was observed at 48 h for the MOI of 30:1 (Figure 4 D). For *CXCL8* expression, slight increases could be detected after 48 h in the presence of *S. aureus* with a significant 3.6-fold mean increase in SM-hpBCs infected at the MOI of 30:1 (Figure 5 F).

Of note, *CCL2*, *CXCL1* and *CXCL8* expressions were up-regulated by both SM- and OM-hpBCs stimulated with LPS until 48 h (Supplementary Figures 2 B, D and F).

To further investigate the impact of *S. aureus* on hpBCs, the protein release of the 3 previously studied chemokines was measured. In the acute infection model (Table 3), *CCL2* and *CXCL8* protein releases were detected in supernatants of the cells of all donors only after 9 h and were within the levels of the non-infected control hpBCs. In the persistent infection model (Table 3), the release of *CCL2* by the hpBCs of all donors increased from 9 h to 48 h and stayed within the levels of the non-infected hpBCs. Concerning *CXCL8*, the protein release was detected in supernatants of OM-hpBCs of all donors from 9 h to 48 h and stayed within the levels of the non-infected control OM-hpBCs whereas it only happened at 48 h for SM-hpBCs. The *CXCL1* protein release was never detected in the supernatants of the cells of all the donors at the same time in both acute and persistent infection models (Table 3). Nevertheless, LPS stimulation induced up regulations of all the 3 chemokines when compared to the control cells in both acute and persistent model of infection (Supplementary table 2).

Table 3: Effect of *S. aureus* on *CCL2*, *CXCL1* and *CXCL8* protein release by SM-hpBCs and OM-hpBCs (**bold**). Cells were exposed to viable *S. aureus* (MOI of 10:1 and 30:1) for 1 h, 3 h, 6 h and 9 h in acute infection and for 1 h, 9 h, 24 h and 48 h in persistent infection. Data were presented as minimal value, median value and maximal value from 4 independent donors set (- means undetermined).

Acute infection																								
CCL2 pg.ml ⁻¹	1h						3h						6h						9h					
	ctrl		10:1		30:1		ctrl		10:1		30:1		ctrl		10:1		30:1		ctrl		10:1		30:1	
Max	573	1259	355	1105	405	1005	1232	2341	950	2291	665	2668	5123	8059	5609	8027	6900	7695	5877	7538	5375	5641	5142	8082
Median	-	306	-	189	-	-	-	589	-	623	-	639	407	704	589	791	809	942	3870	3310	2272	4754	1806	4443
Min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	426	2444	593	1060	523	1000
Persistent infection																								
CCL2 pg.ml ⁻¹	1h						9h						24h						48h					
	ctrl		10:1		30:1		ctrl		10:1		30:1		ctrl		10:1		30:1		ctrl		10:1		30:1	
Max	2294	1792	2188	2133	1775	1871	6525	6037	3325	5926	3738	6532	9500	10329	8381	9352	9331	9912	13756	11458	11494	11356	12889	11389
Median	674	1473	556	1474	640	1465	2722	4955	2640	4999	2855	4935	6007	7154	5314	7368	5115	7487	9324	7040	7296	8226	10915	8274
Min	-	-	-	-	-	-	1983	4102	1539	4242	2083	3942	2761	6019	2517	5989	2722	6027	2928	2008	3261	1742	4549	7633
Acute infection																								
CXCL1 pg.ml ⁻¹	1h						3h						6h						9h					
	ctrl		10:1		30:1		ctrl		10:1		30:1		ctrl		10:1		30:1		ctrl		10:1		30:1	
Max	-	218	220	-	224	-	222	-	238	-	238	-	216	214	260	211	218	211	-	317	275	361	269	807
Median	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	198	-	97	-	99	-	259	93	286	90	273
Min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Persistent infection																								
CXCL1 pg.ml ⁻¹	1h						9h						24h						48h					
	ctrl		10:1		30:1		ctrl		10:1		30:1		ctrl		10:1		30:1		ctrl		10:1		30:1	
Max	-	-	-	-	-	-	271	291	-	346	-	373	228	413	230	406	285	377	262	517	278	670	287	555
Median	-	-	-	-	-	-	93	92	-	97	-	98	-	110	-	106	119	102	-	149	-	121	-	132
Min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acute infection																								
CXCL8 pg.ml ⁻¹	1h						3h						6h						9h					
	ctrl		10:1		30:1		ctrl		10:1		30:1		ctrl		10:1		30:1		ctrl		10:1		30:1	
Max	-	-	-	-	-	-	46	-	41	-	44	-	45	220	258	530	353	528	415	707	413	690	410	687
Median	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	38	-	33	-	29	212	370	215	372	186	357
Min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27	35	37	32	31
Persistent infection																								
CXCL8 pg.ml ⁻¹	1h						9h						24h						48h					
	ctrl		10:1		30:1		ctrl		10:1		30:1		ctrl		10:1		30:1		ctrl		10:1		30:1	
Max	198	262	191	240	192	236	651	461	498	470	573	457	678	521	637	481	782	496	718	570	633	551	674	613
Median	79	94	66	83	84	93	443	387	408	354	386	350	524	436	541	404	529	417	566	472	597	466	627	538
Min	-	-	-	-	-	-	-	51	-	52	-	64	27	213	-	195	-	197	50	270	35	300	53	385

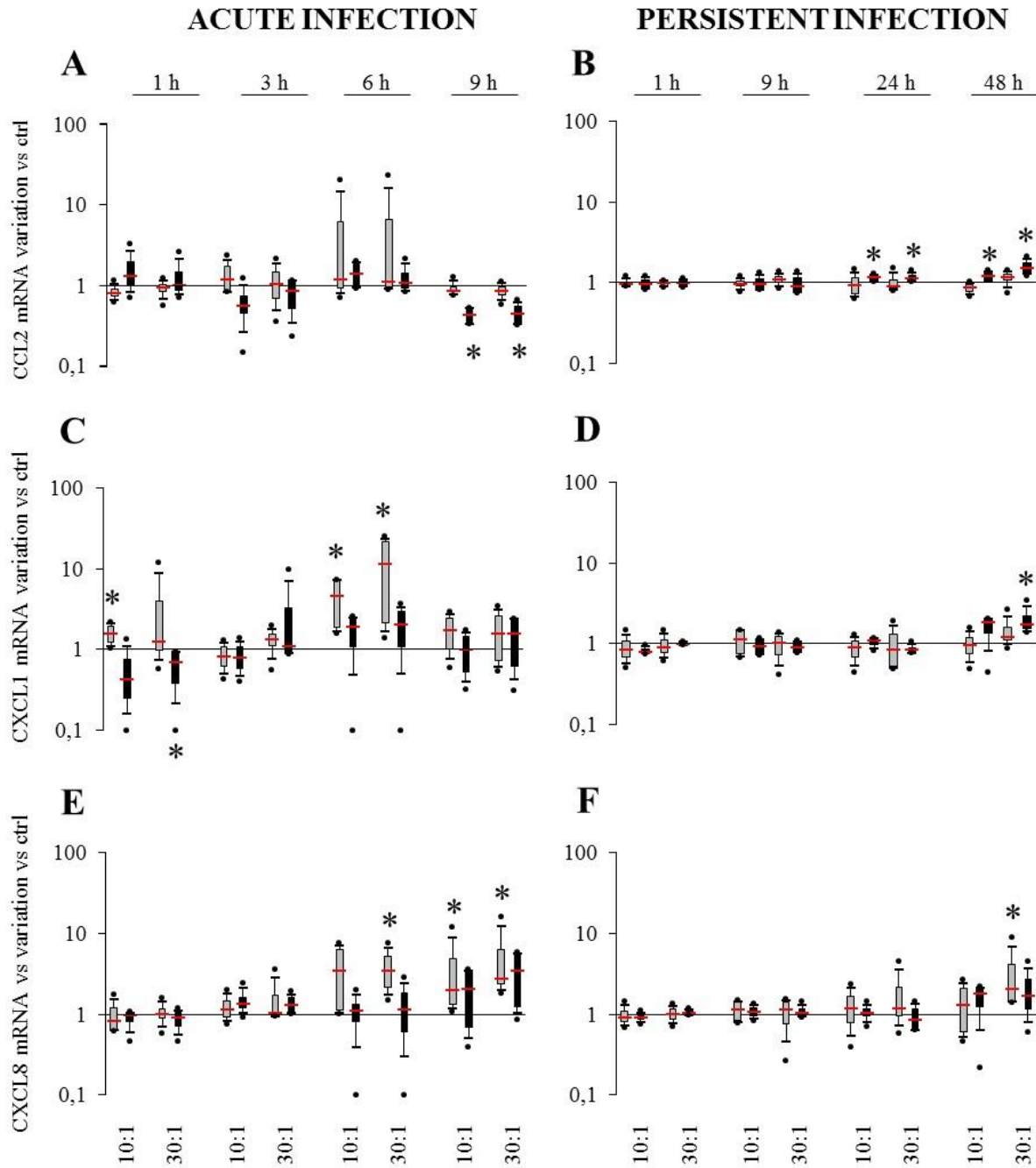


Figure 5: Effect of *S. aureus* on *CCL2* (A, B), *CXCL1* (C, D) and *CXCL8* (E, F) mRNAs expressions by SM-hpBCs (grey boxes) and OM-hpBCs (black boxes). Cells were exposed to viable *S. aureus* (MOI of 10:1 and 30:1) for 1 h, 3 h, 6 h and 9 h in acute infection (A, C, E) and for 1 h, 9 h, 24 h and 48 h in persistent infection (B, D, F). Expressions of *CCL2*, *CXCL1* and *CXCL8* mRNA were evaluated by RT-PCR analysis, data were shown as specific variation of mRNA compared to relative non-infected cells using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (*HPRT-1* was used as internal control). * means $p < 0.05$ vs relative non-infected cells for each time period. Experiments were performed on 4 independent donors.

***S. aureus*-related production of OPG and RANKL by hpBCs**

Bone forming cells can modulate osteoclastogenesis through the production of RANKL and OPG. RANKL binds to RANK on osteoclast precursor to favor their activation whereas OPG is a decoy receptor for RANKL, able to decrease the osteoclastogenesis. The impact of osteogenic differentiation and *S. aureus* interaction on OPG and RANKL expression were therefore evaluated (Figure 6).

In the acute infection model, for both SM- and OM-hpBCs, 9 h were required to observe a two-fold mean significant decrease of OPG expression for both 10:1 and 30:1 MOIs (Figure 6 A). Conversely, LPS stimulation induced a significant increase of OPG expression at 6 and 9 h with both hpBCs (Supplementary Figure 3 A).

In the persistent infection model, the level of OPG mRNA remained equal in presence or absence of bacteria for both hpBCs up to 48 h whereas an increase of expression was observed from 9 h to 48 h when both the hpBCs were stimulated with LPS (Figure 6 B, Supplementary Figures 3 B). Concerning RANKL, no significant modulation of expression has been observed in any condition, even with LPS stimulation (Figures 6 C and D, Supplementary Figures 3 C and D).

To further investigate the impact of *S. aureus* on hpBCs, the protein release of OPG was measured in cell supernatants. In the acute infection model (Table 4), the OPG protein release was detected in supernatants of the cells of all donors from 6 h to 9 h and was within the levels of the non-infected control hpBCs. Globally, the release by all the cells increased from 1 h to 6 h and decreased at 9 h. In the persistent model of infection (Table 4), the OPG protein release by the cells of all donors increased with time from 9 h to 48 h and was within the levels of the non-infected hpBCs. However, LPS stimulation induced up regulations of OPG when compared to the control cells in both acute and persistent model of infection (Supplementary Table 3).

Table 4: Effect of *S. aureus* on OPG protein release by SM-hpBCs and OM-hpBCs (**bold**). Cells were exposed to viable *S. aureus* (MOI of 10:1 and 30:1) for 1 h, 3 h, 6 h and 9 h in acute infection and for 1 h, 9 h, 24 h and 48 h in persistent infection. Data were presented as minimal value, median value and maximal value from 4 independent donors set (- means undetermined).

Acute infection																								
OPG pg.ml ⁻¹	1h						3h						6h						9h					
	ctrl		10:1		30:1		ctrl		10:1		30:1		ctrl		10:1		30:1		ctrl		10:1		30:1	
Max	1705	2327	1639	3891	2053	3836	4933	8545	5813	6255	4800	8873	12909	19891	15738	7227	12773	17636	16133	22065	15147	18370	15413	23043
Median	1308	1165	1128	1335	1181	1086	3365	3039	4646	2346	3268	3984	10521	5634	10817	6306	11630	6654	4470	6162	5536	6401	5324	7288
Min	-	130	-	-	-	-	1000	826	1739	1522	-	2043	3565	3348	6391	4826	3565	5410	1443	3377	1902	5273	3475	4273

Persistent infection																								
OPG pg.ml ⁻¹	1h						9h						24h						48h					
	ctrl		10:1		30:1		ctrl		10:1		30:1		ctrl		10:1		30:1		ctrl		10:1		30:1	
Max	6719	6896	10656	4938	9469	5688	17469	12646	10625	10902	11844	9699	27219	25000	25781	23788	31156	30455	39819	87355	72250	65072	49781	83949
Median	1330	2346	1178	2529	1339	2539	4305	6915	6081	7108	5233	7253	11548	13958	12679	16361	13515	18292	21231	33149	26050	27990	24734	30538
Min	700	-	683	-	667	-	1834	155	2125	-	2334	-	4521	310	4979	143	4938	393	7875	1274	7021	1298	7083	1417

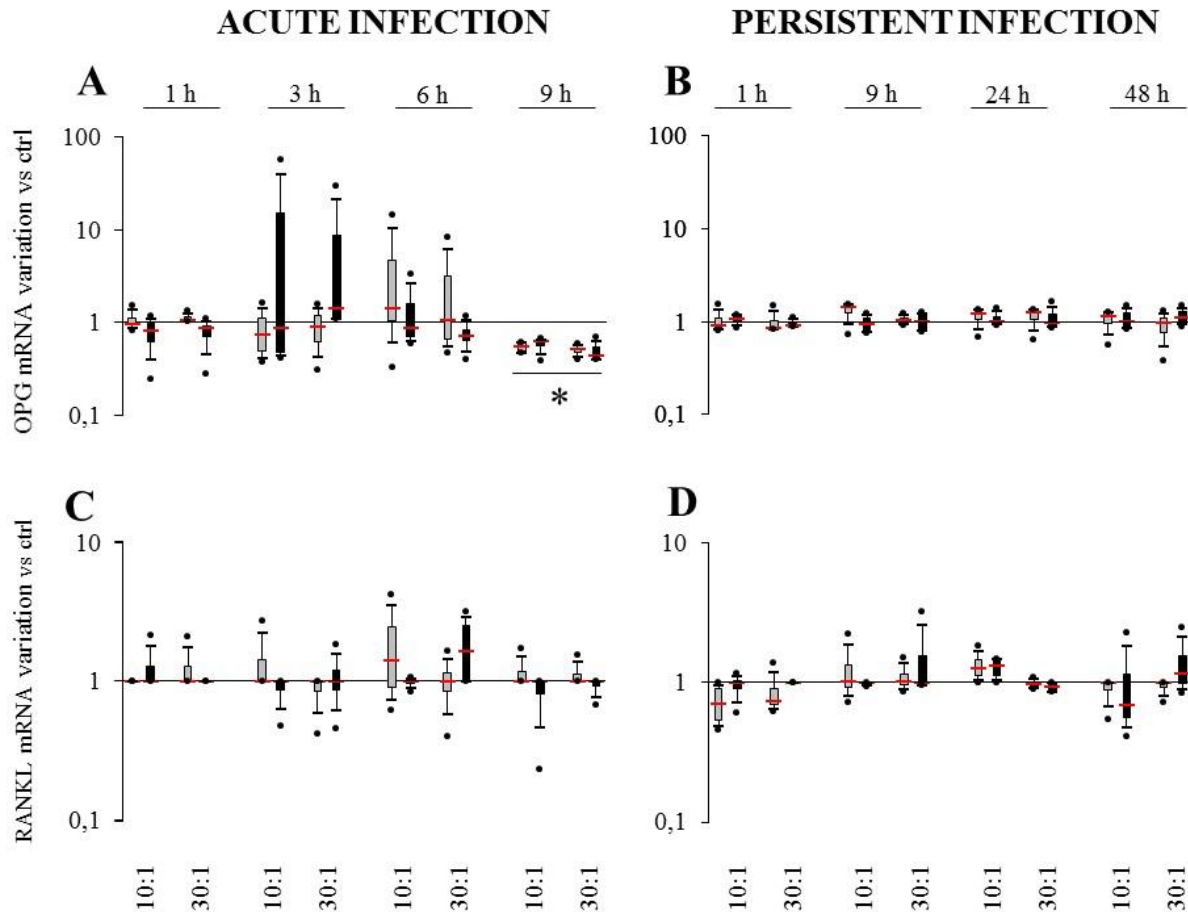


Figure 6: Effect of *S. aureus* on *OPG* (A, B) and *RANKL* (C, D) mRNAs expressions by SM-hpBCs (grey boxes) and OM-hpBCs (black boxes). Cells were exposed to viable *S. aureus* (MOI of 10:1 and 30:1) for 1 h, 3 h, 6 h and 9 h in acute infection (A, C) and for 1 h, 9 h, 24 h and 48 h in persistent infection (B, D). Expressions of *OPG* and *RANKL* mRNA were evaluated by RT-PCR analysis, data were shown as specific variation of mRNA compared to relative non-infected cells using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (*HPRT-1* was used as internal control). * means p < 0.05 vs relative non-infected cells for each time period. Experiments were performed on 4 independent donors.

DISCUSSION

The bone microenvironment is a complex environment where osteoblasts and their precursor are central cells. Originated from the mesenchymal lineage, osteoblasts are the cells responsible for bone formation. Differentiation of bone forming cells starts from a mesenchymal stem cell, evolves through several states such as osteoprogenitor, pre-osteoblast and osteoblast to end as a matrix-embedded cell known as osteocyte (Aubin, 2001). Osteoblast is the major cell for synthesis of the bone organic matrix. This latter is mostly composed of type I collagen but also contains non-collagenous proteins such as fibronectin, osteopontin and osteocalcin (Marie,

2008). Up to now, the conditioning culture media for the osteoblast maturation *in vitro* was composed of ascorbic acid, β -glycerophosphate and dexamethasone, to trigger bone matrix mineralization (Park, 2012; Langenbach and Handschel, 2013). Here, for the first time to our knowledge, the maturation of bone cells with higher alkaline phosphatase activity, increased type I collagen fibers formation and apparition of osseous protein such as osteocalcin, was obtained with a dexamethasone-free osteogenic medium. Using both non-osteogenic (standard) and dexamethasone-free osteogenic media, we were able to establish two maturation stages population out of one patient cells panel, allowing us to appreciate solely the maturation effects on cells physiology without any genetic side effects. The absence of dexamethasone avoids its interferences in the inflammatory response of hpBCs (Wright and Friedland, 2004) which is primordial for the chosen readouts of the present paper. This is an important pre requisite as the osteoblast maturation impact on *S. aureus* infection has never been taken in account before this study.

Interaction between *S. aureus* and osteoblasts has started to be documented since the demonstration of internalization by Hudson and colleagues until more recent studies highlighting the involvement of staphylococcal toxins and small colony variants during osteoblasts infection (Hudson et al., 1995; Lorena Tuchscher et al., 2015; Valour et al., 2015). Most of these studies using live *S. aureus* have been focused on the persistent interaction with murine or human osteoblast cell lines, so the onset of infection, as well as the consequences of extracellular growing bacteria were rarely considered except in one paper (Hamza and Li, 2014).

Therefore to document more precisely the human osteoblast maturation effect on cells responses towards *S. aureus*, we used two different *in vitro* models of infection. The first one - the acute infection model - which allows a direct interaction from one to nine hours between live *S. aureus* and hpBCs was previously used to test the interaction of *S. aureus* with mesenchymal stem cells (Josse et al., 2014). This model integrated the impact of intracellular as well as extracellular staphylococci growing in the osteoblast environment. The second one - the persistent infection model - is adapted from a pre-existent *in vitro* model (Wright and Friedland, 2002), where extracellular staphylococci are specifically killed by gentamicin after 1 h of interaction in order to preserve only intracellular bacteria until 48 h.

Infection of osteoblasts by *S. aureus* is a keystone, a determining element in the development of osteomyelitis in bone tissue and as such, we looked at different parameters which have a link with the bacterial pathogenesis, as to say, attachment, internalization, bacterial survival and capacity to induce pro-inflammatory cytokines or chemokines that play a major role in the

stimulation of other cells in the bone microenvironment. *S. aureus* NCTC 8325-4, a commonly used laboratory bacteria was used to establish if osteoblast maturation can have an impact on its pathogenesis towards hpBCs and if this bacteria is also able to stimulate the hpBCs as in other previous early interaction cell models (Al Alam et al., 2010; Escotte et al., 2006).

Attachment is the first step in a bacterial infection process. Scanning electron microscopy observations of interaction of *S. aureus* on SM- and OM-hpBCs showed that *S. aureus* can bind on both types of cells with a greater susceptibility for OM-hpBCs which could be explained by a higher presence of extracellular matrix proteins around these hpBCs.

As seen previously by others, internalization is the pre requisite for possible survival of *S. aureus* inside the osteoblasts (Hudson et al., 1995; Tuchscher and Löffler, 2016) and *S. aureus* collagen adhesion (Cna) and bone sialoprotein binding protein (Bbp) could play a synergistic role in the initial adhesion of *S. aureus* to osteoblasts and thus favoring the subsequent fibronectin-mediated internalization (Ahmed et al., 2001; Testoni et al., 2011; Tung et al., 2000). Nevertheless, comparing both models after 9 h of infection, it is clear that extracellular bacteria are constantly internalized by the hpBCs, explaining why the intracellular pool is more important in the acute infection model than in the persistent model.

Furthermore, even if in our settings OM-hpBCs have a higher expression of bone sialoprotein gene (*IBSP*) and a higher production of type I collagen fibers, no differences in internalization and survival of *S. aureus* inside SM- and OM-hpBCs could be seen, suggesting that *S. aureus* also uses mechanisms of internalization to invade hpBCs that are independent from bone extracellular matrix.

