



HAL
open science

Les facteurs de virulence staphylococciques : interaction avec les mastocytes humains et modulation de leur expression par les antibiotiques

Elisabeth Hodille

► To cite this version:

Elisabeth Hodille. Les facteurs de virulence staphylococciques : interaction avec les mastocytes humains et modulation de leur expression par les antibiotiques. Bactériologie. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1109 . tel-01896321

HAL Id: tel-01896321

<https://theses.hal.science/tel-01896321>

Submitted on 16 Oct 2018

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.



N° d'ordre NNT : 2018LYSE1109

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 341
Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation

Spécialité de doctorat : Micro-organismes, interactions, infections

Soutenue publiquement le 05/07/2018, par :
Elisabeth HODILLE

**Les facteurs de virulence staphylococciques :
interaction avec les mastocytes humains et
modulation de leur expression par les antibiotiques**

Devant le jury composé de :

DUMITRESCU, Oana
MCU-PH, Université de Lyon 1
FRANÇOIS, Patrice
MCU-PH, Université de Genève
HERY-ARNAUD, Geneviève
PU-PH, Université de Brest
LINA, Gérard
PU-PH, Université de Lyon 1
PLOY, Marie-Cécile
PU-PH, Université de Limoges
VOCANSON, Marc
CR Inserm, CIRI, Lyon

Co-directrice de thèse

Rapporteur

Rapporteur

Directeur de thèse

Examinatrice

Examineur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. le Professeur Frédéric FLEURY

Président du Conseil Académique

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Didier REVEL

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

Vice-président de la Commission Recherche

M. Fabrice VALLÉE

Directrice Générale des Services

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. X. PERROT

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme C. FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

Résumé

S. aureus est un pathogène majeur de l'Homme capable de produire une grande variété de facteurs de virulence tels que les phénol-solubles modulines alpha (PSM α) et l'hémolysine delta (Hld). La transmission de *S. aureus* est essentiellement manu-portée mais les éléments favorisant sa dissémination dans la population restent inconnus. Les mastocytes étant connus pour libérer des médiateurs pruritogènes, nous avons suspecté leur implication dans la physiopathologie et la transmission des infections cutanées staphylococciques. Sur une lignée de mastocytes humains, l'Hld et les PSM α 1, montrés pour être produits *in vivo*, déclenchaient la libération de tels médiateurs. Chez *S. aureus*, la production des toxines est sous la dépendance du système de régulation globale Agr. Les souches de *S. aureus* appartenant au type Agr1, produisant significativement plus d'Hld et de PSM α que les autres souches, ont été les plus fréquemment retrouvées au cours de l'année 2017 dans les infections cutanées staphylococciques. Ceci corrobore l'hypothèse selon laquelle une souche de *S. aureus* produisant des toxines capables d'interagir avec les mastocytes et induisant un prurit, diffuse plus facilement dans la population. Nous avons ensuite étudié la modulation de l'expression des PSM α et d'Hld par des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques. L'oxacilline induisait une inhibition de l'expression des PSM α et d'Hld alors que la clindamycine entraînait plus fréquemment une induction de leur expression. Ces observations nous ont interrogé sur l'utilisation de la clindamycine considérée habituellement comme anti-toxinique et sur l'effet bénéfique ou délétère de l'effet inhibiteur de l'oxacilline.

Mots clés : *Staphylococcus aureus*, facteurs de virulence, Phénol-solubles modulines (PSM), hémolysine delta (Hld), leucocidines de Panton-Valentine (PVL), hémolysine alpha (Hla), mastocytes, transmission, concentration sub-inhibitrice, antibiotique, oxacilline, clindamycine, linézolide, tigécycline

Laboratoire de rattachement : Unité Inserm 1111, Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), équipe « Pathogénie des Staphylocoques », Hôpital de la Croix Rousse, Institut des Agents Infectieux, 103 Grande rue de la croix Rousse, 69004 LYON, France.

Staphylococcal virulence factors: interaction with human mast cells and modulation of their expression by antibiotics

Abstract

S. aureus is a major human pathogen able to produce several virulence factors such as phenol-soluble modulins alpha (PSM α) and delta hemolysin (Hld). *S. aureus* is essentially spread through hand but the elements promoting its spreading stay unsolved. Mast cells release several soluble mediators triggering itching behavior. We suspect the mast cell involvement in spreading of *S. aureus* strains and in physiopathology of staphylococcal skin infections. Upon human mast cell line, we showed that PSM α 1 and Hld induced the release of mediators triggering itching behavior. Moreover, these toxins were produced *in vivo* during staphylococcal skin infections. Expression of staphylococcal virulence factors is regulated by global regulatory system Agr. Interestingly, we observed that *S. aureus* strains belonging in Agr1 produced higher quantity of PSM α and Hld than those belonging to Agr2 and Agr3, and were more frequently responsible to skin infections during the last year. This observation supports our hypothesis whereby a strain producing toxins able to trigger mast cell mediator inducing scratching behavior, spreads electively in the community. Thereafter, we studied modulation of PSM α and Hld expression by sub-inhibitory concentration of antibiotics. We reported that oxacillin induced an inhibitory effect on PSM α and Hld expression, while clindamycin resulted in more frequently an inducer effect. These results are discordant with these observed with Panton-Valentine leucocidin and alpha hemolysin and interrogate on clindamycin use for its anti-toxin activity and on benefic or deleterious effect of oxacillin inhibitory effect.

Key words: *Staphylococcus aureus*, virulence factors, Phenol-soluble modulins (PSM), delta hemolysin (Hld), Panton-Valentine leucocidines (PVL), alpha hemolysin (Hla), mast cells, transmission, sub-inhibitory concentration, antibiotic, oxacillin, clindamycin, linezolid, tigecyclin.

Remerciements

Tout d'abord, je tiens sincèrement à remercier **Professeur Geneviève Héry-Arnaud** et **Docteur Patrice François** d'avoir accepté de lire et juger ce travail et du temps ainsi accordé en tant que rapporteurs. Mes remerciements vont également au **Professeur Marie-Cécile Ploy** et **Docteur Marc Vocanson** pour la participation à ce jury de thèse.

Un grand merci à mon directeur de thèse, **Professeur Gérard Lina**, pour sa confiance et son aide tout au long de la thèse ainsi que dans le développement de mon parcours professionnel.

A ma co-directrice de thèse, **Docteur Oana Dumitrescu**, j'exprime mes profonds remerciements pour sa confiance, son aide, sa disponibilité tout au long de cette thèse ainsi que pour le travail d'équipe au quotidien, c'est particulièrement agréable de travailler avec une personne à l'écoute qui nous pousse à donner le meilleur de nous-même.

Je remercie également **Professeur Sophie Jarraud**, **Docteur Sandrine Boisset** et **Docteur Thomas Henry** d'avoir suivi au cours des années, l'évolution de ce travail au sein du mon comité de pilotage.

Ensuite, j'aimerais vivement remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail et qui m'ont permis de le mener à terme : **Docteur Françoise Bienvenu** pour les dosages de tryptase, **Docteur Charlotte Cuerq** et **Docteur Régine Cartier** pour les dosages de LDH, **Docteur Anne Tristan** et **Docteur Michèle Bes** ainsi que toutes les techniciennes du Centre National de Référence des Staphylocoques pour toutes les données fournies sur les souches de *S. aureus*, **Docteur Jean-Paul Steghens** pour la mise au point de la technique de dosage des PSM par HPLC-MS, **Docteur Emilie Blond** pour la mise à disposition de la machine HPLC-MS jusqu'à sa fin, **Docteur Adriana Plesa** pour son expertise dans le domaine de l'immuno-phénotypage et la cytométrie en flux, votre aide a été précieuse pour la recherche du CD88, **Monsieur Cédric Badiou** pour son accueil, sa patience et son aide à la réalisation des expériences, **Docteur Laetitia Beraud**, **Madame Séverine Périan** et **Madame Valentine Berti** pour leur participation à la réalisation des expériences.

Je remercie également tous mes collègues bactériologistes que ce soit du temps de Lyon Sud : **Docteur Michèle Pérouse de Montclos** dont j'espère la retraite heureuse et belle, **Docteur Isabelle Fredenucci**, **Docteur Jean-Philippe Rasigade**, **Docteur Oana Dumitrescu** et **Professeur Gérard Lina** ; ou depuis la création de l'IAI, **Docteur Christine Furhmann**, **Docteur Wael Salka**, **Docteur Céline Dupieux**, **Docteur Anne-Gaëlle Ranc**, **Docteur Anne Doléans**, **Docteur Olivier Dauwalder**, **Professeur Jérôme Etienne**, **Professeur François Vandenesch**, **Docteur Laetitia Béraud**, **Docteur Chantal Sobas**, **Docteur Pascale Girardo**, **Docteur Tiphaine Gaillard**, **Docteur Cristina Revil**,

Docteur Hélène Salord, Docteur Coralie Bouchiat, Docteur Ghislaine Descours, Docteur Anne Tristan, Docteur Michèle Bes, Docteur Claude-Alexandre Gustave, Professeur Frédéric Laurent et Professeur Sophie Jarraud. Je remercie également **Professeur Florence Ader**, collègue infectiologue, auprès de qui j'apprends tellement de chose, merci de favoriser une telle cohésion entre bactériologistes et infectiologues.

De plus, j'adresse mes sincères remerciements à **tous les techniciens et toutes les techniciennes de bactériologie** ex-Lyon Sud qui m'ont formé alors que je n'étais qu'une petite interne, ex-Lyon Est et ex-Lyon Nord, maintenant toutes et tous IAI !! Une pensée toute particulière pour les Békassines : **Laura H** (alias Ketchup), **Laura M** (alias Mayo), **Zahia** (alias Zahiou), **Pascaline** (alias Pascaloche), **Fanny** (alias Fannoche), **Claire** (alias Clairette) et les nouvelles venues **Marina** (alias Marinouche), **Tiphaine** et **Roxane**. Et bien sûr un grand merci à **Charlotte** (nom de famille « des BK »). C'est un très grand plaisir de travailler avec vous au quotidien. Malgré les difficultés rencontrées, l'ambiance de travail est super et vous ne rechignez jamais, même s'il s'agit de faire de la « Qualité ».

Merci à tous les membres de l'équipe de recherche Inserm 1111 « Pathogénie des Staphylocoques » et en particulier à **Cédric, Karen, Florence, Jess' et Sabine** pour leur accueil lors de mon stage dans l'unité.

Merci à toutes les personnes qui m'ont soutenu, me soutienne et me supporte ! tous les jours et qui font qu'« elle est pas belle la vie ! » : des collègues ou ex-collègues de travail qui sont devenus plus que ça : **Anne, Camille L et Mohammed, Camille B et Charlotte, Yohann et Marion**, c'est toujours un immense plaisir de se retrouver pour un petit resto, **Laeti et Cyril** pour les dégustations de vin (qu'est-ce qu'on s'est déjà bu comme bonnes bouteilles !), **Anne-Ga et Stéphane** (vive les ramoneurs de Menhirs !), **Caro, Loulou et Céd**, malgré le temps révolu du groupe des Croix-Roussiens et la distance qui nous sépare actuellement, vous serez toujours les bienvenus pour un barbecue dans le jardin (attention aux pantalons !!), **Anne-So, Christelle et Christelle**, le groupe des assistantes de Lyon Sud. Un merci tout particulier à **Soso**, mon amie de toujours, pour tout ce qu'on a vécu ensemble... à **Bitus** son compagnon et leurs petits bouts **Anaëlle et Antonin**.

Un grand merci à ma famille, ma maman **Colette**, mon papa **Joseph**, mes frères **François et Etienne**, mes sœurs **Pauline et Mathilde** ainsi qu'à ma belle-sœur **Marie**, mon beau-frère **Stéphane** et à tous mes adorables neveux et nièces **Constantin, Auguste, Adèle et Antonine**.

Et enfin un énorme merci à l'Amour de ma vie, **Michel**.

Table des matières

RESUME.....	5
ABSTRACT	6
REMERCIEMENTS.....	7
TABLE DES MATIERES	9
LISTE DES ABREVIATIONS.....	11
INDEX DES FIGURES.....	14
INDEX DES TABLEAUX	15
INTRODUCTION.....	16
SECTION 1 : IDENTIFICATION DES FACTEURS DE VIRULENCE	
STAPHYLOCOCCIQUES CAPABLES D'INTERAGIR AVEC LES MASTOCYTES	
HUMAINS.....	17
PARTIE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	17
<i>Chapitre 1 : Les toxines formant des pores de Staphylococcus aureus et la régulation de leur expression</i>	17
I. La leucocidine de Panton-Valentine (PVL)	17
i. Structure et mécanisme d'action	17
ii. Implication en clinique	19
iii. Epidémiologie et distribution des souches de <i>S. aureus</i> productrices de PVL.....	22
II. Les phénol-solubles modulines (PSM) et hémolysine delta (Hld)	24
i. Structure et mécanisme d'action	24
ii. Implication en clinique	26
iii. Epidémiologie des souches productrices de PSM.....	28
III. L'hémolysine alpha (Hla)	30
i. Structure et mécanisme d'action	30
ii. Implication en clinique	31
iii. Epidémiologie des souches productrices d'Hla	31
IV. Régulation de l'expression des toxines chez <i>S. aureus</i>	32
i. Système de « quorum sensing » Agr.....	32
ii. Autres mécanismes de régulation	36
<i>Chapitre 2 : Les mastocytes humains</i>	37
I. Généralités	37
i. Description morphologique	37
ii. Localisation, origine et classification des mastocytes	38
II. Fonction immunitaire physiologique des mastocytes dans l'organisme.....	40
i. Les récepteurs	40
ii. Les médiateurs	42
iii. Fonctions physiologiques lors du processus infectieux	42
Rôle de sentinelle.....	42
Fonction antimicrobienne directe.....	43
Rôle dans la communication avec les cellules environnantes non immunitaires.....	44
Rôle dans l'immunité adaptative.....	44
Rôle inhibiteur pour un retour à l'homéostasie	45

Effet délétère d'une réponse excessive des mastocytes au cours des infections.....	45
III. <i>Staphylococcus aureus</i> et mastocytes dans la littérature	47
i. Les moyens d'étudier les mastocytes.....	47
ii. Reconnaissance et effet des éléments de la paroi : peptidoglycane et acide lipotéichoïque.....	48
iii. Reconnaissance et effet des toxines et autres facteurs solubles	50
iv. Modèle d'infection expérimentale <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> avec la bactérie entière.....	51
PARTIE 2 : TRAVAIL PERSONNEL.....	53
I. Problématique	53
II. Mise en évidence de l'action des PSM α et de l'Hld sur les mastocytes humains et implication dans les infections cutanées aiguës staphylococciques.....	54
SECTION 2 : MODULATION DE L'EXPRESSION DES FACTEURS DE VIRULENCE	
STAPHYLOCOCCIQUES PAR LES ANTIBIOTIQUES.....	67
PROBLEMATIQUE.....	67
PARTIE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	68
PARTIE 2 : TRAVAIL PERSONNEL.....	101
I. Conservation de l'effet anti-toxinique de la clindamycine sur des souches de <i>S. aureus</i> présentant un phénotype de résistance MLS _B inducible	101
II. Mise en évidence de l'effet inhibiteur de l'oxacilline sur l'expression des PSM α et de l'Hld.....	115
DISCUSSION.....	143
Mise en évidence de l'implication de l'interaction entre mastocytes et Hld/PSM α 1 dans la physiopathologie et la transmission des infections cutanées à <i>S. aureus</i>	143
Modulation de l'expression des toxines staphylococciques formant des pores par des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques	146
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	151
ANNEXES.....	153
Annexe 1 : Liste des principaux médiateurs libérés par les mastocytes, leurs fonctions biologiques ainsi que les stimuli permettant leur libération/excrétion par les mastocytes.	153
Annexe 2 : Données supplémentaires de la publication n°1.....	159
Annexe 3 : Données supplémentaires de la publication n°2.....	164
Annexe 4 : Données supplémentaires de la publication n°4.....	202
BIBLIOGRAPHIE	210

Liste des abréviations

ABC (transporteur)	ATP binding cassette
ADAM10	A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ag	Antigène
Agr	Accessory gene regulator
AIP	Auto-inducible peptide
AP-1	Activator protein 1
ARN	Acide ribonucléique
BMMC	Bone-marrow derived mast cell
C5aR	Récepteur pour la fraction C5a du complément
CBMC	Cord-blood derived mast cell
CC	Complexe clonal
CCL terminale	Chimiokines possédant un motif Cystéine-Cystéine dans leur partie N-terminale
CCR	Récepteur aux chimiokines de type CC
CCY	Casamino acid citric acid Yeast
c-kit	Récepteur au SCF
CLP	Cecal ligation and puncture
CLRs	C-type lectins receptors
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CPA	Cellule présentatrice de l'antigène
CXCL terminale	Chimiokines de motif Cystéine-amino-acide-Cystéine dans leur partie N-terminale
CXCR	Récepteur aux chimiokines de type CXC
Cys-LT	Cysteinyl leukotriene
DAMPs	Danger-associated molecular patterns
DARC	Duffy antigen receptor for chemokines
DL ₅₀	Dose létale 50
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
<i>erm</i>	erythromycin ribosome méthylase
FcεRI	Récepteur de type I pour le fragment Fc des immunoglobulines E
FcγR	Récepteur pour le fragment Fc des immunoglobulines G
FGF	Fibroblast growth factor
FnbA	Fibronectin binding protein A
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HDL	High density lipoprotein
HIF-1α	Hypoxia-inducible factor 1α
Hla	Hémolysine alpha
Hld	Hémolysine delta
Hly	Hémolysine gamma
HMC-1	Human mast cell 1 (lignée mastocytes humains)
HNP	Human neutrophil peptide
HPLC-MS	High-performance liquid chromatography-mass spectrometry

IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IgE	Immunoglobuline de type E
IgG	Immunoglobuline de type G
IL	Interleukines
IRF-5	Interferon regulatory factor 5
JNK	Jun N-terminal kinase
LDH	Lactate déshydrogénase
LDL	Low density lipoprotein
LTA	Lipoteichoic acid (acide lipotéichoïque)
LT	Leucotriène
LTB4	Leucotriène B4
LTreg	Lymphocyte T régulateur
LPS	Lipo-polysaccharide
μM	micro-molaire
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MC	Mastocyte
MCETs	Mast cell extracellular traps
MC _T	Mastocyte de type T pour tryptase
MC _{TC}	Mastocyte de type TC pour tryptase, chymase
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MDA-5	Melanoma differentiation-associated protein 5
MLS _B	Macrolides, lincosamides, streptogramines B
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
NETs	Neutrophil extracellular traps
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NGF	Nerve growth factor
NK	Natural killer
NLRP3	NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
NLRs	NOD-like receptors
nM	nano-molaire
NOD	Nucleotide oligomerization domain
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Tampon phosphate salin
PCMC	Peritoneal-cell mast cell
PDGF	Platelet-derived growth factor
PGD	Prostaglandine
PGN	Peptidoglycane
Pmt	Phenol-soluble modulins transporter
PLP	Protéines liant les pénicillines
PNEo	Polynucléaire éosinophile
PNN	Polynucléaire neutrophile
PSM	Phenol-soluble modulin ou Phénol-soluble moduline
PRRs	Pattern recognition receptors
PVL	Leucocidine de Panton-Valentine
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene-I
RLRs	RIG-I-like receptors
Rot	Repressor of toxins

RT-qPCR	Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
Sar	Staphylococcal accessory regulator
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
SARM-C	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline communautaire
SARM-H	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline hospitalier
SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible à la méticilline
SCF	Stem cell factor
SEA	Staphylococcal enterotoxin A
SEB	Staphylococcal enterotoxin B
ST	Sequence type
TGF- β	Transforming growth factor de type β
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
UVB	Ultra-violet B
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VLDL	Very low density lipoprotein
WT	Wild-type = sauvage

Index des figures

Figure 1 : Mécanisme d'action des leucocidines synergo-hyménotropes de <i>S. aureus</i>	19
Figure 2 : Mécanisme physiopathologique de la PVL dans la pneumonie nécrosante	21
Figure 3 : Distribution mondiale initiale des principaux clones de SARM-C et leurs mouvements de propagation.....	23
Figure 4 : Structure en l'hélice α de PSM α 4	24
Figure 5 : Vue d'ensemble des fonctions biologiques des PSM	26
Figure 6 : Modèle expérimental murin étudiant l'implication de l'Hld dans la dermatite atopique	28
Figure 7 : Niveau d'expression de PSM α 1, PSM α 2, PSM α 3, PSM α 4, PSM β 1, PSM β 2 et Hld de différentes souches de <i>S. aureus</i>	29
Figure 8 : Mécanisme d'action de l'Hla.	30
Figure 9 : Fonction biologique de L'Hla.	31
Figure 10 : différentes phases de croissance d'une culture de <i>S. aureus</i> , associées à l'expression des facteurs de virulence	32
Figure 11 : Système de régulation à deux composants Agr chez <i>S. aureus</i>	33
Figure 12 : Structure bidimensionnelle de l'ARNIII.....	35
Figure 13 : Mastocyte isolé à partir de tissu cutané	38
Figure 14 : Classification des différentes populations de mastocytes présents chez l'Homme	39
Figure 15 : Hétérogénéité des mastocytes selon les organes.....	39
Figure 16 : différents médiateurs libérés par les mastocytes en fonction du temps	42
Figure 17 : Place centrale du mastocyte dans la communication cellulaire lors de la réaction immunitaire contre un pathogène	46
Figure 18 : Effet du LTA du microbiote cutané sur la maturation des mastocytes cutanés	49

Index des tableaux

Tableau 1 : Composition des différentes leucocidines synergo-hyménotropes chez <i>S. aureus</i> , leurs récepteurs et cellules cibles	18
Tableau 2 : Liste des PRRs de surface et PRRs intracellulaires présents chez les mastocytes et leurs principaux ligands.....	41

Introduction

Staphylococcus aureus est un pathogène majeur de l'Homme, responsable d'infections bénignes comme sévères mettant en jeu le pronostic vital du patient. Il s'agit d'une bactérie pouvant également coloniser, sans être pathogène, un tiers de la population générale, notamment au niveau de la muqueuse nasale. Les infections à *S. aureus* peuvent toucher un grand nombre de tissus et d'organes, mais majoritairement, cette bactérie est à l'origine d'infections cutanées (Lowy 1998). La transmission de *S. aureus* au sein d'une population est essentiellement manu-portée. *S. aureus* est un germe à la fois pyogène, c'est-à-dire qu'il provoque la formation de pus en détruisant les tissus de l'hôte et toxigène. En effet, il a la capacité de produire des toxines capables d'induire des maladies spécifiques. Ainsi, les superantigènes, comprenant les entérotoxines et la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1) induisent respectivement des toxi-infections alimentaires et le choc toxique staphylococcique, et les exfoliatines, appelées également épidermolysines, provoquent des syndromes d'exfoliation staphylococciques pouvant être localisés ou généralisés. Certaines toxines, notamment les toxines formant des pores, participent et renforcent l'effet pyogène de la bactérie en détruisant soit les cellules de l'immunité pour la leucocidine de Pantou-Valentine (PVL) ou les phénol-solubles modulines (PSM), soit les globules rouges ou encore les cellules épithéliales pour l'hémolysine alpha (Hla). Dans le cadre des infections cutanées, la production des toxines formant des pores par la souche de *S. aureus* peut moduler l'étendue de l'infection, de telle sorte qu'un isolat hautement producteur donnera plus favorablement des infections plus profondes et récidivantes, avec une extension locorégionale jusqu'à la formation d'abcès sous-cutanés plus ou moins volumineux. Cliniquement, ces infections ressemblent initialement à des piqûres/morsures d'araignées avec une zone érythémateuse et inflammatoire centrée sur la « piqûre » et parfois une plage de dermo-nécrose centrale (Dominguez 2004; Suchard 2011). Ces lésions cutanées entraînent également très volontiers une sensation de prurit intense participant à l'impression de piqûre. Les mastocytes sont impliqués dans la symptomatologie des piqûres/morsures d'araignée (Rattmann et al. 2008; Paludo et al. 2009) et notamment dans la sensation de prurit (Gupta et Harvima 2018). C'est pourquoi, nous avons tout d'abord étudié l'impact des toxines formant des pores sur les mastocytes humains. Ensuite, nous avons étudié l'impact de concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques sur la modulation de l'expression de ces toxines afin d'améliorer notre connaissance sur le sujet et permettre de proposer le meilleur traitement à administrer en cas d'infections staphylococciques à composante toxinique.

Section 1 : Identification des facteurs de virulence staphylococciques capables d'interagir avec les mastocytes humains

PARTIE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Les toxines formant des pores de Staphylococcus aureus et la régulation de leur expression

Dans la revue bibliographique de la première partie, nous proposons de développer la structure, le mécanisme d'action, l'implication dans la physiopathologie des infections et l'épidémiologie des toxines formant des pores produites par *S. aureus*, PVL, Hla et PSM α , puis d'expliquer la modulation de leur production au cours d'une infection.

I. La leucocidine de Panton-Valentine (PVL)

Historiquement, la PVL a été décrite pour la première fois par Panton et Valentine en 1932 où, sans décrire la toxine en tant que telle, les auteurs décrivaient une corrélation positive entre des souches de *S. aureus* possédant une forte activité leucotoxique et une présentation clinique sévère chez l'Homme, à type de furoncle ou ostéomyélite (Panton et Valentine 1932).

i. Structure et mécanisme d'action

La PVL appartient à la famille des leucocidines à deux composants, ou toxines synergo-hyménotropes, où deux composés agissent en synergie pour former un pore à la surface des membranes des cellules cibles. Ces deux composés distincts sont nommés composé S (slow eluted) et composé F (fast eluted) en fonction de leur élution en chromatographie. Chez *S. aureus*, il existe cinq sous-unités S et quatre sous-unités F, s'associant entre elles pour former cinq toxines à deux composants complètes (Tableau 1) : la PVL, l'hémolysine gamma (Hl γ) A/B, l'Hl γ C/B, la leucocidine LukED et la leucodine LukAB.

Tableau 1 : Composition des différentes leucocidines synergo-hyménotropes chez *S. aureus*, leurs récepteurs et cellules cibles. D'après Spaan et al. 2017.

Toxine	Sous-unité S	Sous-unité F	Récepteur de la sous-unité S	Cellule cible	Espèce cible
PVL	LukS-PVL	LukF-PVL	C5aR = CD88 et C5L2 (Spaan et al. 2013)	PNN Monocytes Macrophages	Homme (très active) Lapin (moyennement active) Souris (peu active)
HlyA/B	HlyA	HlyB	CCR2, CXCR1 et CXCR2 (Spaan et al. 2014) DARC sur les érythrocytes (Spaan et al. 2015a)	PNN Monocytes Macrophages Erythrocytes	Homme (très active) Souris (moyennement active)
HlyC/B	HlyC	HlyB	C5aR (Spaan et al. 2015b)	PNN Monocytes Macrophages	Homme (très active) Lapin (moyennement active) Souris (peu active)
LukED	LukE	LukD	CCR5 (Alonzo et al. 2013) CXCR1 et CXCR2 (Reyes-Robles et al. 2013) DARC sur les érythrocytes (Spaan et al. 2015a)	PNN Monocytes Macrophages Cellules dendritiques Lymphocyte T Cellules NK Erythrocytes	Homme (très active) Souris (très active)
LukAB = LukHG	LukA = LukH	LukB = LukG	CD11b (DuMont et al. 2013)	PNN Monocytes Macrophages Cellules dendritiques	Homme (très active) Lapin (moyennement active) Souris (peu active)

La formation du pore nécessite une liaison séquentielle des deux composés à la membrane de la cellule cible. Dans un premier temps, le composé S se fixe sur son récepteur membranaire, puis le composé F se fixe au composé S du complexe formé. Il se produit ensuite une oligomérisation des composés S et F pour former un hétéro-octamère formé de 4 sous-unités S et 4 sous-unités F. Ce pré-pore subit enfin une modification conformationnelle afin de créer un véritable pore transmembranaire (Colin et al. 1994) (Figure 1). La spécificité des cellules cibles ainsi que la spécificité d'espèce de chaque toxine synergo-hyménotropes dépend de la reconnaissance et de l'affinité du composé S pour son récepteur cellulaire (Tableau 1). Très récemment, il a été montré pour la PVL que la spécificité d'espèce dépendait également de la reconnaissance du composé F pour son récepteur, le CD45 (Spaan 2018). En fonction de la dose de toxine mise en contact avec la cellule cible, l'effet sera différent. A dose sub-lytique, la formation de l'oligomère octamérique permet l'ouverture des canaux calciques de la cellule cible, permettant un influx calcique intracellulaire. Cet influx calcique déclenche l'activation de la cellule selon des voies de signalisation intracellulaire variées et induit la libération de cytokines ou de médiateurs, à composante majoritairement pro-inflammatoire, comme par exemple la libération d'IL-8 et de LTB4 par les polynucléaires neutrophiles (PNN) et d'histamine par les polynucléaires

basophiles (König et al. 1995). A dose plus importante, la formation du pore transmembranaire altère la perméabilité de la membrane cellulaire entraînant la mort cellulaire par apoptose ou par nécrose en cas de concentration très élevée de toxine (autour de 40 ng/mL) (Genestier et al. 2005; Löffler et al. 2010).

S. aureus produit donc des toxines capables de tuer les cellules de l'immunité innée, PNN et macrophages, lui permettant d'échapper au système immunitaire. De plus, ces toxines en créant des lésions très inflammatoires et nécrotiques, entraînent la libération massive de composés pro-inflammatoires, déclenchant le recrutement de nouvelles cellules de l'immunité et entretenant donc une boucle d'amplification de l'inflammation sur le site de l'infection.

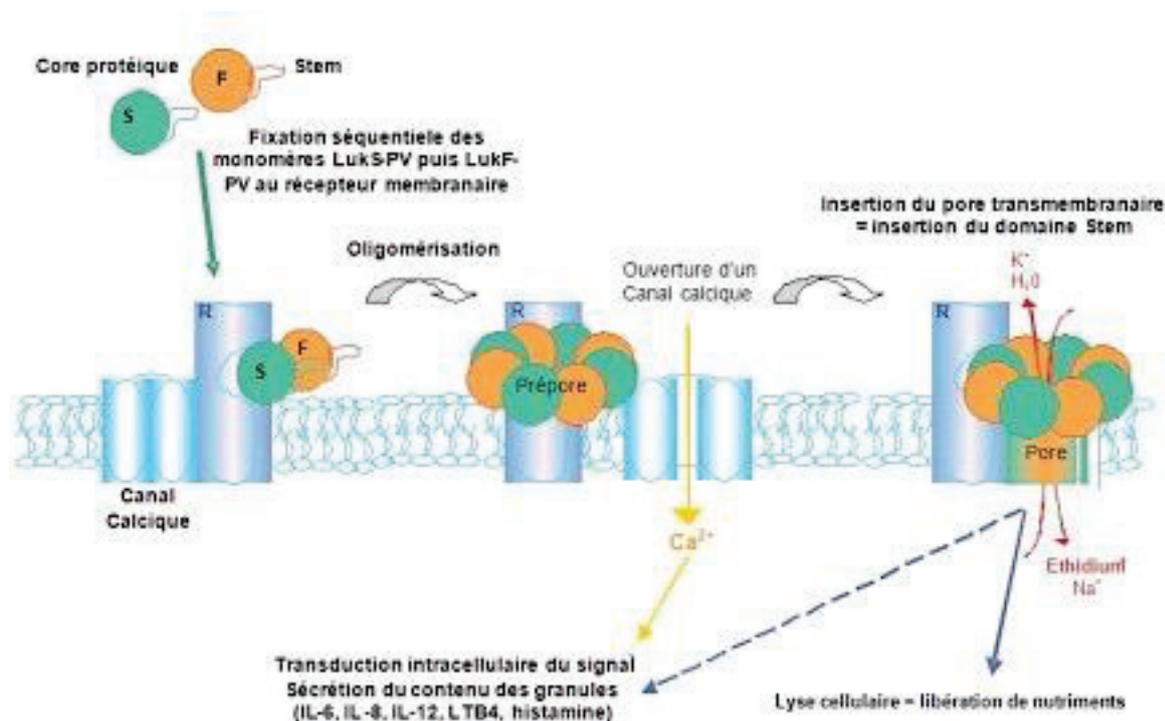


Figure 1 : Mécanisme d'action des leucocidines synergo-hyménotropes de *S. aureus*. Tout d'abord, la sous-unité S se fixe sur son récepteur spécifique. Ensuite, la sous-unité F se lie à son composé S au sein du complexe composé S-récepteur, à condition que le corécepteur du composé F soit également exprimé à la surface de la cellule cible. Ceci déclenche alors la formation d'un hétéro-octamère par oligomérisation de 4 sous-unités S et 4 sous-unités F, avec ouverture des canaux calciques attenants et influx calcique intracellulaire. Cet influx calcique permet l'activation de la cellule cible avec libération de médiateurs diverses en fonction de la cellule touchée. Enfin, la formation du pore transmembranaire rompt l'équilibre hydro-électrique de la cellule entraînant sa mort cellulaire par apoptose ou nécrose en fonction de la concentration de toxine dans le milieu. D'après Vincenot et al. 2008.

ii. Implication en clinique

Chez l'Homme, les données épidémiologiques et les cas rapportés indiquent que les souches de *S. aureus* productrices de PVL sont reliées à des infections sévères pouvant mettre en jeu le pronostic vital du patient. C'est le cas de la pneumonie nécrosante (Gillet et al. 2002). La production de PVL a également été mise en cause dans les infections cutanées primitives, c'est-à-dire survenant sur peau saine, volontiers extensives et récidivantes (Lina et al. 1999; del Giudice et al. 2009). Ce type d'infections cutanées peut former des abcès sous-cutanés très inflammatoires, douloureux avec une

zone érythémateuse très étendue, pouvant se confondre avec des piqûres d'araignées. Enfin, les infections ostéo-articulaires induites par des souches de *S. aureus* productrices de PVL sont responsables d'infection ostéo-articulaire plus grave que les souches ne produisant pas la PVL, avec des signes de choc septique dans la moitié des cas et la présence d'abcès profonds dans près de 80 % des cas (Dohin et al. 2007). Une étude chinoise propose même d'utiliser la PVL comme un indicateur de mauvais pronostic lors des ostéomyélites à *S. aureus* (traitement plus long, symptômes inflammatoires plus sévères) (Jiang et al. 2017).

Récemment, une méta-analyse regroupant tous les cas et études publiés sur les infections graves à *S. aureus* producteur de PVL a conclu qu'il existe effectivement une corrélation positive entre les infections cutanées graves nécessitant une prise en charge chirurgicale et souches productrices de PVL (Shallcross et al. 2013). Cette étude ne conclut cependant pas sur la relation entre pneumonie nécrosante et production de PVL, sans doute car elle exclut étonnamment l'étude princeps de Gillet et al. précédemment citée (Gillet et al. 2002).

A la vue de ces observations, des modèles expérimentaux animaux d'infection pulmonaire, cutanée et ostéo-articulaire ont été mis au point pour explorer le rôle physiopathologique de la PVL. Comme la PVL est inactive sur les PNN de souris, l'animal de choix pour étudier l'influence de cette toxine est le lapin. Le schéma d'expérience de ces études est globalement semblable. Il consiste à comparer, sur un modèle donné d'infection, l'impact, l'évolution et l'issue d'animaux infectés avec des souches de *S. aureus* produisant la PVL, dite sauvage ou « Wild-type », leur mutant isogénique inactivée pour les gènes codant *lukS-pvl* et *lukF-pvl* et donc ne produisant pas la PVL (Δ PVL), et la souche Δ PVL complémentée en PVL avec les gènes *lukS-pvl* et *lukF-pvl* en position chromosomique ou plasmidique. Ainsi, il est possible de comparer uniquement l'impact de la production de PVL sur le devenir des infections sans modifier le fond génétique de la souche.

Tout d'abord, en utilisant ce procédé sur un modèle d'infection pulmonaire de lapin et une souche de *S. aureus* résistant à la méticilline communautaire (SARM-C), USA300, Diep et al ont montré que la PVL augmentait la capacité de la souche de *S. aureus* à causer des lésions sévères et nécrotiques du poumon, un œdème pulmonaire, une hémorragie alvéolaire et des hémoptysies. De plus, le taux de mortalité des animaux infectés avec la souche sauvage et la souche Δ PVL complémentée en PVL était plus élevé que celui des animaux infectés avec la souche Δ PVL (Diep et al. 2010). Les auteurs complétaient ces données en observant que l'instillation directe de PVL purifiée dans le poumon d'un lapin entraînait les mêmes lésions pulmonaires avec recrutement et lyse de PNN sur site alors que celles-ci ne se manifestaient pas chez un lapin neutropénique, en l'absence de PNN. Il proposait enfin un modèle complet de physiopathologie de la pneumonie nécrosante (Figure 2).

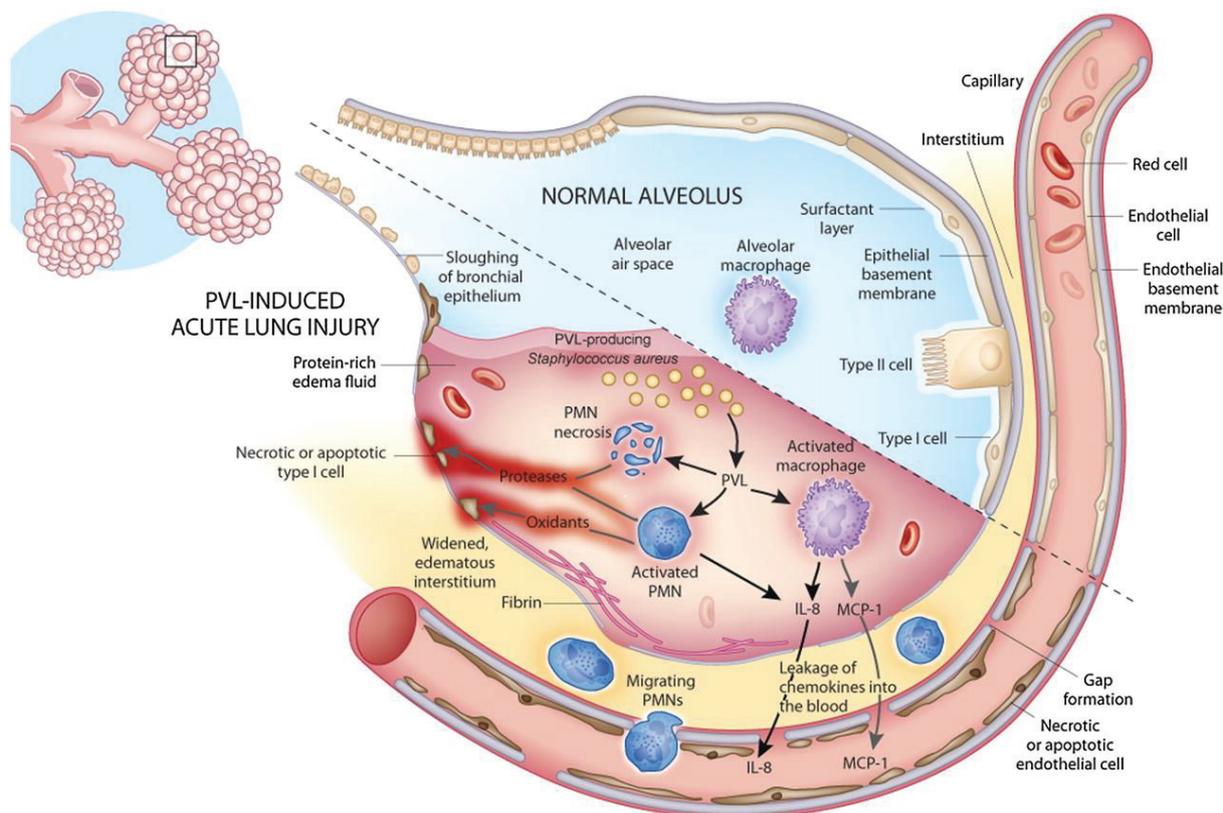


Figure 2 : Mécanisme physiopathologique de la PVL dans la pneumonie nécrosante. La PVL produite lors d'une infection à *S aureus* entraîne d'abord l'activation des PNN (= PMN, polymorphonuclear neutrophils) et des macrophages, induisant la production de cytokines pro-inflammatoires IL-8 et MCP-1. Ceci favorise le recrutement sur le site de l'infection d'autres cellules de l'immunité, incluant les PNN. La concentration de la PVL augmentant, la toxine provoque la lyse des PNN dans l'alvéole pulmonaire, entraînant la libération du contenu granulaire des PNN composé de lysozyme et de protéases. Ces derniers digèrent les tissus environnants et favorisent donc le développement de lésions alvéolaires. La lyse des PNN entraîne également la libération de cytokines et de médiateurs pro-inflammatoires, recrutant encore plus de cellules de l'immunité qui seront à leur tour lysées, entretenant le cycle délétère du processus inflammatoire et augmentant alors la progression et l'étendue des lésions. D'après Diep et al. 2010.

Ensuite, sur un modèle d'ostéomyélite chez le lapin et en utilisant un inoculum faible et fort de bactérie, Crémieux et al. ont montré que les lapins infectés avec un fort inoculum de la souche sauvage LAC de fond génétique USA300 et produisant la PVL, induisait des infections plus graves au niveau osseux avec déformations osseuses, atteintes musculaires et articulaires, que celles observées chez les lapins infectés avec la souche Δ PVL (Crémieux et al. 2009). Dans cette étude, la complémentation en PVL de la souche Δ PVL n'a pas été étudiée. Plus tard, la même équipe montrait que la PVL était bien impliquée dans la formation d'abcès osseux lors d'une ostéomyélite à *S. aureus* producteur de PVL, et qu'elle favorisait également la dissémination hématogène de la bactérie pour former des localisations secondaires pulmonaires. Cependant, la présence ou non de la PVL ne modifiait pas la mortalité des animaux (Crémieux et al. 2014).

Enfin, concernant les résultats des modèles d'infections cutanées à *S. aureus* sur lapin, les études sont plutôt discordantes. En effet, d'un côté, Lipinska et al. ont observé que la souche sauvage LAC et la souche Δ PVL complétementée en PVL provoquaient des lésions cutanées plus larges et plus nécrotiques chez les animaux que la souche Δ PVL, dans les 3 à 4 jours suivant l'injection intradermique de

bactéries (Lipinska et al. 2011). De même, Chi et al. ont montré, en utilisant un fond génétique de SARM-C différent appartenant au ST59, que les souches productrices de PVL, souche sauvage et souche Δ PVL complétée en PVL, induisaient des lésions cutanées plus larges, plus profondes et surtout avec une plage de nécrose plus étendue que celle provoquées suite à l'infection avec la souche Δ PVL (Chi et al. 2013). D'un point de vue mécanistique, ils proposaient que la PVL faciliterait l'échappement des bactéries à l'endo-lysosome lorsque celles-ci sont internalisées par les kératinocytes cutanés, permettant ainsi leur prolifération dans le cytoplasme, ce qui induirait la mort des kératinocytes par apoptose. La mort des kératinocytes favoriserait alors le processus inflammatoire. De l'autre côté, Kobayashi et al., en utilisant des souches possédant le même fond génétique que la première étude, ne montraient aucune différence significative entre le volume de l'abcès induit par la souche sauvage et celui induit par la souche Δ PVL, quel que soit le temps post-infection et ce, jusqu'à 14 jours post-infection (Kobayashi et al. 2011). La différence entre les résultats de ces trois études pourrait venir du mode d'inoculation de la bactérie qui se fait par voie sous-cutanée pour Kobayashi et al. et par voie intradermique pour les deux autres études.

Globalement, les études expérimentales chez le lapin démontrent le rôle physiopathologique de la PVL comme facteur de virulence aggravant l'infection, dans les trois modèles présentés : pneumonie nécrosante, infection ostéo-articulaire et infection cutanée. Chez l'Homme, le fait de retrouver *in vivo* la production de PVL au cours de ces infections, notamment dans les abcès cutanés et dans le liquide broncho-alvéolaire des patients atteints de pneumonie nécrosante, à dose active (concentration moyenne respective de 0,54 μ g/mL et 0,11 μ g/mL) voire à très forte dose (pouvant atteindre des centaines de μ g/mL) est un argument supplémentaire pour impliquer cette toxine dans la physiopathologie des infections précitées (Badiou et al. 2008, 2010; Rouzic et al. 2010).

iii. Epidémiologie et distribution des souches de *S. aureus* productrices de PVL

Les gènes *lukS-PV* et *lukF-PV* codant pour les sous-unités S et F de la PVL sont portés, dans le génome de *S. aureus*, par un élément génétique mobile transférable, un bactériophage. L'épidémiologie et la distribution des souches de *S. aureus* portant la PVL ont évolué au cours du temps et notamment ont été largement modifiées dans les années 1990 par l'apparition des SARM-C. Au milieu du siècle dernier, avant l'avènement des SARM-C, la PVL était majoritairement portée par des souches de *S. aureus* sensible à la pénicilline (SASM) et sa prévalence, à l'époque, était alors faible de l'ordre de 2% des souches (Prevost et al. 1995). Au début des années 1990, sont apparues dans la communauté générale, des souches de *S. aureus* résistant à la pénicilline (SARM) particulièrement virulentes, touchant des patients sans facteurs de risque et donnant des infections graves. Ces souches n'avaient aucune parentalité génétique avec les SARM d'origine hospitalière (SARM-H) : elles ont donc été appelées SARM-C pour communautaire.

Plusieurs clones, d'abord spécifiques de continents, se sont largement étendus tout autour du monde (Figure 3) : ST8 USA300 en Amérique du Nord, ST80 dans le bassin méditerranéen et l'Europe, ST59 en Asie de l'est, ST30 en Asie du Pacifique, ST93 et ST30 en Australie (DeLeo et al. 2010).

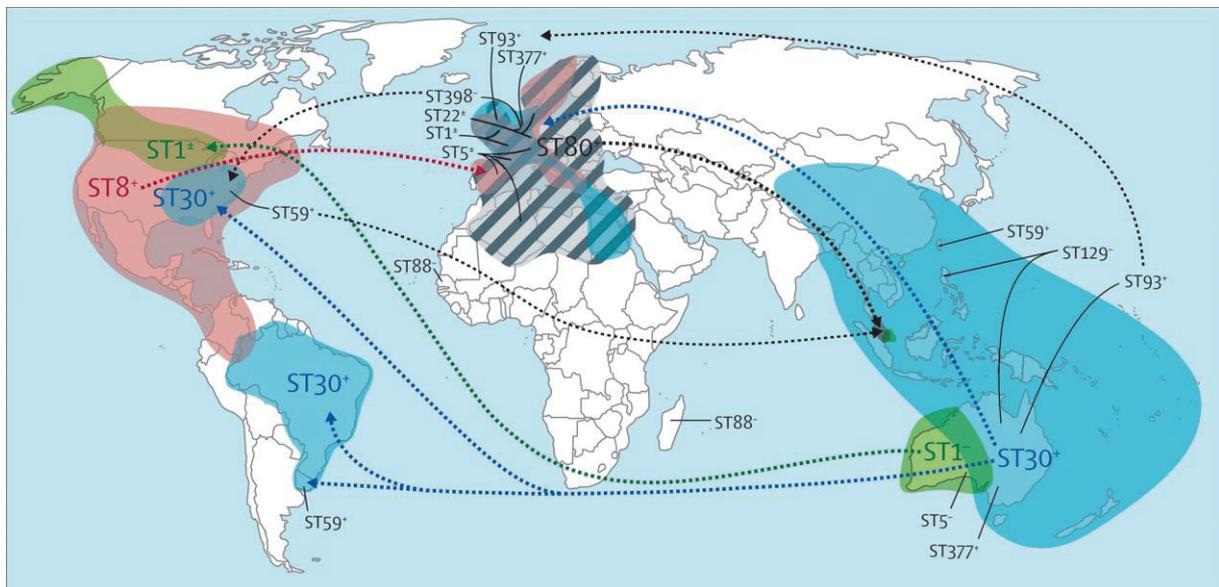


Figure 3 : Distribution mondiale initiale des principaux clones de SARM-C et leurs mouvements de propagation. D'après DeLeo et al. 2010.

Initialement, la particularité des souches de SARM-C est qu'elles produisaient toutes la PVL, à tel point que la PVL était utilisée comme marqueur des SARM-C. Ces clones se sont rapidement répandus dans le monde entier, atteignant leur apogée dans les années 2000 à 2010. Ainsi, entre 2004 et 2008, aux Etats-Unis d'Amérique, la proportion du clone de SARM-C, ST8 USA300 PVL+, parmi les souches de *S. aureus* isolées d'infections cutanées, passait de 19% en 2004 à 45% en 2008 (O'Hara et al. 2012). En Europe, l'épidémiologie des SARM-C était plus disparate. Certains pays étaient fortement touchés comme la Grèce, où sur les 27% de souches de *S. aureus* portant la PVL isolées principalement d'infections cutanées, 45% étaient des SARM-C (Chini et al. 2006). Alors que d'autres pays étaient moins touchés, comme le Royaume-Uni qui recensait moins de 2% de souches de *S. aureus* productrices de PVL parmi des isolats envoyés au centre national de référence (Holmes et al. 2005).

En France, la prévalence des infections à SARM-C producteurs de PVL est restée et reste plutôt faible, évoluant sous la forme de cas sporadiques ou de petites épidémies, avec le clone Européen ST80 (Robert et al. 2011), mais également avec le clone ST8 USA300 (Mee-Marquet et al. 2015). A côté de ces cas, les autres épidémies d'infections cutanées à *S. aureus* producteur de PVL sont dues à des SARM, de fonds génétiques variés (CC1, CC121, ...) (Bourigault et al. 2014; Couvé-Deacon et al. 2016).

II. Les phénol-solubles modulines (PSM) et hémolysine delta (Hld)

i. Structure et mécanisme d'action

Les PSM sont de petits peptides amphipathiques, d'abord décrits chez *Staphylococcus epidermidis* (Peschel et Otto 2013). Chez *S. aureus*, il a été décrit deux familles de PSM : les PSM α dont la séquence peptidique est composée d'une vingtaine d'acides aminés ayant une structure en hélice alpha (Figure 4), et les PSM β , d'une quarantaine d'acides aminés ayant une structure en feuillet beta.

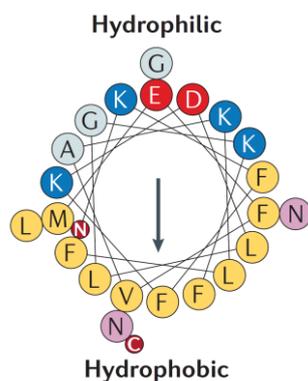


Figure 4 : Structure en l'hélice α de PSM α 4, avec une moitié de l'hélice hydrophobe et l'autre moitié hydrophile, procurant à ces peptides un caractère amphipathique. D'après Wang et al. 2007.

L'analyse des séquences peptidiques ont permis de différencier 4 types de PSM α (PSM α 1 à PSM α 4) et 2 types de PSM β (PSM β 1 et PSM β 2). De plus, l'hémolysine delta (Hld), toxine staphylococcique connue depuis longtemps pour son activité hémolytique, appartient à la famille des PSM α de par sa structure. A l'état naturel chez *S. aureus*, l'ensemble des PSM est produit sous une forme formylée en N-terminal (Wang et al. 2007).

Pour être excrétés dans le milieu extracellulaire, *S. aureus* utilise un système d'export spécifique aux PSM, le transporteur Pmt (phenol-soluble modulins transporter), codé par quatre gènes, *pmtA*, *pmtB*, *pmtC* et *pmtD*, formant un transporteur à quatre composants de type ABC (ATB-binding cassette) (Chatterjee et al. 2013). Ce transporteur est essentiel pour la bactérie car en son absence, l'accumulation de PSM α et d'Hld entraîne des dommages considérables sur la bactérie du fait de leurs propriétés lytiques sur les membranes cellulaires (division cellulaire anormale, membrane cytoplasmique endommagée).

Les PSM possèdent différentes propriétés biologiques, globalement différentes entre PSM α et PSM β (Figure 5). Tout d'abord, contrairement aux PSM β , les PSM α , incluant Hld, ont une forte activité lytique sur les cellules de par leur structure amphipathique, leur permettant de dissoudre les membranes plasmiques par agrégation à leur surface et formation de pores transmembranaires. Selon les études, la dose minimum lytique des PSM α sur les PNN humains a été estimée à 10 μ g/mL pour PSM α 1, PSM α 2, PSM α 3 et Hld, avec une plus forte activité lytique de PSM α 3 (Wang et al. 2007). De manière intéressante, les PSM α sont aussi actifs sur les PNN humains que sur les PNN murins, de

lapins ou de macaques (Löffler et al. 2010). Aux mêmes concentrations, les PSM α ont également un effet lytique sur les érythrocytes (Cheung et al. 2012).

De plus, il a été montré que les PSM α formylés en N-terminal pouvaient agir comme de potentiels ligands des récepteurs FPR2 (Formyl protein receptor 2), présents à la surface des PNN. Les effets des PSM α sur les PNN *via* FPR2 peuvent se produire à de plus faible concentration, de l'ordre du ng/mL, bien en-dessous de leur concentration lytique. La reconnaissance de PSM α par FPR2 a pour conséquence, d'une part, d'agir comme un chimio-attractant permettant le recrutement de PNN sur le site de l'infection, et d'autre part de déclencher un influx calcique intracellulaire induisant l'activation des PNN avec libération de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-8 (Kretschmer et al. 2010). Cet influx calcique déclenche également une réaction oxydative de la part des PNN, avec libération d'anions superoxydes, inhibant l'action immuno-modulatrice des PSM α par inactivation de ces derniers (Forsman et al. 2012). Le système immunitaire met donc en place un rétrocontrôle négatif de l'effet des PSM α sur les PNN, afin de contrôler le processus inflammatoire. Néanmoins, cet effet aura également pour conséquence de favoriser l'échappement au système immunitaire de la bactérie en diminuant le recrutement de nouvelles cellules phagocytaires professionnelles. Paradoxalement, il a également été montré que les PSM α déclenchaient la production rapide et efficace de pièges extracellulaires par les PNN, appelés NETs (Neutrophils extracellular traps), de manière indépendante à la stimulation du FPR2 et à la production de radicaux libres oxygénés (Björnsdottir et al. 2017). La production de NETs est plutôt considérée comme un des moyens de l'immunité innée pour neutraliser les pathogènes. Néanmoins, l'efficacité des NETs nécessite une structure intacte de la chromatine, qui peut facilement être altérée par la DNase produite par les souches de *S. aureus*.

Les PSM α , et notamment PSM α 3, moduleraient également l'immunité adaptative. En effet, il a été montré que PSM α 3 avaient un effet chimio-attractant pour les cellules dendritiques de souris et immuno-modulateur en modifiant le panel de cytokines libéré lors de leur activation par des lysats de *S. aureus*. Cette modification se traduit par une augmentation de la libération de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 au détriment de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-6 ou l'IL-12. Cet effet et notamment la diminution de sécrétion d'IL-12, induirait au final une inhibition du développement de la réponse immunitaire T de type Th1, indispensable à la production d'IFN γ à activité antibactérienne (Schreiner et al. 2013). Par ce biais, la production de PSM par les souches de *S. aureus* favoriserait une fois de plus, son échappement au système immunitaire.

Outre moduler l'immunité innée et adaptative, les PSM, et notamment PSM α 1 et PSM α 2, affichent des propriétés antibactériennes vis à vis d'autres espèces bactériennes, comme *Streptococcus pyogenes*, conférant un avantage aux souches de *S. aureus* fortement producteurs dans la compétition pour la colonisation de surface telle que la peau (Joo et al. 2011). Enfin, l'agrégation des PSM en fibres amyloïdes favoriseraient la formation de biofilm par les souches de *S. aureus* producteurs (Schwartz et al. 2012).

Cependant, le rôle extracellulaire des PSM reste discuté, dans la mesure où les lipoprotéines circulantes, notamment celles du sérum (HDL, LDL, VLDL), inhibent complètement l'action lytique ou immuno-modulatrice des PSM (Surewaard et al. 2012). L'intérêt de la production des PSM par *S. aureus* pourrait donc résider ailleurs, dans l'infection intracellulaire. En effet, il a été montré que la production des PSM peut survenir lorsque la bactérie est internalisée par des phagocytes professionnels, au sein même des phago-lysosomes, promouvant une fois de plus l'échappement à sa destruction et permettant sa libération dans le milieu cytoplasmique où elle est capable de réplication (Surewaard et al. 2012; Grosz et al. 2013). Globalement, ces données montrent que les PSM ont une action intracellulaire et extracellulaire à condition que qu'il n'y ait pas de lipoprotéines et/ou que les quantités produites de toxines saturent les capacités d'inhibition de celles-ci.

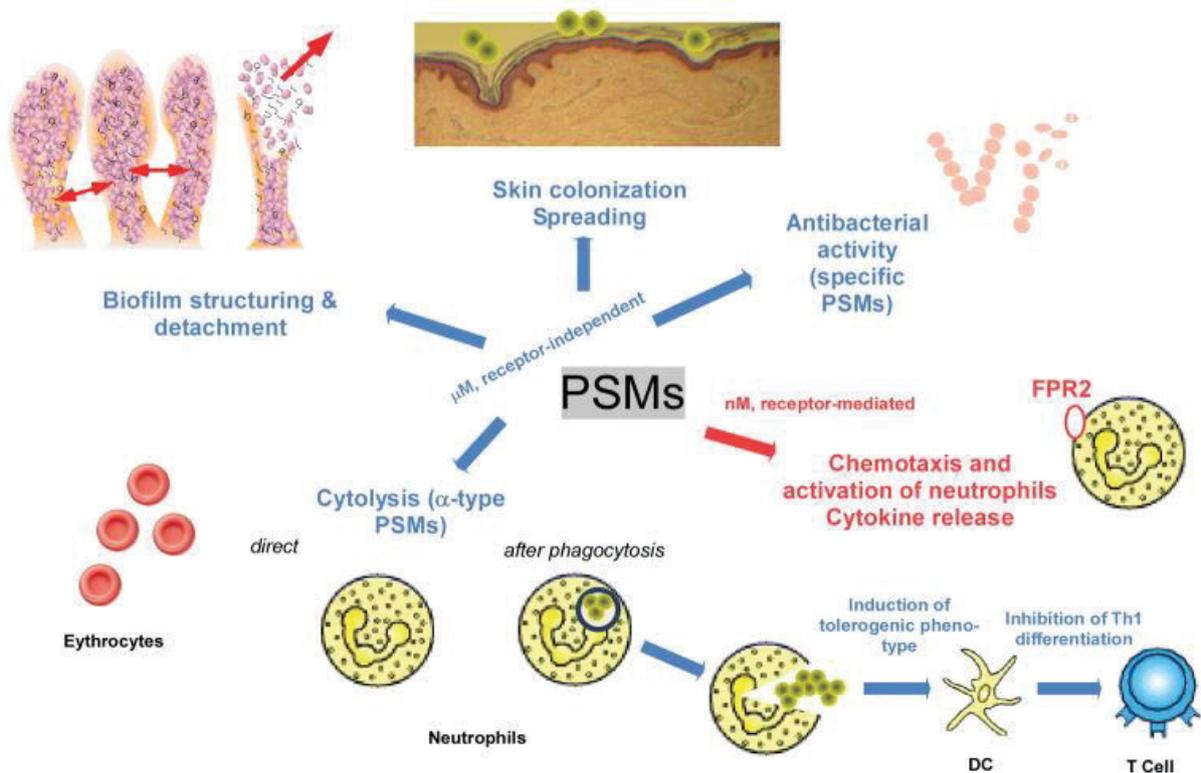


Figure 5 : Vue d'ensemble des fonctions biologiques des PSM. Les fonctions indépendantes des récepteurs FPR2, survenant à des concentrations de l'ordre du μM , sont signalées par les flèches bleues : activité bactéricide vis à vis d'autres espèces bactériennes favorisant l'expansion de la colonisation des surfaces ; activité promouvant la formation du biofilm ; activité cytolitique des PSM α , extracellulaire directe sur les érythrocytes et les PNN humains, et intracellulaire permettant l'échappement au phago-lysosome et lyse des phagocytes de l'intérieur ; activité immuno-modulatrice de l'immunité cellulaire T (T cell) avec inhibition de la réponse Th1 par induction d'un phénotype tolérogène des cellules dendritiques (DC). Les fonctions dépendantes des récepteurs FPR2, survenant à des concentrations de l'ordre du nM, sont indiquées par la flèche rouge : activité chimio-attractante pour les PNN humains avec activation de ces derniers permettant la libération de cytokines pro-inflammatoires. D'après Peschel et Otto 2013.

ii. Implication en clinique

Il a été montré avec plusieurs modèles expérimentaux d'infections animales, et notamment d'infections cutanées, que les PSM, et en particulier les PSM α doués d'une capacité lytique, étaient des facteurs de virulence majeurs impliqués dans la physiopathologie des infections à *S. aureus*.

Comme précédemment, le but de ces expériences est de comparer l'évolution et l'issue d'infection induite par une souche sauvage de *S. aureus*, son mutant inactivé pour les gènes de *psm α* et/ou *hld*, et si possible la souche complémentée.

Ainsi, Wang et al. ont montré sur un modèle d'infection cutanée de souris, que la souche sauvage, USA300 LAC, produisait des infections cutanées avec une plage de dermo-nécrose beaucoup plus étendue que celles obtenues avec la souche Δ PSM α (Wang et al. 2007). Les infections cutanées induites par la souche Δ Hld n'étaient significativement pas différentes, en termes d'étendue et de plage de nécrose, que celles induites par la souche sauvage. Sur un modèle expérimental de lapin, Kobayashi et al. ont également observé en utilisant la souche USA300 LAC, que les PSM α étaient des facteurs de virulence important dans l'établissement d'abcès sous-cutanés volumineux (Kobayashi et al. 2011).

De plus, les PSM α , incluant Hld, interviendraient dans la physiopathologie de la dermatite atopique, une maladie allergique cutanée. Le protocole murin mis en place par deux études afin de mimer la dermatite atopique, a consisté à abraser légèrement la couche cornée de la peau dorsale de la souris par épilation, puis d'y appliquer pendant une semaine une souche sauvage de *S. aureus*, ou son mutant isogénique Δ PSM α ou Δ Hld à l'aide d'une gaze stérile et d'analyser ensuite, à la fin de la durée d'infection, les modifications cutanées obtenues (Figure 6). Ainsi, Nakamura et al. ont montré que la toxine Hld était un facteur de virulence majeur dans l'établissement d'un état de dermatite atopique, en induisant la dégranulation des mastocytes cutanés (Nakamura et al. 2013). En effet, dans leur modèle, les souris sauvages non déficientes en mastocytes, sur lesquelles avait été appliquée la souche USA300 LAC Δ Hld affichaient un score de la maladie significativement inférieur au score affiché par les souris traitées avec la souche LAC sauvage. Cette différence disparaissait lorsque l'expérience était réalisée avec des souris déficientes en mastocytes (déficience apportée selon un mode dépendant du c-kit, voir paragraphe dédié). Dans ce dernier cas, les deux groupes de souris traitées avec la souche sauvage et la souche Δ Hld affichaient un score de maladie identique, significativement inférieur à celui retrouvé chez les souris sauvages traitées avec la souche LAC sauvage. Le phénotype initial, c'est-à-dire semblable à celui rencontré chez les souris sauvages, était restauré par la complémentation en mastocytes des souris déficientes, prouvant que c'est bien l'impact d'Hld sur les mastocytes qui entraînait l'établissement de la dermatite atopique. Plus tard, Syed et al. ont conclu que les PSM α étaient également des facteurs de virulence intervenant dans l'inflammation cutanée et que ces toxines étaient nécessaires au recrutement de PNN dans le derme de souris soumis au même traitement que décrit précédemment. Ce recrutement de PNN était alors médié par la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL-18 et IL-1 β) par les kératinocytes, consécutive à l'action des PSM α sur ces derniers (Syed et al. 2015).

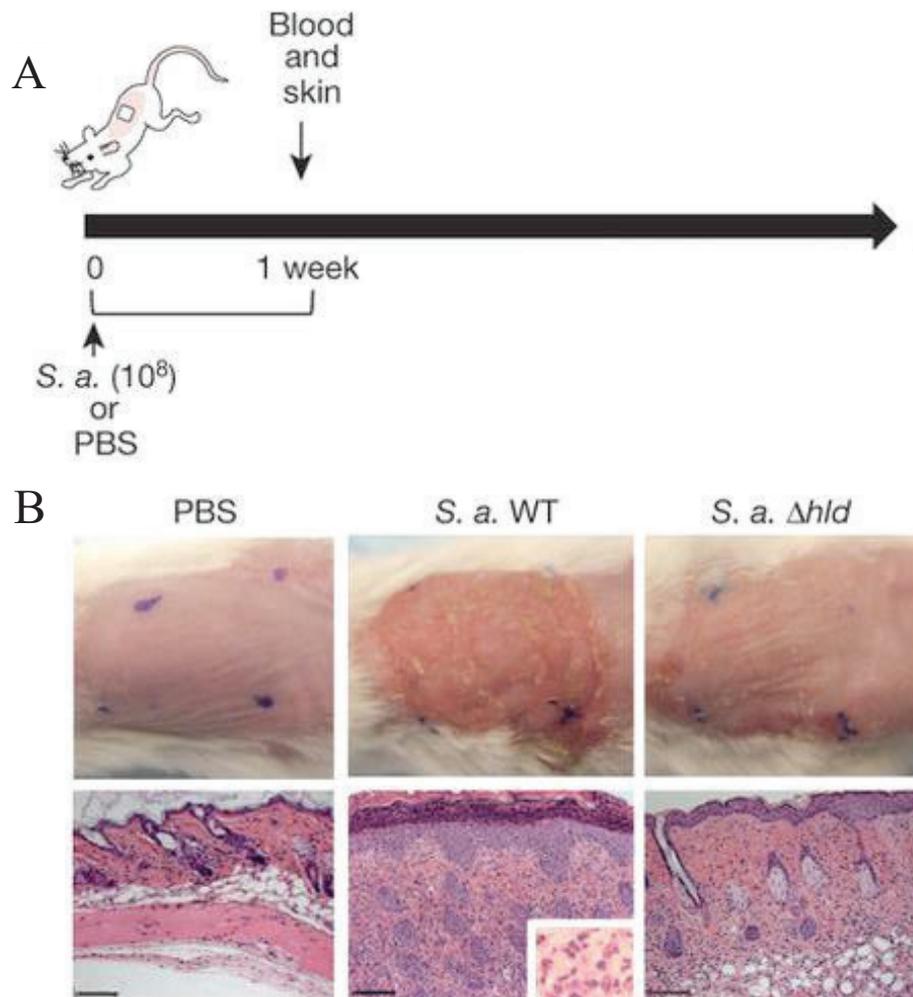


Figure 6 : Modèle expérimental murin étudiant l'implication de l'Hld dans la dermatite atopique. A) Etapes de l'expérience : à J0, un patch contenant la souche de *S. aureus* à étudier est appliqué sur la peau dorsale de la souris après épilation. Une semaine après, le score de la maladie est enregistré et des prélèvements sont réalisés pour étudier la morphologie cutanée. B) Aspects macroscopique et microscopique de la peau de la souris traitée par les différentes souches de *S. aureus* ou le contrôle négatif constitué de PBS. S. a. WT = *S. aureus* « Wild-type » = souche sauvage, S. a. Δhld = *S. aureus* délété pour le gène *hld* codant la toxine Hld. D'après (Nakamura et al. 2013). D'après Nakamura et al. 2013.

iii. Epidémiologie des souches productrices de PSM

Contrairement aux gènes codant les deux sous-unités de la PVL, les gènes codant les PMS, *pmsα1*, *pmsα2*, *pmsα3*, *pmsα4*, *pmsβ1*, *pmsβ2* et l'Hld, *hld*, sont portés par le « core » génome de *S. aureus*, impliquant que toutes les souches de *S. aureus* produisent ces toxines. Le gène *hld* est porté par une partie codante de l'ARNIII, ARN effecteur du système de régulation Agr (Accessory gene regulator, voir paragraphe dédié).

Bien que toutes les souches de *S. aureus* sont productrices de PSM et d'Hld, le niveau de production de ces toxines varie d'une souche à l'autre. Les auteurs de la première étude ayant découvert l'existence des PSM chez *S. aureus* ont d'abord conclu que les SARM-C produisaient plus de PSM et d'Hld que les SARM-H (Wang et al. 2007). Des observations comparant le niveau de production de ces toxines par différentes souches cliniques de *S. aureus* issues d'infections de localisations variées, montrent qu'indépendamment du statut de la résistance à la méticilline, les souches isolées

d'infections cutanées produisent globalement plus de PSM α et d'Hld que les souches isolées d'endocardites ou d'infections pulmonaires (Berlon et al. 2015; Qi et al. 2016). La production en PSM β n'était significativement pas différente entre les groupes (Figure 7). Ces dernières données corroborent l'hypothèse que les PSM et Hld, chez *S. aureus*, sont surtout des facteurs de virulence importants dans les infections cutanées.

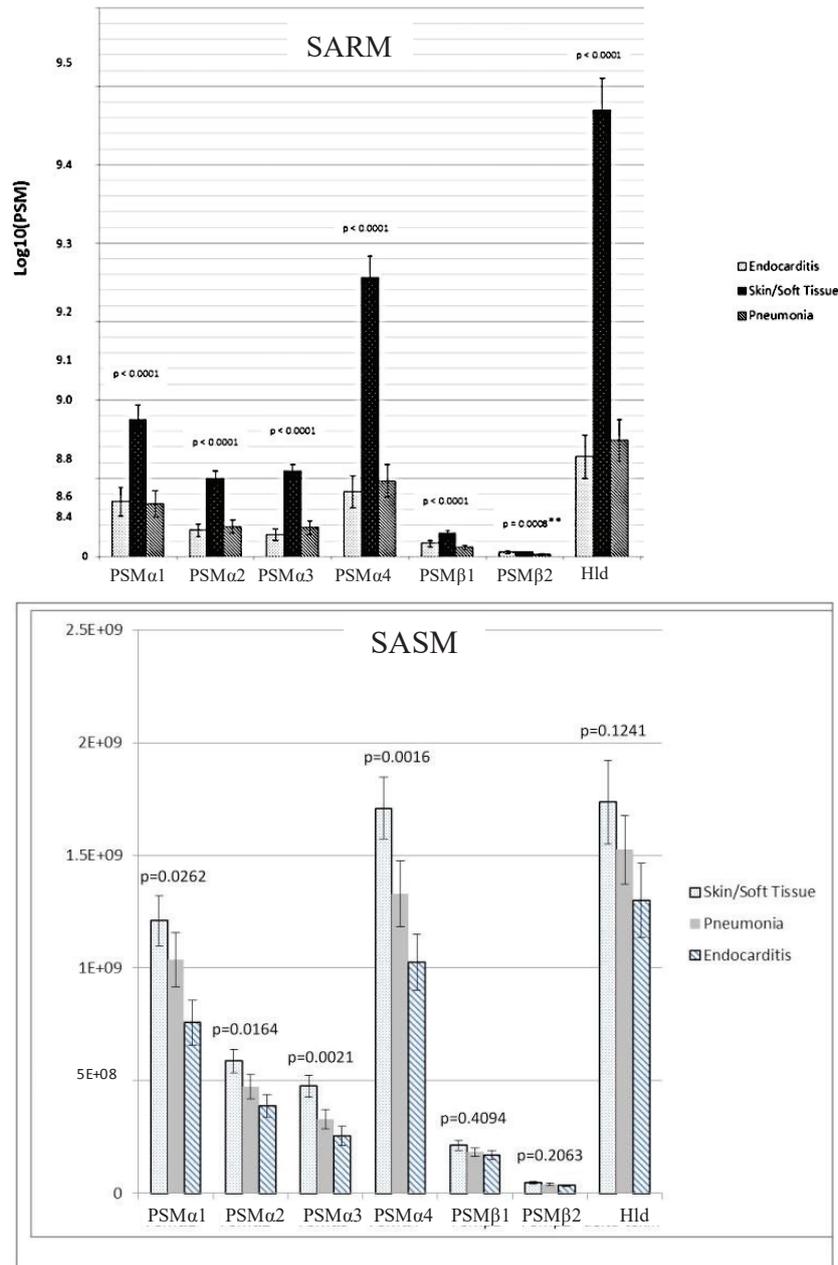


Figure 7 : Niveau d'expression de PSM α 1, PSM α 2, PSM α 3, PSM α 4, PSM β 1, PSM β 2 et Hld de différentes souches de *S. aureus*, discriminées en fonction du site infectieux. En haut, collection de souches de SARM isolées d'endocardites (n=59, histogramme blanc), d'infections cutanées (n=59, histogramme noir) ou de pneumopathies (n=59, histogramme gris). A bas, collection de SASM isolées d'infections cutanées (n=54, histogramme bleu clair), de pneumopathies (n=54, histogramme gris) ou d'endocardites (n=54, histogramme rayé blanc et bleu). D'après Berlon et al. 2015 ; Qi et al. 2016.

III. L'hémolysine alpha (Hla)

i. Structure et mécanisme d'action

L'hémolysine alpha (Hla) est une toxine protéique. Les monomères d'Hla s'oligomérisent en homoheptamère pour former des pores à la surface de cellules cibles, nécessitant la présence du récepteur ADAM10 (a disintegrin and metalloprotease 10) (Figure 8) (Wilke et Bubeck Wardenburg 2010).

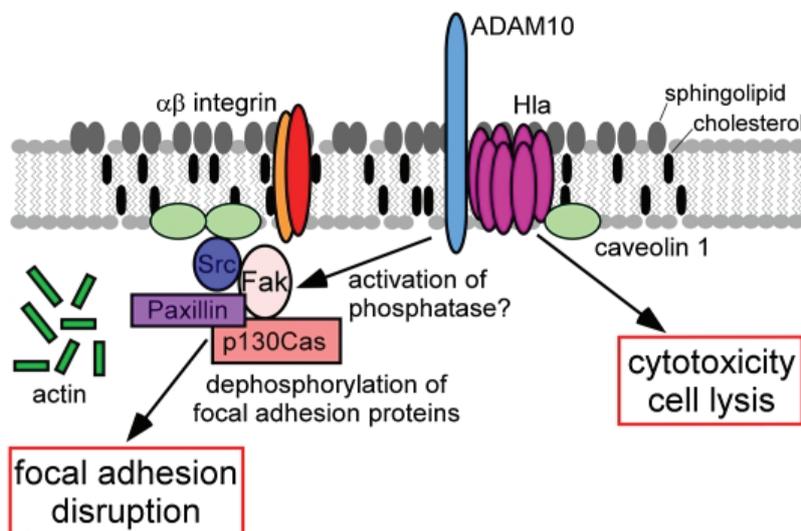


Figure 8 : Mécanisme d'action de l'Hla. Formation d'un heptamère d'hélice alpha à la surface des cellules cibles en regard d'un récepteur ADAM10. Ce pore transmembranaire, formant une structure de type « tonneau β », induit une cytotoxicité cellulaire et une rupture de l'adhésion intercellulaire. D'après Wilke et Bubeck Wardenburg 2010.

Ainsi, Hla a des propriétés lytiques, à forte concentration (ordre du μM), sur les érythrocytes humains, les monocytes humains, les lymphocytes T mais pas les PNN (Löffler et al. 2010; Nygaard et al. 2012; Berube et Bubeck Wardenburg 2013; Nygaard et al. 2013). De plus, Hla est une des principales toxines de *S. aureus* capable d'induire une rupture des barrières épithéliales et de la paroi endothéliale par clivage de la protéine cadhérine E des jonctions serrées (Inoshima et al. 2011; Powers et al. 2012), permettant de favoriser l'extension tissulaire et/ou la diffusion hémotogène de l'infection. En effet, la protéine cadhérine E est une des cibles de l'activité protéolytique du domaine à activité métalloprotéasique de l'ADAM10, induite par la liaison de Hla à celui-ci. Enfin, à plus faible concentration (ordre du nM) l'interaction entre Hla et son récepteur ADAM10 déclenche des activités immunomodulatrices des cellules endothéliales et épithéliales, avec production de cytokines pro-inflammatoires (Figure 9).

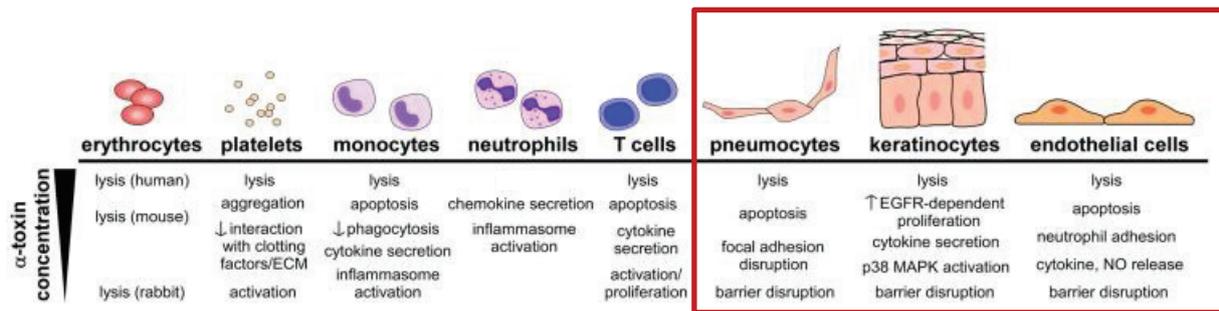


Figure 9 : Fonction biologique de l'Hla. En fonction de la concentration, Hla a soit une activité cytolytique, soit une activité immuno-modulatrice. Dans les infections à *S. aureus*, Hla a un rôle majeur dans l'expansion de l'infection par l'activation de l'activité métallo-protéase de l'ADAM10, son récepteur, induisant la rupture des jonctions intercellulaires des tissus « barrières » de l'organisme (encadré rouge), comme le tissu endothélial, épithélial et épiderme, permettant à l'infection de se propager plus facilement. D'après Berube et Bubeck Wardenburg 2013.

ii. Implication en clinique

A l'aide de modèles expérimentaux animaux d'infections en utilisant des souches sauvages de *S. aureus* et leur mutant isogénique délété en toxine, Δ Hla, il a été montré que Hla était un facteur de virulence staphylococcique impliqué dans les pneumonies, les infections cutanées, les bactériémies, les péritonites, les endocardites, les infections cornéennes et mamellaires (Berube et Bubeck Wardenburg 2013).

Concernant les infections cutanées, Kobayashi et al. ont montré sur leur modèle d'infections cutanées sur lapins, que la souche Δ Hla induisait un abcès sous-cutané de volume significativement inférieur à celui de la souche sauvage (Kobayashi et al. 2011). Récemment, il a été montré que l'administration d'anticorps monoclonal anti-Hla (MEDI4893) pouvait limiter l'étendue de l'infection cutanée sur un modèle d'infection dermo-nécrotique de souris (Hilliard et al. 2015) et de lapin (Le et al. 2016), démontrant que l'effet de la toxine pouvait être inhibée *in vivo*, au cours du processus infectieux.

iii. Épidémiologie des souches productrices d'Hla

Chez *S. aureus*, Hla est codée par le gène *hla*, porté par le « core » génome, indiquant que ce facteur de virulence est produit par toutes les souches de *S. aureus*. La traduction du gène *hla* conduit à la production d'un précurseur de 319 acides aminés, subissant par la suite une maturation pour donner une toxine active d'environ 33 KDa et constituée d'une séquence protéique de 293 acides aminés.

Il existe plusieurs génotypes d'Hla, dont certaines mutations, notamment celles touchant les histidines en position 35, 48, 144 et 259, entraînent une altération des fonctions biologiques de la toxine (Menzies et Kernodle 1994). De plus, des polymorphismes dans le promoteur du gène *hla* peuvent entraîner des modulations dans les niveaux d'expression de la toxine (Liang et al. 2011). Ainsi, certains auteurs ont rapporté que les SARM-C exprimaient plus Hla que les SARM-H, comme cela a été montré pour les PSM (Li et al. 2010; Tavares et al. 2014), et notamment que le clone de SARM-C ST93, en produisaient à très haut niveau (Chua et al. 2014).

IV. Régulation de l'expression des toxines chez *S. aureus*

Au cours du processus infectieux, *S. aureus* régule finement la production de ces facteurs de virulence afin d'optimiser sa chance de succès dans l'établissement puis l'extension de l'infection chez l'hôte. Ainsi, *S. aureus*, à faible densité cellulaire, exprime préférentiellement des molécules d'adhésion afin de coloniser les surfaces, alors qu'à plus forte concentration il produit des toxines et des enzymes lui permettant d'initier et d'étendre l'infection tout en échappant au système immunitaire (Figure 10) (Lowy 1998).

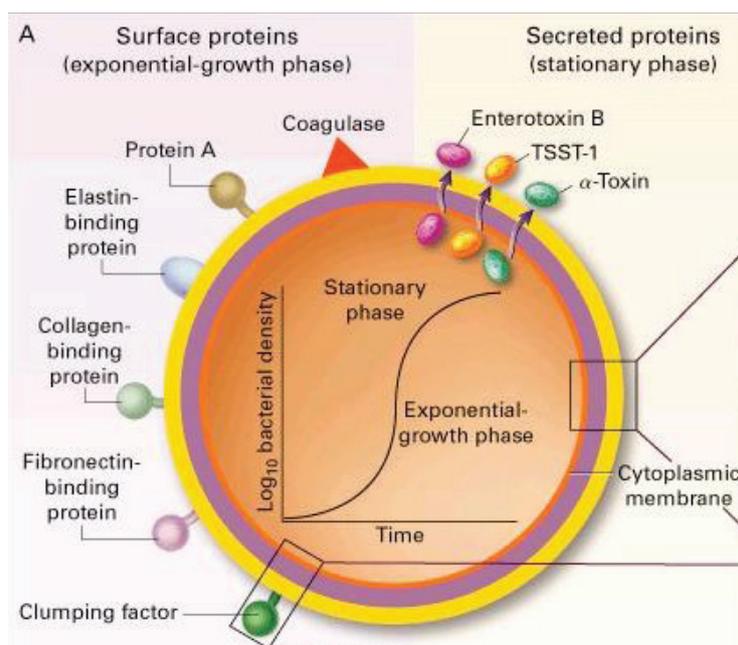


Figure 10 : Différentes phases de croissance d'une culture de *S. aureus*, associées à l'expression des facteurs de virulence. En phase exponentielle de croissance, le panel de facteurs exprimés comprend surtout des facteurs d'adhésion comme la protéine A, la coagulase, les protéines liant le fibrinogène et la fibronectine, favorisant l'adhésion aux surfaces et la colonisation. En phase post-exponentielle de croissance ou phase stationnaire, les facteurs de virulence exprimés sont composés de toxines excrétées ayant des propriétés cytolitiques et des protéases enzymatiques permettant l'établissement et l'expansion de l'infection. D'après Lowy 1998.

Les toxines formant des pores décrites précédemment sont donc plutôt produites en phase post-exponentielle de croissance, au moment de l'initiation et de l'expansion de l'infection. La régulation de leur expression nécessite la coordination de plusieurs processus régulateurs capables de percevoir les signaux environnementaux afin de s'adapter à chaque situation. Chez *S. aureus*, le principal système régulateur de « quorum sensing » est le système Agr.

i. Système de « quorum sensing » Agr

Le système Agr est un système régulateur à deux composants, permettant à *S. aureus* de moduler l'expression de ses facteurs de virulence en fonction de la densité bactérienne environnante, c'est-à-dire une communication cellule-cellule entre bactéries appelée « quorum-sensing ». Le gène *agr* comprend deux opérons distincts, appelés ARNII et ARNIII, de sens de lecture opposée et sous le contrôle transcriptionnel de deux promoteurs, P2 et P3 respectivement. L'opéron ARNII code 4

éléments du système Agr (AgrA, AgrB, AgrC et AgrD) et l'opéron ARNIII code l'ARNIII, correspondant à l'effecteur intracellulaire du système Agr (Bronesky et al. 2016).

Ce système est donc composé des acteurs suivants (Figure 11) :

- AgrD, précurseur intracellulaire du peptide phéromone ou peptide auto-inductible (AIP) extracellulaire, reflétant la densité bactérienne avoisinante.
- Le transporteur AgrB, permettant à la fois l'export d'AgrD dans le milieu extracellulaire et sa maturation en AIP.
- Le récepteur transmembranaire AgrC, capable de reconnaître AIP et de réagir à son accumulation dans l'environnement, activant la voie de signalisation intracellulaire du système Agr. L'activité kinase intracellulaire du récepteur déclenchée lors de son activation permet la phosphorylation de l'effecteur AgrA.
- Le facteur transcriptionnel effecteur AgrA, ayant comme cibles privilégiées les 2 promoteurs, P2 et P3 du système, permettant d'une part de rétro-contrôler positivement l'amplification du système Agr, d'autre part de permettre la transcription de l'ARNIII. Le facteur transcriptionnel AgrA permet également de déclencher directement la transcription des gènes codant les PSM.

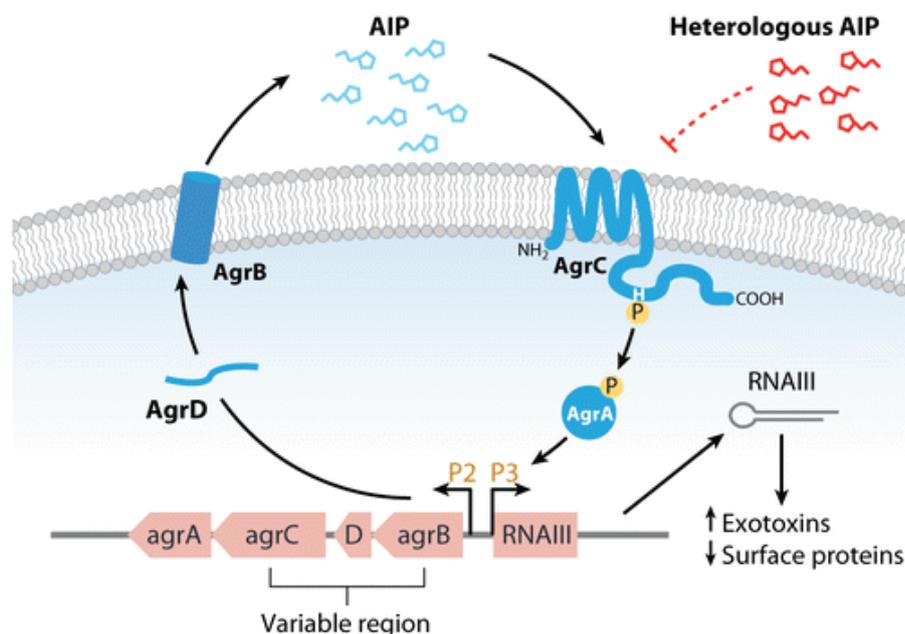


Figure 11 : Système de régulation à deux composants Agr chez *S. aureus*. Le peptide auto-inductible (AIP), provenant du précurseur intracellulaire AgrD, exporté et maturé par le transporteur AgrB, est reconnu par le récepteur transmembranaire AgrC. Cette reconnaissance active le site à activité protéine kinase de la partie intracellulaire du récepteur AgrC et entraîne la phosphorylation de l'effecteur intracellulaire AgrA. Le facteur transcriptionnel AgrA phosphorylé a pour cible les promoteurs P2 et P3 permettant la transcription des opérons ARNII et ARNIII, portant les gènes codant pour les éléments du système Agr d'une part, AgrA, AgrB, AgrC et AgrD et de l'ARNIII d'autre part. L'induction de la transcription de l'opéron ARNII permet donc une boucle d'amplification du système. L'ARNIII, véritable effecteur intracellulaire du système, permet de moduler l'expression des facteurs de virulence de *S. aureus* en promouvant l'expression des exotoxines au détriment des protéines de surface. Les régions variables AgrB, AgrD et AgrC signent la variabilité génétique des différents géotypes d'Agr. Les peptides AIP d'un géotype ne peuvent pas activer les récepteurs d'un autre type d'Agr, signant l'interférence moléculaire entre les différents géotypes d'Agr. D'après Novick et Geisinger 2008.

L'effecteur intracellulaire ARNIII est un ARN régulateur de 514 nucléotides possédant une structure complexe, composée d'un cadre de lecture dans sa région 5' codant l'Hld, et d'une majeure partie d'ARN non codant agissant comme régulateur de la traduction des ARNm (Figure 12). L'extrémité 3' et notamment la boucle 13, a la capacité de se lier préférentiellement aux ARNm possédant un site de liaison du ribosome dans une boucle 5', afin de former un complexe ARNIII-ARNm. Ce complexe est alors dégradé rapidement par une RNase III conduisant à l'arrêt irréversible de la traduction de l'ARNm en question. Ainsi, l'ARNIII réprime directement par un mécanisme anti-sens, la traduction des facteurs d'adhésion de *S. aureus* comme la protéine A, la coagulase et la protéine liant le fibrinogène SA1000. Inversement, l'ARNIII promeut directement l'activation de la traduction de Hla, car la fixation de sa boucle 4 à l'ARNm *hla* permet la libération du site de fixation au ribosome. De plus, la boucle 14 inhibe l'expression de la protéine régulatrice Rot (Repressor of toxin), possédant une activité pléiotropique positive sur l'expression de la protéine A et la coagulase, et négative sur l'expression de Hla, l'hémolysine β et les Hly B et C ainsi que de diverses sérines et cystéines protéases (Saïd-Salim et al. 2003). Enfin, à l'inverse, l'ARNIII améliore la traduction du régulateur MgrA par stabilisation de son ARNm, ce dernier possédant des activités répressives dans la formation du biofilm, l'autolyse et la production de protéines liées à la paroi pouvant intervenir dans l'adhésion, comme la protéine A (Bronesky et al. 2016).

En résumé, que ce soit de manière directe ou indirecte, l'ARNIII favorise le switch du phénotype « adhésion » vers le phénotype « infection » de *S. aureus*.

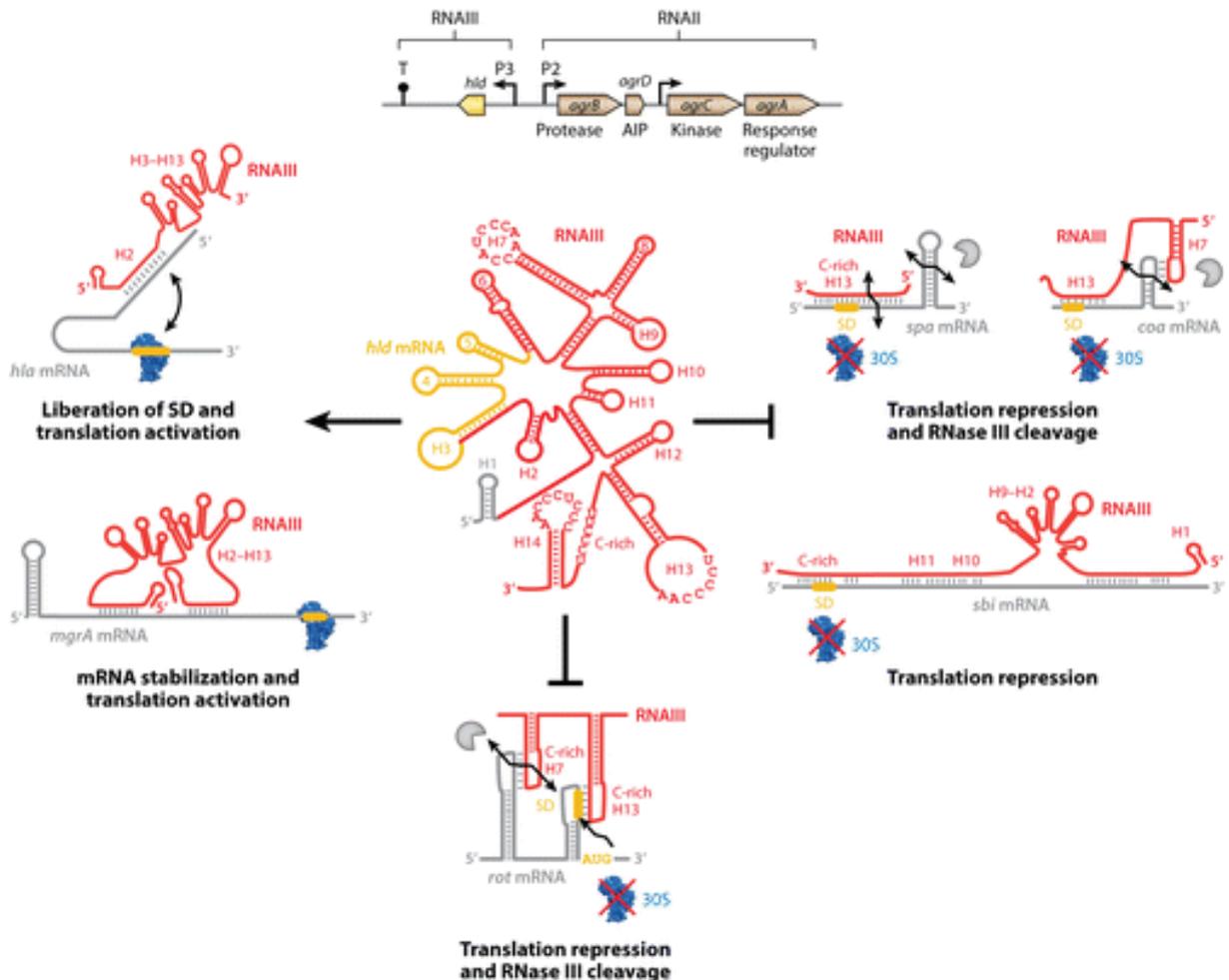


Figure 12 : Structure bidimensionnelle de l'ARNIII. Une partie codante de l'extrémité 5' code la toxine Hld. Les parties non codantes agissent de différentes manières sur les ARNm, permettant de moduler la traduction de différentes protéines : répression directe par un mécanisme anti-sens des ARNm codant les protéines de surface comme la protéine A et la coagulase, inhibition de la traduction de la protéine régulatrice Rot. A l'inverse, stabilisation de l'ARNm de la protéine régulatrice MgrA permettant de favoriser son expression, libération du site permettant la fixation du ribosome à l'ARNm de Hla induisant sa traduction. D'après Bronesky et al. 2016.

Ainsi, lorsque la bactérie est en début de phase exponentielle de croissance, correspondant à la phase de colonisation des surfaces, où la densité bactérienne est faible, le système Agr n'est pas activé. Au fur et à mesure que la croissance bactérienne augmente atteignant la phase post-exponentielle de croissance ou phase stationnaire, correspondant à la phase où *S. aureus* est prêt pour infecter l'hôte, la forte densité en peptide AIP dans l'environnement permet d'activer Agr. Au final, l'activation d'Agr déclenche la production et la libération de toxines cytolytiques promouvant l'établissement d'une infection aiguë, par la destruction de tissus et la formation importante de pus. D'ailleurs, il a été bien décrit dans la littérature que les souches de *S. aureus* possédant un système Agr fonctionnel produisait des infections aiguës (Traber et al. 2008; Bronesky et al. 2016), alors que les souches possédant un système Agr défectueux étaient plutôt reliées à des infections chroniques, comme des bactériémies persistantes sur cathéter (Fowler et al. 2004), des infections ostéo-articulaires chroniques (Valour et al. 2015) ou à un état de colonisation non infectieux (Shopsin et al. 2008). Enfin, il a été montré que les

SARM-C, et notamment le clone USA300, avaient des hauts niveaux de production d'ARNIII à l'état d'équilibre, pouvant expliquer leur capacité à produire des hauts niveaux de PSM et d'Hla et donc en partie leur grande virulence (Montgomery et al. 2010).

Au sein même de l'espèce *S. aureus*, il existe une certaine variabilité génétique dans les gènes codant le système Agr, et notamment dans les séquences de AgrB, AgrC et AgrD (et donc d'AIP), permettant de les réunir en quatre génotypes (Agr1, Agr2, Agr3 et Agr4). La réponse de « quorum-sensing » est basée sur une reconnaissance hautement spécifique de l'AIP pour son récepteur au sein de chaque génotype, interdisant donc la communication cellule-cellule entre deux souches de *S. aureus* présentant des systèmes Agr différents, et donc introduisant la notion d'interférence entre deux types d'Agr.

ii. Autres mécanismes de régulation

A côté du système Agr, d'autres systèmes régulateurs existent chez *S. aureus*, modulant l'expression des facteurs de virulence soit directement, soit indirectement *via* une action sur le système Agr ou sur l'ARNIII. Ainsi, le système Agr peut donc moduler ou être modulé par les autres systèmes régulateurs, aboutissant au final, à un système complexe et intriqué permettant à *S. aureus* de réguler l'expression de ses facteurs de virulence au plus près de ses besoins.

Les mécanismes régulateurs peuvent être soit des systèmes à deux composants comme le système Agr, soit des protéines régulatrices à qualité de facteur transcriptionnel comme Rot ou MgrA, soit des petits ARN non codants (Yarwood et Schlievert 2003).

Les systèmes à deux composants les plus importants après Agr sont :

- Le système SaeRS : comprenant le récepteur transmembranaire à activité intracellulaire histidine kinase SaeS et le facteur transcriptionnel SaeR. Ce système est affecté par différents stimuli environnementaux comprenant la variation de salinité, de pH, de la concentration en glucose environnante, la présence de peptides antimicrobiens de type HNP (Human neutrophil peptid) ou de certains antibiotiques (clindamycine, linézolide) dans le milieu et le stress oxydatif. Ce système est lui-même activé par Agr et réprimé par Rot et Sigma B. Ce système promeut la synthèse d'hémolysines (Bronesky et al. 2016; Liu et al. 2016).
- Le système ArlS : réprimant la production d'hémolysine et d'exo-enzymes, favorisant la formation de biofilm, l'activité autolytique et la production de pompes à efflux. Ce système est lui-même contrôlé par le facteur Sigma B (Yarwood et Schlievert 2003; Bronesky et al. 2016).
- Le système SrrAB : réprimant la transcription d'ARNIII et favorisant la survie de la bactérie dans des conditions de stress oxydatif et d'hypoxie. En effet, dans ces conditions précaires, la synthèse à haut niveau de toxines serait trop énergivore et donc délétère pour la bactérie. Le système SrrAB est lui-même inhibé par le système Agr permettant un retour à l'équilibre dès que les conditions redeviennent plus favorables à l'infection (Yarwood et al. 2001).

Quant aux protéines régulatrices pouvant se fixer directement à l'ADN au niveau de promoteur cible, nous pouvons citer :

- La protéine SarA (Staphylococcal accessory regulator A) : elle est nécessaire pour l'activation de la transcription de l'opéron ARNII du système Agr et interfère également directement avec un large panel de facteurs de virulence comprenant la promotion de l'expression des protéines liant le fibrinogène et la fibronectine, de l'Hla, et la répression de celle de la protéine A et de protéase. D'autres protéines de structures similaires en double hélice sont des homologues de SarA. Ainsi, SarR est un régulateur inhibant l'expression de SarA et agissant comme un répresseur d'Agr en déplaçant SarA du promoteur P2. Quant à SarS, cette protéine régulatrice promeut l'expression de la protéine A et réprime celle d'Hla, sa propre expression étant réprimé par Agr (Cheung et al. 2008; Bronesky et al. 2016).
- La protéine Rot : c'est un protéine homologue de SarA, régulée négativement par le système Agr et réprimant l'expression de nombreuses hémolysines à la faveur des protéines d'adhésion (Saïd-Salim et al. 2003).
- La protéine MgrA réprime la production de biofilm, l'activité autolytique et l'expression des protéines d'adhésion comme la protéine A et promeut la formation de la capsule. Son expression est améliorée par le système Agr (Bronesky et al. 2016).
- Le facteur alternatif Sigma B répond au stress environnemental en régulant négativement un grand nombre de systèmes de régulation dont Agr, SaeRS, ArlS et favorisant l'expression d'ARNs non codants comme RsaA, permettant d'orienter l'énergie de la bactérie vers la production d'adhésines et d'exoprotéines, donc de biofilm, plutôt que vers la croissance. C'est donc un élément déterminant pour la persistance intracellulaire de *S. aureus* et pour la chronicisation de l'infection (Tuchscher et Löffler 2016). De plus RsaA, petit ARN non codant, induit la répression de MgrA, promouvant ainsi le développement d'un phénotype de biofilms et favorisant également la chronicisation de l'infection (Romilly et al. 2014).

Chapitre 2 : Les mastocytes humains

I. Généralités

i. Description morphologique

Les mastocytes ont été découverts pour la première fois en 1878 par le scientifique Allemand Paul Ehrlich. Ces cellules sont facilement reconnaissables au microscope par la présence de très nombreuses granulations intra-cytoplasmiques, métachromiques, recouvrant entièrement la surface de la cellule (Figure 13). L'étude phylogénie générale montre que ces cellules sont présentes depuis le règne des invertébrés (Frossi et al. 2018).

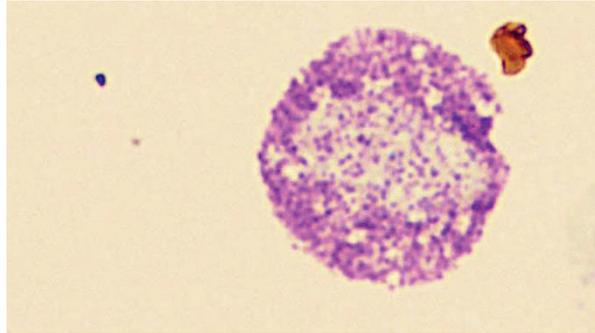


Figure 13 : Mastocyte isolé à partir de tissu cutané. Coloration au bleu de toluidine, grossissement X100, visualisation des granulations métachromiques violettes. Photo prise par nos soins.