Bone loss in osteomyelitis is caused by the death of osteoblasts strengthened by increased activation of osteoclasts. A tight balance between bone formation by osteoblasts and bone resorption by osteoclasts is essential for the strength and integrity of bones. Therefore we followed the osteoblast death after *S. aureus* infection, as well as the production of osteoclastic regulators.

Internalization of *S. aureus* is a determinant event in induction of cell death through apoptosis (Bayles et al., 1998; Menzies and Kourteva, 1998; Kahl et al., 2000; Mempel et al., 2002). Here, like in a previous experiment with mesenchymal stem cells (Josse et al., 2014), the cell death has been observed after 6 h of acute infection, independently of hpBCs maturation. Even if recent study by Rasigade et al. reported that the activity of phenol-soluble modulins is the major actor in osteoblast killing by *S. aureus* and that α -hemolysin activity can be neglected (Rasigade et al. 2013), one could still suggest that the α -hemolysin produced by the extracellular *S. aureus*

NCTC 8325-4 participate to the death phenomenon in the acute infections, as no differences could be seen in the persistent model where the bacteria are only intracellular.

Following interaction with *S. aureus*, the first line of defense for cells is to secrete inflammatory factors like cytokines or chemokines, which are able to activate and recruit immune cells in an attempt to clear the bacteria in the microenvironment (Turner et al., 2014).

For the first time, our study puts forward a different kinetics of mRNA chemokine expression between infected SM- and OM-hpBCs as well as different profiles of expression in both acute and persistent models.

In the acute model of infection, the *IL-6* mRNA over-expression by both SM- and OM-hpBCs infected with *S. aureus*, as well as the weak responses in *IL-1 β* and *TNF- α* mRNA expressions, were already observed during *S. aureus* and mesenchymal stem cells interaction (Josse et al., 2014). In the persistent infection model, the expressions of *IL-6* and *IL-1 β* mRNAs were increased after 48 h as it was observed in *in vitro* models close to ours (Marriott et al., 2002; Bost et al., 1999; Jauregui et al., 2013). Our results also suggests that cell maturation does not impact the cytokine expression.

For chemokines, if *CCL2* mRNA is significantly down regulated in the acute infection of OM-hpBCs after 9 h, it does not vary in SM-hpBCs. Moreover, concerning *CXCL1* and *CXCL8* mRNA expression, it is obvious that the SM-hpBCs are more susceptible to *S. aureus* than the OM-hpBCs in the acute model of infection. At the opposite, the tasks are shared in the persistent infection model. *CCL2* and *CXCL1* mRNA expressions are up regulated by OM-hpBCs after 24 h and 48 h respectively whereas a significant over-expression of *CXCL8* mRNA by SM-hpBCs was observed after 48 h. Moreover, these distinct responses in both our cell population argued that they were *S. aureus* specific as LPS induces the same chemokine profiles on both SM-hpBCs and OM-hpBCs in our models. One explanation could be that immature SM-hpBCs are more susceptible to induce an acute inflammation and to recruit neutrophils in response to extracellular *S. aureus* while OM-hpBCs, more involved in matrix formation and mineralization would take part to inflammation later and potentially recruiting monocytes in response to intracellular bacteria. Furthermore, if *CCL2* and *CXCL8* mRNA increased expressions by *S. aureus*-infected osteoblasts have already been observed in an *in vitro* model close to our model of persistent infection (Jauregui et al., 2013; Bost et al., 2001), it was the first time, to our best knowledge, that an over-expression of *CXCL1* mRNA was observed by *S. aureus*-infected osteoblasts.

Influence of bone-forming cells on osteoclastogenesis happens through the production of RANKL and its decoy receptor OPG. OPG inhibits RANK/RANKL binding and thereby

modulate the formation and activation of osteoclasts (Edwards and Mundy, 2011). In our persistent infection model, neither the expression of *RANKL* nor *OPG* mRNA did vary at all, even in the presence of *S. aureus*. However, for the first time and in opposition with the increase of *OPG* expression after LPS stimulation, a decrease of *OPG* expression without any modulation of *RANKL* for both SM- and OM-hpBCs has been observed after 9 h in the model of acute infection. This suggests that the regulation of *OPG* could be induced specifically by *S. aureus* and that extracellular bacteria could play a major role in the regulation.

Concerning the protein release of cytokines and chemokines, we did not observed any significant variations in the release by *S. aureus*-infected hpBCs compared to the non-infected counterparts whereas upregulations of IL-6, CCL2, CXCL1, CXCL8 and OPG releases could be seen with the LPS stimulation in both SM- and OM-hpBCs. These results are in opposition to previous experiments, where upregulations of IL-6, CCL2 and CXCL8 releases have been observed (Bost et al., 1999; Wright and Friedland, 2002; Jauregui et al., 2013; Bost et al., 2001) as well as a decrease of OPG release (Claro et al., 2011; Young et al., 2011). These differences could be explained by the setting of experimental procedures, notably the characteristics of the cells. In other previous studies, *in vitro* experiments were mostly performed using osteoblastic cell lines or marketed normal osteoblasts coupled with high MOIs (75:1 or 250:1) to stimulate the cells. This may have led to an overstatement of the results. In our study, we used human primary cells from several independent donors. It certainly contributes to the important inter-donor viability that we observed but it also strengthens our results in regard to the clinical outcome in patients.

Based upon our findings, we suggest that hpBCs / osteoblasts are not the initiators of an inflammatory response but more reservoirs allowing the persistence of *S. aureus* inside bones and the development of chronic infections. Recent papers about small colony variants, staphylococcal toxin-related osteoblast killing or adaptation of *S. aureus* to chronicity contribute to these statements (Rasigade et al., 2013; Valour et al., 2015; Tuchscher et al., 2016; Tuchscher and Löffler, 2016)

CONCLUSION

In this study, we developed two models of *in vitro* infection between *S. aureus* and two populations of human primary bone-forming cells, immature and mature. We observed that osteoblast maturation did not influence neither the internalization nor the survival of *S. aureus*

inside hpBCs, nor the cell death related to the infection. Studying the expression of chemokines, cytokines and osteoclastogenic regulators by hpBCs, we observed different profiles of chemokines expression between SM- and OM-hpBCs. Nevertheless, we did not notice any variation of relative proteins release by both SM- and OM-hpBCs in the presence of *S. aureus* compared to the non-infected counterparts. Our findings support that osteoblast maturation did not impact the behavior of hpBCs infected with *S. aureus* and also suggested that the role of osteoblasts / hpBCs may not be pivotal for the inflammatory response in osteomyelitis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors warmly thank Sylvie Bouthors, and Chantal Grimplet for their technical assistance, Kevin Delaitre for having carefully proof read this manuscript and Bouchaib Lamkhioued for fruitful scientific discussion. JJ is the recipient of a fellowship from the French « Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche ». This work received a support from BQR, URCA 2011.

REFERENCES

- Ahmed, S., Meghji, S., Williams, R.J., Henderson, B., Brock, J.H., and Nair, S.P. (2001). *Staphylococcus Aureus* Fibronectin Binding Proteins Are Essential for Internalization by Osteoblasts but Do Not Account for Differences in Intracellular Levels of Bacteria. *Infection and Immunity* 69 (5): 2872–77. doi:10.1128/IAI.69.5.2872-2877.2001.
- Al Alam, D., Deslee, G., Tournois, C., Lamkhioued, B., Lebargy, F., Merten, M., et al. (2010). Impaired Interleukin-8 Chemokine Secretion by *Staphylococcus Aureus*-Activated Epithelium and T-Cell Chemotaxis in Cystic Fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 42 (6): 644–50. doi:10.1165/rcmb.2008-0021OC.
- Aubin, J.E. (2001). Regulation of Osteoblast Formation and Function. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 2 (1): 81–94.
- Bayles, K.W., Wesson, C.A., Liou, L.E., Fox, L.K., Bohach, G.A., and Trumble W.R. (1998). Intracellular *Staphylococcus Aureus* Escapes the Endosome and Induces Apoptosis in Epithelial Cells. *Infection and Immunity* 66 (1): 336–42.
- Bost, K.L., Bento, J.L., Petty, C.C., Schrum, L.W., Hudson, M.C., and Marriott, I. (2001). Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression by Osteoblasts Following Infection with *Staphylococcus Aureus* or *Salmonella*. *Journal of Interferon & Cytokine Research* (5): 297–304. doi:10.1089/107999001300177484.

- Bost, K.L., Ramp, W.K., Nicholson, N.C., Bento, J.L., Marriott, I., and Hudson M. C. (1999). *Staphylococcus Aureus* Infection of Mouse or Human Osteoblasts Induces High Levels of Interleukin-6 and Interleukin-12 Production. *The Journal of Infectious Diseases* 180 (6): 1912–20. doi:10.1086/315138.
- Brauer, A., Pohlemann, T., and Metzger, W. (2016). Osteogenic Differentiation of Immature Osteoblasts: Interplay of Cell Culture Media and Supplements. *Biotechnic & Histochemistry: Official Publication of the Biological Stain Commission*, January, 1–9. doi:10.3109/10520295.2015.1110254.
- Braux, J., Velard, F., Guillaume, C., Bouthors, S., Jallot, E., Nedelec, J-M., et al. (2011). A New Insight into the Dissociating Effect of Strontium on Bone Resorption and Formation. *Acta Biomaterialia* 7 (6): 2593–2603. doi:10.1016/j.actbio.2011.02.013.
- Brun, V., Guillaume, C., Mechiche Alami, S., Josse, J., Jing, J., Draux F., et al. (2014). Chitosan/hydroxyapatite Hybrid Scaffold for Bone Tissue Engineering. *Bio-Medical Materials and Engineering* 24 (1 Suppl): 63–73. doi:10.3233/BME-140975.
- Claro, T., Widaa, A., O’Seaghdha, M., Miajlovic, H., Foster, T.J., O’Brien, F.J., et al. (2011). *Staphylococcus Aureus* Protein A Binds to Osteoblasts and Triggers Signals That Weaken Bone in Osteomyelitis. *PloS One* 6 (4): e18748. doi:10.1371/journal.pone.0018748.
- Edwards, J.R., and Mundy, G.R. (2011). Advances in Osteoclast Biology: Old Findings and New Insights from Mouse Models. *Nature Reviews Rheumatology* 7 (4): 235–43. doi:10.1038/nrrheum.2011.23.
- Escotte, S., Al Alam, D., Le Naour, R., Puchelle, E., Guenounou, M., and Gangloff, S.C. (2006). T Cell Chemotaxis and Chemokine Release after *Staphylococcus Aureus* Interaction with Polarized Airway Epithelium. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 34 (3): 348–54. doi:10.1165/rcmb.2005-0191OC.
- Hamza, T., and Li, B. (2014). Differential Responses of Osteoblasts and Macrophages upon *Staphylococcus Aureus* Infection. *BMC Microbiology* 14: 207. doi:10.1186/s12866-014-0207-5.
- Hudson, M.C., Ramp, W.K., Nicholson, N.C., Williams, A.S., and Nousiainen, M.T. (1995). Internalization of *Staphylococcus Aureus* by Cultured Osteoblasts. *Microbial Pathogenesis* 19 (6): 409–19. doi:10.1006/mpat.1995.0075.
- Jarry, T.M., and Cheung, A.L. (2006). *Staphylococcus Aureus* Escapes More Efficiently from the Phagosome of a Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial Cell Line than from Its Normal Counterpart. *Infection and Immunity* 74 (5): 2568–77. doi:10.1128/IAI.74.5.2568-2577.2006.
- Jauregui, C.E., Mansell, J.P., Jepson, M.A., and Jenkinson, H.F. (2013). Differential Interactions of *Streptococcus Gordonii* and *Staphylococcus Aureus* with Cultured Osteoblasts. *Molecular Oral Microbiology* 28 (4): 250–66. doi:10.1111/omi.12022.
- Josse, J., Velard, F., and Gangloff, S.C. (2015). *Staphylococcus Aureus* vs. Osteoblast: Relationship and Consequences in Osteomyelitis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 5: 85. doi:10.3389/fcimb.2015.00085.

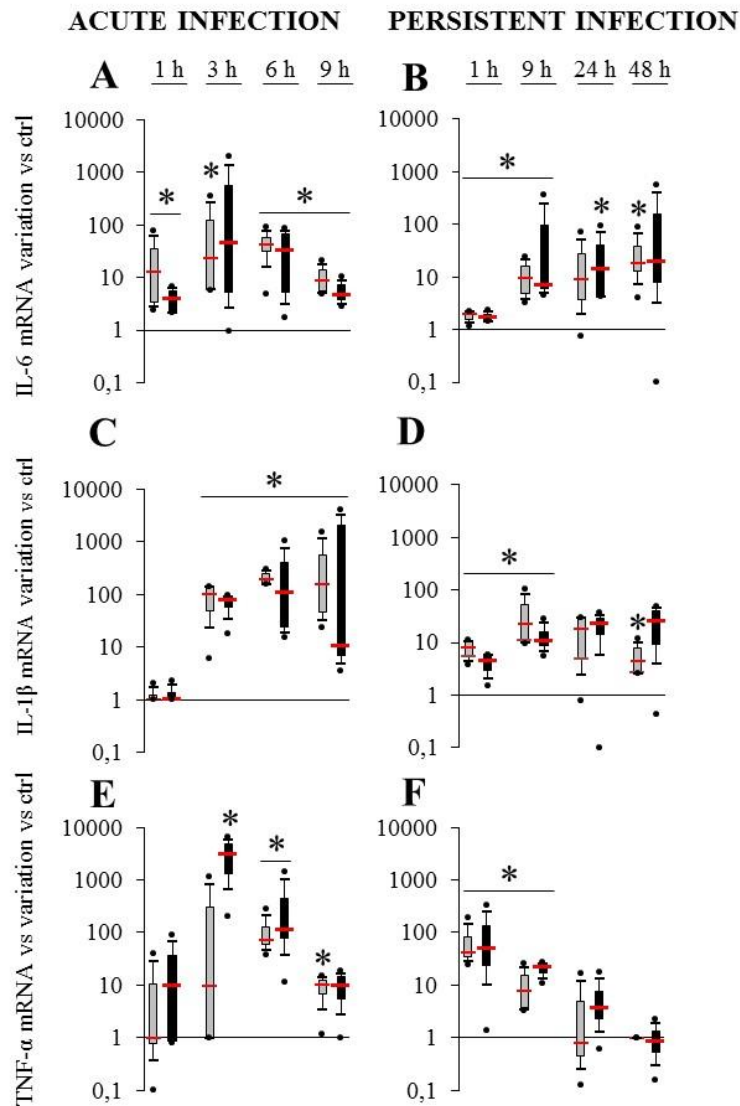
- Josse, J., Velard, F., Mechiche Alami, S., Brun, V., Guillaume, C., Kerdjoudj, H., et al. (2014). Increased Internalization of *Staphylococcus Aureus* and Cytokine Expression in Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells. *Bio-Medical Materials and Engineering* 24 (1 Suppl): 27–35. doi:10.3233/BME-140971.
- Kahl, B.C., Goulian, M., van Wamel, W., Herrmann, M., Simon, S.M., Kaplan, G., et al. (2000). *Staphylococcus Aureus* RN6390 Replicates and Induces Apoptosis in a Pulmonary Epithelial Cell Line. *Infection and Immunity* 68 (9): 5385–92.
- Komori, T. (2006). Regulation of Osteoblast Differentiation by Transcription Factors. *Journal of Cellular Biochemistry* 99 (5): 1233–39. doi:10.1002/jcb.20958.
- Langenbach, F., and Handschel, J (2013). Effects of Dexamethasone, Ascorbic Acid and β -Glycerophosphate on the Osteogenic Differentiation of Stem Cells in Vitro. *Stem Cell Research & Therapy* 4: 117. doi:10.1186/scrt328.
- Lew, D.P., and Waldvogel, F.A. (2004). Osteomyelitis. *Lancet (London, England)* 364 (9431): 369–79. doi:10.1016/S0140-6736(04)16727-5.
- Lisignoli, G., Toneguzzi, S., Grassi, F., Piacentini, A., Tschon, M. Cristino, S., et al. (2002). Different chemokines are expressed in human arthritic bone biopsies: IFN- γ and IL-6 differently modulate IL-8, MCP-1 and RANTES production by arthritic osteoblasts. *Cytokine* 20 (5): 231–38. doi:10.1006/cyto.2002.2006.
- Littlewood-Evans, A.J., Hattenberger, M.R., Lüscher, C., Pataki, A., Zak, O., and O'Reilly, T. (1997). Local Expression of Tumor Necrosis Factor Alpha in an Experimental Model of Acute Osteomyelitis in Rats." *Infection and Immunity* 65 (8): 3438–43.
- Löffler, B., Tuchscher, L., Niemann, S., and Peters, G. (2014). *Staphylococcus Aureus* Persistence in Non-Professional Phagocytes. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM* 304 (2): 170–76. doi:10.1016/j.ijmm.2013.11.011.
- Lowy, F.D. (1998). *Staphylococcus Aureus* Infections. *The New England Journal of Medicine* 339 (8): 520–32. doi:10.1056/NEJM199808203390806.
- Marie, P.J. (2008). Transcription Factors Controlling Osteoblastogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 473 (2): 98–105. doi:10.1016/j.abb.2008.02.030.
- Marriott, I., Hughes, F.M., and Bost, K.L. (2002). Bacterial Infection of Osteoblasts Induces Interleukin-1beta and Interleukin-18 Transcription but Not Protein Synthesis. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 22 (10): 1049–55. doi:10.1089/107999002760624288.
- Mempel, M., Schnopp, C., Hojka, M., Fesq, H., Weidinger, S., Schaller, M., et al. (2002). Invasion of Human Keratinocytes by *Staphylococcus Aureus* and Intracellular Bacterial Persistence Represent Haemolysin-Independent Virulence Mechanisms That Are Followed by Features of Necrotic and Apoptotic Keratinocyte Cell Death." *The British Journal of Dermatology* 146 (6): 943–51.

- Menzies, B.E., and Kourteva, I. (1998). Internalization of *Staphylococcus Aureus* by Endothelial Cells Induces Apoptosis. *Infection and Immunity* 66 (12): 5994–98.
- Montanaro, L., Speziale, P., Campoccia, D., Ravaioli, S., Cangini, I., Pietrocola, G., et al. (2011). Scenery of *Staphylococcus* Implant Infections in Orthopedics. *Future Microbiology* 6 (11): 1329–49. doi:10.2217/fmb.11.117.
- Ogawa, S.K., Yurberg, E.R., Hatcher, V.B., Levitt, M.A. and Lowy F.D. (1985). Bacterial Adherence to Human Endothelial Cells *in Vitro*. *Infection and Immunity* 50 (1): 218–24.
- Park, J-B. (2012). The Effects of Dexamethasone, Ascorbic Acid, and β -Glycerophosphate on Osteoblastic Differentiation by Regulating Estrogen Receptor and Osteopontin Expression. *The Journal of Surgical Research* 173 (1): 99–104. doi:10.1016/j.jss.2010.09.010.
- Reilly, S.S., Hudson, M.C., Kellam, J.F., and Ramp, W.K. (2000). *In Vivo* Internalization of *Staphylococcus Aureus* by Embryonic Chick Osteoblasts. *Bone* 26 (1): 63–70.
- Rasigade, J-P., Trouillet-Assant, S., Ferry, T., An Diep, B., Sapin, A., Lhoste, Y., et al. (2013). PSMs of Hypervirulent *Staphylococcus Aureus* Act as Intracellular Toxins That Kill Infected Osteoblasts. *PLoS One* 8 (5): e63176. doi:10.1371/journal.pone.0063176.
- Testoni, F., Montanaro, L., Poggi, A., Visai, L., Campoccia, D., and Arciola, C.R. (2011). Internalization by Osteoblasts of Two *Staphylococcus Aureus* Clinical Isolates Differing in Their Adhesin Gene Pattern. *The International Journal of Artificial Organs* 34 (9): 789–98. doi:10.5301/ijao.5000058.
- Tuchscher, L., Kreis, C.A., Hoerr, V., Flint, L., Hachmeister, M., Geraci, J., et al. (2016). *Staphylococcus Aureus* Develops Increased Resistance to Antibiotics by Forming Dynamic Small Colony Variants during Chronic Osteomyelitis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 71 (2): 438–48. doi:10.1093/jac/dkv371.
- Tuchscher, L., Bischoff, M., Lattar, S.M., Noto Llana, M., Pförtner, H., Niemann, S., et al. (2015). Sigma Factor SigB Is Crucial to Mediate *Staphylococcus Aureus* Adaptation during Chronic Infections. *PLoS Pathogens* 11 (4): e1004870. doi:10.1371/journal.ppat.1004870.
- Tuchscher, L., and Löffler, B. (2016). *Staphylococcus Aureus* Dynamically Adapts Global Regulators and Virulence Factor Expression in the Course from Acute to Chronic Infection. *Current Genetics* 62 (1): 15–17. doi:10.1007/s00294-015-0503-0.
- Tung, H., Guss, B., Hellman, U., Persson, L., Rubin, K., and Rydén, C. (2000). A Bone Sialoprotein-Binding Protein from *Staphylococcus Aureus*: A Member of the Staphylococcal Sdr Family. *The Biochemical Journal* 345 Pt 3 (February): 611–19.
- Turner, M.D., Nedjai, B., Hurst, T., and Pennington, D.J. (2014). Cytokines and Chemokines: At the Crossroads of Cell Signalling and Inflammatory Disease. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1843 (11): 2563–82. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.05.014.
- Valour, F., Rasigade, J-P., Trouillet-Assant, S., Gagnaire, J., Bouaziz, A., Karsenty, J. et al. (2015). Delta-Toxin Production Deficiency in *Staphylococcus Aureus*: A Diagnostic Marker of Bone and Joint Infection Chronicity Linked with Osteoblast Invasion and Biofilm Formation. *Clinical Microbiology and Infection* 21 (6): 568.e1–568.e11. doi:10.1016/j.cmi.2015.01.026.