Les mastocytes sont de véritables senseurs grâce à la présence à leur surface ou dans leur cytoplasme d'une grande variété de récepteurs. Ils ont la capacité de répondre à divers stimuli en libérant une diversité tout aussi importante de médiateurs. Les réponses au stimuli sont également variables en fonction des récepteurs et des voies d'activation impliqués, en terme de rapidité de réponse (très rapides lors de dégranulation, ralenties lors de synthèse), et d'étendue de réponse (localisée à généralisée, et dans ce dernier cas, souvent délétère pour l'hôte (exemple : réaction allergique pouvant aller jusqu'au choc anaphylactique) (Maurer et Pucillo 2018). Les mastocytes ont un rôle critique dans l'organisme vis à vis des maladies allergiques, auto-immunes, infectieuses, cardio-vasculaires, cancéreuses et d'immunodéficience (Varricchi et al. 2018).

Parmi la grande variété de récepteurs présents à la surface des mastocytes, certains sont caractéristiques comme le récepteur au Stem cell factor (SCF), également appelés c-Kit ou CD117, obligatoire pour la migration et le développement intra-tissulaire des mastocytes ; et le récepteur de haute affinité pour le fragment Fc des immunoglobulines E (IgE), le FcεRI, responsable de l'hypersensibilité de type I médiée par les IgE (Varricchi et al. 2018).

ii. Localisation, origine et classification des mastocytes

Bien qu'ils soient peu nombreux dans l'organisme, les mastocytes sont localisés à des endroits stratégiques, dans les tissus « barrières » comme la peau et les muqueuses (bronchiques, intestinales, ...). Cela leur permet d'être en première ligne dans la défense de l'hôte lors de l'intrusion d'un élément étranger.

Les mastocytes ont pour origine des cellules souches hématopoïétiques immatures CD34+, présentes dans la moelle osseuse puis dans le sang circulant, avant de migrer vers les tissus conjonctifs où elles finissent leur maturation. La maturation s'effectue sous l'influence de stimuli micro-environnementaux tels que le SCF mais aussi d'autres cytokines libérées par les cellules environnantes. Le phénotype définitif du mastocyte dépend donc du tissu « hôte » dans lequel il a mûri (Urb et Sheppard 2012; Varricchi et al. 2018).

Classiquement, il est admis de classer les phénotypes de mastocytes en fonction de la composition en protéase de leur contenu granulaire, type T pour « tryptase » (MC_T) et le type TC pour « tryptase, chymase » (MC_{TC}), ainsi que des schémas possibles de la dégranulation (Figure 14) (Galli et al. 2011).

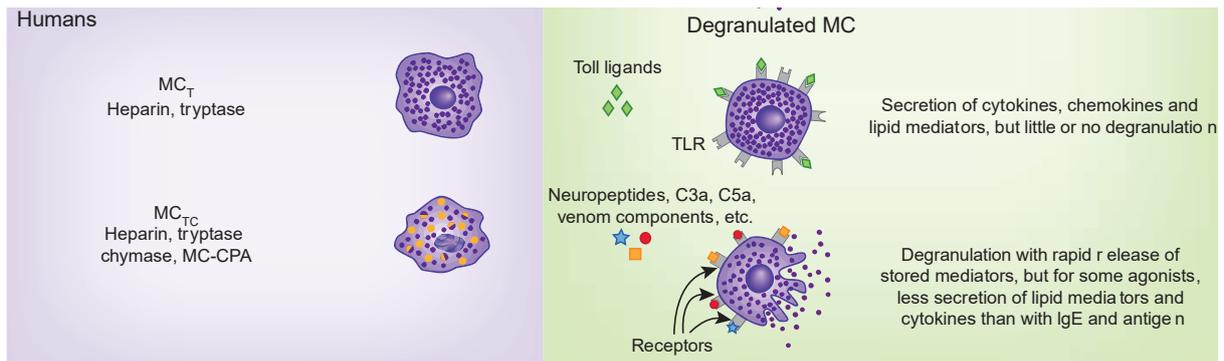


Figure 14 : Classification des différentes populations de mastocytes (MC) présents chez l'Homme, basée sur le contenu granulaire et les ligands induisant la dégranulation. Le type MC_T contient de l'héparine et de la tryptase dans ses granules, synthétise des médiateurs tels que les cytokines, prostaglandines, leucotriènes mais dégranule peu. Le type MC_{TC} contient de l'héparine, de la tryptase et de la chymase dans les granules et dégranule rapidement après stimulation de différents ligands. Le phénotype MC_T est notamment retrouvé dans le poumon et l'intestin alors que le phénotype MC_{TC} est retrouvé dans la peau et la cavité péritonéale. D'après Galli et al. 2011.

Cependant, cette classification ne met pas en évidence la très grande variété de mastocytes présente dans l'organisme et une revue récente propose un mode de classification basée sur leur localisation par organe, et au sein même de chaque organe, des variations selon le site anatomique (Figure 15). Cette variabilité physiologique est dictée par l'existence de fonctions spécifiques des mastocytes au sein de chaque tissu ainsi que des besoins exprimés pour ces fonctions (Frossi et al. 2018).

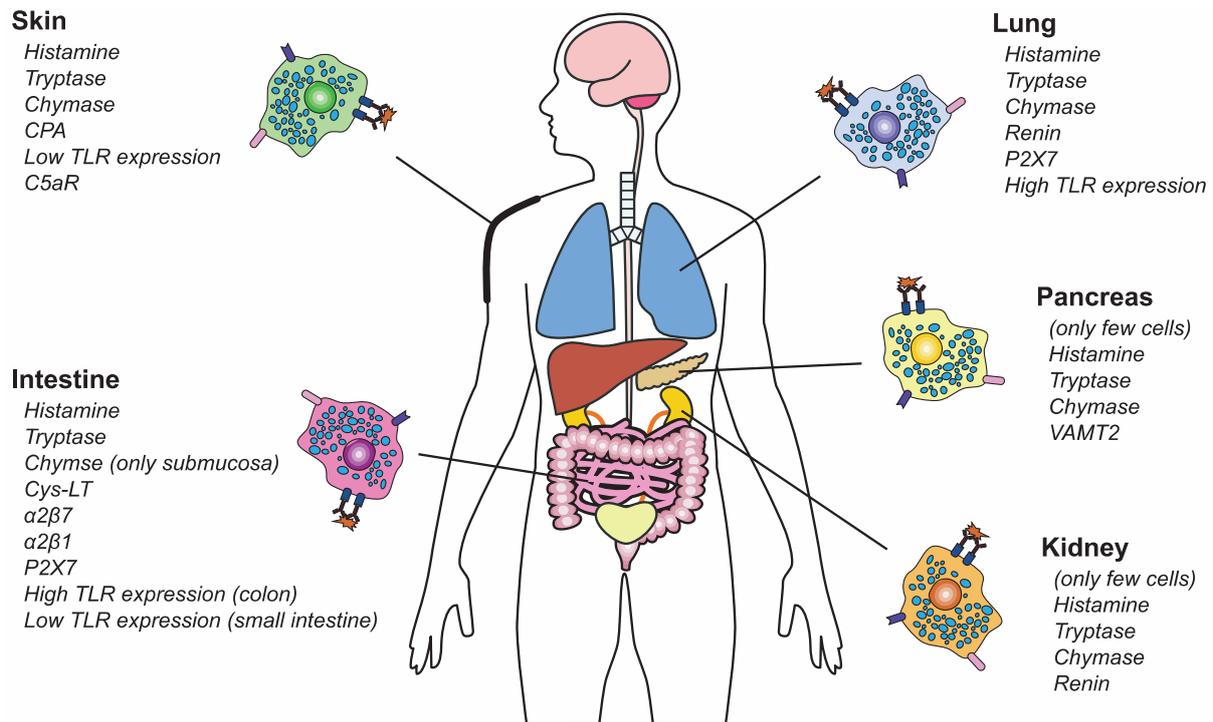


Figure 15 : Hétérogénéité des mastocytes selon les organes. En plus de l'expression de la tryptase et/ou de la chymase, chaque mastocyte dans son tissu synthétise et libère des médiateurs particuliers ayant des fonctions spécifiques pour l'organe. C5aR : récepteur au fragment C5a du complément, CPA : carboxypeptidase, Cys-LT : leucotriènes cystéinés. TLR : Toll-like receptor. $\alpha 2\beta 7$ et $\alpha 2\beta 1$: intégrines. P2X7 : récepteur purinergique. D'après Frossi et al. 2018.

Afin d'illustrer ces derniers propos, nous proposons de développer quelques exemples concernant les mastocytes cutanés. Concernant la densité en mastocytes présents dans le derme, celle-ci est supérieure dans la peau des parties du corps les plus exposées au milieu extérieur comme les avant-bras ou les membres inférieurs que dans la peau recouvrant le tronc et l'abdomen. Cette distribution non homogène répond ainsi au besoin physiologique de réponse aux stimuli (Janssens et al. 2005; Frossi et al. 2018). Cependant, une plus faible expression en récepteurs de surface de type Toll-like récepteur (TLR) et en récepteurs prurinerigiques P2X7 pour l'ATP extracellulaire est retrouvée sur les mastocytes cutanés par rapport à l'expression retrouvée sur les autres cellules de l'immunité (Motakis et al. 2014). Il a été proposé que cette différence d'expression en récepteurs permet de conserver un état homéostatique au niveau cutané en évitant une sur-stimulation mastocytaire (Kurashima et al. 2014). Ainsi, un ensemble d'éléments physiologiquement équilibrés permet de garantir une défense anti-infectieuse optimale au niveau des tissus « barrières » y compris de la peau. Toute rupture dans cet équilibre entraînant une stimulation accrue des mastocytes induit des effets néfastes pour l'hôte, avec l'apparition de pathologies diverses comme, au niveau cutané, l'urticaire, l'eczéma, le psoriasis et la dermatite atopique.

Dans la suite du document, nous développerons le rôle des mastocytes dans l'interaction hôte-pathogène, mettant en lumière leur fonction de sentinelle dans la détection des agents infectieux ainsi que leur mission centrale dans la mise en place du processus inflammatoire afin de les neutraliser.

II. Fonction immunitaire physiologique des mastocytes dans l'organisme

i. Les récepteurs

Pour détecter les modifications environnementales qui peuvent prendre la forme d'une intrusion d'un pathogène, les mastocytes sont dotés d'un très grand nombre de récepteurs reconnaissant différents ligands.

Les récepteurs les plus connus sont les FcεRI, responsables de l'allergie immédiate de type I médiée par les IgE. La stimulation de ce récepteur déclenche la dégranulation mastocytaire responsable des œdèmes, de l'inflammation et du prurit observés lors de ces réactions.

Les mastocytes possèdent d'autres récepteurs aux immunoglobulines, notamment des récepteurs pour le fragment Fc des IgG de différents types : FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB et FcγRIIIA (Redegeld et al. 2018).

Dans le cadre de l'immunité innée, les mastocytes sont également pourvus d'un grand nombre de récepteurs reconnaissant les « pathogen-associated molecular patterns » (PAMPs) et les danger-associated molecular patterns » (DAMPs), appelés les « pattern recognition receptors » (PRRs). La liste des principaux récepteurs PRRs exprimés par les mastocytes et les ligands (PAMPs) reconnus sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Liste des PRRs de surface et PRRs intracellulaires présents chez les mastocytes et leurs principaux ligands. LTA = Lipo-téichoïque acide ; PGN = peptidoglycane ; LPS = lipopolysaccharide ; CLR = C-type lectins receptors ; RLR = Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)-like receptors ; NLR = Nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptors. D'après Redegeld et al. 2018.

Récepteurs PRRs	Principaux ligands reconnus
TLRs de surface	
Hétérodimères TLR2/TLR1	- Lipopeptides tri-acétylés dérivés des bactéries et mycobactéries
Hétérodimères TLR2/TLR6	- Lipopeptides di-acétylés des mycoplasmes (MALP2) et des levures - LTA
TLR2	- PGN des bactéries à Gram positifs - Polysaccharides ou glycoprotéines dérivées de virus ou parasite
TLR4	- LPS des bactéries à Gram négatifs - Polysaccharides et glycoprotéines dérivés des virus et des parasites
TLR5	- Flagelline
TLRs intra-cellulaires endosomals	
TLR3	- ARN double brin viral
TLR7	- ARN simple brin viral
TLR8	- ARN simple brin viral
TLR9	- Dinucléotide CpG bactérien, mycobactérien et viral
CLRs de surface	
Dectin-1	- β -glucane des agents fongiques
RLRs cytoplasmiques	
RIG-I	- ARN double brin viral
MDA-5	- ARN double brin viral
LGP2	- ARN double brin viral
NLRs cytoplasmiques	
NOD1	- PGN
NOD2	- PGN
NLRP3	- PGN et ARNm bactérien
Surface CD48	- Adhésine FimH des pili (ou fimbriae) bactériens

Les mastocytes expriment également à leur surface des récepteurs couplés aux protéine G comme les récepteurs aux molécules du complément C3aR et C5aR (pour les mastocytes cutanés), des récepteurs aux endothélines et à d'autres neuropeptides et neurotransmetteurs, des récepteurs aux eicosanoïdes (prostaglandines (PGD) et leucotriènes (LT)) pouvant induire des actions autocrines et paracrines et des récepteurs prurineuriques. Ils possèdent également des récepteurs aux interleukines, notamment à l'IL-1 et à l'IL-33, et expriment à leur surface un certain nombre d'intégrines (CD29, CD49, CD49e, CD61, CD51, α 1 β , α 2 β 1, α 4 β 7) (Redegeld et al. 2018).

ii. Les médiateurs

Les mastocytes sont capables de synthétiser et excréter une myriade de médiateurs de différente nature (protéase, cytokines, PGD, LT, ...), dont la libération peut être extrêmement rapide (de l'ordre de la seconde) ou différée (de l'ordre de la minute ou de l'heure), en fonction de la voie de signalisation impliquée (Figure 16). Tout d'abord le mastocyte est capable de libérer son contenu granulaire composé principalement de protéases (tryptase, chymase), d'histamines et de TNF- α (tumor necrosis factor) en quelques secondes. Ces médiateurs sont préformés et conservés dans les granules en attendant leur libération par dégranulation. Par la suite, le mastocyte est capable de synthétiser, dans les minutes qui suivent une activation, des éicosanoïdes à partir de lipides comme les PGD et les LT, puis dans l'heure qui suit, des chimiokines et cytokines. Enfin, après activation, le mastocyte est capable de régénérer son contenu granulaire et même de se multiplier en attendant un nouveau stimulus (Abraham et St John 2010).

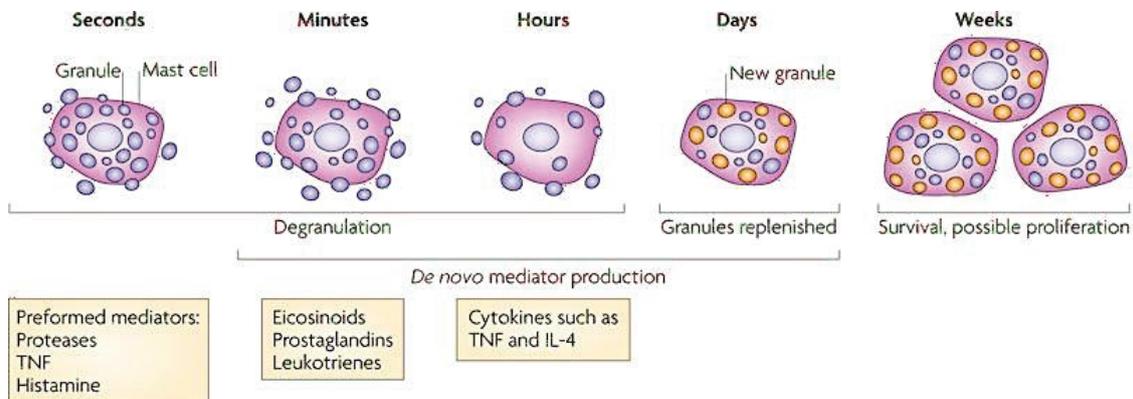


Figure 16 : Différents médiateurs libérés par les mastocytes en fonction du temps. Après stimulation, le mastocyte a la capacité de dégranuler dans les secondes qui suivent, libérant ainsi son contenu granulaire (protéase, histamine, TNF- α préformé) puis il est capable de synthèse *de novo* des prostaglandines, leucotriènes, cytokines et chimiokines. D'après Abraham et St John 2010.

Les principaux médiateurs synthétisés et libérés par les mastocytes sont listés dans l'annexe 1. Selon le schéma d'activation du mastocyte et en fonction du type mastocytaire, le panel de médiateurs libérés sera différent.

iii. Fonctions physiologiques lors du processus infectieux

Rôle de sentinelle

Grâce à l'ensemble de ces récepteurs, les mastocytes reconnaissent et réagissent face à l'intrusion d'un agent pathogène dans l'organisme, dans le cadre de l'immunité innée. Dans le cas d'une bactérie, ce sont notamment les PAMPs qui déclenchent les réponses mastocytaires.

Pour les bactéries à Gram positif, le PGN de paroi permet l'activation des mastocytes *via* le TLR-2 provoquant la dégranulation mastocytaire, contrairement à l'activation médiée par les autres TLRs. Elle entraîne donc la libération de facteurs promouvant le recrutement de cellules phagocytaires (PNN et macrophages) sur le site de l'infection, comme l'histamine qui favorise la diapédèse, grâce à son action vaso-active augmentant la perméabilité vasculaire et son action modulatrice de l'expression

d'adhésines à la surface de l'endothélium. L'activation *via* le TLR-2 provoque également la production d'un panel large de cytokines, majoritairement d'IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, TNF- α , IFN γ , GM-CSF, et des LT cystéinées, LTB4 et PGD2. Cette production de cytokines est induite par l'activation de voies de signalisation intracellulaires dépendantes de la protéine adaptatrice MyD88 (Myeloid differentiation primary response 88) conduisant à la production de facteurs transcriptionnels comme NF- κ B, AP-1 ou p38 et JNK (voie des MAP-kinases) (Redegeld et al. 2018). Pour les bactéries à Gram négatif, la reconnaissance du lipopolysaccharide (LPS) par le TLR-4 n'entraîne pas la dégranulation mastocytaire, mais libère un cocktail de cytokines pro-inflammatoires comprenant entre autres TNF- α , IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, GM-CSF, des LT cystéinées et des chimiokines (CCL1, CCL2, CCL3, CXCL2). Cette libération est médiée par une voie de signalisation intracellulaire dépendante aussi de MyD88 permettant la production des facteurs transcriptionnels suivants : AP-1, NF- κ B et IRF-5. La stimulation des mastocytes par la flagelline *via* le TLR-5 est moins étudiée et entraînerait la libération d'IL-1 β et de TNF- α , également *via* une voie dépendante de MyD-88 (Redegeld et al. 2018).

L'activation des PRRs de surface peut être accompagnée d'une activation des PRRs cytoplasmiques comme les récepteurs TLR-9, NOD et NLRP3. La reconnaissance cytoplasmique de l'oligonucléotide CpG par le TLR-9 ne déclenche pas la dégranulation mais induit la libération de LT cystéinées, IFN α , IFN γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6 et de chimiokines (CCL2, CCL5 et CXCL2), selon une fois de plus une voie de signalisation dépendante de MyD88 (Redegeld et al. 2018). L'activation de NOD1 et NOD2 *via* le PGN promeut la production de d'IL-8, de TNF- α et de chimiokines (CCL3, CCL4). Cette activation utilise comme effecteur cellulaire la voie du NF- κ B et des MAP kinases. Le récepteur NLRP3, quant à lui, lors de son activation, favorise la formation d'un inflammasome, permettant la maturation des cytokines pro-inflammatoires (Redegeld et al. 2018).

Globalement, la reconnaissance des éléments bactériens par les mastocytes déclenche la libération d'un cocktail cytokinique plutôt pro-inflammatoire, favorisant l'initiation et le développement du processus inflammatoire. Notamment, le mastocyte est la seule source connue de TNF- α préformé, à libération extrêmement rapide. Le mastocyte a donc le rôle de sentinelle dans la détection du pathogène et de « lanceur d'alerte » dans la participation à l'initiation de la réponse inflammatoire immunitaire lors de l'intrusion d'un agent pathogène. En outre, il possède une activité antibactérienne propre en mettant en jeu différents mécanismes.

Fonction antimicrobienne directe

Dans le cadre de l'immunité innée, les mastocytes sont également capables d'avoir une activité antibactérienne directe par différents mécanismes. Tout d'abord, les mastocytes sont capables de phagocyter les bactéries et les levures puis de produire des radicaux libres oxygénés (Malaviya et al. 1994; Pinke et al. 2016). Ensuite, les mastocytes sont capables de synthétiser et de libérer des peptides antimicrobiens naturels, de la famille des cathélicidines, suite à leur activation par le LPS ou l'acide

lipotéichoïque (LTA) (Di Nardo et al. 2003). Enfin les mastocytes sont capables d'induire la formation de pièges extracellulaires, appelés « mast-cell extracellular traps » (MCETs), analogues aux NETs formés par les PNN et composés d'un mélange d'ADN nucléaire, de composés granulaires et de peptides antimicrobiens. Les MCETs forment des sortes d'extensions dendritiques extracellulaires permettant d'enchâsser et de tuer les micro-organismes envahisseurs (von Köckritz-Blickwede et al. 2008; Möllerherm et al. 2016). Ce processus est un processus actif, modulé par un facteur transcriptionnel central dans la réponse cellulaire au stress hypoxique, l'HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor 1 α) (Möllerherm et al. 2016).

Rôle dans la communication avec les cellules environnantes non immunitaires

Outre l'initiation du processus inflammatoire avec facilitation du recrutement de cellules phagocytaires professionnelles (PNN et macrophages) sur le site de l'infection et l'activité antimicrobienne directe, les mastocytes communiquent *via* les différents médiateurs libérés avec d'autres cellules environnantes, concourant à la clairance de l'agent pathogène. En effet, certains médiateurs comme les LT favorisent la contraction des muscles lisses sous-jacents aux muqueuses envahies, favorisant l'expulsion de virus respiratoires ou de parasites intestinaux (Abraham et St John 2010; St John et Abraham 2013). De plus, il est important de noter que les mastocytes sont physiologiquement situés à proximité très proche des terminaisons nerveuses, permettant une communication intercellulaire étroite entre ces deux types cellulaires. Les mastocytes participent ainsi largement au ressenti douloureux lors du processus inflammatoire ainsi qu'à la réaction pruritogène. Les médiateurs mastocytaires les plus impliqués dans la transmission de l'influx douloureux et pruritogène sont l'histamine, la tryptase, la substance P et le NGF (Zhu et al. 2015; Gupta et Harvima 2018). Dans le cadre pathologique, c'est cette interaction mastocytes-système nerveux qui est à l'origine de la sensation de douleur ou de prurit (psoriasis, dermatite atopique, ...). En outre, dans le cas d'une invasion parasitaire intestinale à helminthes, la communication mastocytes-neurones pourrait favoriser la motilité intestinale conduisant à l'expulsion du parasite (St John et Abraham 2013).

Rôle dans l'immunité adaptative

Le rôle des mastocytes dans l'immunité adaptative est moins important que celui qu'ils tiennent dans l'immunité innée. Cependant, ils peuvent la moduler sur plusieurs aspects. Tout d'abord, le TNF- α libéré permet d'induire l'expression localisée de la sélectine-E par les cellules endothéliales permettant, après le recrutement de cellules phagocytaires, le recrutement de cellules dendritiques. De plus, la chimiokine CCL20 promeut aussi le recrutement de précurseurs de cellules dendritiques sur le site de l'infection, alors que la chimiokine, CCL5, de son côté, recrute des effecteurs cellulaires T. Les cellules dendritiques recrutées serviront par la suite de cellules présentatrices de l'antigène (CPA) aux lymphocytes T (Abraham et St John 2010). Ensuite, il a été montré que dans une moindre mesure, les mastocytes pouvaient faire office de CPA, notamment pour les lymphocytes T CD8 cytotoxiques *via*

le CMH de type I (Stelekati et al. 2009) mais aussi pour les lymphocytes T CD4 *via* le CMH de type II (Gong et al. 2010), notamment si les mastocytes sont pré-stimulés avec de l'IFN γ (Lotfi-Emran et al. 2018). Enfin, les mastocytes favoriseraient la rétention des lymphocytes B dans les nodules lymphatiques augmentant la probabilité de rencontre entre les lymphocytes spécifiques de l'antigène et les cellules dendritiques présentant l'antigène, garantissant une production efficace et spécifique d'anticorps et ainsi une immunité humorale efficace. Les mastocytes pouvant, par la suite, fixer les IgG par leur fragment Fc seront alors sensibilisés pour cet antigène et répondront plus rapidement lors d'une nouvelle intrusion de celui-ci (Abraham et St John 2010).

Rôle inhibiteur pour un retour à l'homéostasie

Après élimination du pathogène, les mastocytes sont capables d'inhiber physiologiquement leur composante pro-inflammatoire et de modifier le panel de médiateurs libérés vers une composante anti-inflammatoire afin de favoriser le retour à l'équilibre et ainsi prévenir les effets potentiellement délétères de leur activation prolongée. Les mastocytes sont en effet une source non négligeable d'IL-10, anti-inflammatoire, ainsi que de nombreux facteurs de croissance cellulaire, notamment le TGF- β , mais également VEGF, PDGF et FGF2, promouvant la cicatrisation tissulaire et la réparation des vaisseaux sanguins et inhibant la fonction pro-inflammatoire des macrophages et des cellules dendritiques (St John et Abraham 2013). Cette fonction dans la réparation des blessures serait permise par un changement de phénotype des mastocytes sous influence des stimuli micro-environnementaux au cours du processus de cicatrisation (Wulff et Wilgus 2013).

Effet délétère d'une réponse excessive des mastocytes au cours des infections

Malgré leur rôle majeur dans le rôle contre les infections, il existe certaines situations où la sur-activation mastocytaire devient néfaste pour l'hôte, notamment lorsque celle-ci devient chronique ou incontrôlée. C'est le cas, par exemple, dans le cadre de la dermatite atopique, où la colonisation par *S. aureus* assure une activation en continu des mastocytes cutanés selon plusieurs mécanismes (PGN, facteurs de virulence, *via* les IgE) (Geoghegan et al. 2017) ou dans la mucoviscidose, où la colonisation par *Pseudomonas aeruginosa* favorise l'inflammation pulmonaire avec afflux de PNN, entre autre par la libération de TNF- α et IL-1 par les mastocytes bronchiques activés (Lin et al. 2002). De même, il a été montré que dans un modèle expérimental de sepsis sévère à entérobactérie par CLP (cecal ligation and puncture) chez la souris, l'hyper-inflammation menant à une issue fatale pour l'hôte, de manière indépendante à l'élimination du pathogène, avait pour origine une dysrégulation du processus immunitaire induit en partie par le TNF- α libéré par les mastocytes (Piliponsky et Romani 2018).

En résumé, les mastocytes ont un rôle clé dans la réponse immunitaire mise en place suite à l'intrusion dans l'hôte d'un agent pathogène. Cette réponse est ciblée en fonction du stimulus ressenti par le mastocyte et déclenche en cascade une multitude d'action par différents types cellulaires effecteurs

(Figure 17). Cependant, cette réponse peut être parfois mal régulée et devenir délétère pour l'hôte. *S. aureus* est un pathogène majeur de l'Homme et son interaction avec les mastocytes a largement été étudiée, notamment via le PGN. Nous proposons donc maintenant de faire une revue de la littérature des effets de *S. aureus* sur les mastocytes, avec une discussion des effets bénéfiques ou délétères pour l'Homme.

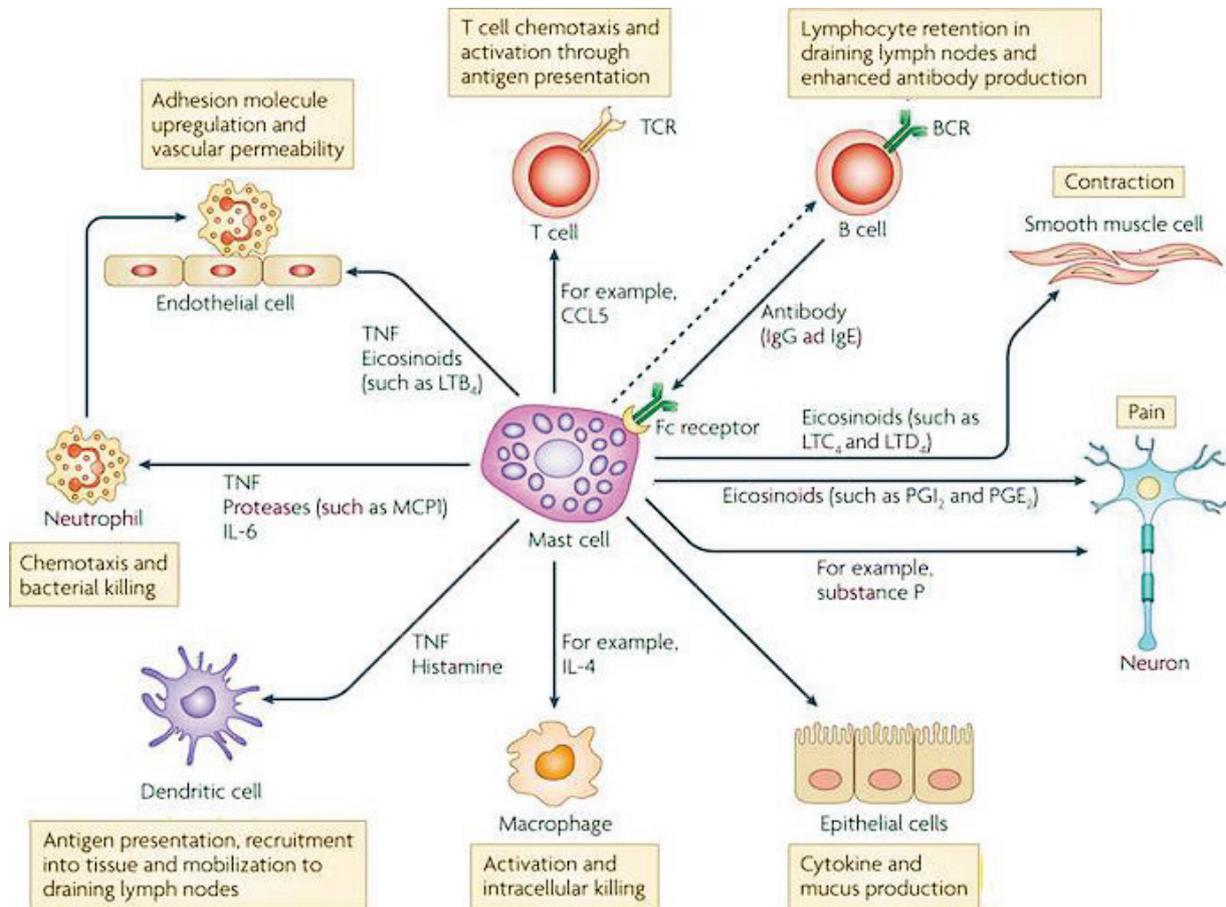


Figure 17 : Place centrale du mastocyte dans la communication cellulaire lors de la réaction immunitaire contre un pathogène. Suite à la reconnaissance du pathogène, le mastocyte permet une cascade d'action dirigée contre l'agresseur concourant à son élimination. Cela comprend la mise en action de l'immunité innée mais aussi de l'immunité adaptative. Tout d'abord, dans le cadre de l'immunité innée, la libération très rapide de TNF- α permet le recrutement de PNN sur le site de l'infection par diapédèse, recrutement d'autant plus aisé qu'il est facilité par une augmentation de la perméabilité vasculaire (histamine, leucotriène, prostaglandines), une augmentation de l'expression d'adhésines par les cellules endothéliales permettant la capture et par la libération de chimiokines attirant les PNN. Les chimiokines participent également au recrutement et à l'activation des macrophages. L'histamine libérée favorise également la production de mucus par les cellules épithéliales, emprisonnant l'agent pathogène. Les LT et PGD, quant à elles, favorisent la contraction des cellules musculaires lisses permettant l'expulsion du parasite (cas des helminthiases intestinales). En outre, le mastocyte participe à l'immunité adaptative en promouvant le recrutement de cellules dendritiques qui iront présenter l'antigène aux cellules B retenus dans les ganglions lymphatiques. Ce mécanisme participe ainsi à la production d'anticorps de haute spécificité pour l'antigène. Le mastocyte peut également activer les lymphocytes T cytotoxique en se comportant lui-même comme une CPA. Enfin, la proximité entre mastocytes et terminaisons nerveuses favorise la transmission de l'influx douloureux *via* les neurotransmetteurs et autres peptides nociceptifs libérés par les mastocytes. D'après Abraham et St John 2010.

III. *Staphylococcus aureus* et mastocytes dans la littérature

Les mastocytes ont un rôle essentiel dans l'immunité innée face aux pathogènes infectieux et notamment vis à vis de *S. aureus*. Il existe donc une interaction très riche entre mastocytes et *S. aureus*, que ce soit dans un sens (effet de *S. aureus* sur les mastocytes) comme dans l'autre (effet des mastocytes sur *S. aureus*).

S. aureus est capable d'agir de multiples façons sur les mastocytes, grâce aux divers ligands générés par la bactérie, tels que les constituants de la paroi des bactéries à Gram positif ou les toxines sécrétées. Ces ligands sont reconnus par différents récepteurs présents à la surface des mastocytes et provoquent donc des impacts différents. Avant de s'intéresser aux effets de *S. aureus* sur les mastocytes, il convient de décrire brièvement les différents moyens d'étudier ce type cellulaire et d'en comprendre la complexité.

i. Les moyens d'étudier les mastocytes

Les moyens d'études des mastocytes *in vitro* sur lignées cellulaires ou *in vivo* sur modèles expérimentaux animaux sont divers et la multitude des phénotypes observés physiologiquement pour ces cellules explique pourquoi certains résultats peuvent parfois être différents en raison de la nature des mastocytes ou du modèle expérimental testés (Sur et al. 2007; Galli et al. 2015).

Afin d'étudier les mastocytes *in vitro*, il est tout d'abord possible d'utiliser des lignées cellulaires mastocytaires humaines comme la lignée HMC-1 ou LAD2 ou des lignées murines comme M/C9. Il est également possible d'obtenir des mastocytes dérivés de moelle osseuse (BMMC, Bone-marrow derived mast cells), de sang de cordon (CBMC, Cord-blood derived mast cells) ou même de sang périphérique, après différenciation des cellules immatures en mastocytes par adjonction de SCF. Ensuite, des techniques développées récemment permettent d'extraire les mastocytes primaires de différents tissus humains ou murins (peau, poumon, péritoine (PCMC, peritoneal-cell derived mast cell) puis de les subcultiver pour en obtenir de grande quantité (Kambe et al. 2001; Malbec et al. 2007; Kulka et Metcalfe 2010).

Enfin, concernant les modèles animaux expérimentaux d'infection *in vivo*, le modèle historique était de comparer des souris sauvages à des souris déficientes en mastocytes selon un processus dépendant du c-kit. La déficience en mastocytes matures était alors obtenue en mutant le récepteur c-kit et en empêchant la maturation et différenciation des mastocytes dans les différents tissus. Cette technique soulève plusieurs interrogations : d'une part ce processus ne permet pas la « complémentation » en mastocytes matures des souris déficientes, et d'autre part, la mutation du récepteur c-kit peut potentiellement avoir d'autres altérations *in vivo* dont le périmètre n'est pas connu. C'est pourquoi, certains auteurs tendent à recommander l'utilisation de méthodes de déplétion en mastocytes indépendante du c-kit, ou même d'étudier une seule fonction à la fois du mastocytes en mutant uniquement les cibles étudiées voulues (Galli et al. 2015).

Nota Bene : dans la suite du paragraphe, le terme « infection » entre « » signifie qu'une partie seulement de la bactérie (peptidoglycane ou toxine) a été introduite dans un modèle *in vitro* ou *in vivo*. Le terme infection signifie que la bactérie vivante a été utilisée pour produire une véritable infection.

- ii. Reconnaissance et effet des éléments de la paroi : peptidoglycane et acide lipotéichoïque

Le constituant le plus étudié dans l'interaction mastocytes - *S. aureus* semble être le PGN. Celui-ci est reconnu par le TLR-2 à la surface des mastocytes. Plusieurs auteurs rapportent que l'activation des mastocytes murins (BMMC) ou humains (HMC-1, CBMC) par le PGN de *S. aureus* via le TLR-2 entraîne la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , l'IL-4, IL-5, IL-6 et l'IL-13 (Supajatura et al. 2002; Ikeda et Funaba 2003; Qiao et al. 2006), de LT cystéinées (Bąbolewska et al. 2012), ainsi que des médiateurs préformés composant le contenu granulaire comme l'histamine (Wu et al. 2007), la sérotonine (Feng et al. 2007) ou la β -hexosaminidase (Supajatura et al. 2002). La libération de ces derniers médiateurs signe la dégranulation mastocytaire. Cette dégranulation est possible car la stimulation de TLR-2 par le PGN induit un influx calcique dans le milieu intracellulaire, déclenchant la libération des granules intra-cytoplasmiques (Supajatura et al. 2002). Ensuite, le LTA de *S. aureus*, autre composé majeur de la paroi des bactéries à Gram positif, a été identifié comme étant également la cible du TLR-2 à la surface des mastocytes. Cette reconnaissance induit la libération de LT cystéinées (Brzezińska-Błaszczyk et Rdzany 2007; Bąbolewska et al. 2012), de TNF- α et IL-8 (mastocytes humains LAD2 et CBMC) (Imajo et al. 2009). De manière intéressante, en utilisant un inhibiteur du facteur nucléaire NF κ -B, Babolewska et al. ont montré que la libération de LT cystéinées par les mastocytes suite à la stimulation du PGN et du LTA était dépendante de la voie du NF κ -B. La reconnaissance du LTA par les mastocytes humains (lignée LAD2) a aussi pour conséquence d'augmenter leur production en récepteur CR-3 de surface, promouvant ainsi la opsonophagocytose de *S. aureus*, CR-3 étant le récepteur permettant de reconnaître l'opsonine iC3b produite par le clivage du fragment C3 du complément (Imajo et al. 2009). Enfin, de manière indirecte, une récente étude a montré le rôle du LTA staphylococcique, incluant *S. aureus*, présent dans le microbiote cutané, dans la promotion de la maturation des mastocytes cutanés présents dans le derme, *via* la libération de SCF par les kératinocytes (Wang et al. 2017) (Figure 18).

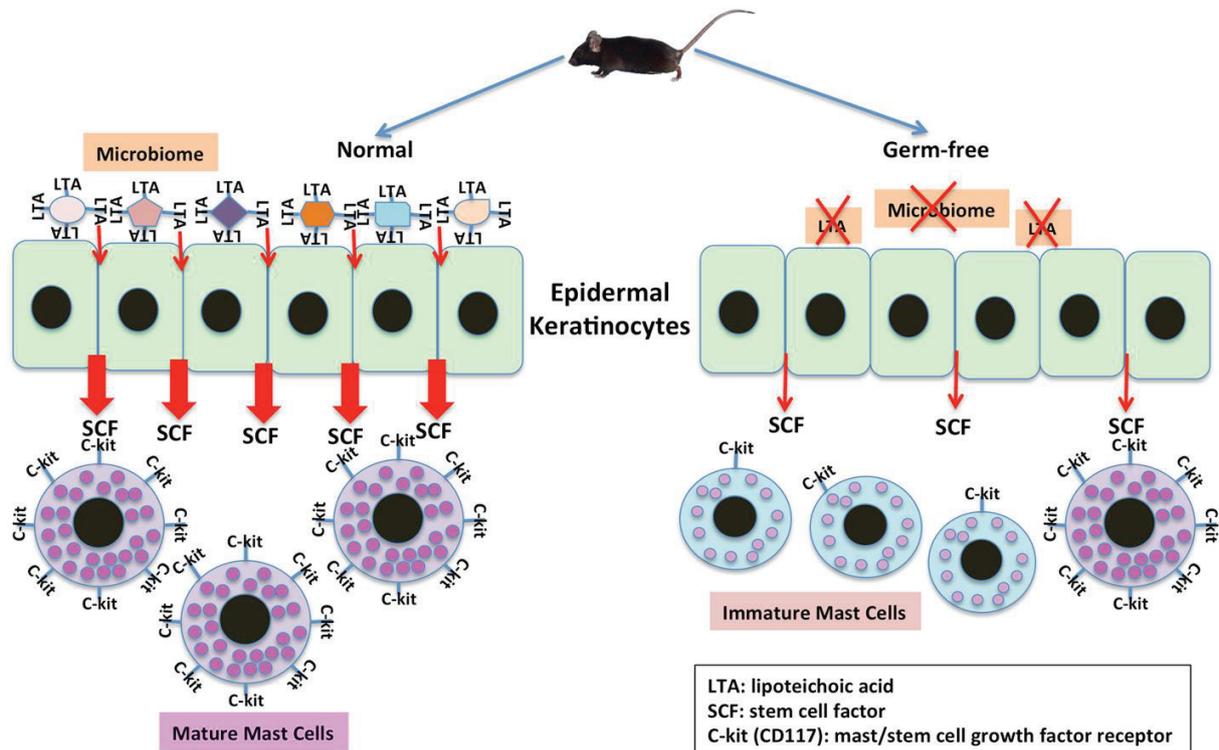


Figure 18 : Effet du LTA du microbiote cutané sur la maturation des mastocytes cutanés. Chez les souris normales, le LTA présents dans la paroi des bactéries à Gram positif, dont les staphylocoques, constituant le microbiote cutané induit la production de SCF par les kératinocytes, médiateurs indispensables à la maturation des mastocytes présents dans le derme sous-jacent. Chez les souris sans microbiote (Germ-free), la production moindre de SCF par les kératinocytes rend difficile la maturation des mastocytes cutanés, qui ne peuvent donc pas jouer leurs fonctions physiologiques ou pathologiques. D'après Wang et al. 2017.

D'autres types de récepteurs mastocytaires et notamment des récepteurs intracellulaires de type NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) ont été montrés comme étant la cible du PGN de *S. aureus*. Ainsi, Wu et al. ont mis en évidence la reconnaissance du PGN par le récepteur NOD2 (Wu et al. 2007), et Feng et al., par le récepteur NOD1 (Feng et al. 2007). Dans cette dernière publication, Feng et al. ont montré que l'administration orale de PGN de *S. aureus* chez la souris entraînait des troubles digestifs à type diarrhée, due à la dégranulation des mastocytes de la muqueuse intestinale *via* l'activation de TLR-2 et NOD1.

Enfin, sur un modèle murin d'« infection » cutanée comparant des souris sauvage, possédant des mastocytes actifs, et des souris déficientes en mastocytes fonctionnels (par mutation du *c-kit*), Supajatura et al. ont mis en évidence que l'injection intradermique de PGN de *S. aureus* au niveau de l'oreille entraînait une réaction cutanée inflammatoire aiguë, objectivée par une augmentation de la perméabilité vasculaire déclenchée par la dégranulation des mastocytes cutanés *via* TLR-2 (Supajatura et al. 2002). En effet, dans cette étude, les souris déficientes en mastocytes affichaient une inflammation moindre suite à l'injection de PGN que les souris sauvages. Par la suite, une autre étude a montré que l'application percutanée, à travers une brèche cutanée au niveau de la paroi abdominale, de PGN induisait un influx massif de mastocytes dans le derme, notamment grâce à la synthèse de TGF- β 1 par les kératinocytes de l'épiderme (Matsui et Nishikawa 2005). Globalement, l'ensemble de

ces données montre que la reconnaissance du PGN de *S. aureus* au niveau cutané par les mastocytes du derme déclenche une réaction inflammatoire majeure à travers leur dégranulation TLR-2 dépendante, phénomène amplifié par le recrutement de mastocytes sur le site de l'infection médié par les kératinocytes.

iii. Reconnaissance et effet des toxines et autres facteurs solubles

S. aureus étant producteur d'un grand nombre de toxines sécrétées, la littérature fait également référence à l'action de ces toxines sur les mastocytes.

Tout d'abord, les superantigènes staphylococciques, et notamment les entérotoxines A et B (SEA et SEB), sont capables d'induire la libération de sérotonine suite à leur reconnaissance par des récepteurs non encore identifiés à la surface des mastocytes de rongeurs (Komisar et al. 1992; Ono et al. 2012). Ono et al. ont montré que cette libération de sérotonine se faisait par dégranulation des mastocytes présents dans la muqueuse gastro-intestinale suite à l'ingestion de SEA par des musaraignes (Ono et al. 2012). Or des récepteurs à la sérotonine sont présents dans les terminaisons nerveuses de la muqueuse intestinale et leur stimulation déclenche un influx nerveux activant la zone cérébrale régissant les réflexes du vomissement. Ce mécanisme permet d'expliquer le rôle émétisant de l'interaction mastocytes-entérotoxines staphylococciques dans les toxi-infections alimentaires à *S. aureus* (Hu et Nakane 2014).

Dans un autre cadre pathologique, les entérotoxines peuvent stimuler indirectement les mastocytes *via* les IgE spécifiques dirigées contre ces toxines. En effet, il a été montré que chez les patients souffrant de dermatite atopique, une forte proportion possédait des IgE anti-entérotoxines (Leung et al. 1993). Or les mastocytes sont capables de lier les IgE à travers le récepteur FcRε et sont donc « primés » en permanence, prêt à entrer en action dès que l'antigène se présente. La fixation de l'allergène sur son IgE a pour conséquence d'activer et de dégranuler les mastocytes, participant ainsi à la physiopathologie des poussées de dermatite atopique (Geoghegan et al. 2017). Dans la continuité, nous avons vu précédemment que l'Hld sécrétée par *S. aureus* participait activement à la physiopathologie des poussées de dermatite atopique en activant directement les mastocytes cutanés (Nakamura et al. 2013).

L'Hla a également été identifiée comme étant un stimulus déclencheur *in vitro* de la dégranulation mastocytaire sur des mastocytes murins, objectivée par la libération de sérotonine (Metz et al. 2009). Les auteurs ont également montré sur un modèle d'« infection » cutanée de souris, que l'injection intradermique d'Hla entraînait une inflammation cutanée avec une épaisseur de la peau mesurée augmentée, signant un œdème. Cependant, contrairement à Supajatura et al. qui concluaient à un effet plutôt délétère de l'activation mastocytaire suite à l'injection de PGN se traduisant par une inflammation excessive, Metz et al. observaient que l'injection d'Hla chez les souris déficientes en mastocytes (par défaut du c-Kit) entraînait un gonflement cutané significativement plus important que chez les souris sauvages à partir du 5^{ème} jour post-« infection », conséquence d'un processus

inflammatoire non contrôlé, traduisant ici, un effet bénéfique des mastocytes dans la promotion de la défense de l'hôte contre une agression et le contrôle de l'« infection ».

Concernant d'autres facteurs solubles pouvant interagir avec les mastocytes, une étude rapporte que l'adénosine dérivée de *S. aureus* digérée par des macrophages pourrait activer des mastocytes humains (HMC-1) et murins (BMMC) et libérer en conséquence de l'IL-8 et de l'IL-6 respectivement (Ma et al. 2011). Enfin, une récente étude a mis en évidence qu'un facteur soluble staphylococcique, non identifié, induisait l'expression de VEGF par des mastocytes murins. Cette induction est indépendante de la voie Myd88, principale voie de signalisation intracellulaire mise en œuvre suite à l'activation des TLR, donc indépendante de la reconnaissance par les TLR, mais partiellement dépendante de la voie du NF- κ B (Johnzon et al. 2016).

iv. Modèle d'infection expérimentale *in vitro* et *in vivo* avec la bactérie entière

Sur un modèle d'infection cellulaire *in vitro*, Rocha-de-Souza et al. ont montré d'une part que des mastocytes humains (CBMC) co-cultivés avec *S. aureus* libéraient du TNF α et de l'IL-8 suite à la reconnaissance par TLR-2 et CD48 et d'autre part, que *S. aureus* pouvait adhérer à la surface des mastocytes, s'internaliser et survivre en intracellulaire. Cette capacité à l'internalisation a été confirmée sur d'autres modèles mastocytaires humains (HMC-1) ou murins (BMMC) et a été montrée comme étant une des possibilités mises en œuvre par *S. aureus* afin d'échapper à l'activité antimicrobienne extracellulaire mise en place par les mastocytes (Feng et al. 2007). Comme cité précédemment, ces activités antimicrobiennes se traduisent par la production de peptides antimicrobiens de type cathélicidine (Di Nardo et al. 2003) et de pièges extracellulaires comparables aux NETs chez les PNN (von Kückritz-Blickwede et al. 2008).

L'internalisation de *S. aureus* dans les mastocytes est donc un moyen pour la bactérie d'échapper au système immunitaire. Elle est en partie médiée par les récepteurs β 1 intégrines, exprimés à la surface mastocytaire, permettant l'adhésion des bactéries à la surface (Abel et al. 2011), *via* la protéine FnBA (fibronectin binding protéine A) synthétisée par *S. aureus* (Goldmann et al. 2016). De manière intéressante, il a été montré que *S. aureus* pouvait promouvoir sa propre internalisation dans les mastocytes afin d'échapper au système immunitaire. En effet, les médiateurs antimicrobiens relargués par les mastocytes suite à la reconnaissance de l'agent pathogène entraînent une surexpression de la protéine FnBA, nécessaire à l'adhésion de la bactérie à la cellule, et de la toxine Hla chez *S. aureus*. Or la reconnaissance de Hla par son récepteur ADAM10, présent à la surface des mastocytes (Faber et al. 2014), induit une sur-expression de la β 1 intégrine favorisant donc l'adhésion et donc l'internalisation de la bactérie (Goldmann et al. 2016). *S. aureus* détourne donc les actions antimicrobiennes mises en place par les mastocytes à son propre avantage.

La stimulation *in vitro* de mastocytes par des *S. aureus* vivants a également été montrée sur des mastocytes murins dérivés du péritoine (PCMC). Cette stimulation induisait la libération importante

de médiateurs pro-inflammatoires comme TNF- α , IL-3 et IL-13 (Rönnberg et al. 2014). Dans le modèle murin d'infection intra-péritonéale réalisée dans la même étude, qui comparait des souris sauvages et des souris déficientes en mastocytes par un mécanisme indépendant du récepteur c-Kit, les auteurs n'ont pas retenu l'influence des mastocytes ni dans l'issue de l'infection (poids des animaux, clairance de la bactérie), ni dans la libération *in vivo* de cytokines.

Néanmoins, la pertinence du modèle d'infection intra-péritonéale utilisée dans cette étude peut être discutée. En effet, d'un point de vue physiopathologique, *S. aureus* n'est pas considéré comme un pathogène « modèle » donnant des infections digestives, mais plutôt un pathogène entraînant des infections cutanées et nous avons expliqué précédemment la multiplicité des phénotypes de mastocytes bien connue. C'est pourquoi, les conclusions formulées d'après un modèle d'infection digestive peuvent ne pas se valoir dans un contexte d'infections cutanées. D'ailleurs, dans une très récente publication, il a été montré que suite à une injection sous-cutanée de *S. aureus* (ST239) chez la souris, celle-ci développait un abcès cutané caractérisé par une infiltration très importante de cellules inflammatoires dans le derme, avec une accumulation marquée de mastocytes ayant un marquage positif de dégranulation avec libération de tryptase (Lei et al. 2018).

PARTIE 2 : TRAVAIL PERSONNEL

I. Problématique

L'exposé des données bibliographiques permet de conclure sur le rôle prépondérant des toxines formant des pores dans la physiopathologie des infections cutanées aiguës à *S. aureus* et sur les fonctions multiples des mastocytes dans l'organisme. L'interaction entre ces deux acteurs a été globalement étudiée dans le cadre des infections cutanées chroniques, notamment dans le cadre de la dermatite atopique (Geoghegan et al. 2017) avec une implication prouvée de certaines toxines formant des pores comme l'Hld (Nakamura et al. 2013).

La symptomatologie particulière de certaines infections cutanées aiguës à *S. aureus* incluant érythème, inflammation, dermo-nécrose, douleur et prurit rappelle la présentation clinique des lésions se développant à la suite d'une morsure/piqûre d'araignée (Dominguez 2004; Suchard 2011). Lors des piqûres d'araignée, les événements inflammatoires responsables de la lésion sont majoritairement de la responsabilité de la dégranulation des mastocytes cutanés, avec notamment la libération de médiateurs vasodilatateurs comme l'histamine et la sérotonine (Rattmann et al. 2008; Paludo et al. 2009). Récemment, un modèle murin d'abcès cutané mettait en évidence une infiltration massive de mastocytes suite à l'injection sous-cutanée de *S. aureus* (Lei et al. 2018). Il apparaîtrait donc que les mastocytes ont un impact sur la physiopathologie des infections cutanées aiguës à *S. aureus*. De plus, l'implication des mastocytes dans les infections cutanées à *S. aureus* pourrait également influencer la transmission de la bactérie, comme la sensation de prurit déclenchée par les médiateurs pruritogènes des mastocytes pourrait favoriser la contamination des mains, principal vecteur de la transmission de *S. aureus* (Bloomfield et Scott 1997).

Cependant, ni l'étude de Lei et al., ni aucune publication dans la littérature n'a comparé l'effet de *S. aureus* sur des souris sauvages *versus* des souris déficientes en mastocytes, afin d'objectiver le rôle des mastocytes dans le processus inflammatoire lors d'infection cutanée aiguë à *S. aureus*: favoriseraient-ils la formation de l'abcès en stimulant le processus inflammatoire ainsi que les influx nerveux pruritogène et douloureux à travers des médiateurs comme la tryptase ? Ou au contraire favoriseraient-ils la résolution de l'infection grâce à leur implication dans l'immunité innée en aidant à la clairance de la bactérie ? Sans doute s'agirait-il d'un apport séquentiel de ces deux facettes, modulé par la capacité de la souche à interagir avec les mastocytes à travers ses facteurs de virulence.

Or la production des facteurs de virulence, et notamment des toxines formant des pores, est variable en fonction des fonds génétiques des souches de *S. aureus* considérées, et atteint des hauts niveaux d'expression dans les souches donnant préférentiellement des infections cutanées aiguës (Berlon et al. 2015; Qi et al. 2016). C'est pourquoi un des premiers buts du travail a été d'étudier l'effet des toxines formant des pores de *S. aureus* sur les mastocytes humains.

II. Mise en évidence de l'action des phénol-solubles modulines et de l'hémolysine delta sur les mastocytes humains et implication dans les infections cutanées aiguës staphylococciques

Première publication : Delta Hemolysin and Phenol-Soluble Modulins, but Not Alpha Hemolysin or Panton-Valentine Leukocidin, Induce Mast Cell Activation.

Elisabeth Hodille, Charlotte Cuerq, Cédric Badiou, Françoise Bienvenu, Jean-Paul Steghens, Régine Cartier, Michèle Bes, Anne Tristan, Adriana Plesa, Vien T. M. Le, Bihn A. Diep, Gérard Lina, Oana Dumitrescu

Frontier in Cellular and Infection Microbiology. 2016 Dec 12;6:180.

Le but de la présente étude était d'étudier la potentielle implication des mastocytes cutanés présents dans le derme dans la physiopathologie et la transmission des infections cutanées staphylococciques aiguës et notamment d'étudier les interactions entre les toxines formant des pores de *S. aureus* et les mastocytes.

Nous avons donc entrepris de tester *in vitro* les toxines formant des pores précédemment décrites dans la partie bibliographique, PVL, Hla, PSM α et Hld, sur une lignée de mastocytes humains, HMC-1, à différentes concentrations pendant 3h. La dégranulation mastocytaire et la lyse cellulaire étaient mesurées par le dosage respectif de la libération de tryptase (Hogan et Schwartz 1997) et de LDH.

Nous avons ainsi montré que PSM α 1, PSM α 3 et Hld induisaient une libération dose-dépendante de tryptase et de LDH par les HMC-1. Ces libérations étaient corrélées entre elles démontrant que la libération de tryptase se produisait sous influence de la lyse cellulaire plutôt que par dégranulation mastocytaire. Aucun effet n'était observé avec la PVL ou Hla. Par la suite, la mise en contact de surnageants de cultures de souches isogéniques délétées pour PSM α (souche déficiente en PSM α), Hld (souche déficiente en Hld) ou AgrA (souche déficiente en système Agr fonctionnel) a permis de confirmer que la libération de tryptase et de LDH était sous la dépendance de la présence de PSM α et Hld dans les surnageants.

PSM α et Hld paraissaient donc être de bons candidats quant à leur action sur les mastocytes pour répondre à la question posée. Il restait à prouver leur production *in vivo* au cours d'une infection cutanée chez l'Homme. Sur 23 pus d'abcès à *S. aureus* récoltés, nous avons retrouvé Hld dans 65% des pus, PSM α 1 dans 17% et PSM α 3 dans aucun des pus, grâce à une méthode de chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse (HPLC-MS) développée dans notre laboratoire. De manière intéressante, nous avons également montré que, sur un ensemble de 46 souches de *S. aureus* responsables d'infections cutanées, Hld était significativement plus produite que PSM α 1 et que PSM α 3 était la toxine la moins produite. Ces résultats étaient concordants avec nos résultats obtenus dans les échantillons cliniques ainsi qu'avec ce qui avait été montré précédemment

quant à la production *in vitro* de PSM et Hld dans des collections de SARM-C et de SASM (Berlon et al. 2015; Qi et al. 2016). Enfin, le niveau de production de PSM α 1, PSM α 3 et Hld était dépendant du type d'Agr, sachant que les souches de *S. aureus* de type Agr1 produisaient significativement plus de toxines que les souches de *S. aureus* de type Agr2 et Agr3.

En conclusion, nos résultats tendent à montrer qu'au cours d'une infection cutanée à *S. aureus*, la production d'Hld d'une part et de PSM α 1 d'autre part ainsi que leur action sur les mastocytes cutanés pourrait entraîner la libération de tryptase, expliquant ainsi en partie les événements cliniques observés lors de ces infections et notamment le prurit, la tryptase étant un des médiateurs les plus pruritogènes libérés par les mastocytes (Zhu et al. 2015). Comme dans les infections cutanées à *S. aureus*, la transmission est essentiellement manuportée, la capacité d'une souche à produire des PSM α et de l'Hld et donc d'avoir un système Agr fonctionnel, pourrait être un critère pour sa sélection et son expansion dans la population.

Les éléments supplémentaires de la publication ci-dessous sont disponibles en annexe 2.



Delta Hemolysin and Phenol-Soluble Modulins, but Not Alpha Hemolysin or Panton-Valentine Leukocidin, Induce Mast Cell Activation

Elisabeth Hodille^{1,2}, Charlotte Cuerq^{2,3}, Cédric Badiou¹, Françoise Bienvenu^{2,4}, Jean-Paul Steghens^{2,3}, Régine Cartier^{2,5}, Michèle Bes^{1,2,6}, Anne Tristan^{1,2,6}, Adriana Plesa^{2,7}, Vien T. M. Le⁸, Binh A. Diep⁸, Gérard Lina^{1,2,6*} and Oana Dumitrescu^{1,2,6}

¹ Centre International de Recherche en Infectiologie, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1111, Université Lyon 1, Centre National de la Recherche Scientifique UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France, ² Hospices Civils de Lyon, Lyon, France, ³ Laboratoire de Biochimie, Centre de Biologie Sud, Lyon, France, ⁴ Laboratoire d'Immunologie, Centre de Biologie Sud, Lyon, France, ⁵ Laboratoire de Biochimie, Groupement Hospitalier Est, Lyon, France, ⁶ Centre National de Référence des Staphylocoques, Bron, France, ⁷ Laboratoire d'hématologie, Centre de Biologie Sud, Lyon, France, ⁸ Division of HIV, Infectious Diseases and Global Medicine, Department of Medicine, University of California, San Francisco, CA, USA

OPEN ACCESS

Edited by:

Pietro Speziale,
Istituto Universitario Di Studi Superiori
Di Pavia, Italy

Reviewed by:

Fabio Bagnoli,
GlaxoSmithKline, Italy
John Yu-Shen Chen,
National University of Singapore,
Singapore

*Correspondence:

Gérard Lina
gerard.lina@univ-lyon1.fr

Received: 12 August 2016

Accepted: 24 November 2016

Published: 12 December 2016

Citation:

Hodille E, Cuerq C, Badiou C, Bienvenu F, Steghens J-P, Cartier R, Bes M, Tristan A, Plesa A, Le VTM, Diep BA, Lina G and Dumitrescu O (2016) Delta Hemolysin and Phenol-Soluble Modulins, but Not Alpha Hemolysin or Panton-Valentine Leukocidin, Induce Mast Cell Activation. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6:180. doi: 10.3389/fcimb.2016.00180

Mast cells are located at host interfaces, such as the skin, and contribute to the first-line defense against pathogens by releasing soluble mediators, including those that induce itching and scratching behavior. Here, we show that delta-hemolysin (Hld) and phenol soluble modulins (PSMs) PSM α 1 and PSM α 3, but not alpha-hemolysin (Hla) or Panton-Valentine leukocidin (PVL), induce dose-dependent tryptase, and lactate dehydrogenase (LDH) release by the HMC-1 human mast cell line. Using supernatants from isogenic strains, we verified that tryptase and LDH release was Hld- and PSM α -dependent. PSM α 1 and Hld production was detected in 65 and 17% of human *Staphylococcus aureus*-infected skin abscess specimens, respectively, but they were produced *in vitro* by all clinical isolates. The results suggest that Hld and PSM- α 1 produced *in vivo* during *S. aureus* skin infections induce the release of mast cell mediators responsible for itching and scratching behavior, which may enhance skin to skin transmission of *S. aureus* via the hands. As Hld and PSMs are upregulated by accessory gene regulator (*agr*), their association may contribute to the elective transmission of *S. aureus* strains with a functional *agr* system.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, mast cells, phenol-soluble modulins, delta hemolysin, virulence, accessory gene regulator, hand-transmission

INTRODUCTION

Microorganisms are increasingly being recognized to have profound effects on the host they invade (Shropshire and Bordenstein, 2016). In many cases, host behaviors are altered upon infection by diverse pathogens, including bacteria (Cameron and Sperandio, 2015). These observed changes in host behavior are often thought to be beneficial to the microorganisms, as they may increase the rate of transmission (Cézilly and Perrot-Minnot, 2005).

Staphylococcus aureus is both a commensal and extremely versatile pathogen and one of the most common causes of bacterial community and healthcare-associated infections in humans (Lowy, 1998). *S. aureus* primarily causes skin and soft tissue infections (SSTIs), bloodstream infections, and pneumonia. The pathogenicity of *S. aureus* is determined by the extended repertoire of toxins produced by this bacteria (Kong et al., 2016). *In vitro* and *in vivo* studies in animals have identified pore-forming toxins, such as Panton-Valentine leukocidin (PVL), alpha-hemolysin (Hla), phenol-soluble modulins (PSMs), and delta-hemolysin (Hld), as major virulence factors involved in the pathophysiology of staphylococcal skin infections (Wang et al., 2007; Kobayashi et al., 2011; Lipinska et al., 2011; Syed et al., 2015). These toxins are capable of targeting a wide variety of immune cells during infection, such as human polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and macrophages, and can significantly contribute to dampening both innate and adaptive immune response to *S. aureus* infection (Pozzi et al., 2015).

The expression of PVL, Hla, and PSMs is regulated in different manners by accessory gene regulator (*agr*), a quorum sensing system in *S. aureus*. Hld is encoded by RNAIII, a non-coding RNA that orchestrates the expression of most virulence factors (Novick et al., 1993), including PVL and Hla (Vandenesch et al., 1991; Dumitrescu et al., 2011). In contrast, PSM α expression is regulated by AgrA, the response regulator of the two component system that activates the *agr* system (Lina et al., 1998; Queck et al., 2008).

Skin to skin contact *via* the hands plays a significant role in the spread of *S. aureus* to new hosts not only in hospitals, but also in nursing homes and child care settings, among others (Bloomfield and Scott, 1997). Increasing the frequency of contact between one's hand and skin colonized or infected by *S. aureus* due to itching and scratching behavior may enhance the transmission potential of the pathogen. The induction of scratching behavior in animals during experimental skin infection by *S. aureus* was described a long time ago (Wagner et al., 1997) but only recently described in humans when skin infections induced by community-acquired methicillin-resistant *S. aureus* (CA-MRSA) were misidentified by both patients and physicians as spider bites because they were very erythematous, indurated, and itchy, sometimes with a central dermo-necrosis (Suchard, 2011).

The skin is considered a major interface of the body for the host defense, not only as a passive barrier, but also through the immune system. Innate immune cells residing in the skin, such as Langerhans cells, dendritic cells, and dermal mast cells, provide cutaneous immune surveillance (Kupper and Fuhlbrigge, 2014). Mast cells are leukocytes originating from hematopoietic progenitor cells and located at host interfaces with the environment, such as the skin, pulmonary, and digestive mucosa. Mast cell differentiation and maturation are different according to the organs in which they are located. Two major phenotypes of mature mast cells are differentiated by granule content and the receptors expressed: Phenotype T contains mainly tryptase, and phenotype TC contains mainly tryptase and chymase (Galli et al., 2011).

These cells are able to recognize pathogenic agents and trigger the inflammatory process through complex inter-cellular communication mediated by several mediators released by mast cells. Thus, mast cells participate in the first line of defense in innate immunity against pathogens, including bacteria (Abraham and St. John, 2010).

Mast cells express several receptors capable of recognizing pathogens that belong to pattern recognition receptor (PRR) family involved in the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), such as Toll-like receptors (TLRs) TLR1 to TLR9, Nod-like receptors (NLRs), and C-type lectin receptors (CLRs), including dectin-1 (Urb and Sheppard, 2012; St. John and Abraham, 2013). Pathogen recognition induces several activation pathways in mast cells, resulting in the release of mediators, such as intra-cytoplasmic granules (histamine, protease, tryptase, tumor necrosis factor [TNF]), lipid-derived eicosanoids (leukotrienes and prostaglandins), and cytokines or chemokines, including TNF, IL-4, and IL-6 (Abraham and St. John, 2010; Urb and Sheppard, 2012; St. John and Abraham, 2013). After bacterial invasion, mast cells preferentially release IL-8 and TNF to promote polymorphonuclear neutrophil (PMN) recruitment at the infection site (Urb and Sheppard, 2012). First, TNF, IL-6, and IL-8 promote PMN chemotaxis. Next, TNF and eicosanoid trigger an up-regulation of adhesion molecules on the endothelial cell surface and vascular permeability, allowing PMN adhesion to endothelial cells and diapedesis (Abraham and St. John, 2010). In addition, mast cells can directly kill pathogens *via* the production of antimicrobial peptides known as cathelicidins (Di Nardo et al., 2003).

Mast cells can recognize bacteria through TLR-2 and TLR-4, which recognize the lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria and peptidoglycans of Gram-positive bacteria, and through TLR-5, which recognizes flagellin (Abraham and St. John, 2010). Mast cell mediators are also known to activate neuroreceptors on sensory nerve fibers involved in the induction of pruritus (Ständer et al., 2008).

Only a few studies have examined the interaction between *S. aureus* and mast cells. *S. aureus* induces mast cell activation through peptidoglycan-sensing by TLR2 (Feng et al., 2007). Two recent studies also confirmed that *S. aureus*-exposed mast cells release pro-inflammatory cytokines, such as IL-8, IL-3, IL-13, and TNF- α (Rönnberg et al., 2014; Swindle et al., 2015). Furthermore, *S. aureus* internalization by mast cells is enhanced by Hla and induces the release of extracellular traps, antimicrobial compounds, and pro-inflammatory cytokines (Abel et al., 2011; Goldmann et al., 2016; Johnzon et al., 2016). Nakamura et al. (2013) also demonstrated in a mouse model that *S. aureus* Hld induces skin mast cell activation, promoting the establishment of atopic dermatitis, an allergic skin disease. However, no data are yet available on the effect of other staphylococcal toxins involved in skin pathophysiology on human mast cells.

The aim of our study was to investigate whether *S. aureus* produces virulence factors during skin infection that may increase the rate of transmission by stimulating itching and scratching behavior through mast cell activation. We examined the impact of virulence factors involved in skin infection pathophysiology on skin mast cell activation and verified

there *in vivo* production in human *S. aureus* skin abscess samples.

MATERIALS AND METHODS

Staphylococcal Virulence Factors and Cells

The staphylococcal virulence factors used in this study were PVL, Hla, Hld, PSM α 1, and PSM α 3. The recombinant proteins LukS-PVL, LukF-PVL, and Hla were produced in our laboratory and resuspended in phosphate buffered saline (PBS) as described previously (Perret et al., 2012). Recombinant PVL activity on the plasma membranes of human polymorphonuclear leukocytes (PMNs) was verified on human PMNs before the study (Supplementary Figure 1). Briefly, purified LukS-PV and LukF-PV were diluted in RPMI to equimolar concentrations (0.05–0.5 μ g/mL, i.e., 0.0015–0.015 μ M) and mixed with human PMNs (10^6 cells) in the presence of 500 ng propidium iodide (PI). The percentage of PI-positive PMNs was determined by flow cytometry (Becton Dickinson Accuri C6 Flow Cytometer) at 5, 10, 15, 20, 25, and 30 min.

The activities of alpha-hemolysin preparations were also confirmed by cell permeability assays using rabbit erythrocytes (Supplementary Figure 2). Recombinant Hla was diluted in PBS (0.001–10 μ g/mL, i.e., 3×10^{-5} –0.3 μ M) and mixed at equal volume in a solution of 2% washed rabbit erythrocytes (bioMérieux). After 60 min of incubation at 37°C, samples were centrifuged at $200 \times g$ for 5 min and the OD_{405nm} of the supernatants measured. The percentage hemolysis of each sample was compared to that of erythrocytes lysed with 1% Triton-X.

PSM α 1, PSM α 3, and Hld were synthesized in the N-formylated form by Genecust Europe® (Luxembourg) with a purity greater than 90% and resuspended in PBS before their use. The HMC-1 human mast cell line was kindly provided by Olivier Lortholary (Pasteur Institute, Paris, France) and cultured in Iscove's modified Eagle's medium (IMDM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 40 μ g/mL gentamicin in 5% CO₂ at 37°C. For cell experiments, HMC-1 cell cultures were adjusted to 1×10^6 cells/mL in IMDM without FCS.

S. aureus Strains and Bacterial Culture

Twenty-three *S. aureus* clinical strains isolated from SSTIs were provided by the French National Reference Center (NRC) for Staphylococci. For each strain, the agr group, MLST-clonal complex or sequence type (ST), *mecA*, Luk-PV gene, Hla, and Hld were detected using a *S. aureus* microarray genotyping kit (Alere, Jouy-en-Josas, France) as described previously (Monecke et al., 2009) (Table 1). Moreover, isogenic mutants of a *S. aureus* USA300-0114 clinical strain, SF8300, were constructed using the oligonucleotides in Supplemental Table S1 and the pKOR1 allelic replacement mutagenesis system as described previously (Bae and Schneewind, 2006; Diep et al., 2010). SF8300 Δ *psma1-4* and SF8300 Δ *agrA* mutants contain in-frame deletions of genes encoding PSM-alpha types α 1- α 4 and AgrA. SF8300Hld(3G > T) mutant contains a single nucleotide change that changes the start codon ATG to ATT to block the initiation

TABLE 1 | Epidemiological characteristics of *S. aureus* strains isolated from SSTIs.

<i>S. aureus</i> isolate	Strain characteristics			
	agr group	MLST or Clonal Complex	<i>mecA</i> detection	luk-PV detection
ST 2012 0567	1	152	–	+
ST 2014 0236	1	398	–	–
ST 2011 1376	1	398	–	–
<u>ST 2013 0774</u>	1	398	–	–
ST 2008 1085	1	188	–	+
ST 2012 1286	1	188	–	+
ST 2013 1093	1	22	–	+
ST 2007 1243	3	30	–	+
<u>ST 2014 0589</u>	1	8	–	–
<u>ST 2014 1539</u>	1	45	–	–
<u>ST 2013 1442</u>	1	97	–	–
ST 2012 0823	1	22	–	–
<u>ST 2012 1497</u>	1	152	–	+
<u>ST 2014 0351</u>	1	97	–	–
ST 2007 1031	3	80	+	+
ST 2011 1384	2	5	+	–
<u>ST 2015 1708</u>	1	398	–	–
ST 2012 0341	3	80	+	+
ST 2007 0901	3	30	–	+
ST 2010 1173	1	8	+	+
ST 2010 2118	3	80	+	+
<u>0150331644</u>	3	30	–	–
ST 2011 0395	2	5	–	–
ST 2013 1215	1	45	–	–
<u>ST 2014 1054</u>	1	45	–	–
<u>ST 2015 1706</u>	1	25	–	–
ST 2012 0150	1	45	–	–
ST 2009 1153	2	5	–	–
<u>ST 2014 1173</u>	3	80	+	+
<u>ST 2012 1322</u>	3	80	–	+
<u>ST 2014 0441</u>	3	30	–	–
HT 2004 1093	3	88	–	+
ST 2010 1734	2	15	–	–
<u>ST 2014 1524</u>	2	2482	–	+
<u>ST 2015 1705</u>	3	30	–	–
ST 2013 1745	1	8	–	–
<u>ST 2014 1033</u>	2	5	+	–
<u>ST 2014 0409</u>	3	30	–	+
ST 2013 1301	2	15	–	–
<u>ST 2015 1710</u>	3	30	–	–
ST 2011 0514	3	30	–	–
ST 2009 0867	1	8	–	–
<u>ST 2015 1711</u>	3	30	–	–
<u>ST 2015 1707</u>	2	5	–	–
<u>ST 2014 1501</u>	3	30	–	–
<u>ST 2015 1709</u>	2	5	–	–

Underlined isolates correspond to clinical samples analyzed for toxin quantification.

of its translation. Colonies of SF8300WT, SF8300 Δ psma1–4, and SF8300Hld(3G > T) were hemolytic on blood agar plate suggesting that agr was functional in these mutants. AgrA-knockout induces an alteration of the agr system and PSM α 1–4 production (Peschel and Otto, 2013). *S. aureus* supernatants were prepared by growing bacteria adjusted to 0.5 MacFarland standard in 3 mL of CCY broth in a rotary shaker (190 rpm) at 37°C for 22 h, followed by centrifugation for 10 min at 3000 \times g to obtain a pellet. Supernatants were stored at –80°C until needed.

Clinical Samples

The study was conducted in accordance with the guidelines of the ethical committees of the participating hospital, Centre Hospitalier Lyon Sud (Hospices civils de Lyon, Pierre Bénite, France) or Groupement Hospitalier Est (Hospices civils de Lyon, Bron, France) (DC-201-1306). Specimens from human *S. aureus* skin abscesses were collected as part of the routine management of patients and stored at –80°C in Eppendorf tubes. A total of 23 samples were obtained and analyzed. For one patient, two samples were collected. For the 23 *S. aureus* isolates, characterization by microarray (Table 1) and culture supernatant collection were carried out as described above.

Mast Cell Activation/Degranulation and Lysis Assay

HMC-1 cells (1×10^6 cells/mL) were incubated in Eppendorf tubes with PVL (0.05, 0.5, or 5 μ g/mL, i.e., 0.0015, 0.015, 0.15 μ M respectively), Hla (10 μ g/mL, i.e., 0.3 μ M), PSM α 1, PSM α 3, Hld (0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 100, or 200 μ g/mL, i.e., around 0.04, 0.2, 0.4, 2, 4, 9, 20, 40, or 80 μ M respectively), SF8300 wild-type (WT), SF8300 Δ psma1–3, SF8300Hld(3G > T), or SF8300 Δ agrA supernatants (20, 10, 5, or 1% v/v) for 3 h at 37°C. Toxin concentrations were inferred from previous studies on human PMNs (Löffler et al., 2010) and preliminary results (data not published). The cells were pelleted by centrifugation at 200 \times g for 10 min and the supernatants collected to measure tryptase by Immunocap (Phadia[®]) assay and lactate dehydrogenase (LDH) by Architect c16000 (Abbott[®]) assay. Mast cell degranulation and lysis were evaluated through tryptase release and LDH release, respectively, and expressed as percentages using the following formula: % = $\frac{\text{Tryptase Test} - \text{Tryptase Tneg}}{\text{Tryptase Tpos} - \text{Tryptase Tneg}} \times 100$. The negative control (Tneg) was obtained using untriggered cell buffer and the positive control (Tpos) using cell lysis solution (Promega[®]).

PVL and Hla Quantification in Bacterial Supernatants

The PVL level in the supernatant was quantified using a specific ELISA kindly provided by bioMérieux (R&D Department, Marcy l'Étoile, France) as described elsewhere (Badiou et al., 2008). The concentration of Hla in the supernatant was quantified using a specific sandwich-type ELISA kindly provided by GlaxoSmithKline Vaccines that targets Hla with a solid-phase GlaxoSmithKline (GSK) monoclonal antibody, anti-Hla. The antibody–antigen complex was detected by a GSK polyclonal

rabbit anti-Hla antibody followed by a peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody as described previously (Otto et al., 2013).

PSM Quantification in Bacterial Supernatants and Clinical Specimens

Bacterial supernatants were thawed at 4°C, diluted 1:5 with methanol at 4°C, and incubated for 10 min at 4°C. After centrifugation at 10,000 \times g for 5 min, the supernatants were recovered for PSM quantification. Clinical specimens were thawed to 4°C, vortexed for 1 min, sterilized by 1 h of heating at 94°C, cooled on ice to 4°C, diluted 1:5 with methanol at 4°C, and incubated for 10 min at 4°C. After centrifugation at 10,000 \times g for 5 min, the supernatants were recovered for PSM quantification. PSM α 1, PSM α 3, and Hld were quantified by high-performance liquid chromatography mass spectrometry (HPLC-MS) in an Agilent[®] system using an adaptation of a method described elsewhere (Wang et al., 2007).

Statistical Analysis

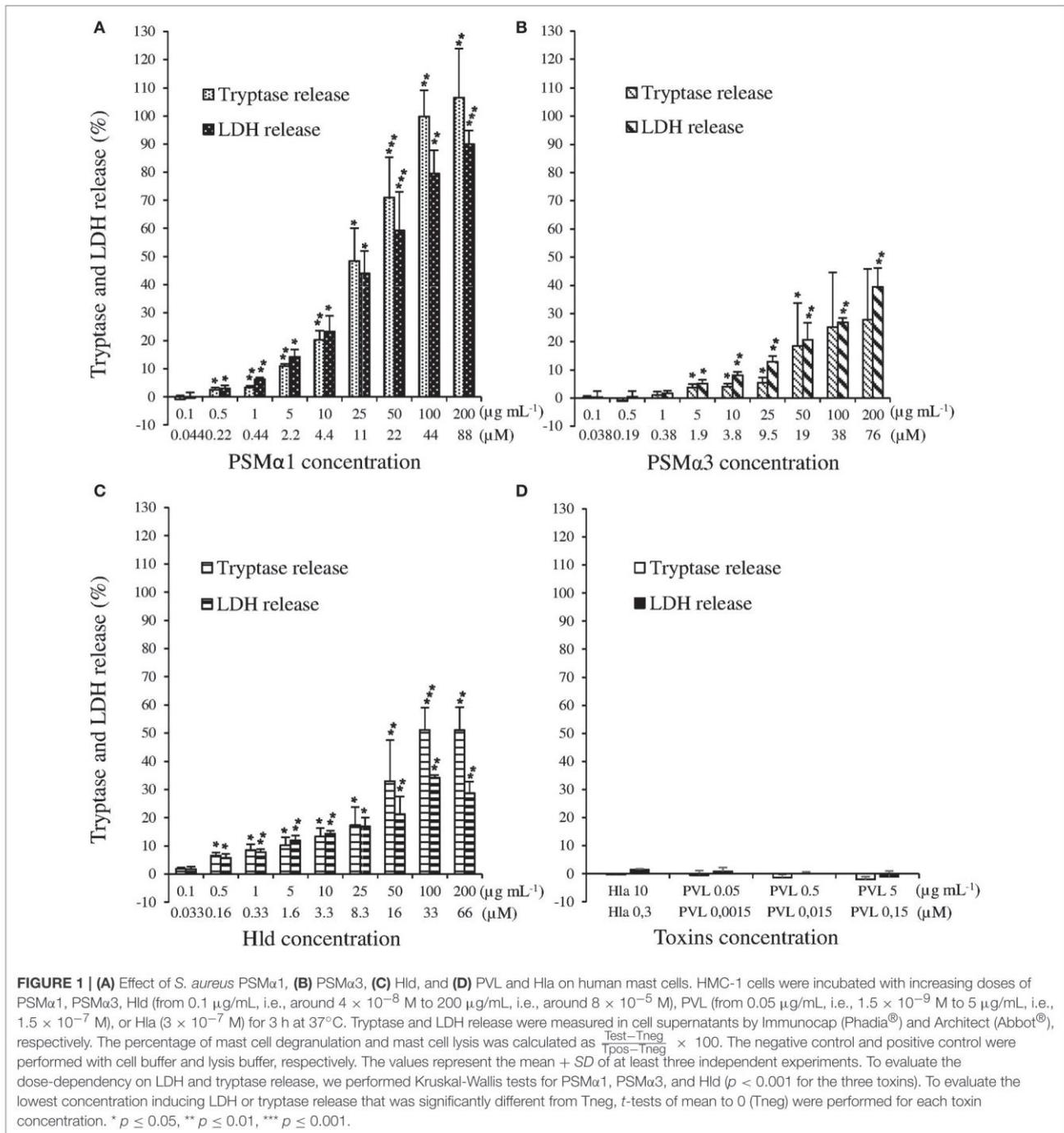
T-tests, ANOVA, Kruskal-Wallis tests following by Bonferroni-adjusted Wilcoxon tests or *t*-tests, and a Pearson correlation test were performed to compare mast cell degranulation and mast cell lysis, as well as PSM and Hld production. $P \leq 0.05$ was considered significant.

RESULTS

The Effect of Toxins on HMC-1 Cells

Because *in vitro* and *in vivo* studies in animals have been implicated PSM α 1, PSM α 3, Hld, Hla, and PVL in the pathophysiology of skin infections, we examined their effect on HMC-1 cells by measuring the tryptase and LDH release. The range of concentrations used for each toxin was inferred from the literature (Badiou et al., 2008; Löffler et al., 2010). We observed that PSM α 1, PSM α 3, and Hld induced tryptase and LDH release from HMC-1 cells in a dose-dependent manner (Kruskal-Wallis tests, $p < 0.001$ for PSM α 1, PSM α 3, and Hld; Figures 1A–C). PSM α 1 was more active than PSM α 3 and Hld. The release of both LDH and tryptase was significantly higher with PSM α 1 than with PSM α 3 and Hld ($p < 0.05$), with the maximal release of tryptase and LDH in the presence of 200 μ g/mL toxin (i.e., 88, 76 and 66 μ M for PSM α 1, PSM α 3, and Hld respectively), achieving levels as high as 106.58 ± 17.29 and $89.99 \pm 4.89\%$ of the positive control with PSM α 1, 27.69 ± 18.09 and $39.41 \pm 6.74\%$ with PSM α 3, and 51.00 ± 8.25 and $28.66 \pm 4.08\%$ with Hld. The lowest toxin concentration inducing tryptase and LDH release was 0.5 μ g/mL for PSM α 1 (i.e., 0.22 μ M) and Hld (i.e., 0.16 μ M) and 5 μ g/mL for PSM α 3 (i.e., 1.9 μ M). Using PSM α 1, PSM α 3, and Hld, tryptase levels correlated with the LDH levels, suggesting that tryptase release was directly linked to mast cell lysis (Supplementary Figure 3).

In contrast to PSMs and Hld, PVL and Hla did not induce tryptase or LDH release by HMC-1 cells, even when applied at high concentrations (5 μ g/mL, i.e., 0.15 μ M) (Figure 1D). This negative data were not associated with the absence of activity in PVL and Hla preparations because they caused membrane



disruption of humans PMNs and rabbit erythrocytes, respectively (Supplementary Figures 1, 2).

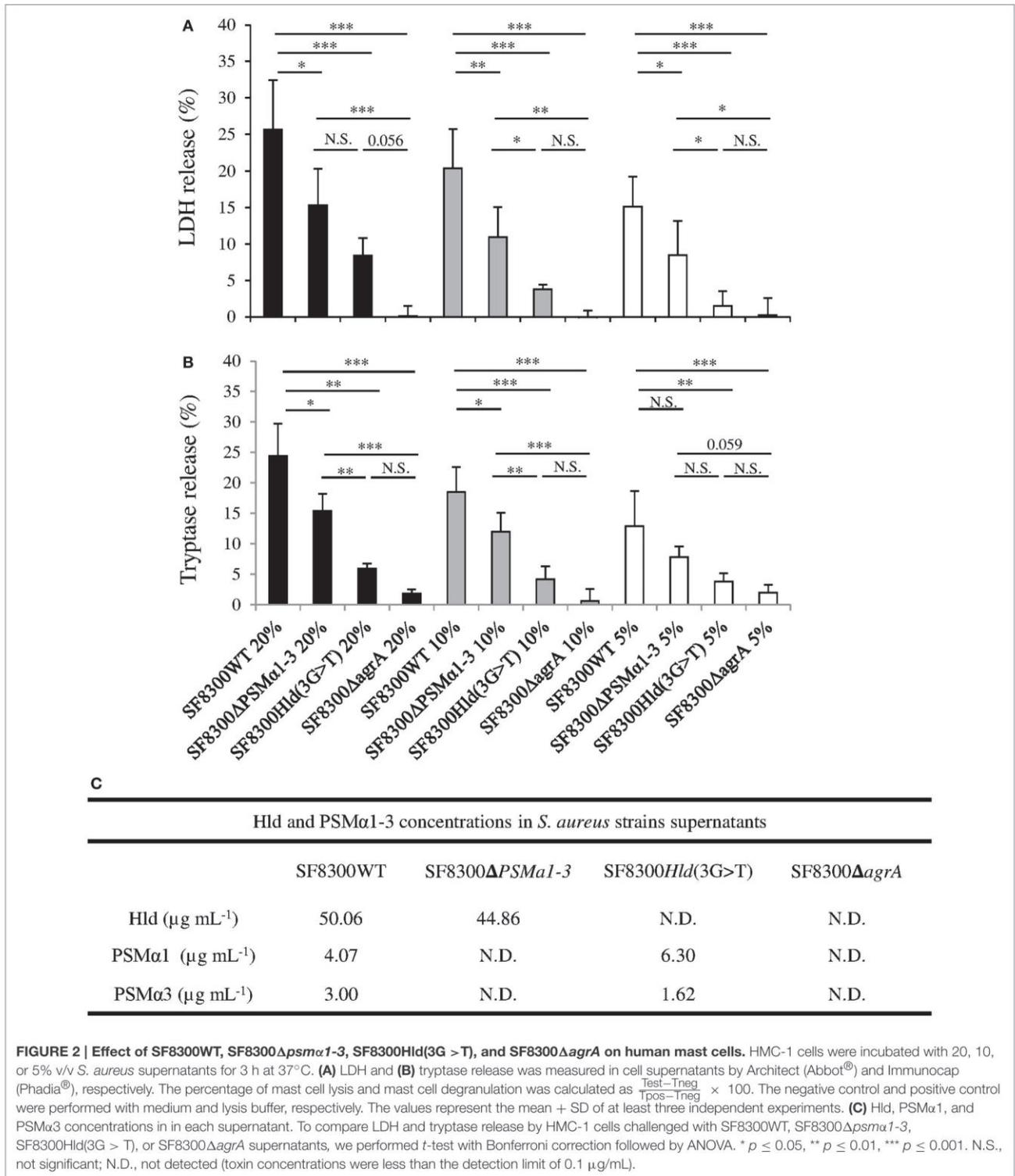
Effect Of *S. aureus* Supernatants on HMC-1 Cells

We quantified Hla, PVL, PSMα1, PSMα3, and Hld in supernatants of SF8300 and its isogenic mutants to confirm

their toxin production profiles. As expected, the concentrations of Hla and PVL in SF8300WT, SF8300Hld(3G > T), and SF8300Δ*psmα1-4* supernatants were similar (Hla: 0.4, 0.4, 0.4 μg/mL; PVL: 18, 25, 26 μg/mL), whereas only a small amount of Hla and PVL was detected in SF8300Δ*agrA* supernatant (0.001 and 0.2 μg/mL, respectively). SF8300WT produced PSMα1 (4.07 ± 0.41 μg/mL), PSMα3 (3.00 ± 0.10 μg/mL), and Hld (50.06

± 6.45 µg/mL), whereas SF8300Hld(3G > T) produced only PSMα1 (6.30 ± 0.64 µg/mL) and PSMα3 (1.62 ± 0.05 µg/mL), SF8300Δ*psmα1-4* produced only Hld (44.86 ± 5.70 µg/mL), and SF8300Δ*agrA* produced none of the mediators (Figure 2).

When we examined the effect of the supernatant from the *S. aureus* SF8300 strain on HMC-1 cells, we observed that LDH and tryptase concentrations were consistent with the effect of synthetic peptides PSMα1, PSMα3, and Hld.



LDH and tryptase release by HMC-1 cells was concentration-dependent (from 20 to 5% v/v; ANOVA, $p < 0.01$) and varied between SF8300WT and its isogenic mutants (Figure 2). The staphylococcal supernatant-induced levels of LDH and tryptase release (using 20 to 5% v/v) in descending order were from SF8300WT, SF8300 Δ psm α 1-4, SF8300Hld(3G > T), and SF8300 Δ agrA. Taken together, these results indicate that LDH and tryptase release by HMC-1 cells challenged with *S. aureus* supernatants was mainly associated with Hld production and secondary to PSM α 1 and PSM α 3 production.

PSM α and Hld Quantification in Clinical Specimens

As only PSM α 1, PSM α 3, and Hld induced tryptase and LDH release by HMC-1 cells, we explored their production during human skin infection (Table 2). Hld was detected in 15 of the 23 pus samples at concentrations ranging from 0.1 to 19.6 μ g/mL (median 0.85 μ g/mL). PSM α 1 was detected in only four of the pus samples at concentrations ranging from 0.1 to 3.9 μ g/mL (median 0.31 μ g/mL). Higher concentrations of Hld and PSM α 1 were detected in the same pus samples. Twelve of the 15 (80%) Hld-positive specimens reached toxic concentrations for HMC-1 cells (i.e., 0.5 μ g/mL), but only one pus sample

contained a toxic concentration of PSM α 1 for HMC-1 cells. Finally, PSM α 3 was detected in none of the tested clinical specimens.

In vitro PSM α and Hld Production by *S. aureus* Strains

Forty-six *S. aureus* clinical isolates from SSTIs were studied for PSM α 1, PSM α 3, and Hld production, including 23 from the clinical specimens analyzed for *in vivo* PSM and Hld production. The other 23 isolates were from the French staphylococci NRC collection with no pus available. Strains belonged to different agr groups and clonal complexes (Table 1): 45.6% (21/46) *S. aureus* strains in agr group 1, 19.6% (9/46) in agr group 2, and 34.8% (16/46) in agr group 3. A majority (39/46) of strains were methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA), and five of seven methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains were *luk-PV*-positive. Four of the latter were community-acquired MRSA strains belonging to the European ST 80 clone, and one belonged to the ST8 USA300 clone. The remaining *luk-PV*-positive *S. aureus* strains ($n = 11$) were MSSA.

All *S. aureus* strains expressed PSM α 1, PSM α 3, and Hld *in vitro*, though at different levels (Figure 3). Nevertheless, the mean Hld production (94.51 ± 52.02 μ g/mL) was much higher than the mean PSM α 1 production (8.10 ± 7.91 μ g/mL),

TABLE 2 | Hld, PSM α 1, and PSM α 3 concentrations in human skin abscesses and bacterial supernatants.

<i>S. aureus</i> isolate	Pus (μ g mL $^{-1}$)			Supernatant (μ g mL $^{-1}$)		
	Hld	PSM α 1	PSM α 3	Hld	PSM α 1	PSM α 3
ST 2014 0441	19.57	3.92	ND	68.84 \pm 9.19	14.45 \pm 4.28	0.11 \pm 0.02
ST 2012 0567	3.69	ND	ND	199.47 \pm 67.67	33.73 \pm 8.48	14.02 \pm 4.96
ST 2014 1173	1.33	ND	ND	77.53 \pm 0.05	5.76 \pm 2.11	2.89 \pm 0.71
ST 2013 0774	1.31	ND	ND	171.55 \pm 14.38	12.16 \pm 2.70	6.07 \pm 2.67
ST 2015 1706	1.26	0.40	ND	88.49 \pm 12.44	8.45 \pm 1.72	2.94 \pm 0.82
ST 2013 1442	1.13	ND	ND	141.12 \pm 13.58	28.52 \pm 2.52	17.10 \pm 7.06
ST 2012 1497	0.90	ND	ND	128.72	8.91	2.07
ST 2015 1705	0.85	ND	ND	52.50 \pm 20.31	1.12 \pm 0.89	0.07 \pm 0.01
015033164401	0.82	ND	ND	98.75 \pm 0.69	22.04 \pm 0.32	0.08 \pm 0.01
ST 2014 0409	0.67	ND	ND	37.79 \pm 4.29	0.37 \pm 0.11	0.06 \pm 0.03
ST 2014 0351	0.59	0.22	ND	123.00 \pm 11.62	10.42 \pm 0.71	2.65 \pm 0.06
ST 2015 1711	0.52	ND	ND	22.15 \pm 9.55	0.33 \pm 0.08	0.07 \pm 0.01
ST 2014 1033	0.31	0.19	ND	43.56 \pm 2.02	9.02 \pm 4.62	2.58 \pm 1.58
ST 2012 1322	0.26	ND	ND	71.81	1.61	0.42
ST 2014 0589	0.12	ND	ND	143.72 \pm 20.12	10.95 \pm 2.94	4.13 \pm 0.21
ST 2014 1539	ND	ND	ND	143.53 \pm 25.19	20.55 \pm 11.23	6.70 \pm 3.86
ST 2015 1708	ND	ND	ND	116.15 \pm 21.28	7.95 \pm 2.25	4.80 \pm 1.66
ST 2014 1054	ND	ND	ND	92.21 \pm 4.28	10.19 \pm 1.27	2.92 \pm 0.46
ST 2014 1524	ND	ND	ND	53.99 \pm 23.55	2.20 \pm 1.53	0.44 \pm 0.20
ST 2015 1710	ND	ND	ND	33.09 \pm 2.19	4.43 \pm 0.19	0.08 \pm 0.01
ST 2015 1707	ND	ND	ND	14.70 \pm 2.94	0.47 \pm 0.17	0.15 \pm 0.04
ST 2014 1501	ND	ND	ND	7.66 \pm 4.91	0.14 \pm 0.04	0.07 \pm 0.03
ST 2015 1709	ND	ND	ND	4.38 \pm 3.05	<0.1	0.07 \pm 0.03

ND, not detected.

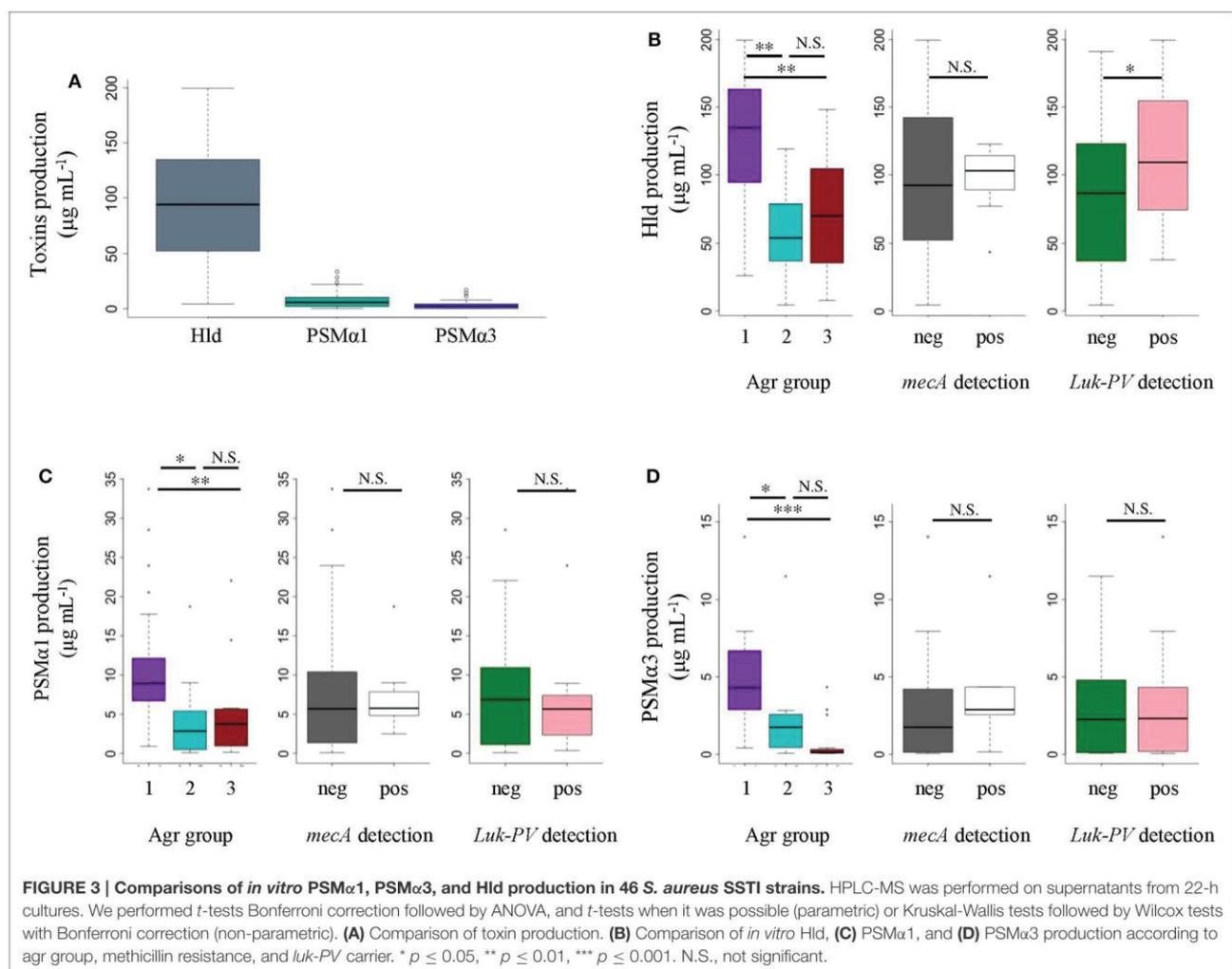
which was higher than the mean PSM α 3 production ($3.09 \pm 3.79 \mu\text{g/mL}$) (Figure 3A). The *in vitro* production levels of the three toxins were not different between MRSA and MSSA (Figures 3B–D). We did not notice any difference in the *in vitro* PSM α 1 and PSM α 3 production levels between *luk-PV*-positive ($n = 16$) and *luk-PV*-negative ($n = 30$) *S. aureus* strains (Figures 3C,D). However, *luk-PV*-positive strains produced more Hld ($113.05 \pm 46.42 \mu\text{g/mL}$) than *luk-PV*-negative strains ($84.62 \pm 52.86 \mu\text{g/mL}$, $p < 0.05$; Figure 3B). We also observed that *S. aureus* from agr group 1 produced higher levels of Hld, PSM α 1, and PSM α 3 than *S. aureus* from agr groups 2 and 3 ($p < 0.05$; Figures 3B–D). No significant difference was found in PSM α 1, PSM α 3, and Hld production between community-acquired MRSA and the other *S. aureus* strains.

Regarding the 23 *S. aureus* strains isolated from pus, we found higher toxin concentrations in culture supernatants than clinical specimens (Table 2). *In vitro* toxin production ranged from 4.38 to 199.47 $\mu\text{g/mL}$ (median 77.53 $\mu\text{g/mL}$) for Hld, from <0.1 to 33.73 $\mu\text{g/mL}$ (median 8.2 $\mu\text{g/mL}$) for PSM α 1, and from 0.06 to

17.1 $\mu\text{g/mL}$ (median 2.07 $\mu\text{g/mL}$) for PSM α 3. No correlation was observed between *in vivo* and *in vitro* Hld quantification (Supplementary Figure 4).

DISCUSSION

Despite progress in our knowledge of *S. aureus* pathophysiology, virulence factors that favor its transmission remain enigmatic. Hands play a significant role in the spread of *S. aureus* to new hosts through contact with skin colonized or infected by *S. aureus*. In the skin, dermal mast cells act in close interaction with nerve fibers and contain substances that act as mediators of itching (Ständer et al., 2008). In this study, we examined whether *S. aureus* pore-forming toxins that are involved in the pathophysiology of skin infection can induce mast cell activation/lysis. We used HMC-1 cells derived from a patient with leukemia. Even though this cell line has two major deficiencies (cytokine-independence and lack of a functional Fc ϵ R), it is widely used and a faithful *in vitro* model of normal



mast cells (Drexler and MacLeod, 2003). We verified that HMC-1 cells produce tryptase, one of the best indicators of mast cell activation (Schwartz et al., 2003; Guhl et al., 2010), and express CD88 similar to human skin mast cells (Füreder et al., 1995; Werfel et al., 1996) (Supplementary Figure 5).

Our results clearly demonstrate that PSM α 1, PSM α 3, and Hld induce dose-dependent tryptase and LDH release by HMC-1 cells. We suspect that tryptase liberation was mainly the result of mast cell lysis. In contrast, PVL and Hla did not induce human HMC-1 cell degranulation or lysis. This finding was unexpected because König et al. (1995) reported that PVL induces histamine release by human basophilic granulocytes, immune cells that are morphologically and functionally related to mast cells, especially given that the HMC-1 cell line expresses C5aR, the PVL receptor (König et al., 1995; Spaan et al., 2013). Two major hypotheses are possible to explain this discrepancy. Either HMC-1 cells do not express enough CD88 to make the cell sensitive to PVL and/or there is an additional specific co-receptor necessary for PVL to be active that is missing from HMC-1 cells. Supplementary investigations should be performed to test these hypotheses.