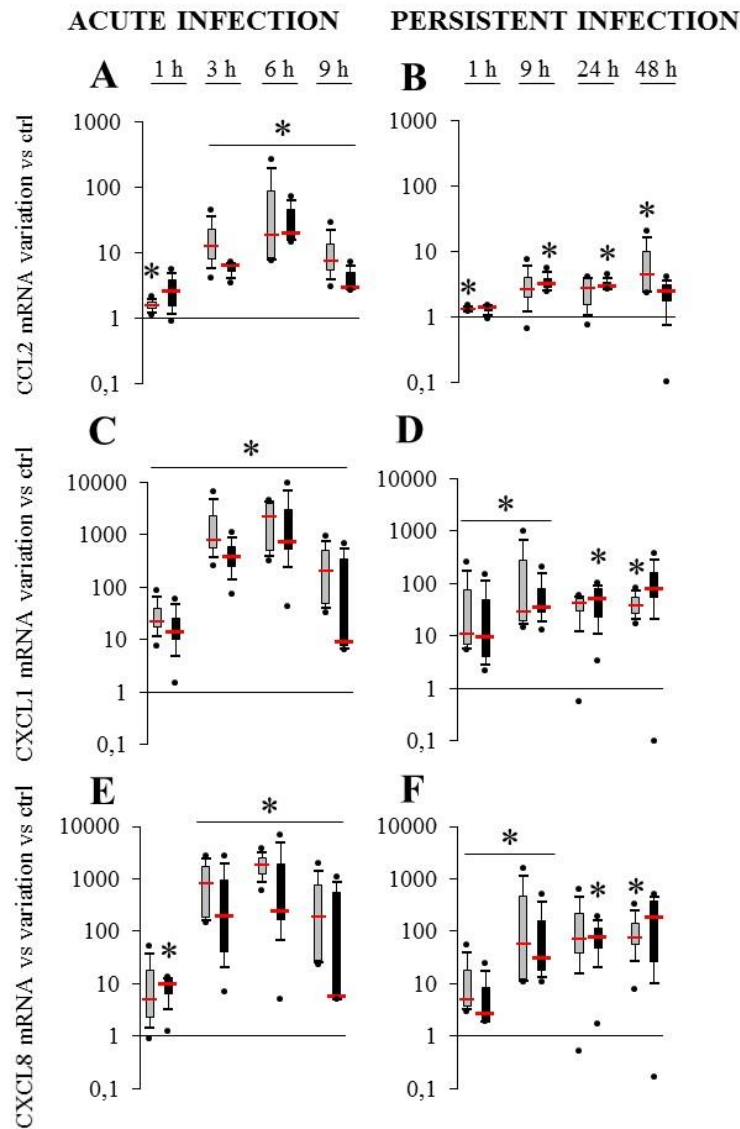
Wright, K.M., and Friedland, J.S. (2002). Differential Regulation of Chemokine Secretion in Tuberculous and Staphylococcal Osteomyelitis. *Journal of Bone and Mineral Research* 17 (9): 1680–90. doi:10.1359/jbmr.2002.17.9.1680.

Wright, K.M., and Friedland, J.S. (2004). Regulation of Chemokine Gene Expression and Secretion in Staphylococcus Aureus-Infected Osteoblasts. *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 6 (9): 844–52. doi:10.1016/j.micinf.2004.04.008.

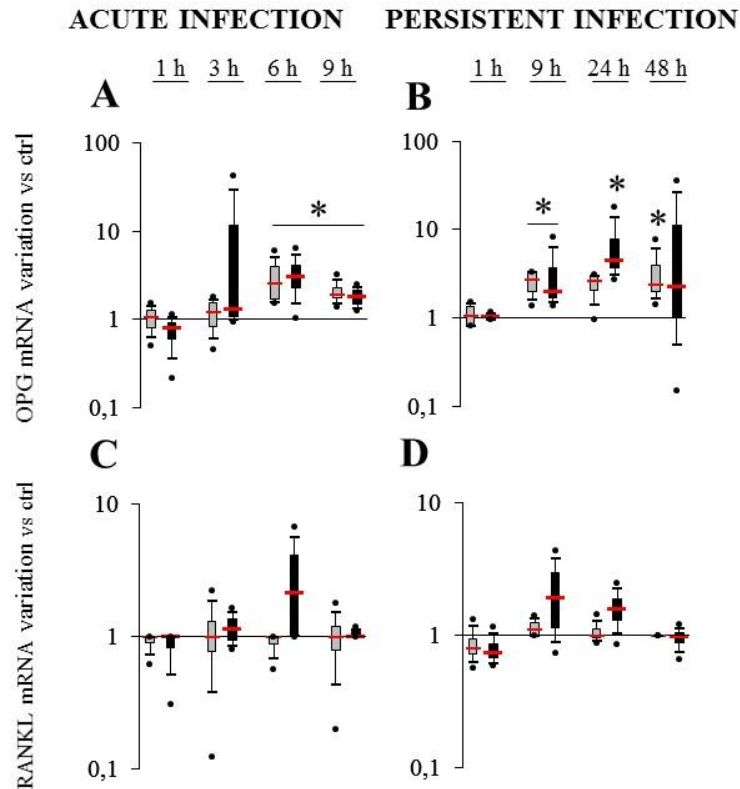
Young, A.B., Cooley, I.D., Chauhan, V.S., and Marriott, I. (2011). Causative Agents of Osteomyelitis Induce Death Domain-Containing TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor Expression on Osteoblasts. *Bone* 48 (4): 857–63. doi:10.1016/j.bone.2010.11.015.



Supplementary Figure 1: Effect of LPS stimulation on *IL-6* (A, B), *IL-1 β* (C, D) and *TNF- α* (E, F) mRNAs expressions by SM-hPBCs (grey boxes) and OM-hPBCs (black boxes). Cells were stimulated with LPS (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 1 h, 3 h, 6 h and 9 h in acute infection (A, C, E) and for 1 h, 9 h, 24 h and 48 h in persistent infection (B, D, F). Expressions of *IL-6*, *IL-1 β* and *TNF- α* mRNA were evaluated by RT-PCR analysis, data were shown as specific variation of mRNA compared to relative non-infected / non-stimulated cells using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method (*HPRT-1* was used as internal control). * means $p < 0.05$ vs relative non-infected / non-stimulated cells for each time period. Experiments were performed on 4 independent donors.



Supplementary Figure 2: Effect of LPS stimulation on *CCL2* (A, B), *CXCL1* (C, D) and *CXCL8* (E, F) mRNAs expressions by SM-hPBCs (grey boxes) and OM-hPBCs (black boxes). Cells were stimulated with LPS ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 1 h, 3 h, 6 h and 9 h in acute infection (A, C, E) and for 1 h, 9 h, 24 h and 48 h in persistent infection (B, D, F). Expressions of *CCL2*, *CXCL1* and *CXCL8* mRNA were evaluated by RT-PCR analysis, data were shown as specific variation of mRNA compared to relative non-infected / non-stimulated cells using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method (*HPRT-1* was used as internal control). * means $p < 0.05$ vs relative non-infected / non-stimulated cells for each time period. Experiments were performed on 4 independent donors.



Supplementary Figure 3: Effect of LPS stimulation on *OPG* (A, B) and *RANKL* (C, D) mRNAs expressions by SM-hPBCs (grey boxes) and OM-hPBCs (black boxes). Cells were stimulated with LPS ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 1 h, 3 h, 6 h and 9 h in acute infection (A, C, E) and for 1 h, 9 h, 24 h and 48 h in persistent infection (B, D, F). Expressions of *OPG* and *RANKL* mRNA were evaluated by RT-PCR analysis, data were shown as specific variation of mRNA compared to relative non-infected / non-stimulated cells using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method (*HPRT-1* was used as internal control). * means $p < 0.05$ vs relative non-infected / non-stimulated cells for each time period. Experiments were performed on 4 independent donors.

Supplementary Table 1: Effect of LPS stimulation on IL-6 protein release by SM-hPBCs and OM-hPBCs (**bold**). Cells were stimulated with LPS for 1 h, 3 h, 6 h and 9 h in acute infection and for 1 h and additional incubations to reach 9 h, 24 h and 48 h in persistent infection. Data were presented as minimal value, median value and maximal value from 4 independent donors set (- means undetermined).

Acute infection																
IL-6 pg.mL ⁻¹	1 h				3 h				6 h				9 h			
	ctrl		LPS		ctrl		LPS		ctrl		LPS		ctrl		LPS	
Max	97	209	79	190	429	442	855	846	702	604	1150	1047	927	924	958	892
Median	22	5	15	16	99	73	576	479	254	153	957	837	671	717	732	742
Min	-	-	-	-	14	29	483	157	113	120	702	619	471	571	615	630

Persistent infection																
IL-6 pg.mL ⁻¹	1 h				9 h				24 h				48 h			
	ctrl		LPS		ctrl		LPS		ctrl		LPS		ctrl		LPS	
Max	2097	1947	2477	2178	3324	3242	6886	6295	4523	4852	10267	7870	5011	6250	14670	10803
Median	726	895	726	890	2445	2540	5958	4649	3712	3422	7367	5357	3939	4066	8065	6171
Min	24	-	10	-	583	82	5310	951	779	85	5068	2867	833	94	4563	5623

Supplementary Table 2: Effect of LPS stimulation on CCL2, CXCL1 and CXCL8 protein releases by SM-hPBCs and OM-hPBCs (**bold**). Cells were stimulated with LPS for 1 h, 3 h, 6 h and 9 h in acute infection and for 1 h and additional incubations to reach 9 h, 24 h and 48 h in persistent infection. Data were presented as minimal value, median value and maximal value from 4 independent donors set (- means undetermined).

Acute infection																
CCL2 pg.mL ⁻¹	1h				3h				6h				9h			
	ctrl		LPS		ctrl		LPS		ctrl		LPS		ctrl		LPS	
Max	573	1259	491	909	1232	2341	922	10105	5123	8059	12114	13691	5877	7538	8744	8969
Median	-	306	-	-	-	589	202	1317	407	704	5752	8857	3870	3310	7402	7161
Min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1912	1381	426	2444	5359	6110

Persistent infection																
CCL2 pg.mL ⁻¹	1h				9h				24h				48h			
	ctrl		LPS		ctrl		LPS		ctrl		LPS		ctrl		LPS	
Max	2294	1792	1988	2113	6525	6037	11806	9356	9500	10329	14667	11454	13756	11458	16375	11139
Median	674	1473	635	1735	2722	4955	6530	7873	6007	7154	9417	9601	9324	7040	11951	9930
Min	-	-	-	-	1983	4102	3228	6404	2761	6019	2839	7849	2928	2008	9117	9198

Acute infection																
CXCL1 pg.mL ⁻¹	1h				3h				6h				9h			
	ctrl		LPS		ctrl		LPS		ctrl		LPS		ctrl		LPS	
Max	-	218	250	-	222	-	385	2506	216	214	17068	16564	-	317	3366	4382
Median	-	-	-	-	-	-	253	338	-	198	4822	5979	-	259	2603	2225
Min	-	-	-	-	-	-	-	226	-	-	782	713	-	-	587	130

Persistent infection																
CXCL1 pg.mL ⁻¹	1h				9h				24h				48h			
	ctrl		LPS		ctrl		LPS		ctrl		LPS		ctrl		LPS	
Max	-	-	-	-	271	291	2261	5231	228	413	6847	11654	262	517	10464	28389
Median	-	-	-	-	93	92	1470	1211	-	110	1970	2406	-	149	2177	5152
Min	-	-	-	-	-	-	326	353	-	-	-	-	-	-	-	153

Acute infection																
CXCL8 pg.mL ⁻¹	1 h				3 h				6 h				9 h			
	0:1		LPS		0:1		LPS		0:1		LPS		0:1		LPS	
Max	-	-	-	-	46	-	4433	4043	45	220	5893	6208	415	707	1075	1055
Median	-	-	-	-	-	-	316	204	-	38	1219	1076	212	370	802	784
Min	-	-	-	-	-	-	138	81	-	-	631	745	-	27	716	721

Persistent infection																
CXCL8 pg.mL ⁻¹	1 h				9 h				24 h				48 h			
	ctrl		LPS		ctrl		LPS		ctrl		LPS		ctrl		LPS	
Max	198	262	1057	1299	651	461	14278	10241	678	521	17209	12455	718	570	17884	13721
Median	79	94	472	567	443	387	11580	7390	524	436	10740	6868	566	472	11268	8023
Min	-	-	-	-	-	51	1061	978	27	213	923	851	50	270	901	889

Supplementary Table 3: Effect of LPS stimulation on OPG protein release by SM-hPBCs and OM-hPBCs (**bold**). Cells were stimulated with LPS for 1 h, 3 h, 6 h and 9 h in acute infection and for 1 h and additional incubations to reach 9 h, 24 h and 48 h in persistent infection. Data were presented as minimal value, median value and maximal value from 4 independent donors set (- means undetermined).

Acute infection																
OPG pg.mL ⁻¹	1h				3h				6h				9h			
	ctrl		LPS		ctrl		LPS		ctrl		LPS		ctrl		LPS	
Max	1705	2327	2982	1344	4933	8545	4836	9018	12909	19891	15418	26145	16133	22065	19387	36576
Median	1308	1165	1263	617	3365	3039	2390	4079	10521	5634	12595	7265	4470	6162	8687	12146
Min	-	130	-	-	1000	826	-	1348	3565	3348	3870	4609	1443	3377	2131	3311

Persistent infection																
OPG pg.mL ⁻¹	1h				9h				24h				48h			
	ctrl		LPS		ctrl		LPS		ctrl		LPS		ctrl		LPS	
Max	6719	6896	11688	7333	17469	12646	83688	11813	27219	25000	39375	46788	39819	87355	54891	98152
Median	1330	2346	1409	2307	4305	6915	6669	8792	11548	13958	18592	23326	21231	33149	23800	44476
Min	700	0	-	500	-	1834	155	2771	202	4521	310	4375	7917	7875	1274	7666

Les principaux résultats obtenus au cours de cette étude sont les suivants :

- L'utilisation d'un milieu de culture ostéogénique sans dexaméthasone permet l'apparition de marqueurs de la maturation ostéoblastique, notamment l'ostéocalcine.
- *S. aureus* est capable d'être internalisé et de persister dans les hpBCs. Toutefois, l'état de maturation des cellules n'influence pas ces phénomènes.
- La présence de *S. aureus* induit une cytotoxicité dans le modèle d'infection aiguë mais n'est pas dépendante de l'état de maturation des hpBCs.
- L'expression de cytokines, de chimiokines et de facteurs impliqués dans l'ostéoclastogénèse par les hpBCs est modulée en présence de *S. aureus*. De plus, la modulation de ces médiateurs varie en fonction de l'état de maturation des cellules.
- La sécrétion sous forme protéique de cytokines, de chimiokines et de facteurs impliqués dans l'ostéoclastogénèse par les hpBCs n'est pas modulée en présence de *S. aureus* en comparaison avec les cellules non infectées.

Notre travail a permis de mettre en évidence que la maturation cellulaire n'influait ni l'internalisation, ni la persistance intracellulaire de *S. aureus* au sein des hpBCs, ni même la mort cellulaire liée à l'infection. L'étude de l'expression des chimiokines, des cytokines et des modulateurs ostéoclastogéniques par les hpBCs, a permis de mettre en avant une différence entre les profils d'expression des chimiokines par les SM- et les OM-hpBCs. Néanmoins, aucune variation n'a été détectée concernant la libération de protéines par les SM- et OM-hpBCs en présence de *S. aureus* par rapport à leurs homologues non-infectées. Nos résultats confirment que la maturation ostéoblastique n'a pas d'incidence sur le comportement des hpBCs infectés par *S. aureus*. De plus, les résultats obtenus suggèrent que le rôle des ostéoblastes / hpBCs ne serait pas prépondérant dans la mise en place de la réponse inflammatoire dans les IOA à *S. aureus*.

2^{ème} partie: Internalisation croissante de *Staphylococcus aureus* et expression de cytokines par les cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton

Les thérapies innovantes basées sur l'utilisation de MSC sont un domaine qui génère beaucoup d'espoir. Leur capacité de différenciation en ostéoblastes et chondrocytes notamment font de ces cellules un outil idéal pour la médecine régénératrice. De plus, elles possèdent des propriétés immuno-modulatrices vis-à-vis de leur environnement direct et peuvent favoriser les processus de réparation tissulaire.

Au cours de l'utilisation des MSC en site chirurgical, pour favoriser la réparation tissulaire, celles-ci pourraient être amenées à rencontrer des bactéries. Cependant, peu d'études sont disponibles concernant l'interaction entre des agents pathogènes et des MSC et sur l'influence de cette interaction sur le comportement des MSC.

S. aureus est responsable d'une forte proportion d'infections nosocomiales, spécifiquement dans le cas des IOA et des IOAM. Il a été récemment décrit que les MSC pourraient avoir un effet bénéfique contre les infections bactériennes. Des études ont notamment démontré que l'administration de MSC issues de la moelle osseuse favorisait la défense antibactérienne dans les infections pulmonaires.

Néanmoins, l'obtention de MSC à partir de la moelle osseuse nécessite des actes chirurgicaux invasifs qui pourraient limiter leur utilisation. Une source alternative à la moelle osseuse est la gelée de Wharton. Les WJ-MSC sont obtenues de manière non invasive et possèdent également un fort potentiel pour la régénération osseuse.

Dans cette étude, le modèle d'infection précoce a été utilisé permettant d'appréhender l'interaction entre *S. aureus* et des WJ-MSC. Nous avons démontré, pour la première fois, que les WJ-MSC étaient capable d'internaliser *S. aureus* de manière croissante au cours du temps. Nos résultats ont aussi montré une augmentation de l'expression de cytokines par les WJ-MSC infectées, suggérant un rôle de ces dernières dans la réponse antibactérienne.

Increased internalization of *Staphylococcus aureus* and cytokine expression in human Wharton's jelly mesenchymal stem cells

Jérôme Josse^{a,b}, Frédéric Velard^{a,c,d}, Saad Mechiche Alami^{a,c}, Valérie Brun^{a,e},
Christine Guillaume^{a,c}, Halima Kerdjoudj^{a,c}, Bouchaib Lamkhieud^{a,b} and
Sophie C. Gangloff^{a,b,*}

^a EA 4691 «Biomatériaux et Inflammation en Site Osseux», Pôle Santé, SFR CAP-Santé (FED 4231),
Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France

^b UFR de Pharmacie, URCA, Reims, France

^c UFR d'Odontologie, URCA, Reims, France

^d Plateforme en Imagerie Cellulaire et Tissulaire (PICT), URCA, Reims, France

^e Département de Chirurgie Orthopédique et Traumatologie, CHU de Reims, Reims, France

Abstract.

BACKGROUND: Although a large number of studies have documented the interaction of mesenchymal stem cells (MSCs) with cells of both the innate and adaptive immune systems, not much is known about how bacteria interact with MSCs and how this might influence MSCs behavior. In this study, we investigated the impact of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), on viability and cytokines' production of human Wharton's jelly-MSCs (WJ-MSCs).

OBJECTIVE: To investigate if WJ-MSCs: (1) internalize *S. aureus*; (2) are able to survive and (3) release immunomodulatory mediators after interaction with *S. aureus*.

METHODS: WJ-MSCs were exposed to *S. aureus* at a multiplicity of infection (MOI) of 10:1 or 30:1 for different designed times. After interaction, intracellular bacteria were quantified as well as MSCs viability. Expression and cytokine-secretion were assessed using quantitative real-time PCR and ELISA.

RESULTS: We found that the challenge of WJ-MSCs with *S. aureus* resulted in increased internalization of *S. aureus* in a time-dependent manner until six hours post-infection at either MOI of 10:1 and 30:1 and in increased expression of IL-6 mRNA and secretion of TNF- α at six hours and nine hours post-infection ($p < 0.05$).

CONCLUSIONS: These results indicate that WJ-MSCs are able to internalize *S. aureus* and reveal a potential important function of these cells in the immune response.

Keywords: Human Wharton's jelly stem cells (WJ-MSCs), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), inflammation, internalization

1. Introduction

Immense expectation surrounds the area of stem cell therapeutics. Since they were first isolated by Friedenstein and his colleagues in 1976 from bone marrow, the capacity of human mesenchymal stem cells (MSCs) for potentially high differentiation has led to many attempts to exploit them in disease

* Address for correspondence: Sophie C. Gangloff, EA 4691 "Bios", UFR de Pharmacie de Reims, 1 Avenue du Maréchal Juin, 51095 Reims Cedex, France. Tel.: +33 3 26 91 35 95; Fax: +33 3 26 91 86 43; E-mail: sophie.gangloff@univ-reims.fr.

modeling and regenerative medicine [1]. Although, they are limited in their differentiation capacity when compared to embryonic stem cells or induced pluripotent stem cells, MSCs have been in the spotlight for regenerative medicine for various indications, due to their availability and potentially beneficial properties, through either autologous or allogenic donation [2]. MSCs have been shown to differentiate *in vitro* into cell lines displaying osteogenic, chondrogenic or adipogenic characteristics [3]. Moreover, they have an immunomodulatory effect on their direct environment [4], and they are able to secrete bioactive molecules that are anti-inflammatory and able to initiate intrinsic tissue regenerative processes [5]. Expected to be used in surgical site to favour tissue regeneration, MSCs can encounter bacteria. However, not much is known about how bacterial pathogens interact with MSCs and how this interaction might influence MSCs' viability and differentiation potential.

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) accounts for a large proportion of hospital-acquired infections, especially among patients with osteomyelitis [6], septic arthritis [7] and implant-related infections [8]. These infections are often caused by biofilm-producing strains, which are difficult to eradicate and may eventually cause bacteremia and new infection sites. Recent *in vivo* studies indicate that MSCs may have beneficial effects in the treatment of sepsis induced by bacterial infection. In these studies, administration of MSCs improved survival and enhanced bacterial clearance [9] mediated in part by secretion of the antimicrobial peptide LL-37 [10]. In Gram-negative sepsis in mice, human MSCs reduce mortality and bacteremia in part by enhancing the phagocytic activity of blood monocytes [11]. In view of these reports, a new antibiotic delivery system made of vancomycin alginate beads embedded in fibrin gel with the addition of bone marrow-derived MSCs could meet the requirements for treating infection and promoting bone formation [12]. However bone marrow harvesting is a highly invasive procedure to the donors and umbilical Wharton's jelly-MSCs (WJ-MSCs) could represent a promising alternative source of MSCs. WJ-MSCs bear higher proliferation rate and self-renewal capacity than adult tissue derived MSCs [13,14] and can be of great value by virtue of their ability to differentiate into distinctive and specialized cells and to secrete site-specific proteins [15]. Herein, in the present study, we quantified the invasion of *S. aureus* into human WJ-MSCs in response to infection and explored inflammatory mediators' production of WJ-MSCs in response to these bacteria. These informations can help to decide if this cell source is suitable for the design and functionality of biocompatible scaffolds for tissue engineering in regenerative medicine.

2. Material and methods

2.1. Bacteria culture

S. aureus 8325-4, wild-type laboratory strain (prophage-free NCTC 8325), was a generous gift from T.J. Foster (Department of Microbiology, Trinity College, Dublin, Ireland). Bacteria were maintained at -80°C and streaked onto trypticase soy broth (TSB) agar plates to obtain single colonies (BioMerieux). After overnight growth in TSB medium at 37°C , *S. aureus* was resuspended in TSB at a starting $\text{OD}_{620\text{ nm}}$ of 0.1 and cultured at 37°C up to an exponential growth phase ($\text{OD}_{620} = 0.4-0.6$). The bacteria were then washed and resuspended in sterile Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, Gibco) for the interaction experiments as described below.

2.2. Isolation and culture of WJ-MSCs

Human umbilical cords were obtained from the maternity of the University Hospital Center (CHU) of Reims after full-term births (with informed consent using the guidelines approved by the ethical board

of the CHU). Briefly, after rinsing in DPBS, umbilical cord vessels were removed and exposed Wharton jelly was cut into small pieces (1–2 mm³). Then, the explants underwent a two-step enzymatic digestion, by overnight incubation with type II collagenase (2 mg/ml, Fisher) followed by Trypsin (Gibco) digestion for 30 min. WJ-MSCs were cultured in α -MEM (Lonza) supplemented with 10% decomplexed fetal calf serum, penicillin/streptomycin/amphotericin 100 IU/ml, glutamine 2 mM (all from Gibco), and maintained in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C. Medium was changed every 3–4 days. WJ-MSCs at fourth passage were seeded at 20,000 cells/well in 24-well culture plates until confluence was reached. For fluorescent staining procedure, WJ-MSCs were seeded on glass coverslips.

2.3. Cells–*S. aureus* interaction

Confluent WJ-MSCs were washed with DPBS and incubated overnight with 1 ml of growth medium without antibiotics. The following day, cells were washed with DPBS and new growth medium without antibiotics was added (1 ml/well). Cell number in one well was determined to optimize the multiplicity of infection (MOI) to get 10:1 and 30:1 (*S. aureus*:cell). After one, three, six and nine hours of co-culture of bacteria (MOI of 10:1 and 30:1) and WJ-MSCs, cultures were washed and used for the gentamicin protection assay as described below. The supernatants of the remaining well cultures were harvested, centrifuged to eliminate cellular debris and bacteria and stored at –80°C for ELISA assays. Adherent cells were washed, dried and stored at –80°C for RNA extraction and real-time PCR analysis. WJ-MSCs grown on glass coverslips were used for fluorescence staining procedure after three hours *in vitro* challenge with *S. aureus*.

2.4. Fluorescence staining procedure

After three hours of co-culture of bacteria and WJ-MSCs, cultures were washed three times with DPBS to eliminate non-adherent bacteria and cells were fixed with 4% paraformaldehyde for ten minutes. Then, cultures were washed and bacteria were stained with Vancomycin Bodipy FL[®] (Invitrogen) and cells' nuclei were stained for two minutes with DAPI (Invitrogen). Glass coverslips were visualized with Zeiss Axiovert 200 M inverted microscope (Carl Zeiss).

2.5. Gentamicin protection assay

To kill the extracellular bacteria, cell cultures were first washed three times with DPBS and then incubated with free-serum growth medium containing 100 µg/ml gentamicin. After one hour incubation at 37°C, cells were washed three times with DPBS and intracellular bacteria were harvested by adding 1 ml of 0.1% Triton X100 to each well. Suspension dilutions of the lysates were plated in triplicate on TSA plates (Easyspiral pro, Interscience) for determination of the recovered colony forming units (CFU) after incubation for 18 hours at 37°C.

2.6. Cytotoxicity assay

Cell death was determined through the measurement of lactate dehydrogenase (LDH) total activity in cell culture supernatant according to the manufacturer's instructions (Cytotoxicity detection kit plus, Roche Diagnostics). The absorbance was read at 592 nm with correction of non-specific background at 700 nm. The LDH activity was correlated with the cell number using a standard curve of cell lysates.

The results are expressed as percentage of viable cells ((initial number cells – number of dead cells) / initial number of cells × 100).

J. Josse et al. / *S. aureus* and Wharton's jelly mesenchymal stem cells

Table 1
Primers' nucleotide sequences and efficiency reaction for each primer couple

Target gene	Sequences		Efficiency
	Forward primer	Reverse primer	
IL-1 β	5'-CTGTCCTGCGTGTGAAAGA-3'	5'-TTGGGTAATTTTGGGATCTACA-3'	1.91
IL-6	5'-GGAACAAGCCAGAGCTGTG-3'	5'-GGCTGGCAATTTGTGGTTGG-3'	2
IL-8	5'-AGACAGCAGAGCACACAAGC-3'	5'-CTCCTTGGCAAACTGCAC-3'	1.99
TNF- α	5'-CAGCCTCCTCCTTCTTGAT-3'	5'-GCCAGAGGGCTGATTAGAGA-3'	1.95
HPRT-1	5'-TGACCTTGATTTATTTTGCATACC-3'	5'-CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT-3'	1.95

2.7. Real-time PCR analysis

Total RNA was extracted from WJ-MSCs using MasterPureTM RNA Purification Kit (Epicentre[®] Biotechnologies) in accordance with the manufacturer instructions. The RNA ratio 260/280 nm from all the samples was comprised between 1.9 and 2 (Nanodrop[®], Thermo Scientific). Thereafter, following manufacturer instructions, RNA was reverse transcribed, with a High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems), into cDNA. The cDNA product was amplified by real-time PCR (Step One Plus, Applied Biosystems) and the mRNA levels for IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α and HPRT-1 (endogenous control) were determined using the double strand-specific Power SYBR[®] Green dye system (Applied Biosystems). Primer sequences for IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α and the housekeeping gene HPRT-1 were determined with the Universal Probe Library Assay Design Center (Roche Applied Science). Primers efficiency was also measured (Table 1). Data analysis was performed with the Step One software (Applied Biosystems). Results were calculated in accordance with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method and were presented as fold ratios.

2.8. Enzyme-linked immunosorbent assay

Chemokines and cytokines (IL-8, IL-1 β , IL-6 and TNF- α) concentrations in conditioned supernatants were measured by ELISA (Duoset[®], R&D Systems). Controls were composed of the non-stimulated cells and media alone.

2.9. Data analysis/statistics

All experiments were performed in duplicate on cells from seven different umbilical cords. Non-parametric exact stratified permutation tests with the *p* value fixed at 0.05 were carried out to determine the significance of the results (StatXact 7.0, Cytel Inc.). Non-parametric statistics were used because of the small number of donors, and the stratification allowed the impact of donor variability to be taken into account.

3. Results

3.1. Internalization of *S. aureus* by WJ-MSCs

Since previous work from our laboratory showed that *S. aureus* 8325-4 could interact and stimulate human primary cells [16,17], we anticipated that it might also interact with WJ-MSCs. *In vitro* challenge

J. Josse et al. / *S. aureus* and Wharton's jelly mesenchymal stem cells

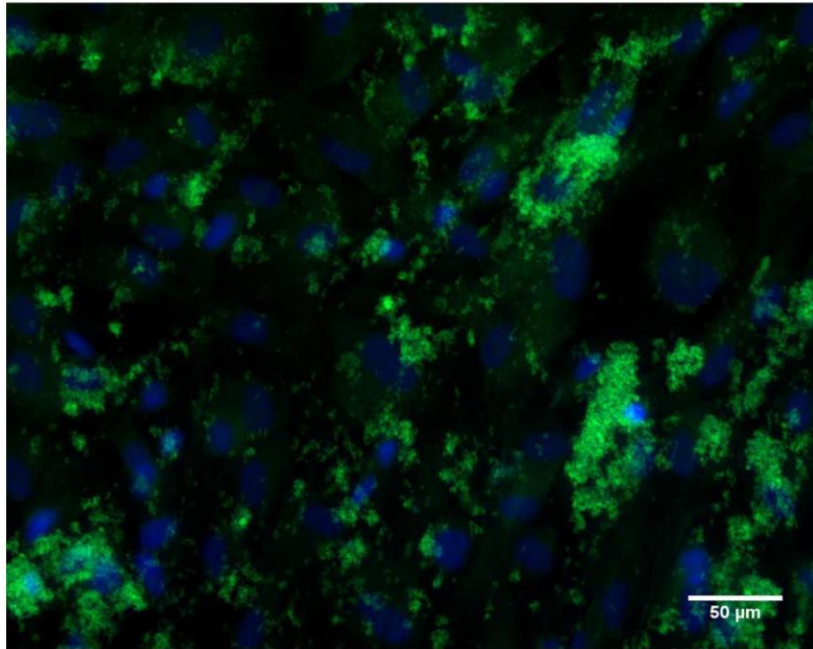


Fig. 1. Interaction between *S. aureus* and WJ-MSCs following three hours *in vitro* challenge. Bacteria were stained with Vancomycin Bodipy FL[®] (green) and cells' nuclei were stained with DAPI (blue) and were visualized with Zeiss Axiovert 200 M inverted microscope at $\times 20$ magnification. (The colors are visible in the online version of the article; <http://dx.doi.org/10.3233/BME-140971>.)

showed that *S. aureus* could interact with WJ-MSCs' surface (Fig. 1) and could also be internalized. Looking more specifically to the intracellular bacteria from one to nine hours, a clear dynamic could be seen (Fig. 2). At one hour post interaction, there was a statistical difference between the two MOI, the mean number of intracellular bacteria per cell was three times higher with the MOI of 30:1 as compared to the MOI of 10:1 (0.312 bacteria/cell and 0.105 bacteria/cell for MOI of 30:1 and 10:1 respectively). After three hours, this difference was not seen anymore. Nevertheless, the number of intracellular bacteria still rose with a significant difference between one and three hours (17.5 times for MOI 10:1), as well as between three and six hours for both MOI with an increase of more than three times. After six hours, there was a mean value of 16 intracellular bacteria per cell.

3.2. WJMSCs viability decreased during acute staphylococcal infection

In order to evaluate the killing of MSCs by bacteria, we investigated cell death by quantifying the LDH release following plasma membrane damage or rupture of WJ-MSCs. LDH is released only by dying cells and its accumulation in the supernatants following WJ-MSCs–bacteria interaction points out the impact on cell viability.

In our model of interaction, the WJ-MSCs were not affected until six hours post-infection (data not shown). At six, like at nine hours post-infection, the viability of the cells significantly decreased in a MOI and time-dependent manner (Fig. 3). The interaction with bacteria at a MOI of 10:1 led to a death increase of 17% at six hours and of 24% at nine hours, whereas with a MOI of 30:1 the lethality was around 23% at six hours and 49% at nine hours post-infection. No cell death was observed in non-infected cells during the nine hours post-infection.

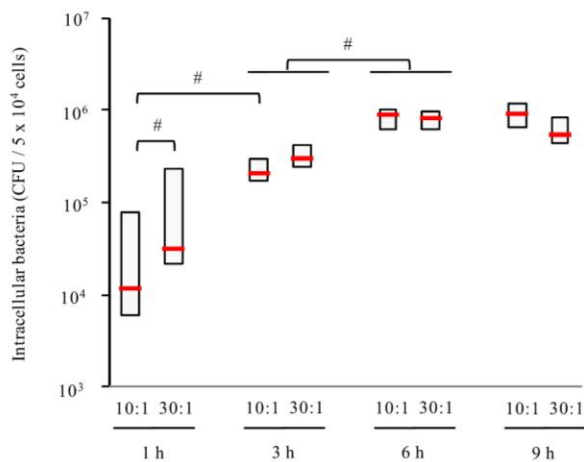


Fig. 2. Internalization of *S. aureus* by WJ-MSCs. Cells were exposed to viable *S. aureus* (MOI 10:1 and 30:1) for one, three, six and nine hours and the amount of intracellular bacteria was determined after serial plating. Results are represented in a logarithmic scale as intracellular bacteria CFU for 5×10^4 cells. Box plot data: the bottom and top of the box are the 1 and 3 quartiles, and the band inside the box is the median, # $p < 0.05$. (Colors are visible in the online version of the article; <http://dx.doi.org/10.3233/BME-140971>.)

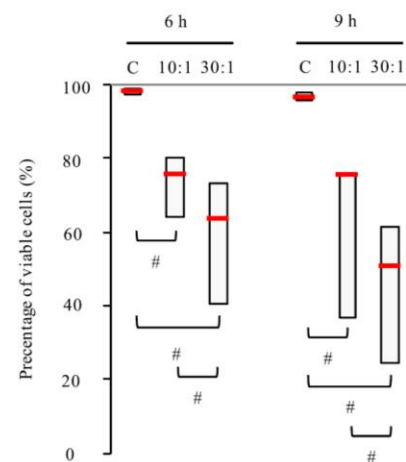


Fig. 3. Effect of *S. aureus* on cell viability. WJ-MSCs were infected with *S. aureus* MOI (10:1 or 30:1). LDH activity was measured in cell supernatants. Results are represented as the percentage of viable cells. Box plot data: the bottom and top of the box are the 1 and 3 quartiles, and the band inside the box is the median, # $p < 0.05$. (Colors are visible in the online version of the article; <http://dx.doi.org/10.3233/BME-140971>.)

3.3. Cytokine production in WJ-MSCs following short time interaction with *S. aureus*

To evaluate the behavior of WJ-MSCs during an acute staphylococcal infection, we investigated the expression and secretion of inflammatory mediators. We focused on IL-1 β , IL-6 and TNF- α largely involved in inflammatory bone loss and osteoarthritis [18,19] and on IL-8 (CXCL8), that is involved in the recruitment of neutrophils and other immune cells [16,20,21].

On one hand, the analysis of the levels of IL-1 β or IL-8 expressed or secreted by WJ-MSCs using bacteria at both MOI, did not show any significant differences between infected and non-infected cells at any time of interaction (data not shown), even so WJ-MSCs secreted IL-8 at a basal concentration that increased from 1.5 pg/ml after one hour to 25.7 pg/ml after nine hours of culture.

On the other hand, as shown in Fig. 4(A) for both MOI compared to non-infected cells, IL-6 mRNA expression was significantly increased at six hours (1.8 fold for 10:1, 2.6 fold for 30:1) and at nine hours post-infection (2.3 fold for 10:1, 2.2 fold for 30:1). As far as, IL-6 protein secretion was concerned and independently of the presence of *S. aureus*, an increase of the basal secretion was observed from 28.5 pg/ml at one hour post-infection (data not shown) to 238.2 pg/ml at nine hours post-infection (Fig. 4(B)). TNF- α mRNA expression was significantly increased only at six hours post-infection with the MOI of 30:1 (Fig. 4(C)). As shown in Fig. 4(D), TNF- α concentration was statistically up-regulated in a time dependent manner in presence of *S. aureus*. Interestingly, the MOI did not have the same impact through the post-infection time. At three hours post-infection, the TNF- α secretion was statistically higher with a MOI of 30:1 than with a MOI of 10:1, whereas the phenomenon was inverted at nine hours post-infection. It also appeared that after six hours, the maximum of secretion of TNF- α was reached for infected cells (Fig. 4(D)).

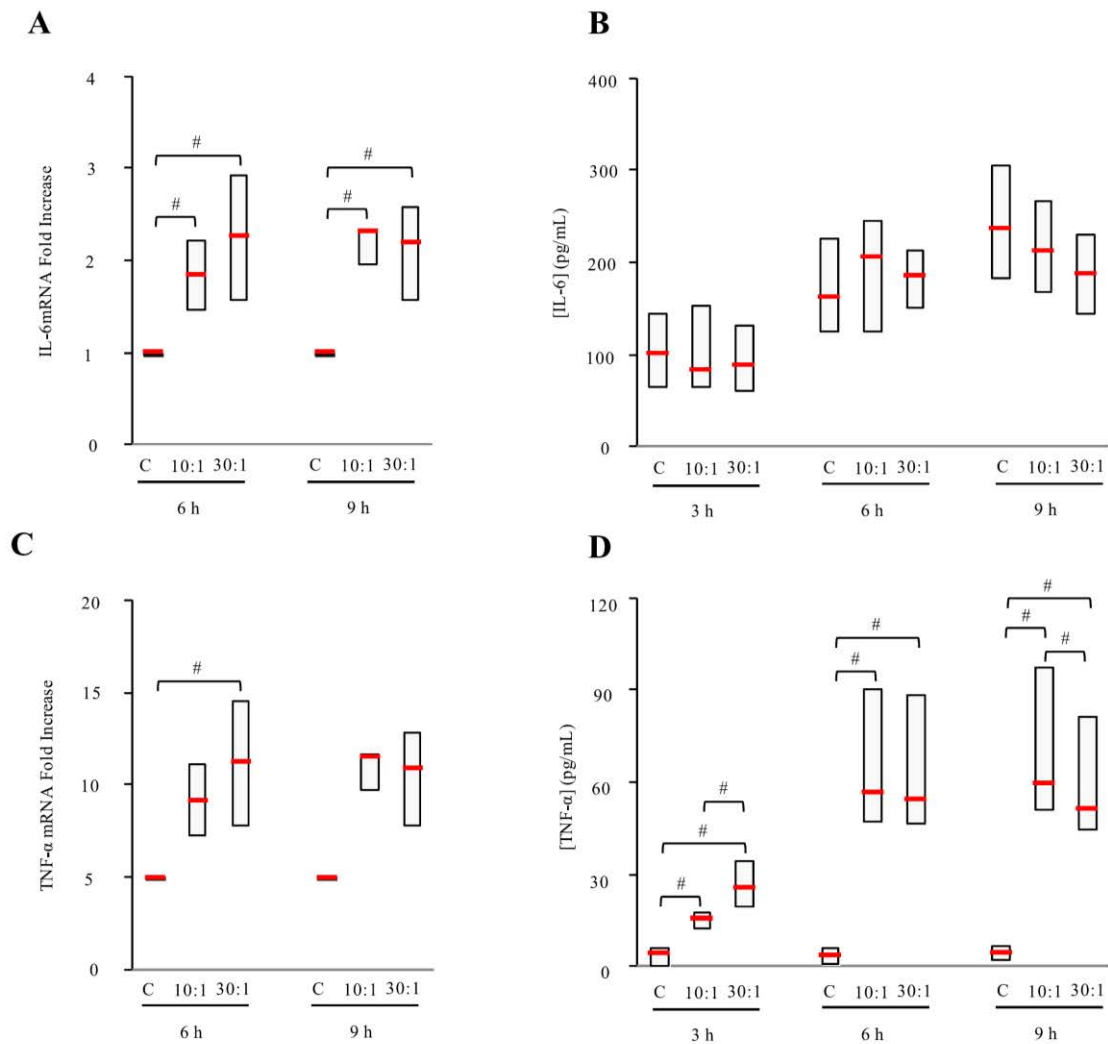


Fig. 4. Effect of *S. aureus* on expression (A, C) and on release (B, D) of IL-6 (A, B) and TNF- α (C, D) by WJ-MSCs. mRNA expressions were evaluated by real-time PCR analysis performed as described in materials and methods after interaction with *S. aureus* at MOI of 10:1 and 30:1. Data are shown as specific variation of target genes mRNA using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (HPRT1 were used as internal control). Protein release was evaluated by ELISA and performed after interaction with *S. aureus* at MOI of 10:1 and 30:1. Results are presented in protein concentrations (pg/ml) normalized for 5×10^4 cells. Box plot data: the bottom and top of the box are the 1 and 3 quartiles, and the band inside the box is the median, # $p < 0.05$. (Colors are visible in the online version of the article; <http://dx.doi.org/10.3233/BME-140971>.)

4. Discussion

MSCs have emerged as important cells that have the capacity to repair the damaged tissue or, to stimulate the host tissue to regenerate itself. Along with their capacity for differentiating into osteoblasts, chondrocytes and adipocytes, recent studies have also shown that WJ-MSCs display immunomodulatory capacities [15]. Data reported in this study demonstrated, for the first time that, WJ-MSCs could internalize *S. aureus* and release inflammatory cytokines that might optimize the immune response for

the benefit of the patient.

There is ample evidence that *S. aureus*, despite being considered as an extracellular pathogen, can also invade several cell types in culture including fibroblasts, osteoblasts, keratinocytes, endothelial cells, epithelial cells, professional phagocytes and human umbilical mast cells [22]. While neutrophils have been implicated in the elimination of *S. aureus*, it is conceivable that other non-immune cells may also participate in the vigorous host response to staphylococcal invasion. It is thus possible that MSCs may help to limit the infection through phagocytosis of *S. aureus*. These bacteria invade eukaryotic cells *via* fibronectin bridging between host cell integrins and staphylococcal surface fibronectin-binding proteins [23]. However, it remains to be determined whether $\alpha 5\beta 1$ integrins are expressed on the surface of WJ-MSCs. Alternatively, *S. aureus* may evade the extracellular antimicrobial activity of MSCs by promoting its own uptake [22]. We can also speculate that ingested *S. aureus* may survive into WJ-MSCs, thereby creating a potential reservoir for protracted infection and inflammation [24]. Therefore, hiding within intracellular compartment of MSCs may not only constitute a strategy of *S. aureus* to avoid clearance but also establish an infection reservoir that could contribute to chronic carriage. The results of this study complement and extend previous investigations showing that several cell types could internalize *S. aureus*.