We found a similar cytotoxic effect of PSM α 1 and PSM α 3 on HMC-1 cells as those previously reported with human neutrophils. The lethal concentration 50% was achieved in both mast cells and human neutrophils at 25 μ g/mL PSM α 1 (Löffler et al., 2010). However, for PSM α 3, we observed only 20% lysis of mast cells at the concentration that results in the 80% lysis of neutrophils (i.e., 50 μ g/mL) (Löffler et al., 2010). We observed the same level of Hld activity against mast cells as Nakamura et al.; using 10 μ g/mL we measured $13.30 \pm 3.01\%$ tryptase release, whereas they reported β -hexosaminidase release of $\sim 10\%$ (Nakamura et al., 2013). The only difference was that β -hexosaminidase release by Hld seems to not be related to cell lysis of the mouse MC/9 mast cell line, which is in contrast to what we observed with HMC-1 cells. This may be due to the different origins of the mast cell lines.

In order to determine whether PSM α 1, PSM α 3, and Hld are expressed *in vivo*, 23 pus samples recovered from human *S. aureus* skin abscesses were analyzed. We detected the presence of Hld in 65% of the analyzed clinical specimens and PSM α 1 in 17% of the samples, but no PSM α 3. The concentration of Hld and PSM α 1 detected in pus samples was 50- and 10-fold lower, respectively, than the concentrations produced *in vitro* and did not correlate. The weakest toxin concentration *in vivo* may indicate that the toxins were degraded more rapidly in pus than in supernatants, despite similar storage procedures. Only 50% of pus samples contained sufficient Hld levels to induce HMC-1 cell lysis, but it was 100% with the *in vitro* supernatants. *In vitro* Hld production was 10-fold higher than mean PSM α 1 production and 30-fold higher than PSM α 3 production as described previously (Berlon et al., 2015).

Two studies recently demonstrated that PSM and Hld production by MRSA and MSSA is higher among SSTI isolates than either infectious endocarditis or hospital-acquired pneumonia (Berlon et al., 2015; Qi et al., 2016). These observations suggested that the level of PSM and Hld correlates more with the disease than the methicillin-resistant status. As PSM and Hld production is regulated by the agr, the level of PSM

and Hld production may reflect agr activity and its requirement for the development of skin infection in humans, as in animal models of *S. aureus* skin infection (Montgomery et al., 2010; Cheung et al., 2011). Looking at the impact of agr alleles in our sample, strains in agr group 1 produced more Hld, PSM α 1, and PSM α 3 than those from groups 2 and 3, despite CA-MRSA belonging mainly to agr group 3 (Tristan et al., 2007).

The involvement of PSM α 1–3 in SSTI pathogenesis was demonstrated by Wang et al., who showed that *S. aureus* strains producing PSM α are more virulent, notably through the capacity of PSM α to lyse neutrophils (Wang et al., 2007). Recently, Syed et al. highlighted the involvement of *S. aureus* PSM α , including Hld, in the induction of skin inflammation through pro-inflammatory cytokine release from keratinocytes (Syed et al., 2015). Skin mast cells are very important immune cells and participate in the fight against pathogens, but they can be deleterious when over-stimulated (Abraham and St. John, 2010; Urb and Sheppard, 2012; St. John and Abraham, 2013). This deleterious effect has been shown in mice, with Hld participating in the development of atopic dermatitis (Nakamura et al., 2013). Therefore, our results suggest that *S. aureus* produces Hld during acute skin infection, and to a lesser extent PSM α 1, which induces mast cell degranulation and/or lysis directly or indirectly through skin inflammation. This human skin mast cell degranulation activates neuroreceptors on sensory nerve fibers involved in the induction of pruritus and explain the itchy feeling during *S. aureus* skin infections (Zhu et al., 2015). We speculate that the scratching behavior induced by *S. aureus* through Hld and PSM production promotes *S. aureus* transmission *via* hand-to-skin contact in the presence of *S. aureus*-infected skin lesions, thereby promoting *S. aureus* epidemicity. As highlighted previously, agr is a key regulatory system for the maintenance of *S. aureus* virulence, which is considered a key factor for host-to-host transmission (Massey et al., 2006). Moreover, Hld is encoded by RNAIII, the effector of agr (Novick et al., 1993). We hypothesize that the Hld–agr association contributes to the elective transmission of virulent *S. aureus* strains with a functional agr system. Altogether could participate in the epidemic success of certain *S. aureus* strains, such as the pandemic CA-MRSA USA300 clone that strongly expresses toxins with the help of the agr system, induces itchy skin infections, and is pandemic in the USA (DeLeo et al., 2010; Cheung et al., 2011; Suchard, 2011).

In conclusion, our results demonstrate that Hld and PSM α 1 are produced by *S. aureus in vivo* and induce human mast cell degranulation and lysis. As mast cell mediators are known to be involved in the induction of pruritus, we hypothesize that *S. aureus* may promote its transmission *via* the hands through scratching of infected skin lesions prompted by Hld and PSM production.

ETHICS STATEMENT

This study was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki and its subsequent amendments, the guidelines for Good Clinical Practices (CPMP/ICH/135/95), the

French regulations and the guidelines of the ethical committees of the participating hospital, Centre Hospitalier Lyon Sud (Hospices civils de Lyon, Pierre Benite, France), and Groupement Hospitalier Est (Hospices civils de Lyon, Bron, France) (DC-201-1306). Only specimens from human *S. aureus* skin abscesses were collected as part of the routine management of patients was examined.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

EH, VL, BD, MB, AT, GL, and OD designed the experiments. EH, CC, CB, FB, JS, RC, and AP performed the experiments. EH, VL, BD, GL, and OD wrote the manuscript.

REFERENCES

- Abel, J., Goldmann, O., Ziegler, C., Hölte, C., Smeltzer, M. S., Cheung, A. L., et al. (2011). *Staphylococcus aureus* evades the extracellular antimicrobial activity of mast cells by promoting its own uptake. *J. Innate Immun.* 3, 495–507. doi: 10.1159/000327714
- Abraham, S. N., and St. John, A. L. (2010). Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 440–452. doi: 10.1038/nri2782
- Badiou, C., Dumitrescu, O., Croze, M., Gillet, Y., Dohin, B., Slayman, D. H., et al. (2008). Panton-Valentine leukocidin is expressed at toxic levels in human skin abscesses. *Clin. Microbiol. Infect.* 14, 1180–1183. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02105.x
- Bae, T., and Schneewind, O. (2006). Allelic replacement in *Staphylococcus aureus* with inducible counter-selection. *Plasmid* 55, 58–63. doi: 10.1016/j.plasmid.2005.05.005
- Berlon, N. R., Qi, R., Sharma-Kuinkel, B. K., Joo, H. S., Park, L. P., George, D., et al. (2015). Clinical MRSA isolates from skin and soft tissue infections show increased *in vitro* production of phenol soluble modulins. *J. Infect.* 71, 447–457. doi: 10.1016/j.jinf.2015.06.005
- Bloomfield, S. F., and Scott, E. (1997). Cross-contamination and infection in the domestic environment and the role of chemical disinfectants. *J. Appl. Microbiol.* 83, 1–9. doi: 10.1046/j.1365-2672.1997.00199.x
- Cameron, E. A., and Sperandio, V. (2015). Frenemies: signaling and nutritional integration in pathogen-microbiota-host interactions. *Cell Host Microbe* 18, 275–284. doi: 10.1016/j.chom.2015.08.007
- Cézilly, F., and Perrot-Minnot, M. J. (2005). Studying adaptive changes in the behaviour of infected hosts: a long and winding road. *Behav. Processes* 68, 223–228. doi: 10.1016/j.beproc.2004.08.013
- Cheung, G. Y., Wang, R., Khan, B. A., Sturdevant, D. E., and Otto, M. (2011). Role of the accessory gene regulator agr in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Infect. Immun.* 79, 1927–1935. doi: 10.1128/IAI.00046-11
- DeLeo, F. R., Otto, M., Kreiswirth, B. N., and Chambers, H. F. (2010). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 375, 1557–1568. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61999-1
- Diep, B. A., Chan, L., Tattevin, P., Kajikawa, O., Martin, T. R., Basuino, L., et al. (2010). Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 5587–5592. doi: 10.1073/pnas.0912403107
- Di Nardo, A., Vitiello, A., and Gallo, R. L. (2003). Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide. *J. Immunol.* 170, 2274–2278. doi: 10.4049/jimmunol.170.5.2274
- Drexler, H. G., and MacLeod, R. A. (2003). Malignant hematopoietic cell lines: *in vitro* models for the study of mast cell leukemia. *Leuk. Res.* 27, 671–676. doi: 10.1016/S0145-2126(03)00007-9
- Dumitrescu, O., Choudhury, P., Boisset, S., Badiou, C., Bes, M., Benito, Y., et al. (2011). Beta-lactams interfering with PBPI induce Panton-Valentine leukocidin expression by triggering sarA and rot global regulators

FUNDING

This work was supported in part by the LABEX ECOFECT (ANR-11-LABX-0048) of Université de Lyon, within the program “Investissements d’Avenir” (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French National Research Agency (ANR).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2016.00180/full#supplementary-material>

- of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 3261–3271. doi: 10.1128/AAC.01401-10
- Feng, B. S., He, S. H., Zheng, P. Y., Wu, L., and Yang, P. C. (2007). Mast cells play a crucial role in *Staphylococcus aureus* peptidoglycan-induced diarrhea. *Am. J. Pathol.* 171, 537–547. doi: 10.2353/ajpath.2007.061274
- Füreder, W., Agis, H., Willheim, M., Bankl, H. C., Maier, U., Kishi, K., et al. (1995). Differential expression of complement receptors on human basophils and mast cells. Evidence for mast cell heterogeneity and CD88/CD5aR expression on skin mast cells. *J. Immunol.* 155, 3152–3160.
- Galli, S. J., Borregaard, N., and Wynn, T. A. (2011). Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat. Immunol.* 12, 1035–1044. doi: 10.1038/ni.2109
- Goldmann, O., Tuchscher, L., Rohde, M., and Medina, E. (2016). α -Hemolysin enhances *Staphylococcus aureus* internalization and survival within mast cells by modulating the expression of β 1 integrin. *Cell Microbiol.* 18, 807–819. doi: 10.1111/cmi.12550
- Guhl, S., Babina, M., Neou, A., Zuberbier, T., and Artuc, M. (2010). Mast cell lines HMC-1 and LAD2 in comparison with mature human skin mast cells—drastically reduced levels of tryptase and chymase in mast cell lines. *Exp. Dermatol.* 19, 845–847. doi: 10.1111/j.1600-0625.2010.01103.x
- Johnzon, C. F., Rönnerberg, E., Guss, B., and Pejler, G. (2016). Live *Staphylococcus aureus* induces expression and release of vascular endothelial growth factor in terminally differentiated mouse mast cells. *Front. Immunol.* 7:247. doi: 10.3389/fimmu.2016.00247
- Kobayashi, S. D., Malachowa, N., Whitney, A. R., Braughton, K. R., Gardner, D. J., Long, D., et al. (2011). Comparative analysis of USA300 virulence determinants in a rabbit model of skin and soft tissue infection. *J. Infect. Dis.* 204, 937–941. doi: 10.1093/infdis/jir441
- Kong, C., Neoh, H. M., and Nathan, S. (2016). Targeting *Staphylococcus aureus* Toxins: a potential form of anti-virulence therapy. *Toxins* 8:E72. doi: 10.3390/toxins8030072
- König, B., Prévost, G., Piémont, Y., and König, W. (1995). Effects of *Staphylococcus aureus* leukocidins on inflammatory mediator release from human granulocytes. *J. Infect. Dis.* 171, 607–613. doi: 10.1093/infdis/171.3.607
- Kupper, T. S., and Fuhlbrigge, R. C. (2014). Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequence. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 211–222. doi: 10.1038/nri1310
- Lina, G., Jarraud, S., Ji, G., Greenland, T., Pedraza, A., Etienne, J., et al. (1998). Transmembrane topology and histidine protein kinase activity of AgrC, the agr signal receptor in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 28, 655–662. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00830.x
- Lipinska, U., Hermans, K., Meulemans, L., Dumitrescu, O., Badiou, C., Duchateau, L., et al. (2011). Panton-Valentine leukocidin does play a role in the early stage of *Staphylococcus aureus* skin infections: a rabbit model. *PLoS ONE* 6:e22864. doi: 10.1371/journal.pone.0022864
- Löffler, B., Hussain, M., Grundmeier, M., Brück, M., Holzinger, D., Varga, G., et al. (2010). *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS Pathog.* 6:e1000715. doi: 10.1371/journal.ppat.1000715

- Lowy, F. D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* 339, 520–532. doi: 10.1056/NEJM199808203390806
- Massey, R. C., Horsburgh, M. J., Lina, G., Höök, M., and Recker, M. (2006). The evolution and maintenance of virulence in *Staphylococcus aureus*: a role for host-to-host transmission? *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 953–958. doi: 10.1038/nrmicro1551
- Monecke, S., Luedicke, C., Slickers, P., and Ehrlich, R. (2009). Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in asymptomatic carriers. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 28, 1159–1165. doi: 10.1007/s10096-009-0752-2
- Montgomery, C. P., Boyle-Vavra, S., and Daum, R. S. (2010). Importance of the global regulators *Agr* and *SaeRS* in the pathogenesis of CA-MRSA USA300 infection. *PLoS ONE* 5:e15177. doi: 10.1371/journal.pone.0015177
- Nakamura, Y., Oscherwitz, J., Cease, K. B., Chan, S. M., Muñoz-Planillo, R., Hasegawa, M., et al. (2013). *Staphylococcus* δ -toxin induces allergic skin disease by activating mast cells. *Nature* 503, 397–401. doi: 10.1038/nature12655
- Novick, R. P., Ross, H. F., Projan, S. J., Kornblum, J., Kreiswirth, B., and Moghazeh, S. (1993). Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J.* 12, 3967–3975.
- Otto, M. P., Martin, E., Badiou, C., Lebrun, S., Bes, M., Vandenesch, F., et al. (2013). Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 1524–1532. doi: 10.1093/jac/dkt073
- Perret, M., Badiou, C., Lina, G., Burbaud, S., Benito, Y., Bes, M., et al. (2012). Cross-talk between *Staphylococcus aureus* leukocidins-intoxicated macrophages and lung epithelial cells triggers chemokine secretion in an inflammasome-dependent manner. *Cell Microbiol.* 14, 1019–1036. doi: 10.1111/j.1462-5822.2012.01772.x
- Peschel, A., and Otto, M. (2013). Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 667–673. doi: 10.1038/nrmicro3110
- Pozzi, C., Lofano, G., Mancini, F., Soldaini, E., Speziale, P., De Gregorio, E., et al. (2015). Phagocyte subsets and lymphocyte clonal deletion behind ineffective immune response to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 750–763. doi: 10.1093/femsre/fuv024
- Qi, R., Joo, H. S., Sharma-Kuinkel, B., Berlon, N. R., Park, L., Fu, C. L., et al. (2016). Increased *in vitro* phenol-soluble modulins production is associated with soft tissue infection source in clinical isolates of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *J. Infect.* 72, 302–308. doi: 10.1016/j.jinf.2015.11.002
- Queck, S. Y., Jameson-Lee, M., Villaruz, A. E., Bach, T. H., Khan, B. A., Sturdevant, D. E., et al. (2008). RNAIII-independent target gene control by the *agr* quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Cell* 32, 150–158. doi: 10.1016/j.molcel.2008.08.005
- Rönnberg, E., Johnzon, C. F., Calounova, G., Garcia Faroldi, G., Grujic, M., Hartmann, K., et al. (2014). Mast cells are activated by *Staphylococcus aureus in vitro* but do not influence the outcome of intraperitoneal *S. aureus* infection *in vivo*. *Immunology* 143, 155–163. doi: 10.1111/imm.12297
- Schwartz, L. B., Min, H. K., Ren, S., Xia, H. Z., Hu, J., Zhao, W., et al. (2003). Trypsin precursors are preferentially and spontaneously released, whereas mature trypsin is retained by HMC-1 cells, Mono-Mac-6 cells, and human skin-derived mast cells. *J. Immunol.* 170, 5667–5673. doi: 10.4049/jimmunol.170.11.5667
- Shropshire, J. D., and Bordenstein, S. R. (2016). Speciation by symbiosis: the microbiome and behavior. *MBio* 7:e01785. doi: 10.1128/mBio.01785-15
- Spaan, A. N., Henry, T., van Rooijen, W. J., Perret, M., Badiou, C., Aerts, P. C., et al. (2013). The staphylococcal toxin Pantone-Valentine Leukocidin targets human C5a receptors. *Cell Host Microbe* 13, 584–594. doi: 10.1016/j.chom.2013.04.006
- Ständer, S., Weisshaar, E., and Luger, T. A. (2008). Neurophysiological and neurochemical basis of modern pruritus treatment. *Exp. Dermatol.* 17, 161–169. doi: 10.1111/j.1600-0625.2007.00664.x
- St. John, A. L., and Abraham, S. N. (2013). Innate immunity and its regulation by mast cells. *J. Immunol.* 190, 4458–4463. doi: 10.4049/jimmunol.1203420
- Suchard, J. R. (2011). “Spider bite” lesions are usually diagnosed as skin and soft-tissue infections. *J. Emerg. Med.* 41, 473–481. doi: 10.1016/j.jemermed.2009.09.014
- Swindle, E. J., Brown, J. M., Rädinger, M., DeLeo, F. R., and Metcalfe, D. D. (2015). IFN- γ enhances both the anti-bacterial and the pro-inflammatory response of human mast cells to *S. aureus*. *Immunology* 146, 470–485. doi: 10.1111/imm.12524
- Syed, A. K., Reed, T. J., Clark, K. L., Boles, B. R., and Kahlenberg, J. M. (2015). *Staphylococcus aureus* phenol soluble modulins stimulate the release of pro-inflammatory cytokines from keratinocytes and are required for induction of skin inflammation. *Infect. Immun.* 83, 3428–3437. doi: 10.1128/IAI.00401-15
- Tristan, A., Bes, M., Meugnier, H., Lina, G., Bozdogan, B., Courvalin, P., et al. (2007). Global distribution of Pantone-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 594–600. doi: 10.3201/eid1304.061316
- Urb, M., and Sheppard, D. C. (2012). The role of mast cells in the defence against pathogens. *PLoS Pathog.* 8:e1002619. doi: 10.1371/journal.ppat.1002619
- Vandenesch, F., Kornblum, J., and Novick, R. P. (1991). A temporal signal, independent of *agr*, is required for *hla* but not *spa* transcription in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 173, 6313–6320. doi: 10.1128/jb.173.20.6313-6320.1991
- Wagner, J. E., Owens, D. R., LaRegina, M. C., and Vogler, G. A. (1997). Self trauma and *Staphylococcus aureus* in ulcerative dermatitis of rats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 171, 839–841.
- Wang, R., Braughton, K. R., Kretschmer, D., Bach, T. H., Queck, S. Y., Li, M., et al. (2007). Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat. Med.* 13, 1510–1514. doi: 10.1038/nm1656
- Werfel, T., Oppermann, M., Butterfield, J. H., Begemann, G., Elsner, J., Götze, O., et al. (1996). The human mast cell line HMC-1 expresses C5a receptors and responds to C5a but not to C5a(desArg). *Scand. J. Immunol.* 44, 30–36. doi: 10.1046/j.1365-3083.1996.d01-272.x
- Zhu, Y., Pan, W. H., Wang, X. R., Liu, Y., Chen, M., Xu, X. G., et al. (2015). Trypsin and protease-activated receptor-2 stimulate scratching behavior in a murine model of ovalbumin-induced atopic-like dermatitis. *Int. Immunopharmacol.* 28, 507–512. doi: 10.1016/j.intimp.2015.04.047

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 © 2016 Hodille, Cuera, Badiou, Bienvenu, Steghens, Cartier, Bes, Tristan, Plesa, Le, Diep, Lina and Dumitrescu. 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.

Section 2 : Modulation de l'expression des facteurs de virulence staphylococciques par les antibiotiques

PROBLEMATIQUE

Les facteurs de virulence staphylococciques, dont l'expression est finement régulée lors du processus infectieux, participent amplement à la physiopathologie des infections à *S. aureus* (Lowy 1998). Le but premier d'un traitement antibiotique est de tuer les bactéries afin de réduire l'inoculum bactérien. Même si les posologies d'antibiotiques utilisées en pratique clinique courante sont choisies pour atteindre des concentrations sériques et tissulaires au-dessus des concentrations minimales inhibitrices (CMI) habituellement décrites pour un couple antibiotique-bactérie donné, il reste possible que, dans certains cas, les bactéries soient soumises à des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques au niveau du site infectieux. Différentes raisons peuvent expliquer cette situation : résistance acquise aux antibiotiques, mauvaise diffusion de l'antibiotique sur le site infecté notamment si le tissu infecté est nécrotique et/ou abcédé, demi-vie de l'antibiotique courte, absorption altérée ou encore interaction médicamenteuse. Or des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques peuvent représenter un stress pour la bactérie, induisant des potentielles modifications dans l'expression des différents facteurs de virulence, pouvant être délétères pour l'hôte si cette modulation se traduit par une augmentation de production de ces facteurs. Ainsi, la connaissance de la modulation de la virulence de *S. aureus* par les antibiotiques permet de mieux appréhender la stratégie thérapeutique à adopter pour traiter au mieux les infections staphylococciques présentant une composante toxigène importante.

La littérature traitant des effets modulateurs des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques sur l'expression des facteurs de virulence de *S. aureus* est riche et s'intéresse notamment aux toxines formant des pores (PVL, Hla), à la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1), aux entérotoxines et à la protéine A. Un des premiers objectifs sur cette thématique a donc été de réaliser une revue exhaustive de cette littérature afin d'identifier d'éventuels éléments manquants ou incomplets.

PARTIE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Deuxième publication : The Role of Antibiotics in Modulating Virulence in Staphylococcus aureus

Elisabeth Hodille, Warren Rose, Binh An Diep, Sylvain Goutelle, Gérard Lina, Oana Dumitrescu

Clinical Microbiology Reviews. 2017 Oct;30(4):887-917

Une revue exhaustive de la littérature traitant de la modulation de l'expression de la virulence de *S. aureus* par les antibiotiques a été réalisée sur la base de données PubMed, permettant de récolter 107 références d'articles originaux, qui ont été ensuite analysées et compilées pour en extraire les principales conclusions. Les preuves scientifiques des conclusions apportées sont basées sur des expériences *in vitro*, *in vivo* sur modèle expérimental d'infection chez l'animal, ou sur des cas rapportés d'infection humaine.

Globalement, certaines bêta-lactamines (oxacilline et imipénème) ont été montrées pour être de puissants inducteurs de la production des exotoxines (Dumitrescu et al. 2007, 2008, 2011), alors que certains antibiotiques agissant en inhibant la synthèse des protéines comme les lincosamides (clindamycine) ou les oxazolidinones (linézolide) sont considérés comme de puissants inhibiteurs de la synthèse des facteurs de virulence impliqués dans la physiopathologie de la pneumonie nécrosante : PVL (Dumitrescu et al. 2007; Stevens et al. 2007; Otto et al. 2013), Hla (Ohlsen et al. 1998; Gemmell et Ford 2002; 2004; Stevens et al. 2007; Pichereau et al. 2012; Otto et al. 2013) et de la toxine responsable du choc toxique staphylococcique, TSST-1 (Dickgiesser et Wallach 1987; Herbert et al. 2001; Stevens et al. 2006). Par conséquent, certaines recommandations nationales préconisent d'utiliser des antibiotiques dits anti-toxiniques, comme la clindamycine ou le linézolide, dans la stratégie thérapeutique de la prise en charge des infections liées aux toxines staphylococciques précédemment citées (Nathwani et al. 2008). Cependant, il n'existe aucun essai clinique randomisé publié à l'heure actuelle permettant de trancher définitivement la question quant à l'intérêt de l'utilisation des antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique dans les infections staphylococciques à composante toxinique, expliquant que certains pays n'incluent pas un tel usage dans leurs recommandations (Liu et al. 2011).

D'un point de vue mécanistique, les bêta-lactamines agissent en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne et en particulier celle du PGN par fixation aux protéines liant les pénicillines (PLP) qui sont des enzymes à activité transpeptidases, transglycosylases et carboxypeptidases impliquées dans sa synthèse. Seules les bêta-lactamines se liant aux PLP-1 (oxacilline de manière non sélective et imipénème de manière sélective) entraînent une forte augmentation de la production de PVL (Dumitrescu et al. 2011). L'augmentation de l'expression des exotoxines, liée à une augmentation de la transcription des gènes (Ohlsen et al. 1998; Dumitrescu et al. 2007; Steinhuber et al. 2008) serait un phénomène intercurrent à l'augmentation de l'activité des systèmes régulateurs SarA, Mgr et Arl,

déclenchée par la bactérie suite à l'hydrolyse du PGN induite par les bêta-lactamines, afin de limiter l'autolyse de la bactérie et contribuer à maintenir son intégrité (Dumitrescu et al. 2011).

Concernant les antibiotiques inhibant la synthèse des protéines, l'effet anti-toxinique de la clindamycine résulte principalement du mécanisme d'action propre à l'antibiotique, c'est-à-dire en réprimant directement la transcription des facteurs de virulence par blocage de l'activité ribosomale. En effet, l'effet anti-toxinique est abolit lorsque le gène *ermB* (erythromycin ribosome méthylase), conférant une résistance constitutive aux macrolides et apparentés par méthylation des ribosomes rendant la fixation impossible de la clindamycine pour son site actif, est présent (Herbert et al. 2001). De plus, la clindamycine interfère avec la transcription de certains mécanismes régulateurs comme le système à deux composants SaeRS (Novick et Jiang 2003) et la répression de SaeRS induit indirectement une diminution de la synthèse des exotoxines.

Pour le linézolide, l'effet inhibiteur sur la production de toxines est également principalement expliqué par son action bloquante de la traduction des protéines par fixation à la sous-unité 50-S des ribosomes (Otto et al. 2013). En effet, l'effet de concentrations sub-inhibitrices de linézolide sur la transcription des gènes codant les toxines est variable, avec l'observation dans certains fonds génétiques, comme le SARM-C ST80, d'une augmentation des ARNs messagers de Hla alors que son expression en est diminuée (Otto et al. 2013). Cela indique des mécanismes de régulation complexes intervenant dans la modulation de la virulence par les antibiotiques et que l'effet sur la transcription des gènes n'est pas toujours le reflet de l'expression des protéines, impliquant que toute variation du transcriptome devrait conduire à une analyse de la protéomique pour conclure sur un effet potentiel.

Les éléments supplémentaires de la publication ci-dessous sont disponibles en annexe 3.



The Role of Antibiotics in Modulating Virulence in *Staphylococcus aureus*

Elisabeth Hodille,^a Warren Rose,^b Binh An Diep,^c Sylvain Goutelle,^d Gerard Lina,^a Oana Dumitrescu^a

Centre International de Recherche en Infectiologie, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1111, Université Lyon 1, Centre National de la Recherche Scientifique UMR5308, ENS Lyon, Lyon, France^a; Pharmacy Practice Division, School of Pharmacy, University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin, USA^b; Division of HIV, Infectious Diseases and Global Medicine, Department of Medicine, University of California, San Francisco, California, USA^c; UMR CNRS 5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive, Université Lyon 1, Lyon, France^d

SUMMARY	888
INTRODUCTION	888
METHODS EMPLOYED TO STUDY EFFECTS OF ANTIBIOTICS ON <i>S. AUREUS</i>	
VIRULENCE	889
Bacterial Growth Conditions (Planktonic, Static or Dynamic, Biofilm, or Hollow-Fiber Infection Model)	889
Antibiotics (Molecules and Concentrations) Explored	891
Readouts for Effects of Antibiotics on Virulence Expression	893
Specific gene transcription variation measured by reporter fusions.....	893
Specific mRNA quantitation.....	894
Transcriptome profiles.....	894
Specific protein measurement	894
Proteomic profiles.....	894
<i>Ex vivo</i> staphylococcal properties.....	895
(i) Opsonophagocytosis and phagocytosis by neutrophils.....	895
(ii) <i>In vitro</i> hemolysis.....	895
(iii) Adhesion to synthetic surfaces or cellular cultures and biofilm formation....	895
(iv) <i>Ex vivo</i> proinflammatory response assessment (cytokine profile)	896
EFFECTS OF ANTIBIOTICS ON STAPHYLOCOCCAL VIRULENCE	897
Effects on Expression of Specific Virulence Factors	897
Alpha-toxin (Hla)	897
TSST-1.....	897
Enterotoxins	898
PVL	898
PSM	899
Protein A (SpA).....	900
Other staphylococcal virulence factors.....	900
Effects on <i>Ex Vivo</i> Staphylococcal Properties.....	901
Opsonophagocytosis and phagocytosis by neutrophils	901
<i>In vitro</i> hemolysis	902
Adhesion to synthetic or organic surfaces and biofilm formation	902
Proinflammatory response after staphylococcal stimulation	903
MECHANISMS INVOLVED IN <i>S. AUREUS</i> VIRULENCE MODULATION BY	
ANTIBIOTICS	904
Protein Synthesis Inhibitory Agents	904
Cell Wall-Disrupting Antibiotics	905
CWSS, autolysis, and virulence modulation.....	905
Beta-lactams and PBP interference	906
SOS response triggered by antibiotics and virulence expression modulation	907
Involvement of global virulence regulators.....	908
THERAPEUTIC IMPACT OF <i>S. AUREUS</i> VIRULENCE MODULATION BY ANTIBIOTICS ..	909
Animal Infection Model Evidence	909
Clinical Evidence	910
CONCLUSIONS	911
SUPPLEMENTAL MATERIAL	911
ACKNOWLEDGMENTS	911
REFERENCES	911
AUTHOR BIOS	916

Published 19 July 2017

Citation Hodille E, Rose W, Diep BA, Goutelle S, Lina G, Dumitrescu O. 2017. The role of antibiotics in modulating virulence in *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev 30:887–917. <https://doi.org/10.1128/CMR.00120-16>.

Copyright © 2017 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Oana Dumitrescu, oana.dumitrescu@chu-lyon.fr.

SUMMARY *Staphylococcus aureus* is often involved in severe infections, in which the effects of bacterial virulence factors have great importance. Antistaphylococcal regimens should take into account the different effects of antibacterial agents on the expression of virulence factors and on the host's immune response. A PubMed literature search was performed to select relevant articles on the effects of antibiotics on staphylococcal toxin production and on the host immune response. Information was sorted according to the methods used for data acquisition (bacterial strains, growth models, and antibiotic concentrations) and the assays used for readout generation. The reported mechanisms underlying *S. aureus* virulence modulation by antibiotics were reviewed. The relevance of *in vitro* observations is discussed in relation to animal model data and to clinical evidence extracted from case reports and recommendations on the management of toxin-related staphylococcal diseases. Most *in vitro* data point to a decreased level of virulence expression upon treatment with ribosomally active antibiotics (linezolid and clindamycin), while cell wall-active antibiotics (beta-lactams) mainly increase exotoxin production. *In vivo* studies confirmed the suppressive effect of clindamycin and linezolid on virulence expression, supporting their utilization as a valuable management strategy to improve patient outcomes in cases of toxin-associated staphylococcal disease.

KEYWORDS *Staphylococcus aureus*, antimicrobial agents, virulence factors

INTRODUCTION

Since the introduction of effective antimicrobial drugs, the morbidity and mortality due to various bacterial pathogens still represent a significant burden. Notably, *Staphylococcus aureus* causes very diverse severe infections, such as pneumonia, bacteremia, scalded skin syndrome, and toxic shock syndrome, in which bacterial toxins are important mediators (1). During infection, impaired functions are caused by host tissue damage induced by various virulence factors released upon bacterial replication. Certain bacterial toxins specifically trigger the immune system, resulting in subsequent cytokine release and further tissue injury. Antibiotic treatment for most infectious diseases is currently based on the ability of antimicrobials to achieve prompt pathogen destruction. Though rapid bacterial eradication is often obtained, sometimes the elimination of the offending organism does not occur fast enough to prevent the deleterious effects of the bacterial virulence factors (2).

Different classes of antibacterial agents may have different effects on the production and release of bacterial toxins and on the subsequent immune response of the host. Antimicrobial agents that disrupt bacterial cell wall synthesis (beta-lactams) lead to bacterial death and the release of pathogen-associated molecular patterns, such as peptidoglycans, lipoproteins, or DNA (3).

More recently, it was shown that subinhibitory concentrations of beta-lactams actively enhance the expression of staphylococcal exotoxins and adhesion molecules (4, 5). In contrast, antimicrobial agents that inhibit the microbial ribosome system (e.g., protein synthesis inhibitors, such as lincosamides and oxazolidinones) suppress the synthesis of bacterial toxins and may have secondary effects that include the dampening of toxin-induced host inflammatory responses (3).

Based on several series of data obtained *in vitro*, the usage of antibiotics that inhibit the expression of virulence factors has been recommended for the treatment of toxin-mediated infections (e.g., toxic shock syndrome and necrotizing pneumonia) (6, 7). Nevertheless, it remains to be determined whether the effects of antibiotics on bacterial toxin production or immunomodulation have any effect on treatment outcomes (8).

Here we review the evidence in the published peer-reviewed literature for modulatory effects of antibiotics on the virulence of *S. aureus* and provide a hypothesis regarding the underlying mechanism of this effect as well as perspectives on the clinical relevance of these findings.

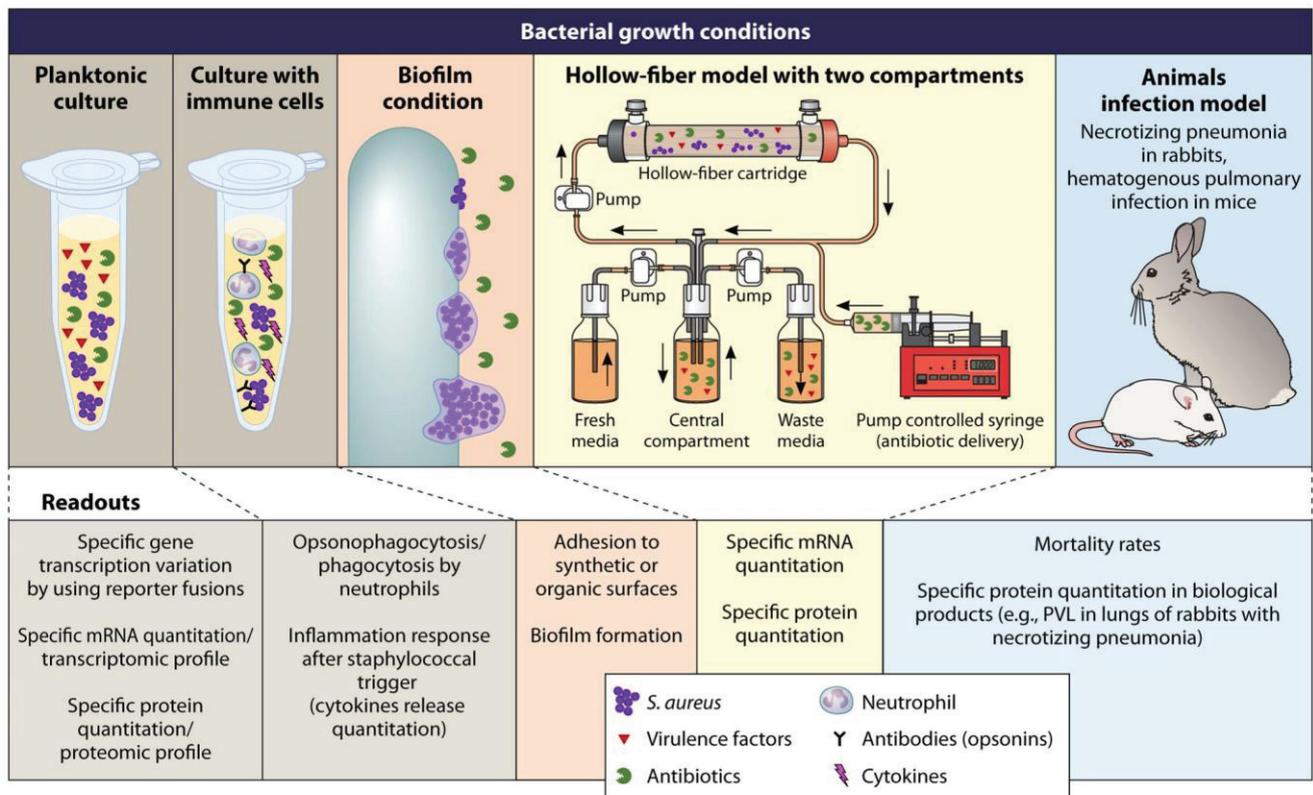


FIG 1 Experimental conditions (top) and readouts (bottom) used in the different reviewed studies of the modulation of *S. aureus* virulence by antibiotics.

METHODS EMPLOYED TO STUDY EFFECTS OF ANTIBIOTICS ON *S. AUREUS* VIRULENCE

An exhaustive literature search of the PubMed database was performed from January through June 2016. The search included no year limitations and used keywords (antibiotics, beta-lactams, oxacillin, vancomycin, linezolid, clindamycin, protein synthesis inhibitor antibiotic, rifampin, trimethoprim, and fluoroquinolone) and each of the following terms: virulence, toxin, toxic shock staphylococcal toxin 1 (TSST-1), Panton-Valentine leukocidin (PVL), protein A, hemolysin, phenol-soluble modulins (PSM), *Staphylococcus*, and *aureus*. Reviews and non-English-language articles were excluded, and the remaining articles were screened manually for relevance (i.e., whether the article included data on antibiotic-mediated effects on the expression of staphylococcal virulence). A total of 107 selected references were categorized as *in vitro*, *in vivo* animal, or *in vivo* human studies. The key data were summarized and critically reviewed. Figure 1 illustrates the main experimental settings and assays used throughout the reviewed publications.

Bacterial Growth Conditions (Planktonic, Static or Dynamic, Biofilm, or Hollow-Fiber Infection Model)

Bacterial growth conditions have an important role in the assessment of bacterial virulence during normal cell growth and in the presence of antibiotic exposure. Secreted bacterial proteins, including enterotoxin B, TSST-1, PVL, PSM, and alpha-toxin, are produced during the late exponential and stationary growth phases, whereas bacterial surface proteins, such as fibronectin-binding protein (FnBP), protein A, clumping factor, and other surface-binding proteins, are produced during the early exponential growth phase (1). For a better understanding of these phenomena, *in vitro* assessments of virulence modification by antimicrobials should be performed under growth conditions that are optimal for the production of selected virulence factors. Planktonic

cultures in the late exponential phase are optimal for the production of secreted proteins. In addition to use of a suitable growth phase, specific types of media should be used to optimize toxin production (9). The antibiotic susceptibility testing method recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), based on the utilization of cation-adjusted Mueller-Hinton medium, which yields insufficient PVL production, was modified. The broth was replaced by casein hydrolysate and yeast extract (CCY) medium, resulting in PVL levels that were approximately 50-fold higher and therefore easily detected by the dosage assay (10). Similarly, a modified CLSI method using tryptic soy broth (TSB) has also been used to determine the effects of antibiotics on PSM production, as PSM concentrations in TSB are consistent with the detection range of the quantitation assay commonly used (11). Other studies of PVL and alpha-toxin expression and/or quantification with antibiotic exposure were performed in CCY medium with agitation, with antibiotic added during the exponential phase, equivalent to 3 h of culture or a 2 McFarland standard (5, 12, 13). Indeed, growth with agitation allows better control of the growth phase than that with the CLSI-recommended static culture conditions. Other studies also initiated antibiotic treatment during mid-log-phase growth and measured TSST-1, alpha-toxin, and PVL in the supernatant following antibiotic exposure in brain heart infusion (BHI) medium supplemented with glucose, sodium bicarbonate, sodium chloride, disodium phosphate, L-glutamine, and magnesium sulfate. This medium permits maximum TSST-1 secretion, along with supporting alpha-toxin and PVL production (4). TSST-1 production levels were compared for two different growth phases. Overall, the stationary phase (overnight growth and adjustment to an inoculum of 1×10^9) allowed better discrimination of antibiotic effects on TSST-1 production than that with the early exponential phase (2 h of growth from 5×10^6 prior to the addition of antibiotics) (14), mainly because of the detection limitations of the dosing assays required for the assessment of antibiotic effects.

In addition to studies on planktonic bacteria, the effects of antibiotics have also been investigated in staphylococcal biofilms, as these remain a challenge in clinical treatment. When the biofilm phenotype is already achieved, the presence of sessile bacteria within an extracellular matrix of polysaccharide, proteins, and extracellular DNA reduces antibiotic effectiveness. Evaluation of virulence factors associated with bacterial attachment and biofilm development is performed in the early exponential growth phase, when these surface proteins are synthesized as a result of their upregulated expression; examples include protein A (*spa*), clumping factor B (*clfB*), collagen adhesion protein (*cna*), coagulase (*coa*), and fibronectin-binding protein (*fnb*) (15–17). Similarly, prevention of the biofilm phenotype is performed by adding antibiotics during the exponential phase of growth, followed by an 18- to 24-h incubation period (18). Cultures are grown in nutrient-rich medium, most commonly tryptic soy broth supplemented with <1% glucose, which has been proven to facilitate biofilm formation (19). Other, less utilized but nonetheless effective media (with or without glucose) for biofilm production include brain heart infusion medium and Luria-Bertani broth (20). However, given that antibiotic activity can be medium dependent (21), the effects of antibiotics on biofilm virulence modification should be interpreted carefully with regard to the growth medium.

In vitro pharmacokinetic and pharmacodynamic (PK/PD) models remain a valuable tool for assessing antimicrobial dose-response relationships both for existing antibiotics and for those in various stages of clinical development. These modeling systems have provided the basis for new PK/PD approaches in patients, including prolonged/continuous-infusion beta-lactam and extended-interval aminoglycoside therapies, among others (22). The use of these systems to investigate the *in vitro* effects of antimicrobials on the production of bacterial toxins remains very limited compared to their overall PK/PD application. Although the arrangement of PK/PD models can be variable due to investigator customization and preferences, the basic underlying principle of delivering human-simulated doses against a pathogen of interest is constant (23). Theoretically, the framework of these systems should permit evaluation of

bacterial virulence effects throughout the dosing interval at concentrations above and below the organism's MIC. One-compartment models (those in which the antibiotic is delivered to the pathogen in a single chamber) have been used to provide basic assessments of antimicrobial effects on bacterial toxin production (24). The limitation of the single-compartment modeling system is the continuous flow of medium entering and exiting the system, which results in significant losses of organisms and/or extracellular protein. This loss hinders the assessment of virulence regulation or toxin protein production upon antibiotic exposure. The one-compartment modeling system has been used only to evaluate streptococcal exotoxin release upon pharmacodynamic antibiotic exposure (24), and no literature supports its validation for the assessment of *S. aureus* virulence.

Hollow-fiber modeling systems offer a more intricate type of pharmacodynamic model, but they follow the same principles outlined for PK/PD models to simulate human antibiotic exposure and duration. The exception with the hollow-fiber system is its two-compartment design, in which an artificial capillary membrane system is used to provide a separation between the central and peripheral compartments (25). The peripheral compartment is inoculated with the organism, and the fibers (available with either a 5-kDa or 20-kDa molecular mass cutoff) trap the bacteria and extracellular proteins, such as toxins and virulence factors. The central compartment remains sterile and delivers the medium and antimicrobial(s) to the peripheral compartment. Although the hollow-fiber system offers many built-in advantages, there has been very little exploration of the effects of antibiotic treatment on *S. aureus* virulence factor expression and toxin production by use of this model. The first and only such study, to date, used simulated human doses of clindamycin, linezolid, minocycline, trimethoprim-sulfamethoxazole, and vancomycin against methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) MW2 over a 72-h treatment period and assessed *S. aureus* virulence by the expression of PVL toxin and the enterotoxin genes *sec4*, *sek*, *seq*, and *sel2* (26). The advantage of this system is that it allows dynamic monitoring of antibiotics, testing of antibiotics in different combinations, and characterization of toxin functionality in medium extracted at selected time points. Only one other study used the hollow-fiber model to study antivirulence effects, using linezolid and ciprofloxacin against *Bacillus anthracis* (27). There remains ample future research potential to identify antivirulence pharmacodynamics by using the hollow-fiber system.

Antibiotics (Molecules and Concentrations) Explored

A large number of *in vitro* studies focused on subinhibitory antibiotic concentrations (sub-MICs), as this setting allows decoupling of the virulence modulation effect from the antimicrobial effect. Moreover, though in clinical therapeutics antibiotics are usually used in high doses, sub-MICs of antistaphylococcal agents may occur, either due to antibiotic-resistant microorganisms or due to the pharmacokinetics of the antibiotic, in several ways.

First, the plasma concentration may fall below the MIC level at the end of the dosing interval for antibiotics with a short half-life and intermittent dosing administration. This is the case for gentamicin (9) and antistaphylococcal penicillins (oxacillin, cloxacillin, dicloxacillin, and nafcillin), whose half-life is only 30 to 60 min in patients with normal renal function (10, 11). In addition, the half-life of antistaphylococcal drugs may be reduced in special populations, such as burn patients (12), cystic fibrosis patients (13, 14), obese patients (15), critically ill patients with augmented renal clearance (16), or young children (17). Such patients have an increased risk of subinhibitory drug concentrations when treated with standard doses.

Second, the antibiotic concentration may be subinhibitory at the site of infection as a result of poor diffusion, especially since severe *S. aureus* infections are associated with intense necrosis. For example, linezolid concentrations of <4 mg/liter have been reported for epithelial lining fluid and alveolar macrophages (18). Another example is beta-lactam penetration into bone. Bone concentrations lower than MIC breakpoints

and low plasma-to-bone-concentration ratios have been reported for several anti-staphylococcal penicillins (19).

Third, low plasma and tissue exposure may occur in cases of drug-drug interactions. A relevant example among anti-staphylococcal agents is rifampin, which is a strong inducer of cytochrome P450 enzymes and transporters (e.g., P-glycoprotein) involved in the metabolism and disposition of many drugs. It has been shown that rifampin can decrease exposure to sub-MIC levels for the companion anti-staphylococcal drugs linezolid (20, 21) and clindamycin (22, 23).

Finally, sub-MICs are likely to occur in cases of poor drug adherence. This may be highly relevant for orally administered drugs in an ambulatory care setting (24, 25).

Early studies of antimicrobial effects on bacterial cell processes showed that sub-MICs of antibiotics can suppress or induce toxin production, and this is still largely the basis for investigating the alterations in bacterial virulence during antibiotic exposure. Because many of the studies share similarities regarding the type of antibiotic used and the antibiotic concentrations explored, this section highlights only a few studies that represent the field.

Clindamycin has widely displayed antivirulence properties due to the antibacterial effects of its binding to the 50S subunit of bacterial ribosomes. In a study of six toxic shock syndrome toxin-producing isolates, clindamycin concentrations ranging from 0.001 to 1.0 $\mu\text{g/ml}$ were evaluated (28). Although clindamycin susceptibility was not reported in that study, it is assumed that the concentrations were sub-MICs because the bacterial growth was similar to that of the no-antibiotic control. The overall effect of toxin suppression by clindamycin observed in the early studies was consistent with most of the following reports, which varied the tested strains, the virulence factors, the antibiotic concentrations, and the inocula. Most often, clindamycin was used at 1/4 the MIC for evaluation of its effects on alpha-toxin and PVL expression (29), but higher antibiotic concentrations, such as 5 times the *S. aureus* MIC, have also been used for testing of higher bacterial inocula (4, 29).

Tetracyclines, including doxycycline and tigecycline (a tetracycline derivative in the glycylcycline subclass), inhibit bacterial growth by preventing the association of aminoacyl-tRNA with the bacterial ribosome via binding to the 30S ribosomal subunit (30). Tetracyclines retain activity against staphylococci, and they have been explored for virulence modification. Because it was the first in its class, tetracycline was initially evaluated at sub-MICs and was found to have inhibitory effects on coagulase and protein A production and to largely abolish alpha- and delta-hemolysin production (31). Tigecycline has been explored least in this regard, but it has been studied against community-acquired MRSA (CA-MRSA) due to its reliable activity. Sub-MICs of tigecycline (1/8, 1/4, and 1/2 MIC) were used to evaluate virulence factor expression in CA-MRSA (13), and concentrations of 1/8 and 1/4 MIC were studied for effects on the exoproteins, phenol-soluble modulins, alpha-hemolysin, and protein A (11).

More recently, a relatively new antibiotic, linezolid, has been studied for antivirulence activity *in vitro*. Linezolid is an oxazolidinone antibiotic that, similar to clindamycin, binds to the 50S subunit of the bacterial ribosome. It is often studied alongside clindamycin for comparative effects *in vitro*; the concentrations relative to the organism's MIC are similar to those discussed for clindamycin. These concentrations range from 1/4 to 5 \times MIC, which is commonly 2 mg/liter for most *S. aureus* strains (4, 12). This effect was confirmed in a hollow-fiber model using therapeutic exposures (26). A study of virulence factor expression in Gram-positive cocci, including *S. aureus*, determined that antivirulence properties of linezolid are apparent at 1/2 to as low as 1/8 MIC (32). A similar approach was used to test sub-MICs of linezolid (12.5, 25, 50, and 90% of the MIC) in another study of *S. aureus* virulence factor expression (33). Though the predominant effect observed for most of the studied toxins was a production decrease, it depended on the quantitation assay used, and the most effective concentrations were those close to the MIC.

The beta-lactam class of antibiotics is highly diverse, featuring multiple agents and subclasses (penicillins, cephalosporins, etc.). Anti-staphylococcal beta-lactams are the

main focus of studies on *S. aureus* virulence. Their mechanism of action of binding to penicillin-binding proteins (PBPs) and inhibiting transpeptidation and/or transglycosylation of the cell wall results in rapid cell lysis and death in susceptible strains. Sub-MICs of antistaphylococcal β -lactams consistently enhance toxin production by *S. aureus*. This was first noted with nafcillin concentrations slightly below the MIC for both methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) and MRSA, which resulted in elevated alpha-toxin production (34). This was confirmed in a later study using a range of sub-MIC nafcillin concentrations, from 0.01 to 8 mg/liter (4). Another study evaluated the effects of multiple beta-lactam agents on PVL expression, using 1/2 MICs of oxacillin, imipenem, cefotaxime, cefaclor, and ceftiofex. After confirming that oxacillin induced PVL production at subinhibitory concentrations of 1/8 to 1/2 MIC (0.12 to 32 mg/liter) (10), the same group found that beta-lactam-induced expression of PVL was linked only to beta-lactams that bound penicillin-binding protein 1 (oxacillin and imipenem) (5). Another study with oxacillin confirmed that it increased the expression of secreted toxins at a single sub-MIC (0.5 mg/liter), albeit to a more moderate level than those noted in other studies (35).

Vancomycin and daptomycin have distinct mechanisms of action, and due to their use in severe MRSA infections, their individual effects on *S. aureus* virulence are important. Vancomycin binds to the cell wall precursors of peptidoglycan and inhibits transpeptidation of the cell wall. In several studies, vancomycin at concentrations of 1/8 to 1/2 MIC of 0.5 to 2 mg/liter had limited effects on *S. aureus* virulence as measured by gene expression or toxin production (10, 13). Daptomycin is a lipopeptide antibiotic with antibacterial activity on the cell membrane; it causes membrane depolarization and potassium efflux without cell lysis. One study of daptomycin at 1/2, 1/4, and 1/8 MIC in select MRSA strains (MIC range, 0.25 to 0.5 mg/liter) reported that these concentrations of the antibiotic had no major effects on virulence factor expression (13).

In vitro experiments mostly evaluated sub-MICs; for clindamycin and linezolid, an inhibitory effect on toxin production was often observed, while for beta-lactams an inducing effect was reported. In addition, miscellaneous antibiotics have also been evaluated over sub-MIC ranges (1/8 to 1/2 MIC): fusidic acid, which binds to elongation factor G, ultimately resulting in protein synthesis inhibition (36), was found to inhibit PVL production in a manner similar to that for the protein synthesis inhibitors clindamycin and linezolid (10), while the fluoroquinolone antibiotics enoxacin, lomefloxacin, and ciprofloxacin, which inhibit bacterial DNA synthesis by binding to gyrase and topoisomerase, were found to inhibit alpha-toxin production (37). Although some antibiotics have not been evaluated for virulence modification in *S. aureus*, data obtained using antibiotics within a similar class or with a similar mechanism of action can help in positing the potential effects of unstudied agents.

Readouts for Effects of Antibiotics on Virulence Expression

Specific gene transcription variation measured by reporter fusions. The effects of antibiotics on virulence expression were explored by means of reporter fusions to examine specific gene transcription (10, 16, 29, 38–41). As a general pattern, *S. aureus* laboratory strains were transfected with a plasmid containing a fusion gene constructed using the promoter of a given gene (a staphylococcal virulence factor or a regulatory gene) and, as a reporter gene, an enzyme gene whose activity is easily measurable, such as *lux* (luciferase) (38, 40, 41), *lacZ* (galactosidase) (10, 16, 29), or *blaZ* (beta-lactamase) (39). Thus, the measured enzyme activity reflects the promoter activity of a specific gene, often *hla* (alpha-hemolysin) (16, 29, 39, 40) or *spa* (protein A) (16, 38, 39), but also the PVL gene (10). This method allows easy screening of the effects of several antibiotics on the transcription of a given gene, particularly if it is coupled with the use of antibiotic discs or Etest diffusion on agar plates (16, 38, 40). However, given that reporter gene experiment data do not take into account the importance of posttranscriptional and translational regulation, the yielded results are not expected to be fully concordant with the effective protein production level.

Specific mRNA quantitation. Specific mRNA quantitation has frequently been used to study the impact of sub-MICs of antibiotics on the expression of a given gene (staphylococcal virulence factor or regulatory genes). Subsequent to RNA extraction and purification, two assays are used to measure specific mRNA levels: Northern blotting and quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). Virulence determinants whose expression was explored by specific mRNA quantitation were *hla* (4, 13, 29, 34, 35, 39, 42), *pvl* (4, 5, 12, 13, 26), and *spa* (13, 16, 38, 39, 43); mRNA levels were normalized with respect to the expression of housekeeping genes, mostly the 16S rRNA gene or *gyrB*. Variation in mRNA levels may occur either by transcriptional modulation or by posttranscriptional mechanisms involving mRNA turnover. Moreover, variations in the mRNA levels induced by sub-MICs of antibiotics do not always result in changes in protein synthesis, which should be taken into account before further conclusions are drawn.

Transcriptome profiles. Several of the selected articles employed a transcriptomic approach using microarray data analysis to study the effects of sub-MICs of antibiotics on staphylococcal virulence (44, 45). This approach shares disadvantages with the quantitation of specific mRNA levels and may have decreased sensitivity for relatively small changes in gene expression. In short, it provides an overview of the transcriptomic modifications induced by sub-MICs of antibiotics, thus allowing the selection of specific candidate genes for further exploration thereafter. Nevertheless, this transcriptomic approach highlights some modifications in global metabolic pathways or regulatory systems but does not precisely measure any given virulence factor. With this method, Awad et al. showed that a sub-MIC of vancomycin (1/2 MIC) induced upregulation of 36 genes of an epidemic MRSA strain, including 15 loci involved in cell wall metabolism, capsule, and autolysis, and downregulation of 12 loci with still-unknown functions (44). Similarly, Kuroda et al. (45) showed that sub-MICs of ceftiofloxacin induced the upregulation of several genes involved in the staphylococcal stress response and in the SaeRS regulatory system (discussed further in a later section).

Specific protein measurement. Because of the above-mentioned misinterpretations linked to mRNA quantitation alone, most of the selected studies also determined whether specific protein expression levels were associated with mRNA quantitation. Different assays were used according to the staphylococcal virulence factor explored. For PVL, protein A (SpA), alpha-hemolysin (Hla), and FnBP, the authors used enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (5, 10, 13, 43, 46), Western blotting, or immunoblotting (12, 29, 33, 35, 41, 42, 47, 48). Notably, confounding factors related to the technical limitations of these assays may hamper the results obtained. Indeed, Turner and Sriskandan (12) reported only slight impacts of flucloxacillin, clindamycin, or linezolid on the PVL production level, while a number of other authors agreed that sub-MICs of flucloxacillin and clindamycin or linezolid increased and decreased PVL production, respectively. These inconsistencies may be due partly to the signal saturation of Western blots for PVL quantitation when antibiotics are added during the exponential growth phase (29). For PSM, which are small peptides of only 20 to 40 amino acids that are not suitable for immune quantitation by ELISAs, the authors used a chromatography technique (generally high-pressure liquid chromatography [HPLC]) coupled with mass spectrometry (MS) (11, 35, 49, 50). For staphylococcal virulence factors with specific enzymatic or toxic functions, such as coagulase or hemolysin, the specific properties of the proteins rather than their antigenic levels were used to quantify their functional activity (45, 51). Given that biological activity is being assessed, more disparities in results may be expected, depending on the variability of the substrate.

Proteomic profiles. Only a few articles (five in the selection) used proteomic profiles to observe the effects of sub-MICs of antibiotics on staphylococcal virulence. These studies used high-resolution semiquantitative assays, such as electrophoresis (SDS-PAGE or two-dimensional electrophoresis) followed by Coomassie blue or silver staining, to determine the effects of antibiotics on the staphylococcal protein profile (35, 39). Other authors complemented electrophoresis with identification of interesting bands

by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF) to identify proteins that were specifically modulated by antibiotic treatment (33, 47). However, because this approach does not yield an accurate quantification of weakly expressed proteins, variations in the expression of these proteins may remain undetected. Consequently, the results obtained using these methods should be confirmed by specific protein measurements. Recently, Liu et al. described a label-free method based on liquid chromatography–tandem MS (LC-MS/MS) that can be used to obtain qualitative and quantitative proteomic profiles for comparison of MSSA and MRSA proteomic profile changes upon oxacillin exposure (52). This strategy provides an overview of the effects of sub-MICs of antibiotics on staphylococcal virulence, including the effects on metabolic pathways, thus permitting a global approach to virulence as a reflection of bacterial physiology. In summary, Liu et al. observed that, for MRSA strains, exposure at 1/8 MIC of oxacillin induced the downregulation of 16 genes involved in amino acid metabolism (alanine, aspartate, and glutamate) and the upregulation of 65 genes, including genes encoding PBP2a-mediated methicillin resistance, the beta-lactamase regulatory protein, the peptidoglycan synthesis network, and pantothenate and coenzyme A (CoA) biosynthesis proteins, with the last two also being upregulated in MSSA strains (52).

Ex vivo staphylococcal properties. (i) Opsonophagocytosis and phagocytosis by neutrophils. The first and probably most important mechanism in the host defense against *S. aureus* is the innate immunity that is mediated mainly through phagocytic cells, such as polymorphonuclear cells (PMNs) and macrophages. *S. aureus* has developed various mechanisms to escape the host immune system; these strategies include inhibition of PMN chemotaxis and PMN activation and antiphagocytosis strategies, such as inhibition of opsonophagocytosis. Therefore, an early interest was taken in the impact of antibiotics on *S. aureus* susceptibility to host defense mechanisms. Early studies, some dating from as far back as 30 years ago, explored various antibiotic families with respect to their impact on the host's antistaphylococcal immune response. Three different protocols were used in these studies. In the first protocol, *S. aureus* isolates were previously cultured with or without antibiotics at sub-MICs and subsequently incubated with PMNs or macrophages (32, 53–62), allowing measurement of the effects of antibiotics on the susceptibility of bacteria to opsonization and opsonophagocytosis or phagocytosis. In the second protocol, *S. aureus* and phagocytic cells were simultaneously cocultivated with antibiotics at sub-MICs (63), enabling study of the synergic effect of antibiotics and phagocytic cells on bacterial survival. In the third method, *S. aureus* and phagocytic cells were incubated together to allow phagocytosis; the remaining extracellular *S. aureus* cells were then lysed, and antibiotics at sub-MICs were added to the medium (64), providing data on the antibiotics' effects on intracellular bacteria. In addition to the assessment of the bactericidal effect of PMNs, several authors also investigated PMN chemotaxis by exploring the ability of the supernatant from antibiotic-treated *S. aureus* to differentially modulate PMN migration through a Boyden chamber (65).

(ii) In vitro hemolysis. The hemolytic ability of *S. aureus* is linked to virulence factor production; therefore, *in vitro* hemolysis has long been studied as a surrogate for staphylococcal virulence assessment. Though a number of *S. aureus* toxins have the ability to lyse red blood cells, most of the hemolytic effect observed *in vitro* is due to Hla production. Two methods were used in the reviewed studies: (i) measurement of the hemolytic activity of *S. aureus* supernatants against rabbit erythrocytes after previous incubation of bacteria with or without antibiotics, with one hemolytic unit being defined as the amount of *S. aureus* supernatant required to liberate 50% of the total hemoglobin from the erythrocytes, expressed in units per milliliter or units per bacterial density (4, 32, 34, 42); and (ii) visual assessment of the hemolytic zones related to *S. aureus* plated on blood agar prior to the deposition of antibiotic disks or of strips containing a predefined gradient of antibiotic concentrations (Etest strips) (37, 45).

(iii) Adhesion to synthetic surfaces or cellular cultures and biofilm formation. *S. aureus* possesses numerous surface proteins that facilitate its adhesion to synthetic and

organic surfaces. The largest and most studied class of such proteins are cell wall-anchored proteins collectively termed microbial surface component-recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs), including SpA and serine-rich adhesin for platelets, which play a particular role (66). The expression of these cell wall-anchored proteins has been linked to a range of infection types, including endocarditis, pneumonia, prosthetic device infections, renal abscesses, mastitis, sepsis, and septic arthritis (67–70). Readouts for determining the production of adhesion virulence factors include either specific quantitation of several proteins involved in adhesion, such as SpA or FnBP (as already discussed), or overall measurement of the adhesion of bacterial cells to synthetic or organic surfaces, which represents the first step in biofilm formation. Bacterial biofilms are organized communities of bacteria embedded in a self-produced matrix of extracellular polymeric substances. Biofilms are increasingly being associated with human infections, especially due to the rise in the use of medical devices such as catheters or implants. The increased host immune system evasion as well as tolerance and resistance to antimicrobials displayed by biofilms leads to failure of conventional antimicrobial therapy. From this perspective, the ability of *S. aureus* strains to form biofilms may be regarded as a virulence factor, and antibiotics that interfere with biofilm formation can therefore modulate staphylococcal pathogenesis. Though biofilm development is complex and heterogeneous, phenotypic readouts have been accepted as standards to assess the impacts of antibiotics on biofilm formation. The assay that is probably most used for analysis of antibiotic prevention of biofilm formation is performed in a 96-well plate (MWP [i.e., multiwell plate]) after overnight incubation of bacteria added to medium in flat-bottomed wells. The newly developed biofilm is measured after staining with crystal violet and subsequent assessment by an absorbance measure (71). In the MWP, biofilms are formed either under static conditions or under low-shear conditions (when plates are placed on a shaker), but in both cases the amounts of available nutrients and aeration are limited. Other methods exist for bacterial quantification in biofilms following antibiotic exposure, including use of flow cells, dynamic biofilm PK/PD models, and other dynamic reactor systems characterized by a continuous flow of fresh nutrients. Biofilms obtained in these two settings display different functional characteristics and architectures, which may affect the results of antibiotic biofilm formation prevention experiments. Indeed, a recent study established that the ability of antibiotics to prevent biofilm formation in dynamic systems (measured via the log reduction in biofilm-embedded bacteria) was significantly lower than that found using the MWP (72). The main cause of discrepancy was the nutrient depletion in the static MWP model, as refreshment of the medium twice daily restored the antibiotic efficacy to levels similar to those observed in the dynamic model.

(iv) **Ex vivo proinflammatory response assessment (cytokine profile).** Invasive *S. aureus* infection elicits a complex immune response in the host. Specific components of *S. aureus* are known to stimulate proinflammatory responses that lead to phagocytosis; however, certain staphylococcal proteins have a role in evading host recognition (73). Although no specific antigen has yet been identified as being essential for *S. aureus* pathogenicity, the secreted virulence factors have been associated with septic shock due to a dysregulated inflammatory response (74). Alpha-toxin, for example, increases the *in vivo* production of the cytokines interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-8, and tumor necrosis factor alpha (TNF- α), in addition to its effect on cytokines involved in adaptive immunity, particularly IL-17 (75). Antibiotics may alter the proinflammatory response of the host to *S. aureus*, in part by preventing virulence factor production. The effects of antibiotics on cytokine production are explored by use of select *ex vivo* protocols. These methods use collected whole blood or cells, such as peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), monocytes, or PMNs, or test the response of a standard cell type, such as macrophages (33, 76–78). *S. aureus* (live or heat killed) or bacterial components, such as peptidoglycans or purified toxins, are added to the *ex vivo* cell medium along with various concentrations of antibiotics. Following incubation, cytokine levels are measured using enzyme-linked immunoassays, with the readout interpreted as relative cytokine concentrations.

EFFECTS OF ANTIBIOTICS ON STAPHYLOCOCCAL VIRULENCE

Effects on Expression of Specific Virulence Factors

Alpha-toxin (Hla). Alpha-toxin or alpha-hemolysin is a secreted, pore-forming cytotoxin that forms heptameric pores in host cell membranes, which result in the lysis of multiple host cell types, including epithelial cells, endothelial cells, monocytes, macrophages, and neutrophils (75, 79, 80). Its role in *S. aureus* pathogenesis is well established for multiple infection types, ranging from skin and skin structure infections to lethal invasive infections. It has recently garnered increasing interest as a potential target for vaccine development and passive immunity due to its being highly conserved in various *S. aureus* backgrounds and its contribution to disease (81). Because alpha-toxin was one of the first *S. aureus* toxins to be identified (82), the effects of antibiotics on its regulation and production have been well studied. In these analyses, antibiotics are often studied at sub-MIC levels, as described in the previous section. Initial observations noted that antibiotics that inhibit protein synthesis reduce the hemolytic activity of *S. aureus*. Several articles published since then have defined the roles of different antibiotic classes in altering alpha-toxin production.

Kernodle et al. studied the effect of nafcillin on alpha-toxin production in 37 *S. aureus* strains *in vitro*. Both nafcillin-susceptible (MSSA) and nonsusceptible (MRSA) strains displayed nafcillin-triggered increases in both alpha-toxin expression and hemolytic activity. Interestingly, the supernatants from nafcillin-exposed strains resulted in increased lethality compared to that of supernatants from unexposed strains when injected intraperitoneally into mice (34). Further effects of sub-MICs of antibiotics on alpha-toxin production were explored by Ohlsen et al., who confirmed increased alpha-toxin gene expression on beta-lactam exposure. They expanded on this finding, showing that beta-lactams induce more alpha-toxin production (up to 30-fold) in MRSA strains than in MSSA strains (29). Other investigations have confirmed alpha-toxin induction by beta-lactams (4, 42). In addition, alpha-toxin expression was completely abolished by clindamycin, reduced by erythromycin and aminoglycosides, unaffected by glycopeptides, and increased by fluoroquinolones (29). Multiple studies have identified linezolid as a potent inhibitor of alpha-toxin expression and secretion (32, 33). However, one study found a stronger concentration-dependent inhibition of alpha-toxin secretion with clindamycin than that with linezolid (13). It has more recently been accepted that protein synthesis inhibitors, especially clindamycin and linezolid, prevent the translation but not transcription of alpha-toxin (4, 26).

TSST-1. Toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1), encoded by the *tst* gene, is considered the classic superantigen toxin in *S. aureus*. The contribution of TSST-1 to serious disease is well defined: it has been portrayed most prominently for its role in toxic shock syndrome in children (65) and in young women through the use of tampons (83). The latter has declined significantly due to public health preventative measures to curb toxic shock syndrome associated with tampon use during menstruation (84). However, it remains an important toxin in severe skin and wound infections, and antibiotics have demonstrated an important clinical role in altering the production of this virulence factor (8).

The *in vitro* data discriminate among antibiotic effects on *tst* expression and toxin secretion. An old study highlighted the inhibitory effect of sub-MICs of clindamycin (from 1/4 to 1/256 MIC) on TSST-1 production (85), and Herbert et al. showed a decrease of *tst* transcription and TSST-1 production with 0.02 $\mu\text{g/ml}$ of clindamycin (39). A comparative study of flucloxacillin, gentamicin, and clindamycin found that clindamycin was most effective at suppressing TSST-1 production, reducing it by up to 95%, whereas the addition of gentamicin or flucloxacillin resulted in a 75% reduction in TSST-1 production (14). A case report of a patient successfully treated with linezolid for toxic shock syndrome correlated this with *in vitro* evidence of suppression of TSST-1 production with either linezolid or clindamycin, while TSST-1 production with nafcillin or vancomycin was no different from that of the control (86). In a study of the transcription and translation of toxins during antibiotic exposure, nafcillin increased and prolonged TSST-1 regulation and production, while clindamycin and linezolid

suppressed translation but not transcription of TSST-1. Tigecycline was studied against *S. aureus* biofilm cultures, and it suppressed *tst* expression, with a 10-fold reduction in TSST-1 production compared to that in untreated cultures (15). Collectively, these studies show that protein synthesis inhibitors have mixed effects on *tst* expression but are effective in significantly reducing TSST-1 production.

Enterotoxins. The family of *S. aureus* enterotoxins is highly diverse, with over 20 identified types, including but not limited to staphylococcal enterotoxins (SEA, SEB, SEC, SED, SEK, and SEE, among others). These toxins are widely recognized as causes of foodborne illnesses, but they have also been implicated for their role in colonization and infections resulting in skin and soft tissue inflammation and dermatitis (87). The toxicity and secretion of all enterotoxins have not been evaluated; rather, an abundance of literature exists on these properties for most prominent enterotoxins. Regardless, studies of antibiotic modulation of enterotoxins are limited compared to those on other toxins. In a study of sub-MICs of oxacillin and levofloxacin, enterotoxin *sec* expression levels were strain dependent, ranging from no change with either drug to a ± 5 -fold difference from the control level (17). A separate study found that linezolid effectively suppressed enterotoxin A and B secretion as much as 32% to 43%, in a concentration-dependent manner, at levels below the MIC (33). Moreover, enterotoxin gene regulation during therapeutic simulations was studied in the hollow-fiber model. This study evaluated *sec4*, *sek*, *seq*, and *sel2* expression during treatment with clindamycin, linezolid, minocycline, trimethoprim-sulfamethoxazole, or vancomycin. Compared to the control, vancomycin and minocycline upregulated enterotoxin expression during the first 8 h, followed by downregulation thereafter. Both clindamycin and linezolid increased enterotoxin expression (26); however, given that both clindamycin and linezolid target protein translation, the observed mRNA increase may not be relevant with regard to the effective protein level, as already shown for PVL.

PVL. PVL is a pore-forming toxin that possesses cytolytic properties and contributes to staphylococcal pathogenesis. PVL-producing *S. aureus* strains are involved in primary skin and soft tissue infections (SSTIs), high-mortality necrotizing pneumonia, and recurrent complicated osteomyelitis (88–90).

Along with alpha-hemolysin, PVL is probably one of the most explored toxins with regard to the effects of antibiotics on virulence expression. All published reports support an increase of PVL expression in strains cultured with beta-lactams. Both the antistaphylococcal penicillins oxacillin and nafcillin at sub-MICs (ranging from 1/8 to 1/2 MIC) induced increases in PVL production in different CA-MRSA backgrounds (ST1, ST8, ST80, and ST59) (4, 5, 27, 53, 64). For beta-lactams other than the antistaphylococcal penicillins, fewer data have been reported. A study by Dumitrescu et al. showed that a sub-MIC of imipenem (1/4 MIC) but not of ceftiofuran, ceftazidime, or cefotaxime induced significant increases in *pvl* mRNA and PVL production after 6 h of culture for four CA-MRSA strains and one laboratory strain (LUG855) (5). This observation provided insight into the mechanism underlying the oxacillin- and imipenem-induced PVL increase, as discussed in a later section. One study disagreed with others about the effect of beta-lactams on PVL production, not observing any effect of sub-MICs of flucloxacillin on the PVL mRNA expression level or protein production (12). Although Turner and Sriskandan used a protocol similar to a previously published one (4) by adding the antibiotics during the mid-exponential growth phase, prior to PVL quantitation by Western blotting, the results were discordant. This discrepancy may be explained by Western blot signal saturation before the antibiotics were added, as the PVL production level in the CCY medium used by Turner and Sriskandan was approximately 50 times higher than that in the BHI medium previously used by Stevens et al. (4).

Furthermore, Stevens et al., Dumitrescu et al., and Otto et al. highlighted the PVL antitoxin effects (inhibition of toxin expression) of sub-MICs of clindamycin and linezolid (4, 10, 13, 46). Clindamycin induced concentration-dependent decreases in *pvl* mRNA and PVL production for concentrations ranging from 1/8 to 1/2 MIC in the aforementioned 5 CA-MRSA strains (ST8, ST1, ST80, ST30, and ST59). Similarly, linezolid

induced concentration-dependent decreases in *pvl* mRNA and PVL production, but to a lesser extent than those with clindamycin, and only for concentrations greater than 1/8 MIC. Moreover, a few studies showed an anti-PVL effect of sub-MICs of fusidic acid (1/4 and 1/2 MIC), rifampin (1/8 to 1/2 MIC), and tigecycline, pristinamycin, tetracycline, and ofloxacin (1/2 MIC) (10, 46). Finally, several authors reported no relevant impact of sub-MICs of vancomycin on PVL expression (10, 13, 46).

In summary, there is a strong body of evidence supporting the idea that sub-MICs of antistaphylococcal penicillins, notably oxacillin and nafcillin, lead to increased expression of PVL, while clindamycin, linezolid, and rifampin suppress PVL expression; finally, vancomycin does not affect the modulation of PVL expression. These phenotypes are controlled by a variety of mechanisms, such as two-component systems (TCS) and global virulence regulators, which are discussed in detail later. Other antibiotics should be tested further to confirm the limited previous reports.

PSM. PSM are secreted virulence factors that elicit a proinflammatory immune response and mediate neutrophil lysis (91). A few recent articles reported the effects of sub-MICs or inhibitory concentrations of antibiotics on PSM expression. First, Joo et al. examined the effects of oxacillin, clindamycin, linezolid, erythromycin, tetracycline, and co-trimoxazole at subinhibitory or inhibitory concentrations on one CA-MRSA ST8 USA300 strain (LAC) and one hospital-acquired MRSA (HA-MRSA) strain (Sanger 252) (50). According to their protocol, oxacillin at a very low concentration (1/50 MIC) induced a significant decrease in PSM α 1-4 production, with unmodified *psm α* mRNA levels, in the LAC strain. In contrast, clindamycin, linezolid, erythromycin, and tetracycline significantly increased PSM α 1-4 production in both the LAC and Sanger 252 strains. Nevertheless, it is difficult to corroborate these data because the antibiotic concentrations tested in the different strains were very dissimilar. A second article compared the effects of sub-MICs of clindamycin and TR-700 (tedizolid), a new oxazolidinone, on PSM production (49). In contrast to Joo et al., Yamaki et al. found that clindamycin and TR-700 (1/2 MIC) induced decreased PSM α 1-4 production in 7 clinical strains isolated from SSTIs (PVL-positive MSSA and MRSA isolates). These discrepancies may be due to differences in the protocols and strains used. However, thereafter, Yamaki et al. found an opposite effect of clindamycin (1/8 MIC); in their study, clindamycin at 1/8 MIC induced an increase in PSM α 1-4 production in 7 of 13 clinical MRSA strains tested (11). This study also showed that 1/8 MIC of linezolid induced an increase in PSM α 1-4 production in 3 isolates and an inhibitory effect in 5 isolates, whereas 1/4 and 1/8 MICs of tigecycline resulted in increased PSM α 1-4 production by 11 isolates (11). These results tend to show that the effects of sub-MICs of clindamycin, linezolid, and tigecycline on PSM α 1-4 production are antibiotic concentration and strain dependent. Finally, Rudkin et al. showed that oxacillin at 0.5 mg/liter induced a decrease in PSM α 1-4 production by 2 CA-MRSA (ST8 and ST1) strains, but the exact effect relative to the MIC was not specified (35).

The expression of delta-hemolysin (Hld), also belonging to the PSM α family, was explored in a single study, which reported a significant increase in Hld mRNA levels upon vancomycin treatment at a concentration equal to the MIC (43). Nevertheless, no proteomic data were provided to confirm the observation.

Altogether, these data support the fact that the impacts of protein synthesis inhibitory agents on PSM production are strain and concentration dependent, while the suppressive effect of oxacillin is consistently found throughout the studies. Mechanisms underlying the modulatory effects of antibiotics on PSM expression may involve *agr* and AgrA, recently shown to influence PSM expression. However, this hypothesis failed to explain all the observed variations. Indeed, though in the first study Yamaki et al. observed significant decreases of AgrA transcripts after treatment with 1/4 and 1/8 MICs of TR-700, similar to the results for PSM α production, this did not apply for clindamycin. Likewise, Joo et al. showed increases of RNA III transcripts for the LAC strain treated with sub-MICs of tetracycline and clindamycin but no decrease in the level of RNA III after oxacillin treatment. Consequently, the mechanisms involved in the modulation of PSM production by antibiotics may be complex, also including

the PSM-specific export system, Pmt (phenol-soluble modulins transporter) (92), and its recently described transcriptional regulator, PmtR (93).

Protein A (SpA). Protein A is an adhesion molecule (MSCRAMM) and is one of the major virulence determinants of *S. aureus*. It promotes immune evasion by binding to the Fc region of antibodies and therefore blocking opsonophagocytosis. SpA is also a candidate for development of vaccines to prevent severe *S. aureus* infections. The effects of antibiotics on SpA expression have been studied for the past 30 years. A report published in 1986 examined the effect of clindamycin on SpA expression and found that 1/2 and 1/4 MICs of this antibiotic induced significant decreases in SpA production by a laboratory strain (Cowan I) and 3 clinical isolates (57). Subsequently, Herbert et al. and Otto et al. confirmed the inhibitory effects of clindamycin sub-MICs on *spa* transcription and SpA production for a different laboratory strain (NCTC 8325) and 4 CA-MRSA isolates (ST1, ST8, ST80, and ST30) (13, 39). For the other protein synthesis inhibitory agents, two authors reported that sub-MICs of linezolid (1/2 MIC) induced decreases in SpA production by the reference strain ATCC 29213 and 5 CA-MRSA clinical isolates (13, 33). One author reported that tigecycline at 1/2 MIC decreased SpA production in 4 CA-MRSA strains (ST1, ST80, ST30, and ST398) but not in a CA-MRSA ST8 isolate (13).

Subrt et al. and Nielsen et al. screened several beta-lactams by examining their impacts on *spa* promoter activity by use of a reporter fusion gene (16, 38). Both reported that sub-MICs of oxacillin, cephalothin, and penicillin induced *spa* promoter activity (consistent with the increase in *spa* mRNA levels). Furthermore, Subrt et al. also observed *spa* promoter upregulation upon methicillin and nafcillin treatment (consistent with qRT-PCR data) (38). In contrast, little or no effect was reported with imipenem, cloxacillin, and cefoperazone. Nielsen et al. also observed *spa* upregulation upon ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, ticarcillin, cefamandole, ceftazidime, and cefixime triggering as well as *spa* downregulation upon cefotaxime, cefepime, and cefuroxime triggering (16).

Moreover, Nielsen et al. reported *spa* promoter upregulation upon treatment with sub-MICs of fluoroquinolones, whereas aminoglycosides were inhibitory with regard to *spa* promoter transcription (16). Finally, inconsistent vancomycin effects on SpA production were reported by three different teams: two studies found no relevant impact of vancomycin sub-MICs on SpA production (13, 38), whereas Cázares-Domínguez et al. found a stimulatory effect of vancomycin on SpA production at the MIC (43).

In summary, there is strong evidence to support an inhibitory effect of sub-MICs of clindamycin and linezolid on SpA expression. Moreover, several beta-lactams, such as oxacillin, cephalothin, and penicillin, lead to increased SpA expression, whereas vancomycin does not induce any relevant modification of SpA expression. For tigecycline and aminoglycosides, the available data are still too discrepant to conclude that they have a suppressive effect.

Other staphylococcal virulence factors. Herbert et al. tested the effects of 0.02 mg/liter clindamycin on FnBP and coagulase production by a laboratory *S. aureus* strain (NCTC 8325) and a clinical isolate (WCUH29) (39). The aforementioned clindamycin concentration induced increased levels of *fnb* mRNA and *coa* mRNA, with a concomitant decrease in coagulase activity. Similar observations were reported by Blickwede et al. for the *S. aureus* Newman strain treated with clindamycin at 1/2 MIC (94). Moreover, Blickwede et al. showed that sub-MICs of florfenicol led to increased *fnb* mRNA and *coa* mRNA levels at mid-exponential growth phase and that a decreased *cpa5* mRNA level correlated with reduced capsule production during post-exponential-phase growth (95, 96). Among other protein synthesis inhibitory agents, linezolid, azithromycin, clarithromycin, and telithromycin showed inhibitory effects on coagulase activity at 1/8 MIC (32, 51). Rasigade et al. reported that 1/4 MICs of oxacillin, moxifloxacin, and linezolid led to increased *fnbA/B* mRNA levels, consistent with the development of a hyperadhesive phenotype in a fibronectin adhesion assay (97). Finally, Bisognano et al. observed increased FnBP production after exposing bacteria to a sub-MIC of ciprofloxacin, but only in fluoroquinolone-resistant *S. aureus* strains (41, 48). In summary, protein synthe-

TABLE 1 Overview of effects of sub-MIC antibiotic concentrations on *S. aureus* virulence expression from *in vitro* experiments

Antibiotic(s)	Effect on expression of virulence factor ^a				
	PVL	TSST-1	Alpha-hemolysin	Protein A	PSM
Oxacillin, nafcillin, methicillin	↑↑	↑	↑↑	↑↑	↓
Vancomycin	—	—	—	—	—
Daptomycin	↑ or —	ND	—	—	ND
Erythromycin	↓	↓	↓	ND	↑
Clindamycin	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↑↑
Linezolid	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↑↑
Streptogramins A and B	↓	↓	↓	↓ or —	ND
Tigecycline	↓	↓	↓	↓	↑↑
Gentamicin	ND	↓	↓	↓	ND
Rifampin	↓↓	↓	↓	↓	ND
Fluoroquinolones	—	ND	↑	↑	ND

^a ↑, significant increase; ↑↑, high increase (>10-fold); ↓, significant decrease; ↓↓, abolished expression; —, no significant effect; ND, not determined.

sis inhibitory agents lead to decreased activity of staphylococcal coagulase, despite the increase in *coa* mRNA level, highlighting the differential effect of ribosome-acting antibiotics on transcription versus translation. Studies exploring FnBP have shown that sub-MICs of fluoroquinolones induce increased *fnpB* mRNA levels consistent with a hyperadhesive phenotype.

An overview of the reviewed data from the *in vitro* experiments is illustrated in Table 1 and further detailed in Table S1 in the supplemental material.

Effects on Ex Vivo Staphylococcal Properties

Opsonophagocytosis and phagocytosis by neutrophils. Most of the studies that explored the effects of antibiotics on the interaction of *S. aureus* with phagocytic cells were performed with lincosamides, such as clindamycin and lincomycin. Many of the results obtained were concordant: preincubation of *S. aureus* with sub-MICs of clindamycin or lincomycin led to increased susceptibility to opsonophagocytosis and faster PMN-induced killing in the presence of human serum or after phagocytosis (55–58, 62). Increased opsonophagocytosis of *S. aureus* after lincosamide treatment was based on the enhancement of opsonization through both the C3b complement fraction and antibody binding (55, 57, 58). Furthermore, Veringa and Verhoef showed that preincubation of *S. aureus* with sub-MICs of clindamycin induced a reduction of protein A synthesis, which is fully concordant with the immunoglobulin (Ig)-mediated increased opsonization hypothesis (57). Overall, Milatovic et al. and Veringa and Verhoef reported that subinhibitory concentrations of clindamycin alter the *S. aureus* morphology or cell wall, allowing better opsonization and subsequent enhancement of phagocytosis (55, 57, 58). Additionally, supernatants of *S. aureus* strains preincubated with 1/4 MIC of lincomycin resulted in a significant increase (approximately 2-fold) of PMN chemotaxis through a Boyden chamber (62), showing that antibiotics can also alter the production of soluble excreted staphylococcal factors with chemotactic activity for PMNs. Likewise, *S. aureus* treated with 1/2 MIC of linezolid displayed increased opsonophagocytosis by human PMNs, probably due to a decrease in SpA synthesis (32). To summarize, both lincosamides and oxazolidinones have the ability to enhance opsonophagocytosis and *S. aureus* killing by PMNs.

Furthermore, the effect of beta-lactams on *S. aureus* opsonophagocytosis varied according to the different classes and growth culture conditions. Using liquid broth cultures, Milatovic observed that *S. aureus* preincubation with 1/3 MIC of piperacillin and penicillin G did not alter bacterial opsonophagocytosis compared to that with *S. aureus* preincubated without antibiotics (56). Likewise, Root et al. showed that *S. aureus* uptake by PMNs was unchanged by penicillin G treatment, though the treatment resulted in a higher degree of susceptibility to PMNs (54). Similarly, Lorian and Atkinson (53) reported that oxacillin pretreatment of *S. aureus* grown on membranes did not

significantly modify opsonophagocytosis. However, as for penicillin G, oxacillin pretreatment of broth-cultured *S. aureus* resulted in more susceptibility to PMN killing, while for membrane-cultured *S. aureus*, the same authors failed to observe an enhancement of PMN-induced killing. Moreover, the oxacillin-induced development of bacterial cell clusters on the membranes was deemed to be the cause of decreased susceptibility to PMNs' early bactericidal effect (after 30 and 60 min), even if the final killing effects (after 2 and 3 h) were similar with and without oxacillin treatment (53). On exploring the effects of cephalosporins, Labro et al. reported that *S. aureus* pretreated with 1/2 MIC of ceftriaxone, in either liquid broth or solid culture, were opsonophagocytosed and killed more efficiently by PMNs (98). The discrepancies between the effects observed with different beta-lactams could be explained by their affinities for PBPs and the subsequent impact on the staphylococcal cell wall. Finally, Elliot et al. showed that addition of both penicillin G and cephalothin to the culture medium led to a significant increase in the killing of already phagocytosed cells, probably by alteration of the bacterium by absorbed antibiotics (64). Altogether, these data support the fact that pretreatment of broth *S. aureus* cultures with sub-MICs of various beta-lactam classes does not modify *S. aureus* opsonophagocytosis but improves *S. aureus* killing by PMNs. These observed effects may differ from one beta-lactam to another, in connection with the targeted PBPs, thereby resulting in different changes in the structure of *S. aureus* and its susceptibility to PMN bactericidal mechanisms.

Given their ability to concentrate inside phagocytes and to promote the host's antibacterial responses, macrolides have also been brought into focus with regard to their effects on staphylococcal opsonophagocytosis. Hence, sub-MICs of erythromycin, but not azithromycin, resulted in an improvement of *S. aureus* opsonophagocytosis (59). The authors of that study explained this discrepancy by a reduction in azithromycin's antibacterial activity in the experimental setting, particularly in the acidic lysosome compartment. In addition, Herrera-Insúa et al. showed that the bactericidal activity of PMNs was enhanced by sub-MICs of azithromycin, thus contributing to a synergic effect on *S. aureus* killing (63).

Among the other classes of antibiotics studied, sub-MICs of doxycycline have been reported to improve *S. aureus* opsonophagocytosis, whereas fluoroquinolones (ofloxacin, ciprofloxacin, and gemifloxacin), gentamicin, and vancomycin had no significant impact on *S. aureus* opsonophagocytosis by PMNs (56, 60, 61). Nevertheless, preexposure of *S. aureus* to vancomycin and gemifloxacin resulted in increased PMN killing (54, 61).

***In vitro* hemolysis.** All of the selected studies that addressed *in vitro* hemolysis reported that sub-MICs of nafcillin induced significant increases in the hemolytic activity of *S. aureus* supernatants without regard to the methicillin susceptibility of the strain (34, 42). The increases in hemolytic activity ranged from 2- to 6-fold. Worlitzsch et al. reported similar observations with amoxicillin for one of three tested MSSA strains isolated from clinical samples (42). Moreover, they observed no impact of sub-MICs of moxifloxacin or gentamicin on the hemolytic activity of supernatants from antibiotic-treated *S. aureus*. Using a method of homogenous spreading of the staphylococcal inoculum on blood agar and subsequent deposition of cefoxitin Etest strips, Kuroda et al. confirmed that there was increased *S. aureus* hemolysis upon the diffusion of sub-MICs of cefoxitin into the medium (45). In contrast to the results for beta-lactams, Gemmell and Ford reported that sub-MICs of linezolid ranging from 1/2 to 1/8 MIC resulted in decreased hemolytic activity of the supernatants of two laboratory *S. aureus* strains (32). The similarity in the effects of the antibiotics on hemolysis and alpha-hemolysin, TSST-1, and PVL expression (i.e., increased expression upon beta-lactam treatment and decreased expression after protein synthesis inhibitory antibiotic treatment) supports the hypothesis of the involvement of global virulence regulators in staphylococcal virulence modulation (as developed below).

Adhesion to synthetic or organic surfaces and biofilm formation. The variety of cell surface proteins associated with *S. aureus* adhesion exemplifies the complexity of studies in this field. In addition, other virulence factors are often included in these

studies, because molecules such as protein A are used both to evade host immune recognition and to initiate adhesion and biofilm formation (99). Adhesion of *S. aureus* to synthetic or organic surfaces is the first step toward forming a biofilm, which is ultimately characterized by a highly complex architecture in its mature form (100). The genetic control of adhesion and biofilm formation is mostly correlative; therefore, the impacts of antibiotics on both phenomena follow similar patterns. Schilcher et al. reported upregulation of the expression of major adhesion genes, including *fnbA/B*, following exposure to 1/4 MIC of clindamycin (101). Fluoroquinolones, mainly ciprofloxacin and levofloxacin, have also been shown to increase bacterial production of FnBP(s) and attachment to artificial surfaces (59, 102). Cázares-Domínguez et al. reported that vancomycin (1/2 MIC) increased the expression of *spa* as well as the production of SpA >4-fold during post-exponential-phase growth, which correlated with vancomycin induction of biofilm formation (43). Nielsen and colleagues evaluated the effects of cell wall-active antibiotics on RNA III and *spa* transcription and on the biofilm phenotype. RNA III and *spa* expression was reduced on exposure to penicillins and to the compared non-cell-wall-active antibiotics, i.e., fluoroquinolones and aminoglycosides. The tested cephalosporins (cephalothin, cefamandole, cefoxitin, ceftazidime, cefixime, cefuroxime, cefotaxime, and cefepime) enhanced RNA III expression but had divergent effects on *spa* transcription (16). A separate study also found ceftaroline to have a strain-dependent effect on adhesion-associated genes (103). Moreover, studies have consistently shown that beta-lactam antibiotics stimulate biofilm production, more prominently noted for MRSA than for MSSA because beta-lactams induce MRSA extracellular DNA (eDNA) release that contributes to biofilm formation and adherence (91, 104, 105). Similarly, sub-MICs (1/4 MIC) of clindamycin altered the biofilm matrix composition by modifying eDNA release and the autolysis rate by increasing the expression of adhesion factors (SpA and FnBP) and secreted proteins (PSM β), thus resulting in a more compact and stable biofilm (106). Limited studies exist on the effects of other protein synthesis inhibitors on *S. aureus* biofilm formation. In one study using both microarray and RT-PCR to evaluate gene expression, azithromycin at sub-MICs decreased biofilm formation by MRSA in a dose-dependent manner (107), while one of the recent anti-MRSA agents, tigecycline, was found to increase the expression of *fnbA*, *clfB*, and *cna* (15). In summary, low beta-lactam and clindamycin concentrations induce biofilm formation by increasing adhesion protein expression, by releasing eDNA, and by modifying the extracellular matrix composition. For the other antibiotics investigated, the observed effects were concentration and strain dependent and did not support a common pattern.

Proinflammatory response after staphylococcal stimulation. Antibiotics may have the added benefit of attenuating the host's response to *S. aureus* toxins, in part due to inhibition of virulent toxin production but also due to their direct immunomodulatory properties. The role of antibiotics in this regard has been studied largely for antibiotics that inhibit protein synthesis. Several studies examined the effect of linezolid on the host inflammatory response *in vitro* by using concentrations ranging from sub-MICs to supratherapeutic concentrations. Although phagocytic cells, primarily PMNs, rapidly and extensively take up linezolid (108), this does not appear to affect PMN chemotaxis or phagocytosis of *S. aureus* (109, 110). In studies evaluating cytokine production following staphylococcal or toxin stimulation, Kushiya et al. found no effect of linezolid, vancomycin, teicoplanin, or arbekacin on cytokine production by TSST-1-stimulated PBMCs, whereas the macrolide antibiotic azithromycin slightly suppressed the production of proinflammatory cytokines (111). Pichereau et al., using antibiotic doses at the maximum concentrations found in serum, noted that clindamycin, daptomycin, vancomycin, and azithromycin had inconsistent effects on staphylococcal toxin-stimulated cytokine production by PBMCs. Linezolid inhibited TNF- α and IL-8 production and tigecycline inhibited IL-6 and gamma interferon (IFN- γ) production following PBMC toxin stimulation. Additionally, in that study, trimethoprim-sulfamethoxazole increased TNF- α and IL-8 production (112). Dey et al. reported that azithromycin was more effective than ciprofloxacin at regulating cytokine release from phagocytic cells (113).

A study by van Langevelde et al. compared antibiotics in the beta-lactam class with protein synthesis inhibitors for the ability to alter endothelial cell secretion of selected chemokines following incubation with *S. aureus*. Endothelial cells treated with beta-lactam released higher concentrations of IL-8 and monocyte chemoattractant protein-1 than those treated with the protein synthesis inhibitors erythromycin, clindamycin, and gentamicin (114). In a separate study, English et al. noted that daptomycin exposure reduced the inflammatory response of macrophages to *S. aureus* (reduced TNF- α release and reduced the accumulation of nitric oxide synthase compared to those with vancomycin or oxacillin) (78). To summarize these various studies, after staphylococcal stimulation of host cells, treatment with protein synthesis inhibitors (erythromycin, clindamycin, azithromycin, and linezolid) may lead to variable suppression of the production of proinflammatory cytokines. Among cell wall-active antibiotics, daptomycin rather than vancomycin or oxacillin reduced the inflammatory response of macrophages to *S. aureus*.

MECHANISMS INVOLVED IN *S. AUREUS* VIRULENCE MODULATION BY ANTIBIOTICS

The mechanisms underlying the modulation of staphylococcal virulence by antibiotics are still not well understood. Depending on the molecule, several modulatory pathways have been investigated to date. Linezolid and clindamycin act mainly by blocking ribosomal function and suppressing the protein synthesis of virulence factors as well as the synthesis of regulators of virulence expression. Other antibiotics, such as the beta-lactams, actively induce exoprotein gene transcription by triggering the SOS response in bacteria or by interfering with the complex regulatory network that governs virulence expression in *S. aureus*.

Protein Synthesis Inhibitory Agents

The most accepted explanation for the effect of clindamycin on *S. aureus* virulence is linked to the ribosome-blocking action. Thus, Herbert et al. investigated the effect of clindamycin on *hla* and *tst* expression in a strain harboring the *ermB* gene (*S. aureus* NCTC 8325 with a silent insertion of Tn551); they showed that the effect of clindamycin was eliminated by the standard macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLSB) resistance mechanism, indicating that the basic biological activity of clindamycin was responsible for the observed effects (39). Using transcription fusion experiments, they showed that clindamycin also inhibits exoprotein transcription, an effect that is also abolished by the MLSB resistance mechanism. The suggested explanation for these observations is that clindamycin specifically interferes with the translation of one or more proteins that regulate transcription of the exoprotein genes. Moreover, some of the two-component signal transduction systems (TCS), which act as global regulators of *S. aureus* virulence expression, may be hampered by clindamycin. This hypothesis is consistent with more recent findings by Novick and Jiang showing that sub-MICs of clindamycin interfere with the regulation of the *saeRS* system, which is a strong positive regulator of exoprotein expression in *S. aureus* (115, 116). Therefore, antibiotic-induced dysfunction of the *saeRS* system may be partly responsible for the suppression of virulence expression in *S. aureus* upon clindamycin treatment.

Although linezolid also markedly suppressed exotoxin expression, its effects on transcription were highly variable. Upon linezolid treatment of five CA-MRSA strains, PVL and Hla release was constantly reduced, while the toxin-specific mRNA levels decreased for only two strains, suggesting that linezolid inhibits virulence expression mainly by blocking ribosomal translation (13). Whereas Stevens et al. reported no effect of linezolid on PVL gene translation (4), Otto et al. found that linezolid reduced mRNA levels of PVL (10, 13), though to a lesser extent than that with clindamycin, and only at concentrations close to the MIC. These discrepancies point to a possible clone-dependent specificity of virulence modulation by antibiotics. Indeed, Stevens et al. studied a clinical isolate of CA-MRSA belonging to the USA400 lineage (4), whereas Otto et al. explored five strains belonging to various CA-MRSA lineages. Moreover, Otto et al.

observed an inhibitory effect of linezolid and clindamycin on *spa* transcription in ST30 and ST80 isolates, contrasting with the case for the USA300 lineage, for which repeated experiments conducted with two isolates failed to generate similar results (117). One explanation may be that antibiotics affect virulence expression by interfering with the complex *S. aureus* regulatory network, which responds to environmental triggers in a clone-specific manner (117).

However, linezolid-induced effects are more heterogeneous than those of clindamycin, possibly because different pathways underlie them. Thus, Otto et al. reported a dramatic increase of *hla* mRNA levels (9.74-fold) in linezolid-treated ST80 CA-MRSA strain cultures (13). This observation can be explained by the fact that 50S ribosome-inhibitory agents, such as linezolid, block several steps of the translational process, resulting in the accumulation of mRNA and other intermediate products of the translational complex (118). Consistently, using a hollow-fiber infection model, Pichereau et al. reported that linezolid may also increase the expression of the PVL and enterotoxin genes at 72 h (26). To summarize, linezolid triggers various modulatory pathways with potential effects on virulence expression (ribosome blockage, transcriptional upregulation, and interference with global regulatory networks), and the final outcome is forged by the complex balance of these responses, which are intimately linked to the genetic backgrounds of strains.

Cell Wall-Disrupting Antibiotics

Numerous reports support the idea that beta-lactams lead to increased exotoxin levels (PVL, TSST-1, Hla, and enterotoxins) not only due to the release of intracellular toxin after bacterial lysis but also by actually increasing exotoxin gene expression (4, 10, 29). Active transcription from the PVL and Hla promoters after beta-lactam treatment has been established clearly by transcriptional fusion assays (10, 29, 40). Moreover, nafcillin was shown to upregulate PVL mRNA expression to a constantly elevated level for up to 34 h after antibiotic treatment, thus maintaining the increased toxin production (4). Meanwhile, vancomycin treatment did not affect PVL production, suggesting that the blockage of cell wall synthesis is not sufficient to increase toxin expression (4, 10). Moreover, not all beta-lactams increase PVL expression; only compounds such as oxacillin, nafcillin, and imipenem strongly induce PVL production, suggesting that these antibiotics trigger specific signaling mechanisms and the activation of regulatory pathways (5), which are discussed later.

CWSS, autolysis, and virulence modulation. Beta-lactams, along with glycopeptides, bacitracin, and D-cycloserine, belong to the class of cell wall-disrupting antibiotic agents. Cell wall-active antibiotics inhibit peptidoglycan biosynthesis, thus resulting in bacterial growth arrest. *S. aureus* triggered with cell wall-active antibiotics displays a specific pattern of gene and protein expression. Using proteomic and transcriptomic approaches, it has been shown that a set of genes called the cell wall stress stimulon (CWSS) is triggered by cell wall-active antibiotics, possibly resulting in the modulation of virulence (119, 120). The CWSS also responds to peptidoglycan hydrolysis, to the inhibition of cell wall synthesis independent of antibiotics, and to other signals, such as the VraRS system activators that stimulate the intramembrane sensor VraS and, subsequently, the response regulator VraR (121). CWSS core genes include *murZ*, encoding one of the initiators of peptidoglycan biosynthesis (122); *pbp2* and *sgtB*, which are involved in transglycosylation; *fmtA*, encoding a cell division septum-associated esterase that controls the D-Ala content of teichoic acids (123); and *tca* and *vraR*, which are involved in glycopeptide resistance (124). The CWSS is activated in various settings when *S. aureus* faces defective peptidoglycan synthesis; CWSS activation results in enhanced cell wall synthesis and a balanced decrease in autolysis (120). Perturbation of the CWSS by a nonantibiotic stimulus was investigated by Sobral et al. in an *S. aureus murF* conditional mutant with IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)-controlled *murF* transcription (106). Microarray gene expression profiling of the *murF* mutant cultured under suboptimal conditions showed, in addition to the activation of genes belonging to the CWSS, some changes in the expression of virulence-related genes.

These included several important virulence determinants, such as fibronectin-binding proteins A and B, clumping factor A, enterotoxin B, and gamma-hemolysin BC. Thus, in addition to modifications in CWSS-associated gene expression and in some metabolic pathways, cell wall stress induced upregulation of a surprisingly large number of virulence determinants, perhaps suggesting an enhanced "defensive" posture by the bacterium during a state of compromised synthetic capacity (106).