It has been reported that MSCs are sensitive to their site-specific microenvironment, and it is anticipated that they will deliver the bioactive agents in a site-specific manner [15]. We have assessed whether WJ-MSCs became activated after encountering *S. aureus* and could exert a direct antimicrobial activity that would be mediated by the discharge of antimicrobial products known to be toxic for *S. aureus* [10] or by release of mediators such as TNF- α , which serve to attract phagocytic cells involved in the elimination of this invading pathogen to the site of infection [25]. Accordingly, our experiments provide evidence that WJ-MSCs release TNF- α upon interaction with *S. aureus*. The additive effect of these two mechanisms (direct internalization and release of inflammatory mediators) may contribute, at least to some extent, to the early control of *S. aureus* infection.

The development of new biomimetic scaffolds that provide bone formation and a suitable microenvironment that controls bacterial colonization is the focus of our research. Because WJ-MSCs evoke minimal immunoreactivity and bear high osteogenic potential, their association with scaffolds for the promotion of bone regeneration, seems possible. In the present study, we investigated the interaction and inflammatory responses of primary human WJ-MSCs to internalized *S. aureus*. We believe that our findings are a good starting point and have great potential to study the simultaneous competition for scaffold surface between MSCs and bacteria in the presence of immune system components.

Acknowledgements

We thank Pr. Olivier Graesslin and his team (maternity ward of CHU Reims) for providing the umbilical cords, Chantal Grimplet for her excellent technical assistance. Jérôme Josse is the recipient of a fellowship from the French « Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche ».

References

- [1] A.J. Friedenstein, J.F. Gorskaja and N.N. Kulagina, Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs, *Exp. Hematol.* **4**(5) (1976), 267–274.
- [2] A.M. Dimarino, A.I. Caplan and T.L. Bonfield, Mesenchymal stem cells in tissue repair, *Front. Immunol.* **4** (2013), 201.
- [3] D.J. Prockop, Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues, *Science* **276**(5309) (1997), 71–74.

- [4] S. Aggarwal and M.F. Pittenger, Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses, *Blood* **105**(4) (2005), 1815–1822.
- [5] A.I. Caplan and J.E. Dennis, Mesenchymal stem cells as trophic mediators, *J. Cell Biochem.* **98**(5) (2006), 1076–1084.
- [6] A. Hogan, V.G. Heppert and A.J. Suda, Osteomyelitis, *Arch. Orthop. Trauma Surg.* **133**(9) (2013), 1183–1196.
- [7] M.E. Shirtliff and J.T. Mader, Acute septic arthritis, *Clin. Microbiol. Rev.* **15**(4) (2002), 527–544.
- [8] L. Montanaro, P. Speziale, D. Campoccia, S. Ravaoli, I. Cangini, G. Pietrocola et al., Scenery of *Staphylococcus* implant infections in orthopedics, *Future Microbiol.* **6**(11) (2011), 1329–1349.
- [9] Y. Yuan, S. Lin, N. Guo, C. Zhao, S. Shen, X. Bu et al., Marrow mesenchymal stem cells reduce methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in rat models, *Cytotherapy* **16**(1) (2014), 56–63.
- [10] A. Krasnodembskaya, Y. Song, X. Fang, N. Gupta, V. Serikov, J.-W. Lee et al., Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37, *Stem Cells* **28**(12) (2010), 2229–2238.
- [11] A. Krasnodembskaya, G. Samarani, Y. Song, H. Zhuo, X. Su, J.-W. Lee et al., Human mesenchymal stem cells reduce mortality and bacteremia in gram-negative sepsis in mice in part by enhancing the phagocytic activity of blood monocytes, *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* **302**(10) (2012), L1003–L1013.
- [12] T. Hou, J. Xu, Q. Li, J. Feng and L. Zen, *In vitro* evaluation of a fibrin gel antibiotic delivery system containing mesenchymal stem cells and vancomycin alginate beads for treating bone infections and facilitating bone formation, *Tissue Eng. Part A* **14**(7) (2008), 1173–1182.
- [13] S. Karahuseyinoglu, O. Cinar, E. Kilic, F. Kara, G.G. Akay, D.O. Demiralp et al., Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: *in situ* and *in vitro* surveys, *Stem Cells* **25**(2) (2007), 319–331.
- [14] S. Kern, H. Eichler, J. Stoeve, H. Klüter and K. Bieback, Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue, *Stem Cells* **24**(5) (2006), 1294–1301.
- [15] G. La Rocca, M. Lo Iacono, T. Corsello, S. Corrao, F. Farina and R. Anzalone, Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells maintain the expression of key immunomodulatory molecules when subjected to osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation *in vitro*: new perspectives for cellular therapy, *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **8**(1) (2013), 100–113.
- [16] S. Escotte, D. Al Alam, R. Le Naour, E. Puchelle, M. Guenounou and S.C. Gangloff, T cell chemotaxis and chemokine release after *Staphylococcus aureus* interaction with polarized airway epithelium, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **34**(3) (2006), 348–354.
- [17] D. Al Alam, G. Deslee, C. Tournois, B. Lamkhioed, F. Lebargy, M. Merten et al., Impaired interleukin-8 chemokine secretion by *Staphylococcus aureus*-activated epithelium and T-cell chemotaxis in cystic fibrosis, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **42**(6) (2010), 644–650.
- [18] M. Feldmann, F.M. Brennan and R.N. Maini, Role of cytokines in rheumatoid arthritis, *Annu. Rev. Immunol.* **14** (1996), 397–440.
- [19] K. Redlich and J.S. Smolen, Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention, *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**(3) (2012), 234–250.
- [20] F. Velard, D. Laurent-Maquin, J. Braux, C. Guillaume, S. Bouthors, E. Jallot et al., The effect of zinc on hydroxyapatite-mediated activation of human polymorphonuclear neutrophils and bone implant-associated acute inflammation, *Biomaterials* **31**(8) (2010), 2001–2009.
- [21] A.S. Gounni, B. Lamkhioed, L. Koussih, C. Ra, P.M. Renzi and Q. Hamid, Human neutrophils express the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI): role in asthma, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **15**(6) (2001), 940–949.
- [22] J. Abel, O. Goldmann, C. Ziegler, C. Höltje, M.S. Smeltzer, A.L. Cheung et al., *Staphylococcus aureus* evades the extracellular antimicrobial activity of mast cells by promoting its own uptake, *J. Innate Immun.* **3**(5) (2011), 495–507.
- [23] B. Sinha and M. Fraunholz, *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events, *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* **300**(2,3) (2010), 170–175.
- [24] J. Schwartz, K.G. Leidal, J.K. Fleming, J.P. Weiss and W.M. Nauseef, Neutrophil bleaching of GFP-expressing staphylococci: probing the intraphagosomal fate of individual bacteria, *J. Immunol.* **183**(4) (2009), 2632–2641.
- [25] M. Enoksson, K.F.K. Ejendal, S. McAlpine, G. Nilsson and C. Lunderius-Andersson, Human cord blood-derived mast cells are activated by the Nod1 agonist M-TriDAP to release pro-inflammatory cytokines and chemokines, *J. Innate Immun.* **3**(2) (2011), 142–149.

Copyright of Bio-Medical Materials & Engineering is the property of IOS Press and its content may not be copied or emailed to multiple sites or posted to a listserv without the copyright holder's express written permission. However, users may print, download, or email articles for individual use.

Les principaux résultats obtenus au cours de cette étude sont les suivants :

- Les WJ-MSC sont capables d'internaliser *S. aureus* de manière croissante au cours du temps dans un modèle *in vitro* d'infection précoce
- La présence de *S. aureus* induit une augmentation du relargage de la LDH après 6 h et 9 h d'interaction traduisant une mortalité accrue des WJ-MSC infectées
- L'expression des ARN messagers de l'*IL-6* et du *TNF- α* est augmentée en présence de *S. aureus* alors que ceux de l'*IL-1 β* et de l'*IL-8 (CXCL8)* ne varient pas significativement.
- Les concentrations protéiques d'*IL-6*, d'*IL-1 β* et d'*IL-8* produites sont similaires pour les WJ-MSC non infectées ou infectées.

Notre travail a mis en évidence pour la première fois le phénomène d'internalisation de *S. aureus* par les WJ-MSC et l'expression de cytokines en réponse à l'infection. L'internalisation observée révèle un comportement similaire à celui d'autres cellules phagocytaires non professionnelles comme les cellules endothéliales, les cellules épithéliales pulmonaires ou les ostéoblastes. L'internalisation de *S. aureus* par les WJ-MSC pourrait protéger cette bactérie contre les cellules immunes responsable de la clairance bactérienne et favoriser la chronicité de l'infection pour une souche bactérienne n'induisant pas de cytotoxicité importante. Concernant la production de cytokines pro-inflammatoires, nos résultats suggèrent que les WJ-MSC pourraient participer à la réponse inflammatoire lors d'une infection à *S. aureus*.

Ces deux mécanismes pourraient contribuer à leur niveau au contrôle précoce de l'infection par *S. aureus*. Ces résultats sont à prendre en compte dans le développement de nouvelles stratégies d'utilisation des WJ-MSC pour la régénération osseuse en site potentiellement infectieux.

DISCUSSION GENERALE

Le microenvironnement osseux est un espace complexe composé de différents compartiments où logent une multitude de populations cellulaires qui communiquent les unes avec les autres (Schéma 23). Cet environnement permet également à l'os de se régénérer si nécessaire, comme par exemple à la suite d'une fracture, d'une résection de tumeur ou d'une infection bactérienne.

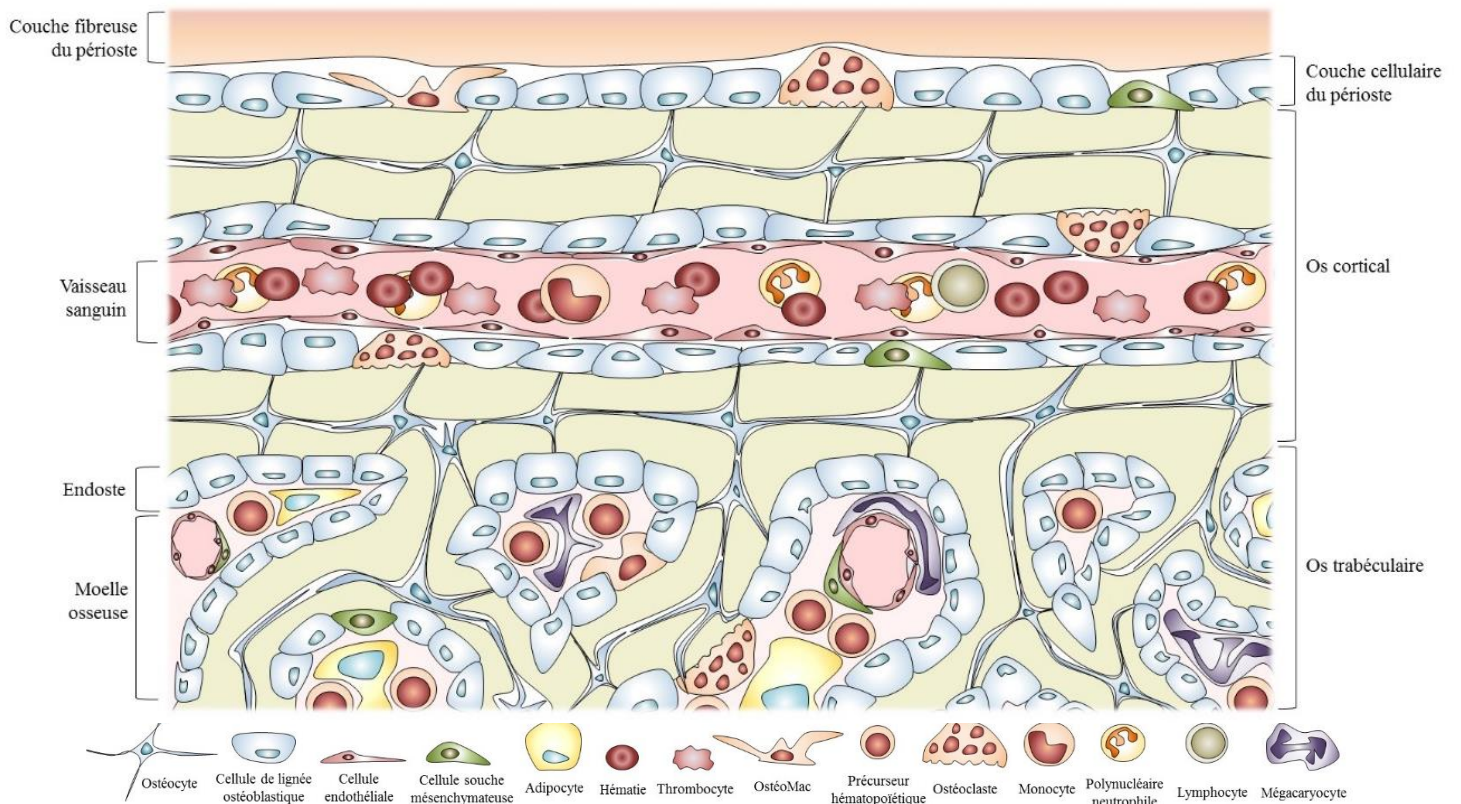


Schéma 23 : le microenvironnement osseux.

Il est communément admis que la pathogenèse d'une bactérie est liée à ses facteurs de virulence mais également à la réponse de l'hôte. Il nous a donc semblé intéressant d'appréhender la relation entre *S. aureus*, principale bactérie impliquée dans les IOA, et des cellules de l'environnement osseux, notamment des cellules des différents stades de la différenciation ostéoblastique (MSC, ostéoblastes pré-matures et ostéoblastes matures) qui participent à la régénération osseuse.

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes donc attachés à caractériser l'interaction entre *S. aureus* et des cellules à potentiel ostéogénique, à savoir des cellules primaires humaines formatrices d'os (hpBCs) et des MSC dérivées de la gelée de Wharton (WJ-MSC), en étudiant plus particulièrement l'internalisation bactérienne, la cytotoxicité cellulaire induite par les bactéries et la capacité des cellules à produire des médiateurs inflammatoires (cytokines, chimiokines) ou des médiateurs modulant l'ostéoclastogénèse.

L'internalisation de *S. aureus* par les cellules de la réponse innée, notamment les PNN, est un phénomène bien connu (105). Après leur recrutement sur le site de l'infection, les PNN sont capables de phagocyter les bactéries et de les détruire par l'effet combiné de réactifs oxydants et des composants cytotoxiques des granules (175), permettant ainsi la clairance bactérienne et par la suite la résolution de l'infection (106). Ce phénomène d'internalisation a aussi été observé pour des cellules phagocytaires non-professionnelles comme des cellules épithéliales pulmonaires, des kératinocytes ou des cellules endothéliales (113–115,176).

Cependant, *S. aureus* est capable d'échapper à la dégradation intracellulaire, particulièrement dans le cas où il est internalisé par des cellules non-phagocytaires, pouvant créer un phénomène de persistance au sein des cellules (112). En effet, *S. aureus* est capable de produire des exotoxines comme les PSM et l' α -hémolysine afin de lyser la membrane phagosomale et de s'échapper dans le cytoplasme (114,177,178). Mais, la production d'exotoxines peut également entraîner une cytotoxicité importante comme cela a pu être observé chez les ostéoblastes en présence de PSM (177) et chez les cellules endothéliales avec l' α -hémolysine (114). Cette cytotoxicité se traduisant par la lyse cellulaire et le relargage des bactéries, elle expose ainsi à nouveau *S. aureus* au système immunitaire. La persistance intracellulaire serait donc plutôt favorisée par un phénotype bactérien provoquant une faible cytotoxicité.

La souche de *S. aureus* NCTC 8325-4 utilisé dans nos modèles d'interaction est décrite comme ayant une faible capacité d'internalisation et de réplication intracellulaire et un phénotype à tendance cytotoxique (forte production d' α -hémolysine) (179,180). Cependant, quel que soit le modèle d'interaction utilisé ou le type cellulaire, nous avons pu montrer que cette bactérie pouvait être internalisée et survivre dans les cellules, alors que dans le même temps et dans les mêmes conditions, *E. coli* n'était pas internalisée.

La faible capacité de réplication intracellulaire de cette souche pourrait expliquer le nombre constant de bactéries intracellulaires observées dans le modèle d'infection persistante avec les hpBCs. De plus, cette observation suggère que l'augmentation du nombre de bactéries

intracellulaires dans nos modèles aigus d'interaction avec les hpBCs et les WJ-MSC s'explique par une entrée régulière de bactéries qui se multiplient continuellement dans le milieu extracellulaire.

Concernant la cytotoxicité induite par *S. aureus*, celle-ci a surtout été retrouvée en présence des bactéries extracellulaires dans le modèle d'infection aiguë, que ce soit pour les WJ-MSC ou les hpBCs. Dans le modèle de persistance, nous n'avons pas observé de mortalité cellulaire accrue alors que ce phénomène avait pourtant été observé pour des cellules endothéliales et pour des ostéoblastes murins (114,181).

La production et l'accumulation d' α -hémolysine par les bactéries extracellulaires pourrait donc être à l'origine de la cytotoxicité observée après 9 h d'interaction dans le modèle d'infection aiguë. De plus, il a récemment été montré que la production d' α -hémolysine peut favoriser l'internalisation de *S. aureus* au sein des mastocytes, par le biais d'une augmentation de l'intégrine $\beta 1$, impliquée dans l'internalisation dépendante de la fibronectine (182). Ce phénomène pourrait aussi participer à l'explication de la forte internalisation observée après 9 h d'interaction dans le modèle d'infection aiguë.

Dans le cadre de la réparation osseuse en site infecté, les notions de persistance intracellulaire et de cytotoxicité associée aux bactéries sont des phénomènes à prendre en compte, aussi bien pour la mise en place du traitement thérapeutique que pour le choix du biomatériau à utiliser dans le comblement d'une résection par exemple.

Ainsi, les cellules associées au produit d'ITO pourraient fournir une niche cellulaire, permettant aux staphylocoques de persister au sein du dispositif en se protégeant de la réponse immunitaire et des traitements antibactériens, favorisant le développement d'une infection chronique.

Dans ce cas telle qu'évoqué précédemment, la cytotoxicité en réponse à l'internalisation de *S. aureus* serait un moindre mal. En effet, la mort des cellules permettrait de libérer les bactéries intracellulaires, les rendant à nouveau accessibles aux cellules phagocytaires professionnelles. La mort des cellules diminuerait malheureusement les capacités de réparation osseuse, mais le développement d'une potentielle infection chronique serait ainsi évité. En comparant les résultats de cytotoxicité entre les WJ-MSC et les hpBCs infectées par *S. aureus*, il semblerait que celle-ci soit plus importante pour les WJ-MSC. En cas de potentielle récurrence au niveau du site de régénération, l'utilisation de WJ-MSC serait donc plus intéressante pour éviter la chronicité de l'infection à *S. aureus*.

Au cours de ces travaux, nous nous sommes également intéressés à la capacité des hpBCs ou des WJ-MSCs à produire des cytokines, des chimiokines et des médiateurs de l'ostéoclastogénèse.

Les cytokines retrouvées majoritairement après une infection à *S. aureus* sont le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6 (98,100). Elles vont permettre de stimuler les cellules qui interviennent dans la réponse immunitaire innée. De plus, ces trois cytokines peuvent toutes stimuler l'ostéoclastogénèse, soit en stimulant la production de RANKL, soit de manière indépendante (51–54). Il semblerait notamment que l'IL-6 ait un rôle prédominant dans la formation et l'activation des ostéoclastes (54).

Les chimiokines quant à elles, sont de petites molécules capables d'initier le recrutement des leucocytes. Les chimiokines CXCL1 et CXCL8 recrutent majoritairement les PNN alors que CCL2 a plutôt un pouvoir attractant vis-à-vis des monocytes et macrophages (101). Comme précédemment pour les cytokines, ces trois chimiokines sont également capables de favoriser l'ostéoclastogénèse (59–63).

Nous avons montré que les WJ-MSCs et les hpBCs sont capables de produire des cytokines et des chimiokines mais que la stimulation de leur expression n'est pas équivalente selon le type et la maturation cellulaire. Une des explications serait une potentielle incapacité de la souche *S. aureus* NCTC 8325-4 à induire une réponse pro-inflammatoire comme cela a pu être suggéré lors d'interactions entre cette souche et des cellules endothéliales (183). Dans cet article, Yao *et al.* proposent que la faible capacité d'induction d'une réponse inflammatoire résulte de la faible internalisation de la souche *S. aureus* NCTC 8325-4, suggérant ainsi que l'internalisation de *S. aureus* est nécessaire à la production de médiateurs pro-inflammatoires. Néanmoins, il est reconnu que *S. aureus* peut induire une réponse inflammatoire *via* des récepteurs extracellulaires comme le TNFR-1, ce qui ne nécessite pas d'internalisation (92). De plus, il a été démontré que la souche *S. aureus* NCTC 8325-4 était capable d'induire la sécrétion de CXCL8 par des cellules épithéliales bronchiques après 3 h d'interaction (184,185). Enfin, nos résultats préliminaires sur des cellules MG-63, une lignée cellulaire issue d'un ostéosarcome humain, ont permis de mettre en évidence une sécrétion accrue d'IL-6 et de CXCL8 en présence de *S. aureus* NCTC 8325-4 dans notre modèle d'infection aiguë. Ces différents résultats suggèrent que la faible expression et l'absence de production de médiateurs pro-inflammatoires ne sont pas liées à la souche bactérienne utilisée mais bien aux cellules et notamment à leur caractère « primaire ».

En effet, comme nous avons pu l'évoquer dans la revue, le constat concernant les capacités des ostéoblastes à produire des médiateurs inflammatoires en réponse de *S. aureus* a été majoritairement observé dans des modèles d'infection utilisant des ostéoblastes murins, des cellules de lignée cellulaire ou à l'aide d'ostéoblastes commerciaux issus d'un seul donneur (117). De plus, il a récemment été démontré que la réponse de cellules endothéliales lors d'une infection à *S. aureus* différait en fonction du caractère « primaire » ou « lignée cellulaire » des cellules (186). Ces résultats corroborent une observation similaire concernant les hpBCs et les MG-63.

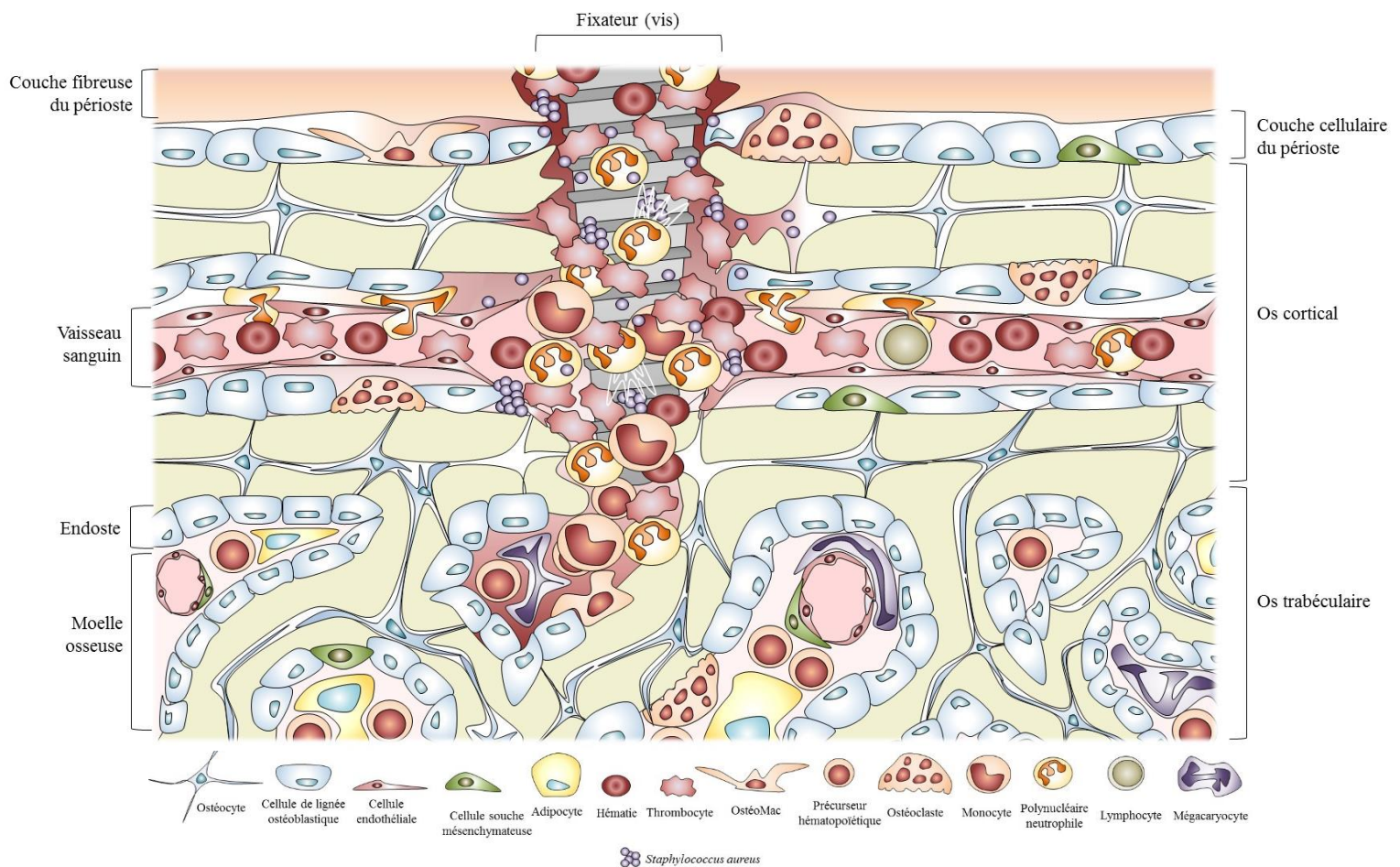


Schéma 24 : Impact d'une IOAM à *Staphylococcus aureus* sur le microenvironnement osseux, le matériel étant un fixateur.

En faisant la somme de ces différentes informations, l'apport de l'ostéoblaste dans la réponse inflammatoire lors d'une IOA ou une IOAM à *S. aureus* peut être remis en cause. Nous suggérons notamment que l'initiation de la réponse inflammatoire observée en réponse à l'infection, que ce soit en clinique ou dans des modèles *in vivo*, serait plutôt la résultante de

l'interaction entre *S. aureus* et l'une des nombreuses cellules présente au sein du microenvironnement osseux (cellules de la niche hématopoïétique, cellules sanguines, *OsteoMacs*) voire même des cellules de la barrière épithéliale (si IOAM par exemple) ou de la circulation sanguine (si infection hématogène par exemple) (Schéma 24).

Dans le contexte d'ITO en site infecté (Schéma 25), le choix de la cellule la plus sensible à la cytotoxicité induite par *S. aureus*, dans notre cas les WJ-MSC, serait un moindre mal afin d'éviter la persistance intracellulaire bactérienne et le développement d'une infection chronique. La fonctionnalisation du biomatériau associé aux cellules par des molécules antimicrobiennes permettrait de protéger les cellules du microenvironnement osseux et les cellules présentes dans le biomatériau, autorisant ces dernières à se focaliser sur la réparation du tissu osseux.

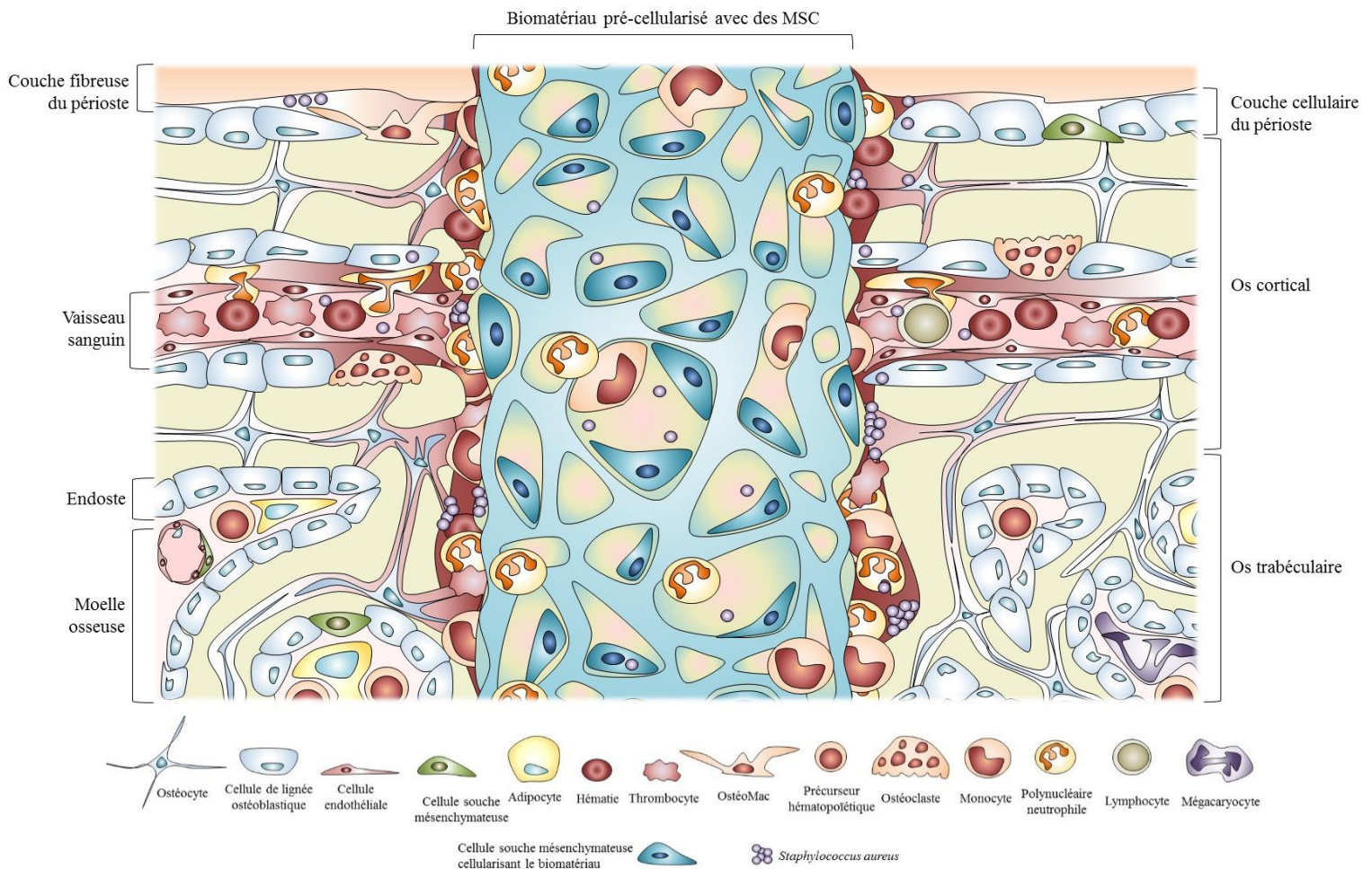


Schéma 25 : Représentation de l'implantation d'un dispositif d'ingénierie tissulaire osseuse en site infecté par *S. aureus*.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Ces travaux de thèse ont permis d'approfondir les acquis concernant l'interaction entre *S. aureus* et les cellules du microenvironnement osseux. Nous avons notamment montré que l'utilisation de cellules humaines primaires issues de plusieurs donneurs est possible pour la mise en place de modèles d'infection *in vitro*, que ce soit des cellules issues d'explants osseux ou des MSC à potentiel ostéogénique. Les résultats présentés dans cette thèse sont plus nuancés et présentent une plus grande variabilité que lors d'utilisation de lignées cellulaires mais nous suggérons que ceux-ci se rapprochent plus des conditions retrouvées en clinique. Toutefois, nos résultats s'accordent avec la littérature concernant l'importance des phénomènes d'internalisation et de cytotoxicité induite dans le pronostic d'une IOA à *S. aureus*.

A l'issue de ces travaux, plusieurs perspectives sont envisagées pour aller plus loin dans la compréhension des phénomènes observés et apporter des réponses pertinentes pour les cliniciens.

Nous souhaitons tout d'abord réaliser des interactions avec d'autres souches de *S. aureus* dans nos modèles d'infection *in vitro*. Celles-ci auraient un phénotype moins cytotoxique et une capacité de persistance intracellulaire plus élevée. La souche UAMS-1 par exemple, fréquemment utilisée lors d'interactions avec des ostéoblastes, mais aussi des souches cliniques identifiées au préalable pourraient être utilisées.

L'internalisation et la persistance de *S. aureus* au sein des cellules osseuses étant la clé de voûte des IOA, nous proposons, à partir de souches cliniques de *S. aureus* utilisées dans notre modèle d'infection aiguë, de cribler des molécules aux propriétés anti-internalisation. La découverte de telles molécules permettrait leur emploi en bithérapie avec des antibiotiques classiques, comme cela a déjà pu être envisagé avec des molécules anti-biofilms (187). La fonctionnalisation de biomatériaux par de telles molécules pourrait représenter un nouvel outil pour lutter contre les IOAM.

La suite logique de ce travail sera la mise au point d'un modèle d'IOAM *in vitro* incluant *S. aureus*, et des WJ-MSC associées à un biomatériau. Une biomatrice composée de chitosane

et d'hydroxyapatite a déjà été testée au laboratoire. Sa biocompatibilité a été validée lors de la culture *in vitro* avec des cellules osseuses primaires humaines (188). Une fois les paramètres de cette interaction tripartite établis, ce modèle *in vitro* pourra nous être utile pour étudier la fonctionnalisation des biomatériaux et son impact sur l'infection bactérienne mais aussi sur la différenciation des WJ-MSC en ostéoblastes en site infecté.

Ceci serait une étape préliminaire à une étude *in vivo*. Un modèle de comblement de défaut critique fémoral par la technique de Masquelet est maîtrisé au sein de notre laboratoire. Ce modèle pourra être adapté pour le développement d'une IOAM et les produits d'ITO contenant des WJ-MSC et des biomatrices fonctionnalisées par des antimicrobiens (anti-intériorisation et anti-biofilms) pourraient être testés.

A noter que la question de la vascularisation devra être abordée. Une pré-implantation au sein d'un muscle squelettique pourrait être envisagée afin d'assurer la vascularisation du dispositif d'ITO. Une co-culture entre WJ-MSC et cellules endothéliales peut également être réalisée au préalable afin de favoriser la formation de vaisseaux sanguins. Dans la possibilité d'une régénération osseuse en site infecté, l'impact d'une infection bactérienne sur la revascularisation de la zone lésée apparaît comme un enjeu majeur.

Enfin nous envisageons d'adapter notre modèle à l'étude de l'interaction entre des cellules osseuses primaires humaines et *P. aeruginosa*. Cette bactérie à Gram négatif est relativement peu étudiée dans les IOA malgré sa forte prévalence dans les IOAM et les IOA du pied diabétique. Des expériences préliminaires menées dans notre laboratoire suggèrent que *P. aeruginosa* n'est pas internalisé par les cellules osseuses et donc que son comportement serait différent de celui de *S. aureus*.

Nous pensons que les résultats obtenus lors de ces travaux ainsi que ceux à venir au travers des perspectives envisagées apporteront de nouvelles pistes pour innover dans la lutte contre les IOA et la réparation du site osseux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ANATOMY & PHYSIOLOGY - OPENSTAX CNX.
<http://cnx.org/contents/14fb4ad7-39a1-4eee-ab6e-3ef2482e3e22@7.28:1/Preface>
2. CLARKE B.
Normal bone anatomy and physiology.
Clin J Am Soc Nephrol CJASN. 2008 Nov;3 Suppl 3:S131–9.
3. ALFORD AI, KOZLOFF KM, HANKENSON KD.
Extracellular matrix networks in bone remodeling.
Int J Biochem Cell Biol. 2015 Aug;65:20–31.
4. CHANG MK, RAGGATT L-J, ALEXANDER KA, KULIWABA JS, FAZZALARI NL, SCHRODER K, et al.
Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo.
J Immunol Baltim Md 1950. 2008 Jul 15;181(2):1232–44.
5. COMPSTON JE.
Bone marrow and bone: a functional unit.
J Endocrinol. 2002 Jun;173(3):387–94.
6. ZHENG Y, ZHOU H, DUNSTAN CR, SUTHERLAND RL, SEIBEL MJ.
The role of the bone microenvironment in skeletal metastasis.
J Bone Oncol. 2013 Feb;2(1):47–57.
7. KOMORI T.
Regulation of osteoblast differentiation by Runx2.
Adv Exp Med Biol. 2010;658:43–9.
8. KOMORI T.
Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors.
J Cell Biochem. 2006 Dec 1;99(5):1233–9.
9. LONG F.
Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage.
Nat Rev Mol Cell Biol. 2012 Jan;13(1):27–38.
10. CAPULLI M, PAONE R, RUCCIN.
Osteoblast and osteocyte: games without frontiers.
Arch Biochem Biophys. 2014 Nov 1;561:3–12.

11. KERN B, SHEN J, STARBUCK M, KARSENTY G.
Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes.
J Biol Chem. 2001 Mar 9;276(10):7101–7.
12. YANO H, HAMANAKA R, NAKAMURA-OTA M, ADACHI S, ZHANG JJ, MATSUO N, et al.
Sp7/Osterix induces the mouse pro- α 2(I) collagen gene (Colla2) expression via the proximal promoter in osteoblastic cells.
Biochem Biophys Res Commun. 2014 Sep 26;452(3):531–6.
13. KNOTT L, BAILEY AJ.
Collagen cross-links in mineralizing tissues: A review of their chemistry, function, and clinical relevance.
Bone. 1998 Mar;22(3):181–7.
14. WHYTE MP.
Chapter 70: Hypophosphatasia: Nature’s Window on Alkaline Phosphatase Function in Man.
Principles of Bone Biology (Second Edition).
San Diego: Academic Press; 2002. p. 1229–48.
15. ORIMO H.
The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease.
J Nippon Med Sch Nippon Ika Daigaku Zasshi. 2010 Feb;77(1):4–12.
16. YOSHIDA CA, KOMORI H, MARUYAMA Z, MIYAZAKI T, KAWASAKI K, FURUICHI T, et al.
SP7 Inhibits Osteoblast Differentiation at a Late Stage in Mice.
PLoS One. 2012 Mar 2;7(3):e32364.
17. EIJKEN M, MEIJER IMJ, WESTBROEK I, KOEDAM M, CHIBA H, UITTERLINDEN AG, et al.
Wnt signaling acts and is regulated in a human osteoblast differentiation dependent manner.
J Cell Biochem. 2008 May 15;104(2):568–79.
18. TERMINE JD, KLEINMAN HK, WHITSON SW, CONN KM, MCGARVEY ML, MARTIN GR.
Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen.
Cell. 1981 Oct;26(1 Pt 1):99–105.
19. ROBEY PG.
Chapter 14 - Bone Matrix Proteoglycans and Glycoproteins.
Principles of Bone Biology (Second Edition).
San Diego: Academic Press; 2002. p. 225–37

20. GRZESIK WJ, ROBEY PG.
Bone matrix RGD glycoproteins: immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells in vitro.
J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res. 1994 Apr;9(4):487–96.
21. CARRON JA, BOWLER WB, WAGSTAFF SC, GALLAGHER JA.
Expression of Members of the Thrombospondin Family by Human Skeletal Tissues and Cultured Cells.
Biochem Biophys Res Commun. 1999 Sep 24;263(2):389–91.
22. HELFRICH MH, NESBITT SA, DOREY EL, HORTON MA.
Rat osteoclasts adhere to a wide range of rgd (arg-gly-asp) peptide-containing proteins, including the bone sialoproteins and fibronectin, via a $\beta 3$ integrin.
J Bone Miner Res. 1992 Mar 1;7(3):335–43.
23. GRAMOUN A, AZIZI N, SODEK J, HEERSCHE JNM, NAKCHBANDI I, MANOLSON MF.
Fibronectin inhibits osteoclastogenesis while enhancing osteoclast activity via nitric oxide and interleukin-1 β -mediated signaling pathways.
J Cell Biochem. 2010 Nov 1;111(4):1020–34.
24. ADDISON WN, MASICA DL, GRAY JJ, MCKEE MD.
Phosphorylation-dependent inhibition of mineralization by osteopontin ASARM peptides is regulated by PHEX cleavage.
J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res. 2010 Apr;25(4):695–705.
25. TANABE N, WHEAL BD, KWON J, CHEN HH, SHUGG RPP, SIMS SM, et al.
Osteopontin signals through calcium and nuclear factor of activated T cells (NFAT) in osteoclasts: a novel RGD-dependent pathway promoting cell survival.
J Biol Chem. 2011 Nov 18;286(46):39871–81.
26. DESBOIS C, KARSENTY G.
Osteocalcin cluster: Implications for functional studies.
J Cell Biochem. 1995 Mar 1;57(3):379–83.
27. HOCK JM, KRISHNAN V, ONYIA JE, BIDWELL JP, MILAS J, STANISLAUS D.
Osteoblast apoptosis and bone turnover.
J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res. 2001 Jun;16(6):975–84.
28. JILKA RL, WEINSTEIN RS, BELLIDO T, PARFITT AM, MANOLAGAS SC.
Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines.
J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res. 1998 May;13(5):793–802.
29. ERIKSEN EF.
Cellular mechanisms of bone remodeling.
Rev Endocr Metab Disord. 2010 Dec;11(4):219–27.

30. DALLAS SL, BONEWALD LF.
Dynamics of the Transition from Osteoblast to Osteocyte.
Ann N Y Acad Sci. 2010 Mar;1192:437–43.
31. BARON R, KNEISSEL M.
WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments.
Nat Med. 2013 Feb;19(2):179–92.
32. WIJENAYAKA AR, KOGAWA M, LIM HP, BONEWALD LF, FINDLAY DM, ATKINS GJ.
Sclerostin stimulates osteocyte support of osteoclast activity by a RANKL-dependent pathway.
PloS ONE. 2011;6(10):e25900.
33. NAKASHIMA T, HAYASHI M, FUKUNAGA T, KURATA K, OH-HORA M, FENG JQ, et al.
Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression.
Nat Med. 2011 Oct;17(10):1231–4.
34. KRAMER I, HALLEUX C, KELLER H, PEGURRI M, GOOI JH, WEBER PB, et al.
Osteocyte Wnt/beta-catenin signaling is required for normal bone homeostasis.
Mol Cell Biol. 2010 Jun;30(12):3071–85.
35. EDWARDS JR, MUNDY GR.
Advances in osteoclast biology: old findings and new insights from mouse models.
Nat Rev Rheumatol. 2011 Apr;7(4):235–43.
36. PAHL HL, SCHEIBE RJ, ZHANG DE, CHEN HM, GALSON DL, MAKI RA, et al.
The proto-oncogene PU.1 regulates expression of the myeloid-specific CD11b promoter.
J Biol Chem. 1993 Mar 5;268(7):5014–20.
37. ZHANG DE, HETHERINGTON CJ, CHEN HM, TENEN DG.
The macrophage transcription factor PU.1 directs tissue-specific expression of the macrophage colony-stimulating factor receptor.
Mol Cell Biol. 1994 Jan;14(1):373–81.
38. HATTERSLEY G, OWENS J, FLANAGAN AM, CHAMBERS TJ.
Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) is essential for osteoclast formation *in vitro*.
Biochem Biophys Res Commun. 1991 May 31;177(1):526–31.
39. TAKAYANAGI H, KIM S, KOGA T, NISHINA H, ISSHIKI M, YOSHIDA H, et al.
Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts.
Dev Cell. 2002 Dec;3(6):889–901.