Concomitantly, cell wall stress in the *murF* suboptimal model resulted in low autolytic activity, which correlated with changes in the expression of the autolysis regulators LrgA and -B and the global regulator SarY. Peptidoglycan hydrolysis or autolysis in *S. aureus* is performed mainly by three nonessential enzymes: the major autolytic enzymes Atl and Sle1, which are murein hydrolases with an important role in the separation of daughter cells (125), and LytM, a glycylglycine endopeptidase involved in cell growth (100). To maintain cell wall integrity, the expression and activities of autolytic enzymes need to be finely tuned. Many environmental stimuli control the expression of autolysis-associated proteins at the posttranscriptional level. Nevertheless, the expression of some autolytic enzymes is also regulated at the transcriptional level. Several TCS systems and global regulators control the autolytic activity in *S. aureus*; these include MgrA (126), ArlRS (127), and SarA (102), all of which negatively modulate autolytic activity. Recently, Antignac et al. showed that a beta-lactam-associated disturbance of cell wall synthesis induced a strong repression of autolytic activity that was consistent with decreased transcription of the *atl* and *sle-1* genes. These observations support the hypothesis that the *S. aureus* regulatory network maintains balanced control of autolytic activity in response to the perturbations of cell wall synthesis, and they provide evidence for coordinated transcriptional regulation of cell wall synthetic and hydrolytic enzymes (104). Although the regulator involved has not yet been identified, most of the above-mentioned TCS or transcriptional regulators that govern autolysis activity are also virulence regulators. Therefore, suppression of autolysis by cell wall-active antibiotics may be the critical link that connects the antibiotic trigger with regulatory modifications that result in enhanced *S. aureus* virulence.

Beta-lactams and PBP interference. The bactericidal effect of beta-lactam antibiotics is based on their interaction with transmembrane penicillin-binding proteins (PBPs), which act as enzymes involved in peptidoglycan biosynthesis. Four PBPs have been detected (105) in wild-type *S. aureus* strains, among which PBPs 1 and 2 are essential (128). For different lineages of CA-MRSA strains, it was shown that PVL production is enhanced by sub-MICs of oxacillin (a nonselective beta-lactam) or imipenem (PBP1 selective [129]) but not cefotaxime (PBP2 selective [130]), cefaclor (PBP3 selective [131]), or ceftiofuran (PBP4 selective [132]). This observation, which suggests that PBP1-specific blockage may be a stimulus for PVL induction upon beta-lactam treatment, was confirmed in a PBP1-specific inducible antisense RNA assay (5). The correlated kinetics of inducible *pbp1* antisense RNA expression and the measured PVL mRNA level confirmed that a PBP1 defect might be the cause of increased PVL expression by *S. aureus*. PBP1 was recently shown to play a major role in the formation of the division septum involved in *S. aureus* daughter cell separation, by interacting with the autolytic system (133). Using an IPTG-inducible PBP1 conditional mutant, Pereira et al. demonstrated that suboptimal function of the transpeptidase domain of PBP1 induced transcriptional downregulation of the *atl* and *sle-1* genes, which encode autolysins involved in the separation of daughter cells (134), consistent with the previous findings of Antignac et al. (104). It has been hypothesized that proper division in *S. aureus* is controlled by checkpoint-type mechanisms in which the transpeptidase activity of PBP1 takes an important part. In the case of a lack of PBP1 transpeptidase activity, as well as in the presence of beta-lactams, the newly synthesized deficient cell wall acts as a stimulus leading to repression of the autolytic system. By this means, only bacteria which have completed appropriate cell wall synthesis may proceed to the next division (134). At this point, it is interesting that control of autolysis in response to cell wall synthesis defects is governed by global regulators, such as MgrA, SarA, and ArlRS,

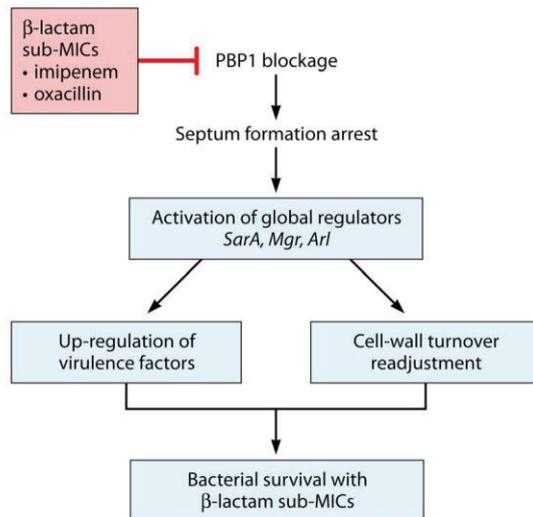


FIG 2 Mechanisms underlying the enhanced virulence expression by *S. aureus* triggered by beta-lactams. The presence of antibiotics is sensed by the bacterium as an environmental signal resulting in the arrest of septum formation; this then triggers the activation of global transcriptional regulators to adjust the cell wall turnover, eventually leading to enhanced toxin production, probably as an additional effect of bacterial adaptation to suboptimal growth conditions.

which also modulate virulence expression in *S. aureus*; this scenario probably explains the PBP1-dependent beta-lactam induction of PVL expression reported previously (Fig. 2) (5).

SOS response triggered by antibiotics and virulence expression modulation. The SOS response is one of the possible stress responses developed by bacteria upon exposure to antibiotics (135). The classical SOS response is controlled by two major determinants: *lexA* and *recA* (136, 137). Though repressed under normal environmental conditions, the SOS response is initiated, by RecA activation, as a result of genotoxic damage. RecA then acts as a coprotease to initiate LexA repressor autocleavage, ultimately leading to the upregulation of an ensemble of DNA repair and recombination genes. LexA is a transcription factor able to bind to a large number of promoters with various affinities, which may increase consequent to severe or persistent DNA damage (138). Fluoroquinolones, which are DNA-damaging antibiotics, and beta-lactams, which promote defective cell wall synthesis, both initiate the SOS response at subinhibitory concentrations (139, 140). It has been shown that ciprofloxacin, a fluoroquinolone, induces LexA-dependent activation of the *fnbB* gene upon antibiotic stress (141). PBP1-specific blockage by beta-lactams was reported to mediate the SOS response through *lexA/recA* regulators (142). This may partially explain the increased transcription of exotoxin genes after cells were exposed to PBP1-selective beta-lactams, although no experimental data are available to support this hypothesis at this time.

Several virulence determinants modulated by antibiotics are encoded by transferable genetic elements, such as pathogenicity islands (PI) (TSST-1 and SaPI_{bov}) (143) or prophages (PVL and phiPV83-pro, phiPVL, or phi11) (144). Although fully integrated into the regulatory mechanism of the host, the expression of transferable pathogenicity genes is tightly linked to the mobile element's genome, and these genes depend on the mobile element for horizontal transfer (145, 146). SOS-inducing antibiotics, such as fluoroquinolones and beta-lactams, may induce the transcription of genes carried by transferable elements both by activating their replication and by triggering phage internal promoters independently of the *S. aureus* regulatory network (145–147). Therefore, the SOS response-inducing antibiotics may activate virulence expression by two regulatory pathways: a *lexA*-dependent derepression of virulence-determining genes and an overexpression of virulence genes as a consequence of the activation of the internal regulatory mechanisms associated with transferable elements.

Involvement of global virulence regulators. Upon exposure to an antibiotic trigger, similar patterns of expression have been observed for a large number of staphylococcal virulence factors, suggesting a pleiotropic effect of antibiotics that may involve global virulence regulators that fine-tune virulence factor production by *S. aureus* in response to the changing environment. These global regulatory systems include several TCS encoding a histidine kinase sensor and a response regulator. The core whole-genome sequence of *S. aureus* reveals that it contains 16 TCS, some of which have been well characterized as global regulatory systems. These are mainly represented by the accessory gene regulator Agr (148), the autolysis-related *arlRS* locus (127), the *S. aureus* exoprotein expression genes *saeRS* (116), and the staphylococcal respiratory response genes *srrAB* (149). More recently, another TCS involved in cell wall synthesis and turnover, the Walk/WalR system, was also shown to positively regulate some of the major virulence genes involved in host-matrix interactions (*efb*, *emp*, and *fnbA/B*) and cytolysis (*hlgACB*, *hla*, and *hly*) through activation of *saeRS* (150). Similar to the Walk/WalR system, Agr, Sigma B, and SarA also affect the level of transcription of *saeRS*, thus placing *saeRS* downstream in the regulatory network as a key element that governs the expression of *S. aureus* exoproteins (115). This makes *saeRS* a good candidate for a TCS that may control *S. aureus* virulence expression upon exposure to an antibiotic trigger. Sub-MIC clindamycin concentrations delay the transcriptional shift normally observed in the *saePQR* promoters, which seems to be linked to the suppression of exotoxin expression in clindamycin-treated strains (115). SaeP promoter transcription is also blocked by linezolid at the mid-exponential growth phase, resulting in a lack of activation of the *saeRS* system, and consistent with the inhibitory effect of linezolid on exotoxin production by *S. aureus* (151). In contrast to protein synthesis inhibitory agents, the beta-lactam cefoxitin increased gamma-hemolysin expression by the *S. aureus* N315 strain in a SaeRS-dependent manner. Indeed, transcriptional studies showed a 2-fold induction of *hlgC* expression by cefoxitin, which was suppressed in the *saeRS* null mutant (45).

To explore the role of the *S. aureus* regulation network in PVL expression upon beta-lactam treatment, isogenic *S. aureus* phiPVL RN6390 strains individually deleted for the *agr*, *saeRS*, *rot*, and *sarA* loci were exposed to sub-MICs of imipenem. PVL production was assessed to determine the impact of each of these regulators on the modulator effect of imipenem on PVL expression. Experiments with *agr* and *saeRS* null mutants yielded increased PVL levels after antibiotic treatment; therefore, these regulators were presumed to be nonessential for PVL induction by beta-lactams. This inconsistency with the previous conclusions of Kuroda et al. (45) may be explained by strain variations (RN6390 versus N315), the molecules tested (imipenem versus cefoxitin), or the measured toxin production (PVL versus Hlg). With respect to antibiotic mechanisms, imipenem acts as a PBP1-selective blocker, while cefoxitin acts as a PBP4-selective blocker; therefore, one may hypothesize that different signaling pathways were triggered by these agents.

Upon imipenem treatment of *sarA* and *rot* null mutants, increased PVL expression could no longer be achieved. Restored phenotypes of the complemented strains confirmed the essential role of these regulators as mediators of PVL induction by beta-lactams (5). Kinetic measurement of the transcription levels of these regulators during *S. aureus* incubation with sub-MICs of imipenem showed increased SarA expression initiated by the antibiotic stimulus followed by Rot downregulation, resulting in subsequent enhanced PVL expression. The pathways leading to SarA trigger by beta-lactams remain unknown, while Rot downregulation may occur either as a direct effect of the antibiotic treatment or as a consequence of SarA overexpression (152).

Taken together, these observations suggest that the presence of antibiotics is sensed by the bacterium as an environmental signal; this then triggers TCS and the production of transcription factors, eventually leading to enhanced toxin production, probably as an additional effect of bacterial adaptation to suboptimal growth conditions.

Therapeutic Impact of *S. aureus* Virulence Modulation by Antibiotics

Animal Infection Model Evidence

Based on initial *in vitro* data suggesting that protein synthesis inhibitory agents (clindamycin and linezolid) may abolish staphylococcal virulence factors and that cell wall-active antibiotics may increase toxin production at sub-MICs, animal studies have addressed the question of whether the administration of these antibiotics, in pharmacokinetic contexts that mimic therapeutic regimens in humans, would translate into differences in treatment efficacy and outcome.

Because rabbits are similar to humans in their susceptibility to PVL (153–155) and because PVL plays a major role in the pathogenesis of necrotizing pneumonia in this animal species (154, 156), linezolid and vancomycin were assessed in a model of CA-MRSA USA300-induced necrotizing pneumonia in rabbits to determine the efficacy of these drugs and whether protection is correlated with suppression of bacterial toxin production in the lungs. In this model, the overall mortality rate was 25% for animals treated with linezolid at a dosing regimen that yielded a peak serum concentration of $10.5 \pm 2.3 \mu\text{g/ml}$ 1 h after dosing, 88% for animals treated with vancomycin at a dosing regimen that yielded a peak serum concentration of $36.1 \pm 4.2 \mu\text{g/ml}$ 1 h after dosing, and 100% for untreated rabbits (157). Specific ELISA quantitation of PVL produced in the lungs of infected rabbits yielded significantly decreased levels of PVL in the linezolid-treated group (31%) compared to those in the vancomycin-treated group (57%) or the untreated group (100%).

A recent study confirmed that vancomycin is inferior to linezolid as well as to clindamycin in another rabbit model of CA-MRSA LAC USA300-induced necrotizing pneumonia, as the two protein synthesis inhibitors were more effective than vancomycin at suppressing bacterial production of PVL in rabbit lungs (158). In that study, a human-equivalent dosing regimen of ceftaroline, an anti-MRSA beta-lactam antibiotic, also demonstrated great protection against lethal pneumonia, likely due to its enhanced capacity to kill MRSA in the lungs.

In a mouse hematogenous pneumonia model, linezolid also demonstrated efficacy superior to that of vancomycin in protecting not only against death caused by PVL-negative vancomycin-insensitive *S. aureus* (VISA) but also against death caused by PVL-positive MRSA strains (159, 160). Because mice are insensitive to PVL leukotoxicity, the enhanced protective effects of linezolid compared to those of vancomycin may not be linked to decreased PVL production by *S. aureus* in mouse lungs. Linezolid may suppress *in vivo* expression of other bacterial toxins, e.g., alpha-toxin, that have proven roles in the mouse pneumonia model (161), although toxin levels in mouse lungs were not measured in these studies. However, linezolid was significantly better than vancomycin at limiting bacterial replication in mouse lungs, which may explain its enhanced protective efficacy (159, 160).

In piglet models of ventilator-associated pneumonia, linezolid showed better efficacy than that of vancomycin (162, 163). Piglets treated with linezolid showed less severe lung pathology, better clearance of MRSA, and longer survival times, but these effects could not be attributed to differences in PK/PD parameters, because all linezolid and vancomycin measured concentrations (plasma, epithelial lining fluid, and lung samples) were higher than the MICs (162, 163). In the absence of a clear reason for the better efficacy of linezolid (although toxin concentrations in the lungs of piglets treated with linezolid or vancomycin were not measured), Luna et al. speculated that the immune response may be modulated by linezolid (162). Nonetheless, linezolid did not seem to exhibit an advantage over vancomycin in modulating the pulmonary innate immune response in a mouse model of MRSA pneumonia (164).

To confirm the effects of sub-MICs of antibiotics on bacterial toxin gene expression *in vivo*, with potential therapeutic consequences, a bioluminescence reporter system in which the light-producing *luxABCDE* operon is fused to the alpha-toxin promoter was used in a mouse sepsis model. This bioluminescence reporter system aimed to show that *in vitro* *hla* promoter activity is enhanced by sub-MICs of teicoplanin, imipenem,

and ciprofloxacin but not by sub-MICs of clindamycin and rifampin (40). Although it was possible to assess *hla* promoter activity by using this bioluminescence reporter system in a mouse infection model, this system may not be useful for evaluating the effects of antibiotic sub-MICs *in vivo* because of the difficulty of achieving specific antibiotic concentrations in the mouse.

Clinical Evidence

Compared to the solid body of *in vitro* experiment-based evidence, inpatient data supporting staphylococcal virulence modulation by antibiotics are rather frail. The main reason explaining the lack of clinical data is the pleiotropic presentation of severe staphylococcal diseases, which makes it very difficult to design the relevant clinical trials necessary to thoroughly investigate the role of virulence-modulating antibiotics in patient outcomes. Consequently, clinical guidelines offer conflicting recommendations on the use of protein synthesis inhibitors (e.g., linezolid and clindamycin) versus standard agents (e.g., vancomycin) to treat invasive MRSA infections. The United Kingdom's clinical guidelines, which seem to put a greater emphasis on *in vitro* and preclinical animal infection model data than the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Canadian clinical guidelines, recommend the use of clindamycin and linezolid because these agents suppress the production of PVL and other toxins and have been used successfully for treatment of severe sepsis and pneumonia (6, 7).

Several clinical case reports suggest that clindamycin or linezolid can be used for the treatment of severe sepsis or pneumonia caused by *S. aureus*, especially for toxin-producing strains. An early case report of four patients with pleuropulmonary complications of PVL-positive community-associated MRSA pneumonia noted not only inappropriate initial antimicrobial therapy but also that three of the patients failed to respond to subsequent treatment with vancomycin (165). These patients were treated subsequently with linezolid or vancomycin, with good clinical results. In a larger case series of 15 patients with community-associated MRSA pneumonia, 14 were treated with clindamycin or linezolid; only 2 (13%) of the patients died, both of whom were severely immunocompromised (166). Retrospective analysis of 92 cases of community-associated *S. aureus* necrotizing pneumonia, the vast majority of which were associated with PVL-positive strains, showed improved clinical outcomes in those who were treated with clindamycin or linezolid (167).

Another case series of three patients with PVL-positive *S. aureus* necrotizing pneumonia demonstrated successful treatment with multiple agents, some of which target bacterial toxin production (168). The rationale for the use of multiple agents, including (i) vancomycin plus clindamycin, (ii) clindamycin and linezolid plus intravenous immunoglobulin (IVIg), and (iii) clindamycin, linezolid, and ofloxacin plus IVIg, may be based on *in vitro* synergy but grounded in the fact that linezolid and clindamycin are known to inhibit *in vitro* bacterial toxin production. For one of the three patients, PVL was shown to be present at toxic concentrations in serial sputum samples, peaking at 3.9 mg/liter on day 2 postadmission (168). The addition of IVIg, which was previously shown to contain antibodies that neutralize PVL-mediated cytotoxicity of human PMNs (169) and to protect against lethal necrotizing pneumonia in a rabbit preclinical model (156), may improve clinical outcomes by neutralizing the toxic effects of these preformed toxins that are not targeted by antimicrobial treatment.

Another case report noted the successful treatment with linezolid of a patient with staphylococcal toxic shock syndrome caused by a MRSA strain producing toxic shock syndrome toxin type 1 (TSST-1) (86). Production of TSST-1 by the infecting MRSA strain was shown to be suppressed *in vitro* at concentrations of linezolid as low as 1 mg/liter (i.e., 1/4 MIC).

Though the issue of virulence modulation was not specifically addressed, randomized controlled clinical trials have provided evidence that linezolid has a higher clinical efficacy than that of vancomycin for the treatment of nosocomial MRSA infection (170). The two major factors explaining linezolid's efficacy were the greater penetration into the epithelial lining fluid and the significantly lower incidence of renal failure than that

with vancomycin. Whether linezolid effectively contributes to decreased *S. aureus* virulence during infection remains to be proven in order to better understand the mechanisms underlying the clinical efficacy of antibiotics as an important factor in directing appropriate treatment decisions.

CONCLUSIONS

Antibiotics, mainly at subinhibitory concentrations, clearly modulate virulence expression in *S. aureus*. Most *in vitro* data point to a suppressive effect of ribosome-active antibiotics (linezolid and clindamycin) on virulence expression, whereas cell wall-active antibiotics (beta-lactams) mainly increase exotoxin production.

In vivo studies also support the suppressive effect of clindamycin and linezolid on virulence expression, supporting their utilization in the management of toxin-associated staphylococcal diseases and offering a potentially valuable strategy to improve patient outcomes.

The mechanisms underlying the effects of clindamycin and linezolid on *S. aureus* virulence are intimately linked to the ribosome-blocking effects of these agents, with subsequent impacts on the functions of global virulence regulators, such as SaeRS. With respect to the inductive effects of beta-lactam antibiotics on staphylococcal virulence, the main hypothesis is that the defect in cell wall synthesis caused by PBP1 blockage is sensed by the bacteria, triggering the regulatory network that controls both autolysis and virulence determinants. The balanced decrease of autolytic activity will then promote the survival of more virulent bacteria. Whether SarA plays a part in the complex regulation which links autolysis, peptidoglycan biosynthesis, and virulence remains to be proven. Deciphering these regulatory pathways may provide new insights into the connections relating the cell wall metabolism to virulence expression in *S. aureus*. A better understanding of these phenomena may supply a logical basis to explain the emergence of both virulent and resistant *S. aureus* strains.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/CMR.00120-16>.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.3 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

Although we did not receive any funding for this review, we have previously received research grants from Pfizer Inc. (G.L., O.D., and B.A.D.), Cubist (W.R., G.L., and O.D.), Basilea Pharmaceutica (E.H., O.D., and G.L.), Merck Inc. (W.R.), and Theravance Biopharma (W.R.).

REFERENCES

- Lowy FD. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339: 520–532. <https://doi.org/10.1056/NEJM199808203390806>.
- Arditi M, Kabat W, Yogev R. 1993. Antibiotic-induced bacterial killing stimulates tumor necrosis factor-alpha release in whole blood. *J Infect Dis* 167:240–244. <https://doi.org/10.1093/infdis/167.1.240>.
- Nau R, Eiffert H. 2002. Modulation of release of proinflammatory bacterial compounds by antibacterials: potential impact on course of inflammation and outcome in sepsis and meningitis. *Clin Microbiol Rev* 15:95–110. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.1.95-110.2002>.
- Stevens DL, Ma Y, Salmi DB, McIndoo E, Wallace RJ, Bryant AE. 2007. Impact of antibiotics on expression of virulence-associated exotoxin genes in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 195:202–211. <https://doi.org/10.1086/510396>.
- Dumitrescu O, Choudhury P, Boisset S, Badiou C, Bes M, Benito Y, Wolz C, Vandenesch F, Etienne J, Cheung AL, Bowden MG, Lina G. 2011. Beta-lactams interfering with PBP1 induce Panton-Valentine leukocidin expression by triggering *sarA* and *rot* global regulators of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 55:3261–3271. <https://doi.org/10.1128/AAC.01401-10>.
- Health Protection Agency. 7 November 2008. Guidance on the diagnosis and management of PVL-associated *Staphylococcus aureus* infections (PVL-SA) in England, 2nd ed. http://www.sbp.com.br/pdfs/Guidance_diagnosis_management_PVL-associatedStaphylococcus_aureus_infections_PVL-SA_inEngland-HPA.pdf.
- Nathwani D, Morgan M, Masterton RG, Dryden M, Cookson BD, French G, Lewis D, British Society for Antimicrobial Chemotherapy Working Party on Community-Onset MRSA Infections. 2008. Guidelines for UK practice for the diagnosis and management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections presenting in the community. *J Antimicrob Chemother* 61:976–994. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn096>.
- Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, Kaplan SL, Karchmer AW, Levine DP, Murray BE, Rybak MJ, Talan DA, Chambers HF, Infectious Diseases Society of America. 2011. Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clin Infect Dis* 52:e18–e55. <https://doi.org/10.1093/cid/ciq146>.
- Woodin AM. 1959. Fractionation of a leucocidin from *Staphylococcus aureus*. *Biochem J* 73:225–237. <https://doi.org/10.1042/bj0730225>.

10. Dumitrescu O, Boisset S, Badiou C, Bes M, Benito Y, Reverdy M-E, Vandenesch F, Etienne J, Lina G. 2007. Effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin. *Antimicrob Agents Chemother* 51:1515–1519. <https://doi.org/10.1128/AAC.01201-06>.
11. Yamaki J, Synold T, Wong-Beringer A. 2013. Tigecycline induction of phenol-soluble modulins by invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 57:4562–4565. <https://doi.org/10.1128/AAC.00470-13>.
12. Turner CE, Sriskandan S. 2015. Panton-Valentine leukocidin expression by *Staphylococcus aureus* exposed to common antibiotics. *J Infect* 71:338–346. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.05.008>.
13. Otto MP, Martin E, Badiou C, Lebrun S, Bes M, Vandenesch F, Etienne J, Lina G, Dumitrescu O. 2013. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 68:1524–1532. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt073>.
14. van Langevelde P, van Dissel JT, Meurs CJ, Renz J, Groeneveld PH. 1997. Combination of flucloxacillin and gentamicin inhibits toxic shock syndrome toxin 1 production by *Staphylococcus aureus* in both logarithmic and stationary phases of growth. *Antimicrob Agents Chemother* 41:1682–1685.
15. Smith K, Gould KA, Ramage G, Gemmell CG, Hinds J, Lang S. 2010. Influence of tigecycline on expression of virulence factors in biofilm-associated cells of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 54:380–387. <https://doi.org/10.1128/AAC.00155-09>.
16. Nielsen LN, Roggenbuck M, Haaber J, Ibrah D, Ingmer H. 2012. Diverse modulation of *spa* transcription by cell wall active antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *BMC Res Notes* 5:457. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-457>.
17. Jo A, Ahn J. 2016. Phenotypic and genotypic characterisation of multiple antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to subinhibitory levels of oxacillin and levofloxacin. *BMC Microbiol* 16:170. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0791-7>.
18. Tang H-J, Chen C-C, Cheng K-C, Wu K-Y, Lin Y-C, Zhang C-C, Weng T-C, Yu W-L, Chiu Y-H, Toh H-S, Chiang S-R, Su BA, Ko W-C, Chuang Y-C. 2013. In vitro efficacies and resistance profiles of rifampin-based combination regimens for biofilm-embedded methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 57:5717–5720. <https://doi.org/10.1128/AAC.01236-13>.
19. Boles BR, Horswill AR. 2008. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog* 4:e1000052. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000052>.
20. Seidl K, Goerke C, Wolz C, Mack D, Berger-Bächi B, Bischoff M. 2008. *Staphylococcus aureus* CcpA affects biofilm formation. *Infect Immun* 76:2044–2050. <https://doi.org/10.1128/IAI.00035-08>.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. M100-S25. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 25th informational supplement. CLSI, Wayne, PA.
22. Gloede J, Scheerans C, Derendorf H, Kloft C. 2010. In vitro pharmacodynamic models to determine the effect of antibacterial drugs. *J Antimicrob Chemother* 65:186–201. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp434>.
23. Nightingale CH (ed). 2007. Antimicrobial pharmacodynamics in theory and clinical practice, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
24. Coyle EA, Cha R, Rybak MJ. 2003. Influences of linezolid, penicillin, and clindamycin, alone and in combination, on streptococcal pyrogenic exotoxin A release. *Antimicrob Agents Chemother* 47:1752–1755. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.5.1752-1755.2003>.
25. Blaser J, Stone BB, Zinner SH. 1985. Two compartment kinetic model with multiple artificial capillary units. *J Antimicrob Chemother* 15(Suppl A):131–137.
26. Pichereau S, Pantrangi M, Couet W, Badiou C, Lina G, Shukla SK, Rose WE. 2012. Simulated antibiotic exposures in an in vitro hollow-fiber infection model influence toxin gene expression and production in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain MW2. *Antimicrob Agents Chemother* 56:140–147. <https://doi.org/10.1128/AAC.05113-11>.
27. Louie A, Vanscoy BD, Heine HS, Liu W, Abshire T, Holman K, Kulawy R, Brown DL, Drusano GL. 2012. Differential effects of linezolid and ciprofloxacin on toxin production by *Bacillus anthracis* in an in vitro pharmacodynamic system. *Antimicrob Agents Chemother* 56:513–517. <https://doi.org/10.1128/AAC.05724-11>.
28. Schlievert PM, Kelly JA. 1984. Clindamycin-induced suppression of toxic-shock syndrome-associated exotoxin production. *J Infect Dis* 149:471. <https://doi.org/10.1093/infdis/149.3.471>.
29. Ohlsen K, Ziebuhr W, Koller KP, Hell W, Wichelhaus TA, Hacker J. 1998. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on alpha-toxin (*hla*) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 42:2817–2823.
30. Chopra I, Roberts M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 65:232–260. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001>.
31. Doss SA, Tillotson GS, Amyes SG. 1993. Effect of sub-inhibitory concentrations of antibiotics on the virulence of *Staphylococcus aureus*. *J Appl Bacteriol* 75:123–128. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb02756.x>.
32. Gemmell CG, Ford CW. 2002. Virulence factor expression by Gram-positive cocci exposed to subinhibitory concentrations of linezolid. *J Antimicrob Chemother* 50:665–672. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf192>.
33. Bernardo K, Pakulat N, Fleer S, Schnaith A, Utermöhlen O, Krut O, Müller S, Krönke M. 2004. Subinhibitory concentrations of linezolid reduce *Staphylococcus aureus* virulence factor expression. *Antimicrob Agents Chemother* 48:546–555. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.2.546-555.2004>.
34. Kernodle DS, McGraw PA, Barg NL, Menzies BE, Voladri RK, Harshman S. 1995. Growth of *Staphylococcus aureus* with nafcillin in vitro induces alpha-toxin production and increases the lethal activity of sterile broth filtrates in a murine model. *J Infect Dis* 172:410–419. <https://doi.org/10.1093/infdis/172.2.410>.
35. Rudkin JK, Laabei M, Edwards AM, Joo H-S, Otto M, Lennon KL, O'Gara JP, Waterfield NR, Massey RC. 2014. Oxacillin alters the toxin expression profile of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 58:1100–1107. <https://doi.org/10.1128/AAC.01618-13>.
36. Moellering RC, Corey GR, Grayson ML. 2011. Introduction: fusidic acid enters the United States. *Clin Infect Dis* 52(Suppl 7):S467–S468. <https://doi.org/10.1093/cid/cir171>.
37. Sonstein SA, Burnham JC. 1993. Effect of low concentrations of quinolone antibiotics on bacterial virulence mechanisms. *Diagn Microbiol Infect Dis* 16:277–289. [https://doi.org/10.1016/0732-8893\(93\)90078-L](https://doi.org/10.1016/0732-8893(93)90078-L).
38. Subrt N, Mesak LR, Davies J. 2011. Modulation of virulence gene expression by cell wall active antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 66:979–984. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr043>.
39. Herbert S, Barry P, Novick RP. 2001. Subinhibitory clindamycin differentially inhibits transcription of exoprotein genes in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 69:2996–3003. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.5.2996-3003.2001>.
40. Steinhuber A, Landmann R, Goerke C, Wolz C, Flückiger U. 2008. Bioluminescence imaging to study the promoter activity of *hla* of *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo. *Int J Med Microbiol* 298:599–605. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.09.008>.
41. Bisognano C, Vaudaux P, Rohner P, Lew DP, Hooper DC. 2000. Induction of fibronectin-binding proteins and increased adhesion of quinolone-resistant *Staphylococcus aureus* by subinhibitory levels of ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 44:1428–1437. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.6.1428-1437.2000>.
42. Worlitzsch D, Kaygin H, Steinhuber A, Dalhoff A, Botzenhart K, Döring G. 2001. Effects of amoxicillin, gentamicin, and moxifloxacin on the hemolytic activity of *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 45:196–202. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.1.196-202.2001>.
43. Cázares-Domínguez V, Ochoa SA, Cruz-Córdova A, Rodea GE, Escalona G, Olivares AL, Olivares-Trejo JJ, Velázquez-Guadarrama N, Xicohtencatl-Cortes J. 2015. Vancomycin modifies the expression of the agr system in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Front Microbiol* 6:369. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00369>.
44. Awad S, Alharbi AE, Alshami I. 2013. Exposure of vancomycin-sensitive *Staphylococcus aureus* to subinhibitory levels of vancomycin leads to upregulated capsular gene expression. *Br J Biomed Sci* 70:58–61. <https://doi.org/10.1080/09674845.2013.11669936>.
45. Kuroda H, Kuroda M, Cui L, Hiramatsu K. 2007. Subinhibitory concentrations of beta-lactam induce haemolytic activity in *Staphylococcus aureus* through the SaeRS two-component system. *FEMS Microbiol Lett* 268:98–105. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00568.x>.
46. Dumitrescu O, Badiou C, Bes M, Reverdy M-E, Vandenesch F, Etienne J,

- Lina G. 2008. Effect of antibiotics, alone and in combination, on Pantone-Valentine leukocidin production by a *Staphylococcus aureus* reference strain. *Clin Microbiol Infect* 14:384–388. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01947.x>.
47. Koszczol C, Bernardo K, Krönke M, Krut O. 2006. Subinhibitory quinupristin/dalfopristin attenuates virulence of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 58:564–574. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl291>.
 48. Bisognano C, Vaudaux PE, Lew DP, Ng EY, Hooper DC. 1997. Increased expression of fibronectin-binding proteins by fluoroquinolone-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to subinhibitory levels of ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 41:906–913.
 49. Yamaki J, Synold T, Wong-Beringer A. 2011. Antivirulence potential of TR-700 and clindamycin on clinical isolates of *Staphylococcus aureus* producing phenol-soluble modulins. *Antimicrob Agents Chemother* 55:4432–4435. <https://doi.org/10.1128/AAC.00122-11>.
 50. Joo H-S, Chan JL, Cheung GYC, Otto M. 2010. Subinhibitory concentrations of protein synthesis-inhibiting antibiotics promote increased expression of the agr virulence regulator and production of phenol-soluble modulin cytolysins in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 54:4942–4944. <https://doi.org/10.1128/AAC.00064-10>.
 51. Yanagihara K, Morinaga Y, Nakamura S, Seki M, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Yamada Y, Kamihira S, Kohno S. 2008. Subinhibitory concentrations of telithromycin, clarithromycin and azithromycin reduce methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* coagulase in vitro and in vivo. *J Antimicrob Chemother* 61:647–650. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm507>.
 52. Liu X, Hu Y, Pai P-J, Chen D, Lam H. 2014. Label-free quantitative proteomics analysis of antibiotic response in *Staphylococcus aureus* to oxacillin. *J Proteome Res* 13:1223–1233. <https://doi.org/10.1021/pr400669d>.
 53. Lorian V, Atkinson B. 1980. Killing of oxacillin-exposed staphylococci in human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 18:807–813. <https://doi.org/10.1128/AAC.18.5.807>.
 54. Root RK, Isturiz R, Molavi A, Metcalf JA, Malech HL. 1981. Interactions between antibiotics and human neutrophils in the killing of staphylococci. *J Clin Invest* 67:247–259. <https://doi.org/10.1172/JCI110020>.
 55. Milatovic D, Braveny I, Verhoef J. 1983. Clindamycin enhances opsonization of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 24:413–417. <https://doi.org/10.1128/AAC.24.3.413>.
 56. Milatović D. 1982. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on the phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol* 1:97–101. <https://doi.org/10.1007/BF02014199>.
 57. Veringa EM, Verhoef J. 1986. Influence of subinhibitory concentrations of clindamycin on opsonophagocytosis of *Staphylococcus aureus*, a protein-A-dependent process. *Antimicrob Agents Chemother* 30:796–797. <https://doi.org/10.1128/AAC.30.5.796>.
 58. Veringa EM, Verhoef J. 1987. Clindamycin at subinhibitory concentrations enhances antibody- and complement-dependent phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes of *Staphylococcus aureus*. *Chemotherapy* 33:243–249. <https://doi.org/10.1159/000238502>.
 59. Pascual A, López-López G, Aragón J, Perea EJ. 1990. Effect of azithromycin, roxithromycin and erythromycin on human polymorphonuclear leukocyte function against *Staphylococcus aureus*. *Chemotherapy* 36:422–427. <https://doi.org/10.1159/000238799>.
 60. Pascual A, Martínez-Martínez L, Perea EJ. 1989. Effect of ciprofloxacin and ofloxacin on human polymorphonuclear leukocyte activity against staphylococci. *Chemotherapy* 35:17–22. <https://doi.org/10.1159/000238631>.
 61. Dal Sasso M, Culici M, Bovio C, Braga PC. 2003. Gemifloxacin: effects of sub-inhibitory concentrations on various factors affecting bacterial virulence. *Int J Antimicrob Agents* 21:325–333. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(02\)00391-6](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(02)00391-6).
 62. Bassaris HP, Lianou PE, Votta EG, Skoutelis T, Papavassiliou T. 1984. Enhancement of polymorphonuclear leukocyte function against gram-positive aerobic organisms grown in the presence of lincomycin. *Infection* 12:369–371. <https://doi.org/10.1007/BF01645216>.
 63. Herrera-Insúa I, Pérez P, Ramos C, Martínez P, Gómez-Lus ML, Prieto J. 1997. Synergistic effect of azithromycin on the phagocytic killing of *Staphylococcus aureus* by human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 16:13–16. <https://doi.org/10.1007/BF01575113>.
 64. Elliott GR, Peterson PK, Verbrugh HA, Freiberg MR, Hoidal JR, Quie PG. 1982. Influence of subinhibitory concentrations of penicillin, cephalo-
- thin, and clindamycin on *Staphylococcus aureus* growth in human phagocytic cells. *Antimicrob Agents Chemother* 22:781–784. <https://doi.org/10.1128/AAC.22.5.781>.
 65. Todd J, Fishaut M, Kapral F, Welch T. 1978. Toxic-shock syndrome associated with phage-group-I staphylococci. *Lancet* ii:1116–1118.
 66. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M. 2014. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol* 12:49–62. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3161>.
 67. Walsh EJ, O'Brien LM, Liang X, Hook M, Foster TJ. 2004. Clumping factor B, a fibrinogen-binding MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) adhesin of *Staphylococcus aureus*, also binds to the tail region of type I cytokeratin 10. *J Biol Chem* 279:50691–50699. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408713200>.
 68. Moreillon P, Entenza JM, Francioli P, McDevitt D, Foster TJ, François P, Vaudaux P. 1995. Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis. *Infect Immun* 63:4738–4743.
 69. Arrecubieta C, Asai T, Bayern M, Loughman A, Fitzgerald JR, Shelton CE, Baron HM, Dang NC, Deng MC, Naka Y, Foster TJ, Lowy FD. 2006. The role of *Staphylococcus aureus* adhesins in the pathogenesis of ventricular assist device-related infections. *J Infect Dis* 193:1109–1119. <https://doi.org/10.1086/501366>.
 70. Vergara-Irigaray M, Valle J, Merino N, Latasa C, García B, Ruiz de Los Mozos I, Solano C, Toledo-Arana A, Penadés JR, Lasa I. 2009. Relevant role of fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* biofilm-associated foreign-body infections. *Infect Immun* 77:3978–3991. <https://doi.org/10.1128/IAI.00616-09>.
 71. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 40:175–179. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6).
 72. Manner S, Goeres DM, Skogman M, Vuorela P, Fallarero A. 2017. Prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm formation by antibiotics in 96-microtiter well plates and drip flow reactors: critical factors influencing outcomes. *Sci Rep* 7:43854. <https://doi.org/10.1038/srep43854>.
 73. Rooijackers SHM, van Kessel KPM, van Strijp JAG. 2005. Staphylococcal innate immune evasion. *Trends Microbiol* 13:596–601. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.10.002>.
 74. Thomer L, Schneewind O, Missiakas D. 2016. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. *Annu Rev Pathol* 11:343–364. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044351>.
 75. Berube BJ, Bubeck-Wardenburg J. 2013. *Staphylococcus aureus* α -toxin: nearly a century of intrigue. *Toxins* 5:1140–1166. <https://doi.org/10.3390/toxins5061140>.
 76. Schmitz FJ, Verhoef J, Hadding U, Heinz HP, Jones ME. 1998. Reduction in cytokine release from human monocytes by modifications in cell wall structure of *Staphylococcus aureus* induced by subinhibitory concentrations of oxacillin. *J Med Microbiol* 47:533–541. <https://doi.org/10.1099/00222615-47-6-533>.
 77. Navarro J. 1987. Modulation of [3H]dihydropyridine receptors by activation of protein kinase C in chick muscle cells. *J Biol Chem* 262:4649–4652.
 78. English BK, Maryniw EM, Talati AJ, Meals EA. 2006. Diminished macrophage inflammatory response to *Staphylococcus aureus* isolates exposed to daptomycin versus vancomycin or oxacillin. *Antimicrob Agents Chemother* 50:2225–2227. <https://doi.org/10.1128/AAC.01559-05>.
 79. Bhakdi S, Tranum-Jensen J. 1991. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Rev* 55:733–751.
 80. Nygaard TK, Pallister KB, DuMont AL, DeWald M, Watkins RL, Pallister EQ, Malone C, Griffith S, Horswill AR, Torres VJ, Voyich JM. 2012. Alpha-toxin induces programmed cell death of human T cells, B cells, and monocytes during USA300 infection. *PLoS One* 7:e36532. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036532>.
 81. Tabor DE, Yu L, Mok H, Tkaczyk C, Sellman BR, Wu Y, Oganiesyan V, Slidel T, Jafri H, McCarthy M, Bradford P, Esser MT. 2016. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin is conserved among diverse hospital respiratory isolates collected from a global surveillance study and is neutralized by monoclonal antibody MEDI4893. *Antimicrob Agents Chemother* 60:5312–5321. <https://doi.org/10.1128/AAC.00357-16>.
 82. Glennly AT, Stevens MF. 1935. *Staphylococcus* toxins and antitoxins. *J Pathol Bacteriol* 40:201–210. <https://doi.org/10.1002/path.1700400202>.
 83. Davis JP, Chesney PJ, Wand PJ, LaVenture M. 1980. Toxic-shock syndrome: epidemiologic features, recurrence, risk factors, and pre-

- vention. *N Engl J Med* 303:1429–1435. <https://doi.org/10.1056/NEJM198012183032501>.
84. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 13:16–34. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.1.16-34.2000>.
 85. Dickgiesser N, Wallach U. 1987. Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1): influence of its production by subinhibitory antibiotic concentrations. *Infection* 15:351–353. <https://doi.org/10.1007/BF01647737>.
 86. Stevens DL, Wallace RJ, Hamilton SM, Bryant AE. 2006. Successful treatment of staphylococcal toxic shock syndrome with linezolid: a case report and in vitro evaluation of the production of toxic shock syndrome toxin type 1 in the presence of antibiotics. *Clin Infect Dis* 42:729–730. <https://doi.org/10.1086/500265>.
 87. Bunikowski R, Mielke M, Skarabis H, Herz U, Bergmann RL, Wahn U, Renz H. 1999. Prevalence and role of serum IgE antibodies to the *Staphylococcus aureus*-derived superantigens SEA and SEB in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 103:119–124. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(99\)70535-X](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(99)70535-X).
 88. Dohin B, Gillet Y, Kohler R, Lina G, Vandenesch F, Vanhems P, Floret D, Etienne J. 2007. Pediatric bone and joint infections caused by Pantone-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus*. *Pediatr Infect Dis J* 26:1042–1048. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e318133a85e>.
 89. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet J-C, Lina G, Bes M, Vandenesch F, Piémont Y, Brousse N, Floret D, Etienne J. 2002. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Pantone-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* 359:753–759. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)07877-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)07877-7).
 90. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J. 1999. Involvement of Pantone-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis* 29:1128–1132. <https://doi.org/10.1086/313461>.
 91. Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, Bach T-HL, Queck SY, Li M, Kennedy AD, Dorward DW, Klebanoff SJ, Peschel A, DeLeo FR, Otto M. 2007. Identification of novel cytolysin peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat Med* 13:1510–1514. <https://doi.org/10.1038/nm1656>.
 92. Chatterjee SS, Joo H-S, Duong AC, Dieringer TD, Tan VY, Song Y, Fischer ER, Cheung GYC, Li M, Otto M. 2013. Essential *Staphylococcus aureus* toxin export system. *Nat Med* 19:364–367. <https://doi.org/10.1038/nm.3047>.
 93. Joo H-S, Chatterjee SS, Villaruz AE, Dickey SW, Tan VY, Chen Y, Sturdevant DE, Ricklefs SM, Otto M. 2016. Mechanism of gene regulation by a *Staphylococcus aureus* toxin. *mBio* 7:e01579-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01579-16>.
 94. Blickwede M, Wolz C, Valentin-Weigand P, Schwarz S. 2005. Influence of clindamycin on the stability of *coa* and *fnbB* transcripts and adherence properties of *Staphylococcus aureus* Newman. *FEMS Microbiol Lett* 252:73–78. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.08.022>.
 95. Blickwede M, Goethe R, Wolz C, Valentin-Weigand P, Schwarz S. 2005. Molecular basis of florfenicol-induced increase in adherence of *Staphylococcus aureus* strain Newman. *J Antimicrob Chemother* 56:315–323. <https://doi.org/10.1093/jac/dki233>.
 96. Blickwede M, Valentin-Weigand P, Schwarz S. 2004. Subinhibitory concentrations of florfenicol enhance the adherence of florfenicol-susceptible and florfenicol-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 54:286–288. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh273>.
 97. Rasiqade JP, Moulay A, Lhoste Y, Tristan A, Bes M, Vandenesch F, Etienne J, Lina G, Laurent F, Dumitrescu O. 2011. Impact of subinhibitory antibiotics on fibronectin-mediated host cell adhesion and invasion by *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol* 11:263. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-263>.
 98. Labro MT, Pochet I, Babin-Chevaye C, Hakim J. 1987. Effect of ceftriaxone-induced alterations of bacteria on neutrophil bactericidal function. *J Antimicrob Chemother* 20:857–869. <https://doi.org/10.1093/jac/20.6.857>.
 99. Burke FM, Di Poto A, Speziale P, Foster TJ. 2011. The A domain of fibronectin-binding protein B of *Staphylococcus aureus* contains a novel fibronectin binding site. *FEBS J* 278:2359–2371. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08159.x>.
 100. Ramadurai L, Jayaswal RK. 1997. Molecular cloning, sequencing, and expression of *lytM*, a unique autolytic gene of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 179:3625–3631. <https://doi.org/10.1128/jb.179.11.3625-3631.1997>.
 101. Schilcher K, Andreoni F, Dengler Haunreiter V, Seidl K, Hasse B, Zinker-nagel AS. 2016. Modulation of *Staphylococcus aureus* biofilm matrix by subinhibitory concentrations of clindamycin. *Antimicrob Agents Chemother* 60:5957–5967. <https://doi.org/10.1128/AAC.00463-16>.
 102. Fujimoto DF, Bayles KW. 1998. Opposing roles of the *Staphylococcus aureus* virulence regulators, Agr and Sar, in Triton X-100- and penicillin-induced autolysis. *J Bacteriol* 180:3724–3726.
 103. Lázaro-Díez M, Remuzgo-Martínez S, Rodríguez-Mirones C, Acosta F, Icardo JM, Martínez-Martínez L, Ramos-Vivas J. 2016. Effects of subinhibitory concentrations of ceftaroline on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilms. *PLoS One* 11:e0147569. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147569>.
 104. Antignac A, Sieradzki K, Tomasz A. 2007. Perturbation of cell wall synthesis suppresses autolysis in *Staphylococcus aureus*: evidence for coregulation of cell wall synthetic and hydrolytic enzymes. *J Bacteriol* 189:7573–7580. <https://doi.org/10.1128/JB.01048-07>.
 105. Suginata H, Blumberg PM, Strominger JL. 1972. Multiple penicillin-binding components in *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 247:5279–5288.
 106. Sobral RG, Jones AE, Des Etages SG, Dougherty TJ, Peitzsch RM, Gaasterland T, Ludovice AM, de Lencastre H, Tomasz A. 2007. Extensive and genome-wide changes in the transcription profile of *Staphylococcus aureus* induced by modulating the transcription of the cell wall synthesis gene *murF*. *J Bacteriol* 189:2376–2391. <https://doi.org/10.1128/JB.01439-06>.
 107. Gui Z, Wang H, Ding T, Zhu W, Zhuang X, Chu W. 2014. Azithromycin reduces the production of α -hemolysin and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Indian J Microbiol* 54:114–117. <https://doi.org/10.1007/s12088-013-0438-4>.
 108. Pascual A, Ballesta S, García I, Perea EJ. 2002. Uptake and intracellular activity of linezolid in human phagocytes and nonphagocytic cells. *Antimicrob Agents Chemother* 46:4013–4015. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.12.4013-4015.2002>.
 109. Ballesta S, Pascual A, García I, Perea EJ. 2003. Effect of linezolid on the phagocytic functions of human polymorphonuclear leukocytes. *Chemotherapy* 49:163–166. <https://doi.org/10.1159/000071139>.
 110. Naess A, Stenhaug Kilhus K, Nystad TW, Sørnes S. 2006. Linezolid and human polymorphonuclear leukocyte function. *Chemotherapy* 52:122–124. <https://doi.org/10.1159/000092539>.
 111. Kushiya K, Nakagawa S, Taneike I, Iwakura N, Imanishi K, Uchiyama T, Tsukada H, Gejyo F, Yamamoto T. 2005. Inhibitory effect of antimicrobial agents and anisodamine on the staphylococcal superantigenic toxin-induced overproduction of proinflammatory cytokines by human peripheral blood mononuclear cells. *J Infect Chemother* 11:192–195. <https://doi.org/10.1007/s10156-005-0389-8>.
 112. Pichereau S, Moran JJM, Hayney MS, Shukla SK, Sakoulas G, Rose WE. 2012. Concentration-dependent effects of antimicrobials on *Staphylococcus aureus* toxin-mediated cytokine production from peripheral blood mononuclear cells. *J Antimicrob Chemother* 67:123–129. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr417>.
 113. Dey S, Majhi A, Mahanti S, Dey I, Bishayi B. 2015. In vitro anti-inflammatory and immunomodulatory effects of ciprofloxacin or azithromycin in *Staphylococcus aureus*-stimulated murine macrophages are beneficial in the presence of cytochalasin D. *Inflammation* 38:1050–1069. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-0070-4>.
 114. van Langevelde P, Ravensbergen E, Grashoff P, Beekhuizen H, Groeneveld PH, van Dissel JT. 1999. Antibiotic-induced cell wall fragments of *Staphylococcus aureus* increase endothelial chemokine secretion and adhesiveness for granulocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 43:2984–2989.
 115. Novick RP, Jiang D. 2003. The staphylococcal *saeRS* system coordinates environmental signals with agr quorum sensing. *Microbiology* 149:2709–2717. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26575-0>.
 116. Giraud AT, Cheung AL, Nagel R. 1997. The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* controls exoprotein synthesis at the transcriptional level. *Arch Microbiol* 168:53–58. <https://doi.org/10.1007/s002030050469>.
 117. Cardot Martin E, Michel A, Raynal B, Badiou C, Laurent F, Vandenesch F, Etienne J, Lina G, Dumitrescu O. 2015. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300 resists staphylococcal protein A modulation by antibiotics and antimicrobial peptides. *Int J Antimicrob Agents* 45:19–24. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.08.009>.