40. SIMONET WS, LACEY DL, DUNSTAN CR, KELLEY M, CHANG MS, LÜTHY R, et al.
Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density.
Cell. 1997 Apr 18;89(2):309–19.
41. HSU H, LACEY DL, DUNSTAN CR, SOLOVYEV I, COLOMBERO A, TIMMS E, et al.
Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Mar 30;96(7):3540–5.
42. BOYLE WJ, SIMONET WS, LACEY DL.
Osteoclast differentiation and activation.
Nature. 2003 May 15;423(6937):337–42.
43. AUBIN JE.
Osteoclast adhesion and resorption: the role of podosomes.
J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res. 1992 Apr;7(4):365–8.
44. BLAIR HC.
How the osteoclast degrades bone.
BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol. 1998 Oct;20(10):837–46.
45. LI YP, CHEN W, LIANG Y, LI E, STASHENKO P.
Atp6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification.
Nat Genet. 1999 Dec;23(4):447–51.
46. MARGOLIS DS, SZIVEK JA, LAI L-W, LIEN Y-HH.
Phenotypic characteristics of bone in carbonic anhydrase II-deficient mice.
Calcif Tissue Int. 2008 Jan;82(1):66–76.
47. WILSON SR, PETERS C, SAFTIG P, BRÖMME D.
Cathepsin K Activity-dependent Regulation of Osteoclast Actin Ring Formation and Bone Resorption.
J Biol Chem. 2009 Jan 23;284(4):2584–92.
48. KRANE SM, INADA M.
Matrix metalloproteinases and bone.
Bone. 2008 Jul;43(1):7–18.
49. SUDA T, TAKAHASHI N, MARTIN TJ.
Modulation of osteoclast differentiation.
Endocr Rev. 1992 Feb;13(1):66–80.

50. HOLLBERG K, HULTENBY K, HAYMAN A, COX T, ANDERSSON G.
Osteoclasts from mice deficient in tartrate-resistant acid phosphatase have altered ruffled borders and disturbed intracellular vesicular transport.
Exp Cell Res. 2002 Oct 1;279(2):227–38.
51. KOTAKE S, SATO K, KIM KJ, TAKAHASHI N, UDAGAWA N, NAKAMURA I, et al.
Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation.
J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res. 1996 Jan;11(1):88–95.
52. MA T, MIYANISHI K, SUEN A, EPSTEIN NJ, TOMITA T, SMITH RL, et al.
Human interleukin-1-induced murine osteoclastogenesis is dependent on RANKL, but independent of TNF-alpha.
Cytokine. 2004 May 7;26(3):138–44.
53. LAM J, TAKESHITA S, BARKER JE, KANAGAWA O, ROSS FP, TEITELBAUM SL.
TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand.
J Clin Invest. 2000 Dec;106(12):1481–8.
54. REDLICH K, SMOLEN JS.
Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention.
Nat Rev Drug Discov. 2012 Mar;11(3):234–50.
55. ISHIMI Y, MIYAURA C, JIN CH, AKATSU T, ABE E, NAKAMURA Y, et al.
IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption.
J Immunol Baltim Md 1950. 1990 Nov 15;145(10):3297–303.
56. KONG YY, FEIGE U, SAROSI I, BOLON B, TAFURI A, MORONY S, et al.
Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand.
Nature. 1999 Nov 18;402(6759):304–9.
57. WONG PKK, QUINN JMW, SIMS NA, VAN NIEUWENHUIJZE A, CAMPBELL IK, WICKS IP.
Interleukin-6 modulates production of T lymphocyte-derived cytokines in antigen-induced arthritis and drives inflammation-induced osteoclastogenesis.
Arthritis Rheum. 2006 Jan;54(1):158–68.
58. KATAYAMA M, OHMURA K, YUKAWA N, TERAO C, HASHIMOTO M, YOSHIFUJI H, et al.
Neutrophils Are Essential As A Source Of Il-17 In The Effector Phase Of Arthritis.
PloS ONE. 2013 mai;8(5):e62231.

59. KHAN UA, HASHIMI SM, BAKR MM, FORWOOD MR, MORRISON NA.
CCL2 and CCR2 are Essential for the Formation of Osteoclasts and Foreign Body Giant Cells.
J Cell Biochem. 2016 Feb;117(2):382–9.
60. ONAN D, ALLAN EH, QUINN JMW, GOOI JH, POMPOLO S, SIMS NA, et al.
The chemokine Cxcl1 is a novel target gene of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein in committed osteoblasts.
Endocrinology. 2009 May;150(5):2244–53.
61. BENDRE MS, MONTAGUE DC, PEERY T, AKEL NS, GADDY D, SUVA LJ.
Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease.
Bone. 2003 Jul;33(1):28–37.
62. VALERIO MS, HERBERT BA, BASILAKOS DS, BROWNE C, YU H, KIRKWOOD KL.
Critical role of MKP-1 in lipopolysaccharide-induced osteoclast formation through CXCL1 and CXCL2. *Cytokine.* 2015 Jan;71(1):71–80.
63. HARDAWAY AL, HERROON MK, RAJAGURUBANDARA E, PODGORSKI I.
Marrow adipocyte-derived CXCL1 and CXCL2 contribute to osteolysis in metastatic prostate cancer.
Clin Exp Metastasis. 2015 Apr;32(4):353–68.
64. ANTHONY BA, LINK DC.
Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells.
Trends Immunol. 2014 Jan;35(1):32–7.
65. REAGAN MR, ROSEN CJ.
Navigating the bone marrow niche: translational insights and cancer-driven dysfunction.
Nat Rev Rheumatol. 2016 Mar;12(3):154–68.
66. NAVEIRAS O, NARDI V, WENZEL PL, HAUSCHKA PV, FAHEY F, DALEY GQ.
Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment.
Nature. 2009 Jul 9;460(7252):259–63.
67. KULAR J, TICKNER J, CHIM SM, XU J.
An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level.
Clin Biochem. 2012 Aug;45(12):863–73.
68. PETTIT AR, CHANG MK, HUME DA, RAGGATT L-J.
Osteal macrophages: a new twist on coupling during bone dynamics.
Bone. 2008 Dec;43(6):976–82.

69. ALEXANDER KA, CHANG MK, MAYLIN ER, KOHLER T, MÜLLER R, WU AC, et al.
Osteal macrophages promote in vivo intramembranous bone healing in a mouse tibial injury model.
J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res. 2011 Jul;26(7):1517–32.
70. WALDVOGEL FA, MEDOFF G, SWARTZ MN.
Osteomyelitis: a review of clinical features, therapeutic considerations and unusual aspects.
N Engl J Med. 1970 Jan 22;282(4):198–206.
71. LEW DP, WALDVOGEL FA.
Osteomyelitis.
Lancet Lond Engl. 2004 Jul 24;364(9431):369–79.
72. MADER JT, SHIRTLIFF M, CALHOUN JH.
Staging and staging application in osteomyelitis.
Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 1997 Dec;25(6):1303–9.
73. RADCLIFFE G.
Osteomyelitis – a historical and basic sciences review.
Orthop Trauma, Volume 29 , Issue 4 , 243 – 252.
74. GER R.
Muscle transposition for treatment and prevention of chronic post-traumatic osteomyelitis of the tibia.
J Bone Joint Surg Am. 1977 Sep;59(6):784–91.
75. KELLY PJ.
Infected nonunion of the femur and tibia.
Orthop Clin North Am. 1984 Jul;15(3):481–90.
76. GORDON L, CHIU EJ.
Treatment of infected non-unions and segmental defects of the tibia with staged microvascular muscle transplantation and bone-grafting.
J Bone Joint Surg Am. 1988 Mar;70(3):377–86.
77. ROMANÒ CL, ROMANÒ D, LOGOLUSO N, DRAGO L.
Bone and joint infections in adults: a comprehensive classification proposal.
Eur Orthop Traumatol. 2011 May;1(6):207–17.
78. RASIGADE J-P.
Physiopathologie des infections ostéoarticulaires chroniques: rôle des biofilms et de la persistance bactérienne intracellulaire.
Lett Infect. 2012 mai - juin ; Tome XXVII (n°3) : 110–5.

79. BRADY RA, LEID JG, CALHOUN JH, COSTERTON JW, SHIRTLIFF ME.
Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection.
FEMS Immunol Med Microbiol. 2008 Jan;52(1):13–22.
80. PELTOLA H, PÄÄKKÖNEN M.
Acute Osteomyelitis in Children.
N Engl J Med. 2014 Jan 23;370(4):352–60.
81. BERBARI EF, KANJ SS, KOWALSKI TJ, DAROUICHE RO, WIDMER AF, SCHMITT SK, et al.
2015 Infectious Diseases Society of America (IDSA) Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Native Vertebral Osteomyelitis in Adults.
Clin Infect Dis. 2015 Jul 29;civ482.
82. HOGAN A, HEPPERT VG, SUDA AJ.
Osteomyelitis.
Arch Orthop Trauma Surg. 2013 Sep;133(9):1183–96.
83. KIM PH, LEOPOLD SS.
Gustilo-Anderson Classification.
Clin Orthop. 2012 Nov;470(11):3270–4.
84. MALHOTRA R, CHAN CS-Y, NATHER A.
Osteomyelitis in the diabetic foot.
Diabet Foot Ankle. 2014;5.
85. CALHOUN JH, MANRING MM, SHIRTLIFF M.
Osteomyelitis of the Long Bones.
Semin Plast Surg. 2009 May;23(2):59–72.
86. MONTANARO L, SPEZIALE P, CAMPOCCIA D, RAVAIOLI S, CANGINI I, PIETROCOLA G, et al.
Scenery of Staphylococcus implant infections in orthopedics.
Future Microbiol. 2011 Nov 1;6(11):1329–49.
87. ZIMMERLI W.
Clinical presentation and treatment of orthopaedic implant-associated infection.
J Intern Med. 2014 Aug 1;276(2):111–9.
88. LOWY FD.
Staphylococcus aureus infections.
N Engl J Med. 1998 Aug 20;339(8):520–32.

89. ELASRI MO, THOMAS JR, SKINNER RA, BLEVINS JS, BEENKEN KE, NELSON CL, et al.
Staphylococcus aureus collagen adhesin contributes to the pathogenesis of osteomyelitis.
Bone. 2002 Jan;30(1):275–80.
90. TUNG H, GUSS B, HELLMAN U, PERSSON L, RUBIN K, RYDÉN C.
A bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal Sdr family.
Biochem J. 2000 Feb 1;345 Pt 3:611–9.
91. GÓMEZ MI, LEE A, REDDY B, MUIR A, SOONG G, PITT A, et al.
Staphylococcus aureus protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1.
Nat Med. 2004 Aug;10(8):842–8.
92. CLARO T, WIDAA A, MCDONNELL C, FOSTER TJ, O'BRIEN FJ, KERRIGAN SW.
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. 2013 Jan;159(Pt 1):147–54.
93. PALMQVIST N, JOSEFSSON E, TARKOWSKI A.
Clumping factor A-mediated virulence during *Staphylococcus aureus* infection is retained despite fibrinogen depletion.
Microbes Infect Inst Pasteur. 2004 Feb;6(2):196–201.
94. JOSEFSSON E, HARTFORD O, O'BRIEN L, PATTI JM, FOSTER T.
Protection against Experimental *Staphylococcus aureus* Arthritis by Vaccination with Clumping Factor A, a Novel Virulence Determinant.
J Infect Dis. 2001 Dec 15;184(12):1572–80.
95. MCDEVITT D, NANAVATY T, HOUSE-POMPEO K, BELL E, TURNER N, MCINTIRE L, et al.
Characterization of the Interaction Between the *Staphylococcus Aureus* Clumping Factor (ClfA) and Fibrinogen.
Eur J Biochem. 1997 Jul 1;247(1):416–24.
96. VANDENESCH F, LINA G, HENRY T.
Staphylococcus aureus hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors?
Front Cell Infect Microbiol. 2012;2:12.
97. TAKEDA K, AKIRA S.
Toll receptors and pathogen resistance.
Cell Microbiol. 2003 Mar 1;5(3):143–53.

98. FOURNIER B, PHILPOTT DJ.
Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system.
Clin Microbiol Rev. 2005 Jul;18(3):521–40.

99. FOURNIER B.
The function of TLR2 during staphylococcal diseases.
Front Cell Infect Microbiol. 2012;2:167.

100. KIELIAN T, HICKEY WF.
Proinflammatory Cytokine, Chemokine, and Cellular Adhesion Molecule Expression during the Acute Phase of Experimental Brain Abscess Development.
Am J Pathol. 2000 Aug;157(2):647–58.

101. SOEHNLEIN O, LINDBOM L.
Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation.
Nat Rev Immunol. 2010 Jun;10(6):427–39.

102. VERDRENGH M, TARKOWSKI A.
Role of neutrophils in experimental septicemia and septic arthritis induced by *Staphylococcus aureus*.
Infect Immun. 1997 Jul;65(7):2517–21.

103. MÖLNE L, VERDRENGH M, TARKOWSKI A.
Role of Neutrophil Leukocytes in Cutaneous Infection Caused by *Staphylococcus aureus*.
Infect Immun. 2000 Nov;68(11):6162–7.

104. Kobayashi SD, BRAUGHTON KR, PALAZZOLO-BALLANCE AM, KENNEDY AD, SAMPAIO E, KRISTOSTURYAN E, et al.
Rapid neutrophil destruction following phagocytosis of *Staphylococcus aureus*.
J Innate Immun. 2010;2(6):560–75.

105. SPAAN AN, SUREWAARD BGJ, NIJLAND R, STRIJP JAG VAN.
Neutrophils Versus *Staphylococcus aureus*: A Biological Tug of War.
Annu Rev Microbiol. 2013;67(1):629–50.

106. LU T, KOBAYASHI SD, QUINN MT, DELEO FR.
A NET Outcome.
Front Immunol. 2012;3:365.

107. THWAITES GE, GANT V.
Are bloodstream leukocytes Trojan Horses for the metastasis of *Staphylococcus aureus*?
Nat Rev Microbiol. 2011 Mar;9(3):215–22.

108. BRINKMANN V, REICHARD U, GOOSMANN C, FAULER B, UHLEMANN Y, WEISS DS, et al.
Neutrophil extracellular traps kill bacteria.
Science. 2004 Mar 5;303(5663):1532–5.
109. FLANNAGAN RS, HEIT B, HEINRICHS DE.
Antimicrobial Mechanisms of Macrophages and the Immune Evasion Strategies of *Staphylococcus aureus*.
Pathog Basel Switz. 2015;4(4):826–68.
110. KUBICA M, GUZIK K, KOZIEL J, ZAREBSKI M, RICHTER W, GAJKOWSKA B, et al.
A Potential New Pathway for *Staphylococcus aureus* Dissemination: The Silent Survival of *S. aureus* Phagocytosed by Human Monocyte-Derived Macrophages.
PLoS ONE. 2008 Jan 9;3 (1).
111. PARSONS B, STRAUSS E.
Surgical management of chronic osteomyelitis.
Am J Surg. 2004 Jul;188(1, Supplement 1):57–66.
112. LÖFFLER B, TUCHSCHERR L, NIEMANN S, PETERS G.
Staphylococcus aureus persistence in non-professional phagocytes.
Int J Med Microbiol IJMM. 2014 Mar;304(2):170–6.
113. KAHL BC, GOULIAN M, VAN WAMEL W, HERRMANN M, SIMON SM, KAPLAN G, et al.
Staphylococcus aureus RN6390 replicates and induces apoptosis in a pulmonary epithelial cell line.
Infect Immun. 2000 Sep;68(9):5385–92.
114. MENZIES BE, KOURTEVA I.
Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis.
Infect Immun. 1998 Dec;66(12):5994–8.
115. HUDSON MC, RAMP WK, NICHOLSON NC, WILLIAMS AS, NOUSIAINEN MT.
Internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured osteoblasts.
Microb Pathog. 1995 Dec;19(6):409–19.
116. REILLY SS, HUDSON MC, KELLAM JF, RAMP WK.
In vivo internalization of *Staphylococcus aureus* by embryonic chick osteoblasts.
Bone. 2000 Jan;26(1):63–70.
117. JOSSE J, VELARD F, GANGLOFF SC.
Staphylococcus aureus vs. Osteoblast: Relationship and Consequences in Osteomyelitis.
Front Cell Infect Microbiol. 2015;5:85.

118. GRAYSON WL, BUNNELL BA, MARTIN E, FRAZIER T, HUNG BP, GIMBLE JM. Stromal cells and stem cells in clinical bone regeneration. *Nat Rev Endocrinol.* 2015 Mar;11(3):140–50.
119. MEIJER GJ, DE BRUIJN JD, KOOLE R, VAN BLITTERSWIJK CA. Cell-based bone tissue engineering. *PLoS Med.* 2007 Feb;4(2):e9.
120. LE BLANC K, MOUGIAKAKOS D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol.* 2012 May;12(5):383–96.
121. LEE JW, FANG X, KRASNODEMBSKAYA A, HOWARD JP, MATTHAY MA. Concise review: Mesenchymal stem cells for acute lung injury: role of paracrine soluble factors. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2011 Jun;29(6):913–9.
122. FRIEDENSTEIN AJ, PETRAKOVA KV, KUROLESOVA AI, FROLOVA GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968 Mar;6(2):230–47.
123. FRAUSIN S, VIVENTI S, VERGA FALZACAPPA L, QUATTROMANI MJ, LEANZA G, TOMMASINI A, et al. Wharton’s jelly derived mesenchymal stromal cells: Biological properties, induction of neuronal phenotype and current applications in neurodegeneration research. *Acta Histochem.* 2015 Jun;117(4-5):329–38.
124. LA ROCCA G, ANZALONE R, CORRAO S, MAGNO F, LORIA T, LO IACONO M, et al. Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. *Histochem Cell Biol.* 2009 Feb;131(2):267–82.
125. TAGHIZADEH RR, CETRULO KJ, CETRULO CL. Wharton’s Jelly stem cells: future clinical applications. *Placenta.* 2011 Oct;32 Suppl 4:S311–5.
126. WATSON N, DIVERS R, KEDAR R, MEHINDRU A, MEHINDRU A, BORLONGAN MC, et al. Discarded Wharton jelly of the human umbilical cord: a viable source for mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2015 Jan;17(1):18–24.
127. LOI n° 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique. 2011-814 juillet, 2011.

128. HENTZE H, SOONG PL, WANG ST, PHILLIPS BW, PUTTI TC, DUNN NR.
Teratoma formation by human embryonic stem cells: Evaluation of essential parameters for future safety studies.
Stem Cell Res. 2009 May;2(3):198–210.

129. GAO LR, CHEN Y, ZHANG NK, YANG XL, LIU HL, WANG ZG, et al.
Intracoronary infusion of Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction: double-blind, randomized controlled trial.
BMC Med. 2015;13:162.

130. TAO H, HAN Z, HAN ZC, LI Z, TAO H, HAN Z, et al.
Proangiogenic Features of Mesenchymal Stem Cells and Their Therapeutic Applications.
Stem Cells Int Stem Cells Int. 2016 Jan 6;2016, 2016:e1314709.

131. TROYER DL, WEISS ML.
Wharton’s jelly-derived cells are a primitive stromal cell population.
Stem Cells Dayt Ohio. 2008 Mar;26(3):591–9.

132. MECHICHE ALAMI S, VELARD F, DRAUX F, SIU PAREDES F, JOSSE J, LEMAIRE F, et al.
Gene screening of Wharton’s jelly derived stem cells.
Biomed Mater Eng. 2014;24(1 Suppl):53–61.

133. QUARTO R, MASTROGIACOMO M, CANCEDDA R, KUTEPOV SM, MUKHACHEV V, LAVROUKOV A, et al.
Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells.
N Engl J Med. 2001 Feb 1;344(5):385–6.

134. MESIMÄKI K, LINDROOS B, TÖRNWALL J, MAUNO J, LINDQVIST C, KONTIO R, et al.
Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells.
Int J Oral Maxillofac Surg. 2009 Mar;38(3):201–9.

135. WARNKE PH, SPRINGER ING, WILTFANG J, ACIL Y, EUFINGER H, WEHMÖLLER M, et al.
Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man.
Lancet Lond Engl. 2004 Sep 28;364(9436):766–70.

136. GIANNOUDIS PV, EINHORN TA, MARSH D.
Fracture healing: the diamond concept.
Injury. 2007 Sep;38 Suppl 4:S3–6.

137. ROSSET P, DESCHASEAUX F, LAYROLLE P.
Cell therapy for bone repair.
Orthop Traumatol Surg Res OTSR. 2014 Feb;100(1 Suppl):S107–12.

138. GÓMEZ-BARRENA E, ROSSET P, LOZANO D, STANOVICI J, ERMTHALLER C, GERBHARD F.
Bone fracture healing: cell therapy in delayed unions and nonunions.
Bone. 2015 Jan;70:93–101.
139. LIEBERGALL M, SCHROEDER J, MOSHEIFF R, GAZIT Z, YORAM Z, RASOOLY L, et al.
Stem cell-based therapy for prevention of delayed fracture union: a randomized and prospective preliminary study.
Mol Ther J Am Soc Gene Ther. 2013 Aug;21(8):1631–8.
140. MARCACCI M, KON E, MOUKHACHEV V, LAVROUKOV A, KUTEPOV S, QUARTO R, et al.
Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study.
Tissue Eng. 2007 May;13(5):947–55.
141. LOMBARDO E, VAN DER POLL T, DELAROSA O, DALEMANS W.
Mesenchymal stem cells as a therapeutic tool to treat sepsis.
World J Stem Cells. 2015 Mar 26;7(2):368–79.
142. KRASNODEMBSKAYA A, SONG Y, FANG X, GUPTA N, SERIKOV V, LEE J-W, et al.
Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37.
Stem Cells Dayt Ohio. 2010 Dec;28(12):2229–38.
143. NÉMETH K, LEELAHAVANICHKUL A, YUEN PST, MAYER B, PARMELEE A, DOI K, et al.
Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production.
Nat Med. 2009 Jan;15(1):42–9.
144. KRIEBEL K, BIEDERMANN A, KREIKEMEYER B, LANG H.
Anaerobic co-culture of mesenchymal stem cells and anaerobic pathogens - a new in vitro model system.
PloS ONE. 2013;8(11):e78226.
145. FIEDLER T, SALAMON A, ADAM S, HERZMANN N, TAUBENHEIM J, PETERS K.
Impact of bacteria and bacterial components on osteogenic and adipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells.
Exp Cell Res. 2013 Nov 1;319(18):2883–92.

146. GORBUNOV NV, MCDANIEL DP, ZHAI M, LIAO P-J, GARRISON BR, KIANG JG. Autophagy and mitochondrial remodelling in mouse mesenchymal stromal cells challenged with *Staphylococcus epidermidis*. *J Cell Mol Med*. 2015 May 1;19(5):1133–50.
147. PIETILÄ M, LÄHTEENMÄKI K, LEHTONEN S, LESKELÄ H-V, NÄRHI M, LÖNNROTH M, et al. Monitoring mitochondrial inner membrane potential for detecting early changes in viability of bacterium-infected human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2012;3(6):53.
148. RAHYUSSALIM NULL, ANDRIANSJAH NULL, KUSNADI Y, ISMAIL H, LUBIS A, KURNIAWATI T, et al. Effect of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* debris and supernatant on bone marrow stromal cells growth. *Acta Medica Indones*. 2012 Oct;44(4):304–9.
149. MAITI A, JIRANEK WA. Inhibition of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced cytokines mRNA production in human bone marrow derived mesenchymal stem cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *BMC Cell Biol*. 2014;15:11.
150. WARD CL, SANCHEZ CJ, POLLOT BE, ROMANO DR, HARDY SK, BECERRA SC, et al. Soluble factors from biofilms of wound pathogens modulate human bone marrow-derived stromal cell differentiation, migration, angiogenesis, and cytokine secretion. *BMC Microbiol*. 2015;15(1):75.
151. AGGARWAL S, PITTENGER MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1815–22.
152. REN G, ZHANG L, ZHAO X, XU G, ZHANG Y, ROBERTS AI, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*. 2008 Feb 7;2(2):141–50.
153. UCCELLI A, MORETTA L, PISTOIA V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2008 Sep;8(9):726–36.

154. DI NICOLA M, CARLO-STELLA C, MAGNI M, MILANESI M, LONGONI PD, MATTEUCCI P, et al.
Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli.
Blood. 2002 May 15;99(10):3838–43.
155. GHANNAM S, PÈNE J, MOQUET-TORCY G, TORCY-MOQUET G, JORGENSEN C, YSSEL H.
Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype.
J Immunol Baltim Md. 2010 Jul 1;185(1):302–12.
156. NAJAR M, RAICEVIC G, BOUFKER HI, FAYYAD-KAZAN H, DE BRUYN C, MEULEMAN N, et al.
Adipose-tissue-derived and Wharton’s jelly-derived mesenchymal stromal cells suppress lymphocyte responses by secreting leukemia inhibitory factor.
Tissue Eng Part A. 2010 Nov;16(11):3537–46.
157. ZHOU C, YANG B, TIAN Y, JIAO H, ZHENG W, WANG J, et al.
Immunomodulatory effect of human umbilical cord Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells on lymphocytes.
Cell Immunol. 2011;272(1):33–8.
158. ITALIANI P, BORASCHI D.
From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation.
Inflammation. 2014;5:514.
159. CHÁVEZ-GALÁN L, OLLEROS ML, VESIN D, GARCIA I.
Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169(+) and TCR(+) Macrophages.
Front Immunol. 2015;6:263.
160. CHEN L, TREDGET EE, WU PYG, WU Y.
Paracrine Factors of Mesenchymal Stem Cells Recruit Macrophages and Endothelial Lineage Cells and Enhance Wound Healing.
PLoS ONE. 2008 Apr 2;3(4).
161. FRANÇOIS M, ROMIEU-MOUREZ R, LI M, GALIPEAU J.
Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation.
Mol Ther J Am Soc Gene Ther. 2012 Jan;20(1):187–95.

162. MAGGINI J, MIRKIN G, BOGNANNI I, HOLMBERG J, PIAZZÓN IM, NEPOMNASCHY I, et al.
Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile.
PloS ONE. 2010;5(2):e9252.
163. CHOI H, LEE RH, BAZHANOV N, OH JY, PROCKOP DJ.
Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF- κ B signaling in resident macrophages.
Blood. 2011 Jul 14;118(2):330–8.
164. SEEBACH E, FREISCHMIDT H, HOLSCHBACH J, FELLEBERG J, RICHTER W.
Mesenchymal stroma cells trigger early attraction of M1 macrophages and endothelial cells into fibrin hydrogels, stimulating long bone healing without long-term engraftment.
Acta Biomater. 2014 Nov;10(11):4730–41.
165. BRANDAU S, JAKOB M, HEMEDA H, BRUDEREK K, JANESCHIK S, BOOTZ F, et al.
Tissue-resident mesenchymal stem cells attract peripheral blood neutrophils and enhance their inflammatory activity in response to microbial challenge.
J Leukoc Biol. 2010 Nov;88(5):1005–15.
166. RAFFAGHELLO L, BIANCHI G, BERTOLOTTO M, MONTECUCCO F, BUSCA A, DALLEGRI F, et al.
Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche.
Stem Cells Dayt Ohio. 2008 Jan;26(1):151–62.
167. BRANDAU S, JAKOB M, BRUDEREK K, BOOTZ F, GIEBEL B, RADTKE S, et al.
Mesenchymal stem cells augment the anti-bacterial activity of neutrophil granulocytes.
PloS ONE. 2014;9(9):e106903.
168. PRASANNA SJ, GOPALAKRISHNAN D, SHANKAR SR, VASANDAN AB.
Pro-inflammatory cytokines, IFN gamma and TNF alpha, influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially.
PloS ONE. 2010;5(2):e9016.
169. RAICEVIC G, NAJAR M, STAMATOPOULOS B, DE BRUYN C, MEULEMAN N, BRON D, et al.
The source of human mesenchymal stromal cells influences their TLR profile as well as their functional properties.
Cell Immunol. 2011;270(2):207–16.

170. ELMAN JS, LI M, WANG F, GIMBLE JM, PAREKKADAN B.
A comparison of adipose and bone marrow-derived mesenchymal stromal cell secreted factors in the treatment of systemic inflammation.
J Inflamm Lond Engl. 2014;11(1):1.
171. WATERMAN RS, TOMCHUCK SL, HENKLE SL, BETANCOURT AM.
A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype.
PloS ONE. 2010;5(4):e10088.
172. KIM H, DARWISH I, MONROY M-F, PROCKOP DJ, LILES WC, KAIN KC.
Mesenchymal stromal (stem) cells suppress pro-inflammatory cytokine production but fail to improve survival in experimental staphylococcal toxic shock syndrome.
BMC Immunol. 2014;15:1.
173. YUAN Y, LIN S, GUO N, ZHAO C, SHEN S, BU X, et al.
Marrow mesenchymal stromal cells reduce methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in rat models.
Cytotherapy. 2014 Jan;16(1):56–63.
174. SEEBACH E, HOLSCHBACH J, BUCHTA N, BITSCH RG, KLEINSCHMIDT K, RICHTER W.
Mesenchymal stromal cell implantation for stimulation of long bone healing aggravates *Staphylococcus aureus* induced osteomyelitis.
Acta Biomater. 2015 Jul;21:165–77.
175. KENNEDY AD, DELEO FR.
Neutrophil apoptosis and the resolution of infection.
Immunol Res. 2009;43(1-3):25–61.
176. KINTARAK S, WHAWELL SA, SPEIGHT PM, PACKER S, NAIR SP.
Internalization of *Staphylococcus aureus* by human keratinocytes.
Infect Immun. 2004 Oct;72(10):5668–75.
177. RASIGADE J-P, TROUILLET-ASSANT S, FERRY T, DIEP BA, SAPIN A, LHOSTE Y, et al.
PSMs of hypervirulent *Staphylococcus aureus* act as intracellular toxins that kill infected osteoblasts.
PloS ONE. 2013;8(5):e63176.
178. JARRY TM, MEMMI G, CHEUNG AL.
The expression of alpha-haemolysin is required for *Staphylococcus aureus* phagosomal escape after internalization in CFT-1 cells.
Cell Microbiol. 2008 Sep;10(9):1801–14.

179. OLIVIER AC, LEMAIRE S, VAN BAMBEKE F, TULKENS PM, OLDFIELD E.
Role of rsbU and staphyloxanthin in phagocytosis and intracellular growth of *Staphylococcus aureus* in human macrophages and endothelial cells.
J Infect Dis. 2009 Nov 1;200(9):1367–70.
180. THAY B, WAI SN, OSCARSSON J.
Staphylococcus aureus α -Toxin-Dependent Induction of Host Cell Death by Membrane-Derived Vesicles.
PLoS ONE. 2013 Jan 31;8(1):e54661.
181. TUCKER KA, REILLY SS, LESLIE CS, HUDSON MC.
Intracellular *Staphylococcus aureus* induces apoptosis in mouse osteoblasts.
FEMS Microbiol Lett. 2000 May 15;186(2):151–6.
182. GOLDMANN O, TUCHSCHERR L, ROHDE M, MEDINA E.
 α -hemolysin enhances *Staphylococcus aureus* internalization and survival within mast cells by modulating the expression of β 1 integrin.
Cell Microbiol. 2015 Nov 23;
183. YAO L, BENGUALID V, LOWY FD, GIBBONS JJ, HATCHER VB, BERMAN JW.
Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces cytokine gene expression.
Infect Immun. 1995 May;63(5):1835–9.
184. AL ALAM D, DESLEE G, TOURNOIS C, LAMKHIOUED B, LEBARGY F, MERTEN M, et al.
Impaired interleukin-8 chemokine secretion by staphylococcus aureus-activated epithelium and T-cell chemotaxis in cystic fibrosis.
Am J Respir Cell Mol Biol. 2010 Jun;42(6):644–50.
185. ESCOTTE S, AL ALAM D, LE NAOUR R, PUCHELLE E, GUENOUNOU M, GANGLOFF SC.
T cell chemotaxis and chemokine release after *Staphylococcus aureus* interaction with polarized airway epithelium.
Am J Respir Cell Mol Biol. 2006 Mar;34(3):348–54.
186. SEIDL K, SOLIS NV, BAYER AS, HADY WA, ELLISON S, KLASHMAN MC, et al.
Divergent responses of different endothelial cell types to infection with *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*.
PloS ONE. 2012;7(6):e39633.
187. REFFUVEILLE F, DE LA FUENTE-NUÑEZ C, MANSOUR S, HANCOCK REW.
A broad-spectrum antibiofilm peptide enhances antibiotic action against bacterial biofilms.
Antimicrob Agents Chemother. 2014 Sep;58(9):5363–71.

188. BRUN V, GUILLAUME C, MECHICHE ALAMI S, JOSSE J, JING J, DRAUX F, et al. Chitosan/hydroxyapatite hybrid scaffold for bone tissue engineering. *Biomed Mater Eng.* 2014;24(1 Suppl):63–73.

BIBLIOGRAPHIE PERSONNELLE

ARTICLES SCIENTIFIQUES

Gossan DP, Magid AA, Yao-Kouassi PA, **Josse J**, Gangloff SC, Morjani H, Voutquenne-Nazabadioko L. Antibacterial and cytotoxic triterpenoids from the roots of *Combretum racemosum*. *Fitoterapia* (accepté le 1er mars 2016)

Josse J, Velard F, Gangloff SC. *Staphylococcus aureus* vs. Osteoblast: Relationship and Consequences in Osteomyelitis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015;5:85.

Josse J, Velard F, Mechiche Alami S, Brun V, Guillaume C, Kerdjoudj H, Lamkhioued B and Gangloff SC. Increased Internalization of *Staphylococcus Aureus* and Cytokine Expression in Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 2014;24(0):27-35. **Prix de Recherche Pharmaceutique de l'URCA 2014**

Brun V, Guillaume C, Mechiche Alami S, **Josse J**, Jing J, Draux F, Bouthors S, Laurent-Maquin D, Gangloff SC, Kerdjoudj H, Velard F. Chitosan/hydroxyapatite Hybrid Scaffold for Bone Tissue Engineering. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 2014;24(0):63-73.

Mechiche Alami, S, Velard F, Draux F, Siu Paredes F, **Josse J**, Lemaire F, Gangloff SC, Graesslin O, Laurent-Maquin D et Kerdjoudj H. Gene Screening of Wharton's Jelly Derived Stem Cells. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 2014;24(0):53-61.

PUBLICATIONS D'ACTES DE CONGRÈS

Mechiche Alami S, Boulmedais F, Velard F, **Josse J**, Schaaf P, Voegel JC, Hemmerlé J, Gangloff SC, Laurent-Maquin D, Kerdjoudj H. Sprayed calcium phosphate materials for bone tissue regeneration. *Wound Repair Regen.* 2013;21(6):A76

Josse J, Velard F, Mechiche Alami S, Guillaume C, Bouthors S, Draux F, Lamkhioued B, Gangloff SC. Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells could play a role in the control of bacterial colonization on bone scaffolds. *Wound Repair Regen.* 2013;21(6):A69

COMMUNICATIONS ORALES

Josse J, Velard F, Mechiche Alami S, Brun V, Guillaume C, Kerdjoudj H, Lamkhioued B, Gangloff SC. Internalisation de *Staphylococcus aureus* par les cellules souches mésenchymateuses: impact potentiel sur la régénération osseuse, *Journée des Jeunes Chercheurs, SFR-CAPSANTE, UPJV, Amiens, 2014*

Jing J, **Josse J**, Mongaret C, Mechiche Alami S, Reynaud R, Laurent-Maquin D, Gangloff SC, Velard F, Kerdjoudj H. Chitosan Hyaluronic based scaffolds for bone regeneration. *26th European Conference on Biomaterials, Liverpool, 2014*

Mechiche Alami S, Hemmerlé J, Boulmedais F, **Josse J**, Schaaf P, Gangloff SC, Velard F, Laurent-Maquin D, Kerdjoudj H. Biomaterial induced bone nodules without medium supplements. *26th European Conference on Biomaterials Conference, Liverpool, 2014*

Jing J, **Josse J**, Mechiche-Alami S, Pauthe E, Velard F, Gangloff SC, Kerdjoudj H. Fabrication and characterization of chitosan/hyaluronic acid porous scaffold with cell colonization. *International symposium on biomaterial and smart system, Cergy-Pontoise, 2014*

Mechiche-Alami S, Hemmerle J, Boulmedais F, Velard F, **Josse J**, Gangloff SC, Schaaf P, Laurent-Maquin D, Kerdjoudj H. Différenciation de Cellules Souches du Cordon Ombilical au Contact d'un Biomatérial. *14èmes Journées du CNESBO Reims, 2014*

Josse J, Velard F, Mechiche Alami S, Guillaume C, Bouthors S, Draux F, Lamkhioued B, Gangloff SC. Wharton jelly derived mesenchymal stem cells could play a role in the control of bacterial colonization on bone scaffolds. *23rd European Tissue Repair Society Meeting, Reims, 2013*

COMMUNICATIONS PAR AFFICHE

Rouabhia M, **Josse J**, Semlali A, Chmielewski W. Design of fluoride-rich restorative dental materials to prevent human oral infections. *10th World Biomaterials Congress, Montréal, Canada; 2016 (Abstract accepté)*

Abedini A, Nguyen PD, **Josse J**, Grimplet C, Madoux J, Gangloff SC, Lavaud C. Etude phytochimique et évaluation microbiologique des substances naturelles de *Dolichandrone spathcea* et *Paypayrola guianensis*. *Journée Jeunes Chercheurs SFR CAP-SANTE, Reims, 2015*

Jing J, **Josse J**, Velard F, Rahouadj R, Schmitt J, Pauthe E, Siad L, Gangloff SC and Kerdjoudj H. Fabrication and characterization of chitosan / hyaluronic acid porous scaffold with cell colonization. *17^{èmes} Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés, Clermont-Ferrand, 2015*

Josse J, Velard F, Guillaume C, Gangloff SC. Conséquences de l'état de différenciation ostéoblastique sur l'infection à *Staphylococcus aureus*. *14^{èmes} Journées du Collège National des Enseignants en Sciences Biologiques Odontologiques, Reims, 2014*

Josse J, Velard F, Guillaume C, Bouthors S, Mechiche Alami S, Kerdjoudj H, Lamkhioued B, Gangloff SC. Influence de l'état de différenciation sur la réponse de cellules ostéogènes au cours d'une infection à *Staphylococcus aureus*. *16^{èmes} Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés, Limoges, 2014*

Mechiche Alami S, Boulmedais F, Velard F, **Josse J**, Schaaf P, Hemmerlé J, Gangloff S, Laurent-Maquin D, Kerdjoudj H. Sprayed Calcium Phosphate Materials for Bone Tissue Regeneration. *16^{ème} Journée de la Société Française de Biologie des Tissus Minéralisés. Limoges, 2014*

Mechiche Alami S, Boulmedais F, Velard F, Mongaret C, **Josse J**, Schaaf P, Hemmerlé J, Gangloff SC, Laurent-Maquin D, Kerdjoudj H. Effet ostéoinducteur d'un revêtement phosphocalcique. *Biomat, « Assises Nationales de la Recherche en Biomatériaux » Autrans, 2014*

Mechiche Alami S, Boulmedais F, Velard F, **Josse J**, Schaff P, Hemmerlé J, Gangloff SC, Laurent-Maquin D, Kerdjoudj H. Biomatériau phosphocalcique ostéoinducteur. *Journées Jeunes Chercheurs, SFR CAP-Santé, Reims, 2014*

Josse J, Velard F, Guillaume C, Bouthors S, Draux F, Lamkhioued B, Gangloff SC. Conséquences de l'état de différenciation ostéoblastique sur l'infection à *Staphylococcus aureus*, *Journée Jeunes Chercheurs SFR CAP-SANTE, 2013. 1^{er} prix recherche du CHU d'Amiens.*

Josse J, Velard F, Mechiche Alami S, Guillaume C, Kerdjoudj H, Lamkhioued B, Gangloff SC. Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells' role in bacteria related-inflammation during bone regeneration *8th Scientific Meeting of the Lorraine Centre of Cartilage Engineering. Nancy, 2013. 1er Prix Poster Extérieur.*

Mechiche Alami S, Boulmedais F, Velard F, **Josse J**, Schaaf P, Voegel JC, Hemmerlé J, Gangloff SC, Laurent-Maquin D, Kerdjoudj H. Calcium phosphate hybrids for bone tissue regeneration. *8th Scientific Meeting of the Lorraine Centre of Cartilage Engineering. Nancy, 2013*

Mechiche Alami S, Boulmedais F, Velard F, **Josse J**, Schaaf P, Voegel JC, Hemmerlé J, Gangloff SC, Laurent-Maquin D, Kerdjoudj H. Sprayed calcium phosphate materials for bone tissue regeneration. *23rd European Tissue Repair Society Meeting, Reims, 2013*

IMPACT DE L'INFECTION A STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUR LE MICROENVIRONNEMENT OSSEUX

Les infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus aureus* sont des pathologies fréquentes dont les conséquences peuvent aller de la simple altération cellulaire à un retard de la réparation osseuse ou une réponse inflammatoire excessive. Afin d'étudier ce phénomène, nous avons, dans un premier temps, développé deux modèles d'infections in vitro faisant interagir *Staphylococcus aureus* et des cellules osseuses primaires issues d'explants chirurgicaux humains. Ces cellules ont été préalablement cultivées dans un milieu standard ou un milieu ostéogénique afin d'obtenir 2 populations à des stades de maturation différents. L'étude de l'internalisation de *Staphylococcus aureus*, de la mortalité cellulaire et de la production de médiateurs inflammatoires pour ces 2 populations a permis d'établir si l'impact de *Staphylococcus aureus* variait en fonction de la maturation cellulaire. Dans un second temps, nous avons étudié l'impact de *Staphylococcus aureus* sur des cellules souches mésenchymateuses dérivées du cordon ombilical. En effet, dans le cadre d'une régénération osseuse en site infecté, les cellules souches mésenchymateuses pourraient être amenées à interagir avec *Staphylococcus aureus*. Nous avons donc caractérisé la capacité de ces cellules à internaliser *Staphylococcus aureus*, à survivre face à l'infection et à produire des médiateurs inflammatoires dans notre modèle in vitro d'infection aiguë. Ce projet nous a permis de valider nos modèles d'infection in vitro et de caractériser l'impact de *Staphylococcus aureus* sur différentes cellules du microenvironnement osseux, donnant ainsi de nouvelles pistes pour le développement de stratégies pour la lutte antibactérienne et l'ingénierie tissulaire osseuse.

Staphylococcus aureus ; ostéoblaste ; cellule souche mésenchymateuse ; infection ; inflammation ; ingénierie tissulaire osseuse.

IMPACT OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS INFECTION ON THE BONE MICROENVIRONMENT

Staphylococcus aureus-related bone and joint infections are common diseases whose consequences can range from simple cell damage to delayed bone repair or excessive inflammatory response. To study this phenomenon, we have developed two models of in vitro infection with *Staphylococcus aureus* and primary bone-forming cells derived from human surgical explants. These cells have been previously cultured in a standard medium or osteogenic medium to obtain two populations at different stages of maturation. The study of *Staphylococcus aureus* internalization, cell death and production of inflammatory mediators in these 2 populations allowed us to establish whether the impact of *Staphylococcus aureus* varied depending on cell maturation. We also studied the impact of *Staphylococcus aureus* on mesenchymal stem cells derived from umbilical cord. In case of bone regeneration in infected site, mesenchymal stem cells may have to interact with *Staphylococcus aureus*. Therefore, we characterized the ability of these cells to internalize *Staphylococcus aureus*, to survive against the infection and to produce inflammatory mediators in our in vitro model of acute infection. This project allowed us to validate our in vitro infection models and to characterize the impact of *Staphylococcus aureus* on different cells in the bone microenvironment, providing new approaches for the development of antibacterial strategies and bone tissue engineering.

Staphylococcus aureus ; osteoblast ; mesenchymal stem cell ; infection ; inflammation ; bone tissue engineering.

Discipline : PHARMACIE

Spécialité : Microbiologie