118. Maguire BA. 2009. Inhibition of bacterial ribosome assembly: a suitable drug target? *Microbiol Mol Biol Rev* 73:22–35. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00030-08>.
119. Singh VK, Jayaswal RK, Wilkinson BJ. 2001. Cell wall-active antibiotic induced proteins of *Staphylococcus aureus* identified using a proteomic approach. *FEMS Microbiol Lett* 199:79–84.
120. Utaida S, Dunman PM, Macapagal D, Murphy E, Projan SJ, Singh VK, Jayaswal RK, Wilkinson BJ. 2003. Genome-wide transcriptional profiling of the response of *Staphylococcus aureus* to cell-wall-active antibiotics reveals a cell-wall-stress stimulon. *Microbiology* 149:2719–2732. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26426-0>.
121. Gardete S, Wu SW, Gill S, Tomasz A. 2006. Role of *VraSR* in antibiotic resistance and antibiotic-induced stress response in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 50:3424–3434. <https://doi.org/10.1128/AAC.00356-06>.
122. Blake KL, O'Neill AJ, Mengin-Lecreulx D, Henderson PJF, Bostock JM, Dunsmore CJ, Simmons KJ, Fishwick CWG, Leeds JA, Chopra I. 2009. The nature of *Staphylococcus aureus* MurA and MurZ and approaches for detection of peptidoglycan biosynthesis inhibitors. *Mol Microbiol* 72:335–343. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06648.x>.
123. Rahman MM, Hunter HN, Prova S, Verma V, Qamar A, Golemi-Kotra D. 2016. The *Staphylococcus aureus* methicillin resistance factor *FmtA* is a D-amino esterase that acts on teichoic acids. *mBio* 7:e02070-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.02070-15>.
124. McAleese F, Wu SW, Sieradzki K, Dunman P, Murphy E, Projan S, Tomasz A. 2006. Overexpression of genes of the cell wall stimulon in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibiting vancomycin-intermediate-*S. aureus*-type resistance to vancomycin. *J Bacteriol* 188:1120–1133. <https://doi.org/10.1128/JB.188.3.1120-1133.2006>.
125. Komatsuzawa H, Sugai M, Nakashima S, Yamada S, Matsumoto A, Oshida T, Suginaka H. 1997. Subcellular localization of the major autolysin, ATL and its processed proteins in *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol* 41:469–479. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1997.tb01880.x>.
126. Ingavale S, van Wamel W, Luong TT, Lee CY, Cheung AL. 2005. Rat/MgrA, a regulator of autolysis, is a regulator of virulence genes in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 73:1423–1431. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.3.1423-1431.2005>.
127. Fournier B, Hooper DC. 2000. A new two-component regulatory system involved in adhesion, autolysis, and extracellular proteolytic activity of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 182:3955–3964. <https://doi.org/10.1128/JB.182.14.3955-3964.2000>.
128. Reed P, Atilano ML, Alves R, Hoiczky E, Sher X, Reichmann NT, Pereira PM, Roemer T, Filipe SR, Pereira-Leal JB, Ligoxygakis P, Pinho MG. 2015. *Staphylococcus aureus* survives with a minimal peptidoglycan synthesis machine but sacrifices virulence and antibiotic resistance. *PLoS Pathog* 11:e1004891. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004891>.
129. Yang Y, Bhachech N, Bush K. 1995. Biochemical comparison of imipenem, meropenem and biapenem: permeability, binding to penicillin-binding proteins, and stability to hydrolysis by beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 35:75–84. <https://doi.org/10.1093/jac/35.1.75>.
130. Georgopapadakou NH, Dix BA, Mauriz YR. 1986. Possible physiological functions of penicillin-binding proteins in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 29:333–336. <https://doi.org/10.1128/AAC.29.2.333>.
131. Georgopapadakou NH, Smith SA, Bonner DP. 1982. Penicillin-binding proteins in a *Staphylococcus aureus* strain resistant to specific beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 22:172–175. <https://doi.org/10.1128/AAC.22.1.172>.
132. Curtis NAC, Hayes MV, Wyke AW, Ward JB. 1980. A mutant of *Staphylococcus aureus* H lacking penicillin-binding protein 4 and transpeptidase activity in vitro. *FEMS Microbiol Lett* 9:263–266. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1980.tb05649.x>.
133. Pereira SFF, Henriques AO, Pinho MG, de Lencastre H, Tomasz A. 2007. Role of PBP1 in cell division of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 189:3525–3531. <https://doi.org/10.1128/JB.00044-07>.
134. Pereira SFF, Henriques AO, Pinho MG, de Lencastre H, Tomasz A. 2009. Evidence for a dual role of PBP1 in the cell division and cell separation of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 72:895–904. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06687.x>.
135. VanBogelen RA, Kelley PM, Neidhardt FC. 1987. Differential induction of heat shock, SOS, and oxidation stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 169:26–32. <https://doi.org/10.1128/jb.169.1.26-32.1987>.
136. Winterling KW, Chafin D, Hayes JJ, Sun J, Levine AS, Yasbin RE, Woodgate R. 1998. The *Bacillus subtilis* DinR binding site: redefinition of the consensus sequence. *J Bacteriol* 180:2201–2211.
137. Courcelle J, Khodursky A, Peter B, Brown PO, Hanawalt PC. 2001. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics* 158:41–64.
138. Anderson DG, Kowalczykowski SC. 1998. Reconstitution of an SOS response pathway: derepression of transcription in response to DNA breaks. *Cell* 95:975–979. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81721-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81721-3).
139. Phillips I, Culebras E, Moreno F, Baquero F. 1987. Induction of the SOS response by new 4-quinolones. *J Antimicrob Chemother* 20:631–638. <https://doi.org/10.1093/jac/20.5.631>.
140. Miller C, Thomsen LE, Gaggero C, Mosseri R, Ingmer H, Cohen SN. 2004. SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science* 305:1629–1631. <https://doi.org/10.1126/science.1101630>.
141. Bisognano C, Kelley WL, Estoppey T, Francois P, Schrenzel J, Li D, Lew DP, Hooper DC, Cheung AL, Vaudaux P. 2004. A recA-LexA-dependent pathway mediates ciprofloxacin-induced fibronectin binding in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 279:9064–9071. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309836200>.
142. Plata KB, Riosa S, Singh CR, Rosato RR, Rosato AE. 2013. Targeting of PBP1 by beta-lactams determines recA/SOS response activation in heterogeneous MRSA clinical strains. *PLoS One* 8:e61083. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061083>.
143. Fitzgerald JR, Monday SR, Foster TJ, Bohach GA, Hartigan PJ, Meaney WJ, Smyth CJ. 2001. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *J Bacteriol* 183:63–70. <https://doi.org/10.1128/JB.183.1.63-70.2001>.
144. Zou D, Kaneko J, Narita S, Kamio Y. 2000. Prophage, phiPV83-pro, carrying Panton-Valentine leukocidin genes, on the *Staphylococcus aureus* P83 chromosome: comparative analysis of the genome structures of phiPV83-pro, phiPVL, phi11, and other phages. *Biosci Biotechnol Biochem* 64:2631–2643. <https://doi.org/10.1271/bbb.64.2631>.
145. Wirtz C, Witte W, Wolz C, Goerke C. 2009. Transcription of the phage-encoded Panton-Valentine leukocidin of *Staphylococcus aureus* is dependent on the phage life-cycle and on the host background. *Microbiology* 155:3491–3499. <https://doi.org/10.1099/mic.0.032466-0>.
146. Ubeda C, Maiques E, Knecht E, Lasa I, Novick RP, Penadés JR. 2005. Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-encoded virulence factors in staphylococci. *Mol Microbiol* 56:836–844. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04584.x>.
147. Goerke C, Köller J, Wolz C. 2006. Ciprofloxacin and trimethoprim cause phage induction and virulence modulation in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 50:171–177. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.171-177.2006>.
148. Novick RP. 2003. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* 48:1429–1449. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03526.x>.
149. Yarwood JM, McCormick JK, Schlievert PM. 2001. Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 183:1113–1123. <https://doi.org/10.1128/JB.183.4.1113-1123.2001>.
150. Delauné A, Dubrac S, Blanchet C, Poupel O, Mäder U, Hiron A, Leduc A, Fitting C, Nicolas P, Cavaillon J-M, Adib-Conquy M, Msadek T. 2012. The WalkR system controls major staphylococcal virulence genes and is involved in triggering the host inflammatory response. *Infect Immun* 80:3438–3453. <https://doi.org/10.1128/IAI.00195-12>.
151. Dumitrescu O, Forey F, Bes M, Vandenesch F, Etienne J, Lina G. 2011. Linezolid decreases exotoxin expression in *Staphylococcus aureus* by early repressing *agr*, *sarA* and *sae* regulators, abstr P1052. 21st Eur Congr Clin Microbiol Infect Dis, Milan, Italy.
152. Manna AC, Ray B. 2007. Regulation and characterization of *rot* transcription in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 153:1538–1545. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/004309-0>.
153. Löffler B, Hussain M, Grundmeier M, Brück M, Holzinger D, Varga G, Roth J, Kahl BC, Proctor RA, Peters G. 2010. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS Pathog* 6:e1000715. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000715>.
154. Diep BA, Chan L, Tattavin P, Kajikawa O, Martin TR, Basuino L, Mai TT, Marbach H, Broughton KR, Whitney AR, Gardner DJ, Fan X, Tseng CW, Liu GY, Badiou C, Etienne J, Lina G, Matthay MA, DeLeo FR, Chambers HF. 2010. Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus au-*

reus Panton-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:5587–5592. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912403107>.

155. Diep BA, Le VTM, Visram ZC, Rouha H, Stulik L, Dip EC, Nagy G, Nagy E. 2016. Improved protection in a rabbit model of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* necrotizing pneumonia upon neutralization of leukocidins in addition to alpha-hemolysin. *Antimicrob Agents Chemother* 60:6333–6340. <https://doi.org/10.1128/AAC.01213-16>.

156. Diep BA, Le VTM, Badiou C, Le HN, Pinheiro MG, Duong AH, Wang X, Dip EC, Aguiar-Alves F, Basuino L, Marbach H, Mai TT, Sarda MN, Kajikawa O, Matute-Bello G, Tkaczyk C, Rasigade J-P, Sellman BR, Chambers HF, Lina G. 2016. IVIG-mediated protection against necrotizing pneumonia caused by MRSA. *Sci Transl Med* 8:357ra124. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aag1153>.

157. Diep BA, Afasizheva A, Le HN, Kajikawa O, Matute-Bello G, Tkaczyk C, Sellman B, Badiou C, Lina G, Chambers HF. 2013. Effects of linezolid on suppressing in vivo production of staphylococcal toxins and improving survival outcomes in a rabbit model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* necrotizing pneumonia. *J Infect Dis* 208:75–82. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit129>.

158. Croisier-Bertin D, Hayez D, Da Silva S, Labrousse D, Biek D, Badiou C, Dumitrescu O, Guerard P, Charles P-E, Piroth L, Lina G, Vandenesch F, Chavanet P. 2014. In vivo efficacy of ceftaroline fosamil in a methicillin-resistant Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* rabbit pneumonia model. *Antimicrob Agents Chemother* 58:1855–1861. <https://doi.org/10.1128/AAC.01707-13>.

159. Yanagihara K, Kaneko Y, Sawai T, Miyazaki Y, Tsukamoto K, Hirakata Y, Tomono K, Kadota J-I, Tashiro T, Murata I, Kohno S. 2002. Efficacy of linezolid against methicillin-resistant or vancomycin-insensitive *Staphylococcus aureus* in a model of hematogenous pulmonary infection. *Antimicrob Agents Chemother* 46:3288–3291. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.10.3288-3291.2002>.

160. Yanagihara K, Kihara R, Araki N, Morinaga Y, Seki M, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Yamada Y, Kohno S, Tsukamoto K, Kamihira S. 2009. Efficacy of linezolid against Panton-Valentine leukocidin (PVL)-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a mouse model of haematogenous pulmonary infection. *Int J Antimicrob Agents* 34:477–481. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.06.024>.

161. Bubeck-Wardenburg J, Bae T, Otto M, Deleo FR, Schneewind O. 2007. Poring over pores: alpha-hemolysin and Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Nat Med* 13:1405–1406. <https://doi.org/10.1038/nm1207-1405>.

162. Luna CM, Bruno DA, Garcia-Morato J, Mann KC, Rizzo Patrón J, Sagardía J, Absi R, García Bottino M, Marchetti D, Famiglietti A, Baleztena M, Biancolini C. 2009. Effect of linezolid compared with glycopeptides in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* severe pneumonia in piglets. *Chest* 135:1564–1571. <https://doi.org/10.1378/chest.08-2169>.

163. Martinez-Olondris P, Rigol M, Soy D, Guerrero L, Agusti C, Quera MA, Li Bassi G, Esperatti M, Luque N, Liapikou M, Filella X, Marco F, de la Bellacasa JP, Torres A. 2012. Efficacy of linezolid compared to vancomycin in an experimental model of pneumonia induced by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in ventilated pigs. *Crit Care Med* 40:162–168. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31822d74a2>.

164. Akinnusi ME, Hattemer A, Gao W, El-Solh AA. 2011. Does linezolid modulate lung innate immunity in a murine model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia? *Crit Care Med* 39:1944–1952. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31821bd79e>.

165. Micek ST, Dunne M, Kollef MH. 2005. Pleuropulmonary complications of Panton-Valentine leukocidin-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: importance of treatment with antimicrobials inhibiting exotoxin production. *Chest* 128:2732–2738. <https://doi.org/10.1378/chest.128.4.2732>.

166. Lobo LJ, Reed KD, Wunderink RG. 2010. Expanded clinical presentation of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Chest* 138:130–136. <https://doi.org/10.1378/chest.09-1562>.

167. Li H-T, Zhang T-T, Huang J, Zhou Y-Q, Zhu J-X, Wu B-Q. 2011. Factors associated with the outcome of life-threatening necrotizing pneumonia due to community-acquired *Staphylococcus aureus* in adult and adolescent patients. *Respir Int Rev Thorac Dis* 81:448–460. <https://doi.org/10.1159/000319557>.

168. Rouzic N, Janvier F, Libert N, Javouhey E, Lina G, Nizou J-Y, Pasquier P, Stamm D, Brinquin L, Pelletier C, Vandenesch F, Floret D, Etienne J, Gillet Y. 2010. Prompt and successful toxin-targeting treatment of three patients with necrotizing pneumonia due to *Staphylococcus aureus* strains carrying the Panton-Valentine leukocidin genes. *J Clin Microbiol* 48:1952–1955. <https://doi.org/10.1128/JCM.01892-09>.

169. Gauduchon V, Cozon G, Vandenesch F, Genestier A-L, Eyssade N, Peyrol S, Etienne J, Lina G. 2004. Neutralization of *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin by intravenous immunoglobulin in vitro. *J Infect Dis* 189:346–353. <https://doi.org/10.1086/380909>.

170. Wunderink RG, Niederman MS, Kollef MH, Shorr AF, Kunkel MJ, Baruch A, McGee WT, Reisman A, Chastre J. 2012. Linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial pneumonia: a randomized, controlled study. *Clin Infect Dis* 54:621–629. <https://doi.org/10.1093/cid/cir895>.

Elisabeth Hodille, Pharm.D., received her pharmacy degree from the University of Dijon, France. She did her medical microbiology residency at Université Lyon 1, where she completed her Ph.D. training. She has been an Assistant Professor in the Microbiology Department of the Faculty of Medicine Lyon Sud since 2011, and she is also a fellow of the staphylococcal pathogenesis research team at the Centre Internationale de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111. Her research focuses on the pathogenic role of pore-forming toxin in *S. aureus* infections.



Warren Rose, Pharm.D., Ph.D., received his pharmacy degree from Butler University, Indianapolis, IN, and completed postdoctoral training at Rush University Medical Center (residency), Chicago, IL, and Wayne State University (fellowship), Detroit, MI, studying antimicrobial pharmacokinetics and pharmacodynamics. He joined the faculty at the University of Wisconsin-Madison in 2008, where he is currently an Associate Professor of Pharmacy. The focus of his research since 2008 has been the study of host and pathogen interactions in relation to antimicrobial treatment and resistance development in Gram-positive pathogens. This includes the effects of antibiotics on *Staphylococcus aureus* virulence. His interests in this area developed from the various patient outcomes observed in his clinical practice that cannot be attributed to antimicrobial susceptibility alone.



Binh An Diep, Ph.D., completed his doctorate in infectious diseases and immunity at the University of California, Berkeley, in 2005. He received postdoctoral training in microbial pathogenesis at the University of California, San Francisco, in 2008. He is currently an Associate Professor of Medicine at the University of California San Francisco School of Medicine. He has been the principal investigator for many works on the pathogenesis of Pantone-Valentine leukocidin-producing *S. aureus* and community-acquired methicillin-resistant *S. aureus*. The goal of his research is to develop novel strategies (including immunotherapies and vaccines) against severe staphylococcal infections.



Sylvain Goutelle received Pharm.D. and Ph.D. degrees from Université Lyon, France. He has been a visiting researcher at the Laboratory of Applied Pharmacokinetics, USC School of Medicine (Los Angeles, CA), and at the Division of Clinical Pharmacology, University Hospital of Lausanne (Switzerland). He is currently Senior Hospital Pharmacist and Associate Professor of Pharmacy at the University Hospitals of Lyon and the Lyon School of Pharmacy. His research focuses on quantitative pharmacokinetics/pharmacodynamics and their applications for optimization of anti-infective drug therapy.



Gerard Lina, M.D., Ph.D., is Professor of Clinical Microbiology at the School of Medicine and the Postgraduate School of Clinical Microbiology of Université Lyon 1. He received his medical degree from the School of Medicine of Université Lyon 1, where he also completed a Ph.D. in immunology and microbiology. He is Head of the Laboratory of Bacteriology of the Lyon Hospitals, Codirector of the Centre National de Référence des Legionelles, and a fellow of the French National Reference Laboratory for Staphylococci, Lyon, France. He is Chair of the French Society of Microbiology (SFM), Secretary of the French Committee of Antimicrobial Testing (CA-SFM), and a member of the steering committee of EUCAST. He has been the principal investigator for many works on staphylococcal pathogenesis and antimicrobial agents at the Centre Internationale de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111, and has coauthored over 200 papers published in peer-reviewed journals.



Oana Dumitrescu, M.D., Ph.D., received her medical degree and microbiology doctorate from Université Lyon 1, France, where she also did her medical microbiology residency. She is Associate Professor in the Microbiology Department of the Faculty of Medicine Lyon Sud, Lyon, France. She has been a fellow of the French National Reference Laboratory for Staphylococci since 2007 and is currently working in the field of *S. aureus* virulence and resistance to antibiotics, with a particular focus on the effects of antibiotics on staphylococcal virulence.



PARTIE 2 : TRAVAIL PERSONNEL

I. Conservation de l'effet anti-toxinique de la clindamycine sur des souches de *S. aureus* présentant un phénotype de résistance MLS_B inducible

Troisième publication : Clindamycin suppresses virulence expression in inducible clindamycin-resistant Staphylococcus aureus strains

Elisabeth Hodille, Cédric Badiou, Caroline Bouveyron, Michèle Bes, François Vandenesch, Gérard Lina, Oana Dumitrescu

« Short report » soumis pour publication dans « *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* »

La clindamycine affiche des propriétés inhibitrices sur l'expression de la virulence de *S. aureus* en induisant une répression de la production des toxines excrétées, comme la PVL, Hla et TSST-1 (Hodille et al. 2017). Cette action est complètement abolie en cas de résistance aux macrolides, lincosamides et streptogramines B (MLS_B) de type constitutif, conférée par exemple par le gène *ermB*, entraînant une résistance constitutive à la clindamycine (Herbert et al. 2001). Cependant, aucune étude n'a jamais investigué l'effet de la clindamycine sur la modulation de la virulence pour des souches de *S. aureus* présentant une résistance inducible aux lincosamides, résistance caractérisée sur l'antibiogramme phénotypique en diffusion par une résistance aux macrolides mais une sensibilité aux lincosamides avec une zone d'induction entre les deux disques d'antibiotiques. Bien que la présence d'une résistance MLS_B inducible chez une souche de *S. aureus* expose au risque d'échec thérapeutique si les lincosamides sont utilisés pour le traitement antibiotique d'infections staphylococciques compliquées (Lewis et Jorgensen 2005; Woods 2009), l'utilisation d'une telle molécule pourrait être intéressante en association avec une autre molécule anti-staphylococcique dans le cadre d'infection à composante toxinique, pour son effet inhibiteur sur la virulence.

Nous avons sélectionné parmi un panel de 180 souches de *S. aureus* testées phénotypiquement et génotypiquement pour la résistance aux macrolides et apparentés, 6 souches présentant un phénotype MLS_B inducible et appartenant à des fonds génétiques variés. Les souches de *S. aureus* sélectionnées ont été cultivées avec ou sans clindamycine (contrôle de croissance), à concentration sub-inhibitrice pendant 6 heures dans un bouillon CCY. La quantité de PVL, Hla et TSST-1 dans les surnageants bactériens obtenus a été mesurée par des tests ELISA, et rapportée au contrôle de croissance sans antibiotique.

Ainsi, nous avons observé que la clindamycine supprimait l'expression de Hla, PVL et TSST-1 malgré la présence d'un gène *erm* conférant une résistance inducible aux lincosamides, avec cependant une profondeur de l'activité suppressive variable en fonction des fonds génétiques. En effet, conformément

à ce que Cardot-Martin et al. observaient avec une résistance à la modulation de l'expression de la protéine A pour une souche de fond génétique USA300 (Cardot Martin et al. 2015), nous avons montré que l'effet inhibiteur de la clindamycine sur l'expression de Hla et PVL était moins prononcé sur la souche de fond génétique USA300 que sur les autres souches de fonds génétiques variés.

En conclusion, nous pouvons affirmer que la clindamycine conserve son activité anti-toxinique sur des souches de *S. aureus* présentant un phénotype de résistance inductible aux lincosamides. La clindamycine pourrait donc être utilisée comme adjuvant modulateur de la virulence, en association à un autre antibiotique anti-staphylococcique, dans la prise en charge des infections staphylococciques à composante toxinique induites par une souche de *S. aureus* présentant un phénotype MLS_B inductible.

Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials
Clindamycin suppresses virulence expression in inducible clindamycin-resistant
Staphylococcus aureus strains
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	CMAM-D-18-00046
Full Title:	Clindamycin suppresses virulence expression in inducible clindamycin-resistant Staphylococcus aureus strains
Article Type:	Short report
Funding Information:	
Abstract:	Clindamycin is a protein synthesis inhibitory agent that has the ability to suppress the expression of virulence factors in Staphylococcus aureus. Recent guidelines recommend the use of clindamycin for the treatment of toxin-mediated infections. Clindamycin modulates virulence expression at sub-inhibitory concentrations (sub-MICs) in clindamycin-susceptible S. aureus strains but fails to do so in constitutive clindamycin-resistant strains. However, no data are currently available on the impact of clindamycin at sub-MICs on the virulence of inducible clindamycin-resistant S. aureus strains. Here, we show that sub-MICs of clindamycin decrease Panton-Valentin leucocidin (PVL), toxic-shock-staphylococcal toxin (TSST-1) and alpha-haemolysin (Hla) expression in 6 inducible clindamycin-resistant isolates cultivated in vitro in CCY medium. These results suggest that the clindamycin anti-toxin effect is retained for inducible clindamycin-resistant S. aureus isolates; therefore, its usage should be considered within the treatment regimen of toxin related infections for inducible clindamycin-resistant S. aureus.
Corresponding Author:	Elisabeth Hodille Centre Hospitalier Universitaire de Lyon FRANCE
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Centre Hospitalier Universitaire de Lyon
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Elisabeth Hodille
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Elisabeth Hodille Cédric Badiou Caroline Bouveyron Michèle Bes Anne Tristan François Vandenesch Gérard Lina Oana Dumitrescu
Order of Authors Secondary Information:	
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response
Is this study a clinical trial?<hr><i>A clinical trial is defined	No

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

by the World Health Organisation as 'any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes'.</i>

Powered by Editorial Manager® and Prodxion Manager® from Aries Systems Corporation

[Click here to view linked References](#)

1 **Clindamycin suppresses virulence expression in inducible clindamycin-**
2 **resistant *Staphylococcus aureus* strains**

3
4
5 3
6 4 Elisabeth Hodille ^{a,c} Cédric Badiou ^c Caroline Bouveyron ^{a,b} Michèle Bes ^{a,b,c} Anne Tristan ^{a,b,c}
7
8 5 François Vandenesch ^{a,b,c} Gérard Lina ^{a,b,c} Oana Dumitrescu ^{a,b,c}
9

10 6
11 7 ^a Department of Bacteriology, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

12 8 ^b National Reference Center for Staphylococci, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

13 9 ^c International Center for Infectiology Research (CIRI), INSERM U1111, Université Lyon 1, CNRS
14
15
16
17
18 10 UMR5308, ENS Lyon, Lyon, France

19
20 11
21
22 12 Corresponding author: Elisabeth Hodille, elisabeth.hodille@chu-lyon.fr, Hôpital de la Croix Rouse-
23
24 13 Centre de Biologie Nord, Grande rue de la Croix Rouse, 69004 Lyon, France, tel: +334 72 07 16 90

25
26 14 Cédric Badiou, cedric.badiou@univ-lyon.fr, CIRI - INSERM U1111, Faculté de Médecine Laennec, 7
27
28 15 rue Guillaume Paradin, 69008 Lyon, France

29
30
31 16 Caroline Bouveyron, caroline.bouveyron@chu-lyon.fr, Michèle Bes, michele.bes@chu-lyon.fr, Anne
32
33 17 Tristan, anne.tristan@chu-lyon.fr, François Vandenesch, francois.vandenesch@chu-lyon.fr, Gérard
34
35 18 Lina, gerard.lina@chu-lyon.fr, Oana Dumitrescu, oana.dumitrescu@chu-lyon.fr, National Reference
36
37 19 Center for Staphylococci, Hôpital de la Croix Rouse-Centre de Biologie Nord, Grande rue de la Croix
38
39 20 Rouse, 69004 Lyon.

40
41 21

42
43 22

44
45
46
47
48 23

49
50
51 24

52
53
54
55 25

56
57
58 26

27 **Abstract**

1
2
3 28 Clindamycin is a protein synthesis inhibitory agent that has the ability to suppress the expression of
4
5 29 virulence factors in *Staphylococcus aureus*. Recent guidelines recommend the use of clindamycin for
6
7 30 the treatment of toxin-mediated infections. Clindamycin modulates virulence expression at sub-
8
9 31 inhibitory concentrations (sub-MICs) in clindamycin-susceptible *S. aureus* strains but fails to do so in
10
11 32 constitutive clindamycin-resistant strains. However, no data are currently available on the impact of
12
13 33 clindamycin at sub-MICs on the virulence of inducible clindamycin-resistant *S. aureus* strains. Here,
14
15 34 we show that sub-MICs of clindamycin decrease Panton-Valentin leucocidin (PVL), toxic-shock-
16
17 35 staphylococcal toxin (TSST-1) and alpha-haemolysin (Hla) expression in 6 inducible clindamycin-
18
19 36 resistant isolates cultivated *in vitro* in CCY medium. These results suggest that the clindamycin anti-
20
21 37 toxin effect is retained for inducible clindamycin-resistant *S. aureus* isolates; therefore, its usage
22
23 38 should be considered within the treatment regimen of toxin related infections for inducible clindamycin-
24
25 39 resistant *S. aureus*.

26
27
28 40 Keywords: *Staphylococcus aureus*, Panton-Valentine leucocidin, toxic-shock-staphylococcal toxin,
29
30 41 alpha-haemolysin, inducible clindamycin resistance, anti-toxin effect

33 42 **Introduction**

34
35
36 43 Clindamycin is a protein synthesis inhibitory agent that has the ability to suppress the expression of
37
38 44 virulence factors in *Staphylococcus aureus* at sub-inhibitory concentrations (sub-MICs). Indeed,
39
40 45 several studies have reported the ability of clindamycin at sub-MICs to decrease the production of
41
42 46 Panton-Valentin leucocidin (PVL), toxic-shock-staphylococcal toxin (TSST-1) or alpha-haemolysin
43
44 47 (Hla) [1–6]. Therefore, recent guidelines recommend the use of clindamycin for the treatment of toxin-
45
46 48 mediated infections (e.g., toxic shock syndrome and necrotizing pneumonia) [7]. This modulation of
47
48 49 virulence expression by clindamycin occurs in clindamycin-susceptible *S. aureus* strains but is
49
50 50 abolished in constitutive clindamycin-resistant strains [5]. Nevertheless, no data are currently available
51
52 51 on the impact of clindamycin at sub-MICs on the virulence of inducible clindamycin-resistant *S. aureus*
53
54 52 strains. Here, we have shown in a selection of inducible clindamycin-resistant *S. aureus* strains that
55
56 53 clindamycin maintains its anti-toxin effect at sub-inhibitory concentrations.

60 54 **Methods**

55 **Bacterial strain selection**

56 One hundred eighty *S. aureus* strains from the French National Reference Centre of Staphylococci
57 were genotyped by the *S. aureus* Genotyping Kit 2.0 (Clondiag Alere® Jena, Germany), and the major
58 macrolide resistance genes were recorded (*ermA/B/C/T*, *linA*, *msrA*, *vatA/B*, *vgaA*, *vgb*, and *mbpB*).
59 The *mecA* gene responsible for methicillin resistance and the *lukS-PVL* and *tst* genes encoding for
60 PVL and TSST-1, respectively, were also recorded.
61 Macrolide phenotypic resistance was determined by the agar diffusion disk assay using antibiotic discs
62 (erythromycin, lincomycin, and quinupristin-dalfopristin) (I2A, Montpellier, France) according to the
63 European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) recommendations. Inducible
64 MLS_B (macrolides, lincosamides, and group B streptogramins) resistance was detected phenotypically
65 by an inhibition zone between the erythromycin disk and the lincomycin disks (positive D-test) [8].
66 *S. aureus* strains exhibiting inducible MLS_B resistance were selected, and the minimal inhibitory
67 concentrations (MIC) of clindamycin (provided by Pfizer, Amboise, France) were determined by micro-
68 dilution method using CCY broth medium. The *S. aureus* strain ATCC 29213 was used for clindamycin
69 MIC determination in both CCY and Mueller-Hinton broths.

70 ***S. aureus* culture conditions and toxin quantification**

71 Since toxin production in Muller Hinton broth medium is very low, experiments were performed in CCY
72 broth medium. Briefly, selected *S. aureus* strains were cultured overnight on Trypticase blood agar
73 plates. Colonies were resuspended in CCY broth to a 0.5 McFarland adjusted turbidity. Cultures were
74 performed at 37°C with gyratory shaking. When the optical density reached a turbidity of a 2
75 McFarland, clindamycin was added to the cultures to the final concentrations of 1/2 MIC, 1/4 MIC, and
76 1/8 MIC. Cultures with or without clindamycin (growth control) were incubated at 37°C with shaking for
77 6 hours. After the incubation time, culture supernatants were collected by centrifugation at 10000 g for
78 15 min and used for toxin quantification. The PVL, Hla and TSST-1 levels in the supernatant were
79 quantified using a specific ELISA assay as previously described [3], using ELISA kit provided by
80 GlaxoSmithKline, Brentford, United Kingdom, and TSST-1 antibodies provided by Toxin technology,
81 Sarasota, FL, USA.

82 **Results**

83 ***Inducible MLS_B resistance in S. aureus strains and the MIC of clindamycin***

84 Among the 180 strains tested, 78 were methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA), and
 85 102 were methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Among these 180 strains, 92 strains
 86 harboured only one macrolide resistance gene: 28 strains harboured *ermA*, 2 strains harboured *ermB*,
 87 40 strains harboured *ermC*, 9 strains harboured *ermT* (all 9 belonging to the clonal complex 398), 9
 88 strains harboured *vgaA*, 3 strains harboured *msrA* and one strain harboured *linA*. Twenty strains
 89 contained two resistance genes: 17 strains contained *msrA* and *mbpB*, one strain contained *ermC* and
 90 *linA*, one strain contained *ermC* and *vgaA* and one strain contained *msrA* and *vgaA*.
 91 Phenotypically, six strains tested positive for the D-test, indicating the presence of MLS_B inducible
 92 clindamycin resistance (Table 1). Three of these strains were MRSA, including a European CA-MRSA
 93 (Community-acquired MRSA) clone, ST80 PVL+ (ST2015-0934), a variant ACME negative CA-MRSA
 94 USA300 clone, ST8 PVL+ (ST2015-0940) and a Geraldine MRSA clone, ST5 TSST-1+ (ST2015-
 95 1098). The 3 remaining *S. aureus* strains were MSSA, including a CC-49 PVL+ strain (ST2014-0018),
 96 a CC-30 TSST-1+ strain (ST2015-0773) and a CC-121 strain (ST2014-0942). The 3 MRSA and the 3
 97 MSSA strains, respectively, carried the *ermC* and *ermA* genes responsible for MLS_B inducible
 98 macrolide resistance. The MIC of clindamycin in CCY for 6 *S. aureus* strains was 0.25 mg/L, while the
 99 MIC of clindamycin for ATCC 29213 *S. aureus* was 0.06 mg/L in both CCY and Mueller-Hinton broth.
 100 Table 1: Inducible MLS_B macrolide resistant strains used to explore clindamycin effect on
 101 virulence factors expression

Strain reference	Description	Clone
ST2014-0018	CC-49, <i>mecA</i> -, <i>ermA</i> +, PVL +	/
ST2015-0773	CC30, <i>mecA</i> -, <i>ermA</i> +, TSST-1 +	/
ST2014-0942	CC121, <i>mecA</i> -, <i>ermA</i> +, PVL -, TSST-1-	/
ST2015-0934	ST80, <i>mecA</i> +, <i>ermC</i> +, PVL +	European CA-MRSA
ST2015-0940	ST8, <i>mecA</i> +, <i>ermC</i> +, PVL +, ACME -	Variant USA 300 CA-MRSA
ST2015-1098	ST5, <i>mecA</i> +, <i>ermC</i> +, TSST-1 +	Geraldine

CA-MRSA: Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Effect of clindamycin on Hla expression and release in MLS_B inducible *S. aureus* strains

104 Sub-MICs of clindamycin (from 1/2 MIC to 1/8 MIC) induced a dramatic decrease of supernatant Hla
105 for 3 strains (ST2014-0018, ST2014-0942 and ST2015-0934) ranging from undetectable Hla levels for
106 ST2014-0018 and ST2014-0942 to low Hla levels (4.07%, CI_{95%} 1.53, 6.62) for ST2015-0934 at each
107 clindamycin concentration (Figure 1(a)). For ST2015-1098, only 1/8 MIC of clindamycin suppressed
108 Hla production (undetectable level), and for ST2015-0940, we observed a slight significant decrease in
109 Hla production (80.99%, CI_{95%}, 67.81, 94.17) at 1/4 MIC and 1/8 MIC of clindamycin (Figure 1(a)). For
110 the ST2015-0773 strain, Hla was undetectable by the ELISA assay regardless of the experimental
111 conditions (control or with antibiotic) most likely due to a truncated Hla variant present in CC-30
112 strains, which the ELISA assay was unable to detect [9].

113 **Effect of clindamycin on PVL expression and release in MLS_B inducible *S. aureus* strains**

114 Of the 6 *S. aureus* strains tested, three strains carried the *lukS-PVL* gene. For these 3 strains, the sub-
115 MICs of clindamycin significantly decreased PVL release compared to that of the growth control
116 (without antibiotics) (Figure 1(b)). PVL concentrations, expressed as percentages of the growth control
117 levels, in the supernatants treated with clindamycin at sub-MICs ranged from 10.46% (CI_{95%}, 2.74,
118 18.18) for ST2017-0018, 25.93% (CI_{95%}, 20.15, 31.71) for ST2015-0934, and 39.55% (CI_{95%}, 16.87,
119 62.23) for ST2015-0940.

120 **Effect of clindamycin on TSST-1 expression and release in MLS_B inducible *S. aureus* strains**

121 Of the 6 *S. aureus* strains tested, two carried the *tst* gene and exhibited variable TSST-1 expression in
122 comparison to that of the growth control: 251.04 ng/mL for ST2015-0773 and 2.49 ng/mL for ST2015-
123 1098. The sub-MICs of clindamycin induced a dramatic decrease of TSST-1 release for ST2015-0773
124 with an undetectable TSST-1 expression at 1/2 MIC of clindamycin and an approximate 99% decrease
125 at 1/8 MIC. For ST2015-1098, 1/2 MIC and 1/8 MIC of clindamycin resulted in an undetectable TSST-
126 1 expression level (Figure 1(c)).

128 **Discussion and conclusions**

129 *S. aureus* produces many virulence factors that play an important role in the pathogenesis of infection,
130 such as Hla [10], PVL [11,12] and TSST-1 [13]. Several studies have shown that clindamycin displays
131 an anti-toxin *in vitro* effect at sub-inhibitory concentrations, inducing a decrease in toxin release [1–6].
132 Moreover, in a rabbit model of PVL + CA-MRSA-induced necrotizing pneumonia, clindamycin was

133 superior to vancomycin in reducing PVL induced tissue damage and the overall mortality rate,
134 consistent with decreased PVL pulmonary concentrations [14]. Several case reports of necrotizing
135 pneumonia and staphylococcal toxic shock highlight clindamycin's efficacy when used as an
136 adjunctive antibiotic for the treatment of *S. aureus* related toxin infections [15]. Notably, a retrospective
137 analysis of 92 cases of CA-MRSA necrotizing pneumonia, mainly due to PVL-producing strains,
138 showed improved clinical outcomes in patients treated with antimicrobials inhibiting toxin production
139 (linezolid or clindamycin) [16].
140 The underlying mechanism of clindamycin's anti-toxin effect is linked to the ribosome-blocking action
141 in which the transcription of exoprotein and SaeRS global regulator system, are reduced [5,17]. This
142 anti-toxin effect is abolished by the constitutive MLS_B resistance mechanism [5] in macrolide and
143 lincosamide-resistant strains.
144 MLS_B resistance results from enzymatic methylation of the antibiotic binding site in the 50S ribosomal
145 subunit (23S rRNA). The responsible methylase encoded by the *erm* gene MLS_B resistance can
146 phenotypically be constitutive (*in vitro* resistance to all MLS_B) or inducible (a positive "D-test"). In the
147 first decade of the 21st century, treatment failure was reported in adult and paediatric populations
148 when clindamycin was used for inducible MLS_B *S. aureus* infections [8,18]. Consequently, the Clinical
149 and Laboratory Standards Institute and EUCAST recommend searching and reporting for the inducible
150 MLS_B phenotype, but also stating that clindamycin may still be used for short-term therapy.[18,19].
151 Nevertheless, no data are currently available on the anti-toxin effect of clindamycin in inducible MLS_B-
152 resistant *S. aureus* isolates. Here, we showed that sub-MICs of clindamycin efficiently resulted in a
153 decrease in PVL, Hla and TSST-1 production for inducible MLS_B *S. aureus* strains *in vitro*, regardless
154 of the methicillin susceptibility. Interestingly, we observed that the decrease of virulence factor release
155 (Hla and PVL) in the presence of clindamycin at sub-MICs was less altered for the variant USA300
156 clone (ST2015-0940). We hypothesize that this effect is likely dependent on the genetic background.
157 This observation is in agreement with the study of Martin-Cardot et al, which had shown that the
158 USA300 clone was resistant to staphylococcal protein A expression modulation by antibiotics and
159 antimicrobial peptides [20].
160 In conclusion, our results indicate that the anti-toxin effect of clindamycin should therefore be
161 considered when treating toxin related infections for inducible clindamycin-resistant *S. aureus*.
162 However, given the risk of constitutive MLS_B resistance acquisition upon clindamycin treatment,

163 clindamycin should be coupled with a bactericidal effective antibiotic for the treatment of toxin-related

164 *S. aureus* severe infections.

165

166 **List of abbreviations**

167 CA-MRSA: Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

168 EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

169 Hla: alpha-haemolysin

170 MIC: minimal inhibitory concentration

171 MLS_B: macrolides, lincosamides, and group B streptogramins

172 MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

173 MSSA: methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*

174 PVL: Panton-Valentin leucocidin

175 Sub-MICs: sub-inhibitory concentrations

176 TSST-1: toxic-shock-staphylococcal toxin

177

178 **Declarations**

179 ***Ethics approval and consent to participate***

180 Not Applicable.

181 ***Consent for publication***

182 Not Applicable.

183 ***Availability of data and materials***

184 The datasets used and analyzed during the current study are available from the corresponding author

185 on reasonable request.

186 ***Competing interests***

187 The authors declare that they have no competing interests.

188 ***Funding***

189 This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or

190 not-for-profit sectors.

191 ***Author's contribution***

7

192 EH, GL and OD designed the experiments. EH, CeB, CaB, MB and AT performed the experiments
193 and collected data. EH analyzed data collection. EH, FV, GL and OD wrote the manuscript. All authors
194 read and approved the final manuscript.

195 **Acknowledgements**

196 We thank the ECCMID (European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) 2017
197 Programme Committee to have accepted this work for ECCMID 2017 congress (paper poster
198 session).

200 **References**

- 201 1. Stevens DL, Ma Y, Salmi DB, McIndoo E, Wallace RJ, Bryant AE. Impact of antibiotics on
202 expression of virulence-associated exotoxin genes in methicillin-sensitive and methicillin-resistant
203 *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*. 2007;195:202–11.
- 204 2. Dumitrescu O, Boisset S, Badiou C, Bes M, Benito Y, Reverdy M-E, et al. Effect of antibiotics on
205 *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin. *Antimicrob Agents Chemother*.
206 2007;51:1515–9.
- 207 3. Otto MP, Martin E, Badiou C, Lebrun S, Bes M, Vandenesch F, et al. Effects of subinhibitory
208 concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant
209 *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68:1524–32.
- 210 4. Ohlsen K, Ziebuhr W, Koller KP, Hell W, Wichelhaus TA, Hacker J. Effects of subinhibitory
211 concentrations of antibiotics on alpha-toxin (*hla*) gene expression of methicillin-sensitive and
212 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42:2817–23.
- 213 5. Herbert S, Barry P, Novick RP. Subinhibitory clindamycin differentially inhibits transcription of
214 exoprotein genes in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 2001;69:2996–3003.
- 215 6. Dickgiesser N, Wallach U. Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1): influence of its production by
216 subinhibitory antibiotic concentrations. *Infection*. 1987;15:351–3.
- 217 7. Nathwani D, Morgan M, Masterton RG, Dryden M, Cookson BD, French G, et al. Guidelines for UK
218 practice for the diagnosis and management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)
219 infections presenting in the community. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61:976–94.
- 220 8. Lewis JS, Jorgensen JH. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococci*: should clinicians and
221 microbiologists be concerned? *Clin Infect Dis*. 2005;40:280–5.
- 222 9. Xiao M, Zhao R, Zhang Q, Fan X, O'Sullivan MVN, Li D-F, et al. Genotypic Diversity of
223 *Staphylococcus aureus* α -Hemolysin Gene (*hla*) and Its Association with Clonal Background:
224 Implications for Vaccine Development. *PLOS ONE*. 2016;11:e0149112.
- 225 10. Berube BJ, Bubeck Wardenburg J. *Staphylococcus aureus* α -toxin: nearly a century of intrigue.
226 *Toxins*. 2013;5:1140–66.
- 227 11. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet J-C, Lina G, Bes M, et al. Association between
228 *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal
229 necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet*. 2002;359:753–9.

230 12. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, et al. Involvement of
 231 Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and
 232 pneumonia. *Clin Infect Dis*. 1999;29:1128–32.

233 13. Todd J, Fishaut M, Kapral F, Welch T. Toxic-shock syndrome associated with phage-group-I
 234 *Staphylococci*. *Lancet Lond Engl*. 1978;2:1116–8.

235 14. Croisier-Bertin D, Hayez D, Da Silva S, Labrousse D, Biek D, Badiou C, et al. In vivo efficacy of
 236 ceftaroline fosamil in a methicillin-resistant panton-valentine leukocidin-producing *Staphylococcus*
 237 *aureus* rabbit pneumonia model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58:1855–61.

238 15. Hodille E, Rose W, Diep BA, Goutelle S, Lina G, Dumitrescu O. The Role of Antibiotics in
 239 Modulating Virulence in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30:887–917.

240 16. Rouzic N, Janvier F, Libert N, Javouhey E, Lina G, Nizou J-Y, et al. Prompt and successful toxin-
 241 targeting treatment of three patients with necrotizing pneumonia due to *Staphylococcus aureus* strains
 242 carrying the Panton-Valentine leukocidin genes. *J Clin Microbiol*. 2010;48:1952–5.

243 17. Novick RP, Jiang D. The staphylococcal saeRS system coordinates environmental signals with agr
 244 quorum sensing. *Microbiol Read Engl*. 2003;149:2709–17.

245 18. Woods CR. Macrolide-inducible resistance to clindamycin and the D-test. *Pediatr Infect Dis J*.
 246 2009;28:1115–8.

247 19. EUCAST. <http://www.eucast.org>. Accessed 14th mars 2018.

248 20. Cardot Martin E, Michel A, Raynal B, Badiou C, Laurent F, Vandenesch F, et al. Community-
 249 acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300 resists staphylococcal protein A
 250 modulation by antibiotics and antimicrobial peptides. *Int J Antimicrob Agents*. 2015;45:19–24.

251

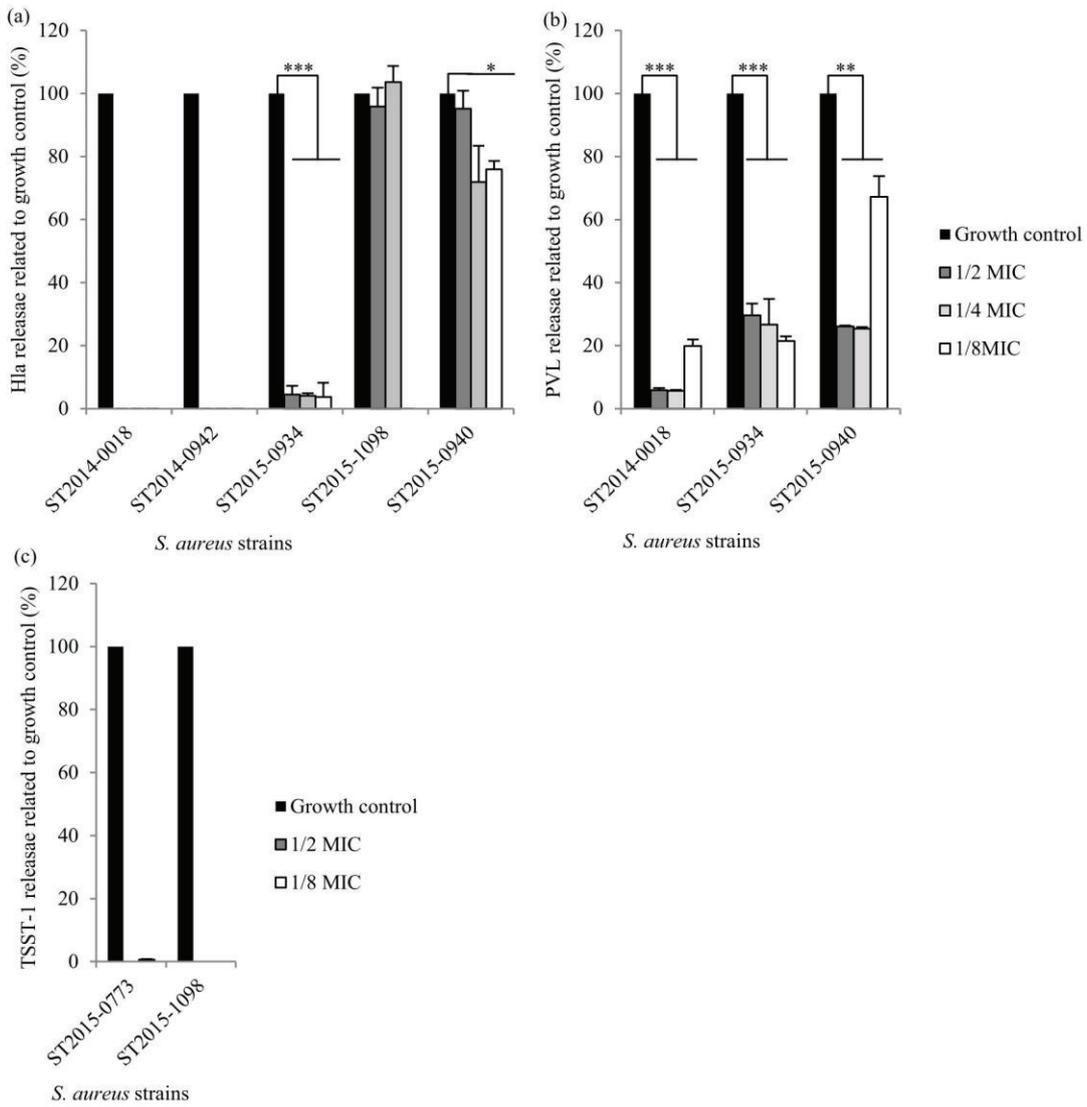
252 **Figure**

253 Figure 1: Virulence factors release by inducible MLS_B-resistant *S. aureus* strains after sub-MIC of
 254 clindamycin treatment.

255 Hla (a), PVL (b) and TSST-1 (c) release were measured by ELISA detection after clindamycin
 256 treatment (1/2 MIC, 1/4 MIC and 1/8 MIC) in comparison to the growth control without clindamycin.
 257 The averages represent two determinations for each condition. For each strain, virulence factor
 258 release at 1/2 MIC, 1/4 MIC and 1/8 MIC of clindamycin were pooled to perform the t test (conformity)
 259 and calculate the 95% Confidence Interval of the average. * p value < 0.05; ** p value < 0.01; *** p
 260 value < 0.001. Lack of a chart bar means that the factor virulence release measure was below the
 261 detection limit (i.e., 0.75 ng/mL for Hla and 1.56 ng/mL for TSST-1).

Figure 1

[Click here to download Figure Figure 1 clinda_ACMA.pptx](#)



II. Mise en évidence de l'effet inhibiteur de l'oxacilline sur l'expression des PSM α et de l'Hld

Quatrième publication : Sub-inhibitory concentrations of oxacillin, but not clindamycin, linezolid or tigecyclin, induce an inhibition of Phenol-soluble modulins expression for Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus

Elisabeth Hodille, Laetitia Beraud, Séverine Périan, Valentine Berti, Michèle Bes, Anne Tristan, Emilie Blond, Gérard Lina, Oana Dumitrescu

En cours de finalisation pour soumission dans « *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* »

Au cours de notre travail bibliographique, il est apparu que la modulation de l'expression des facteurs de virulence staphylococciques par des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques était inégalement étudiée en fonction des facteurs de virulence.

Parmi les thèmes peu étudiés, la modulation de la production des PSM α et de l'Hld par les antibiotiques était le sujet de seulement 4 publications (Joo et al. 2010; Yamaki et al. 2011, 2013; Rudkin et al. 2014), dont certains résultats étaient divergents pour un même antibiotique. Globalement, ces études rapportaient un effet inhibiteur de l'oxacilline sur l'expression des PSM α (Joo et al. 2010; Rudkin et al. 2014), à l'opposé de ce qui était observé pour la modulation de l'expression des autres facteurs de virulence de *S. aureus* tels que la PVL, l'Hla et la TSST-1 (Hodille et al. 2017). De plus, alors que les antibiotiques inhibant la synthèse des protéines, comme la clindamycine et le linézolide, sont reconnus pour être des antibiotiques réprimant l'expression des toxines staphylococciques (PVL, Hla et TSST-1) (Hodille et al. 2017), ces derniers étaient retrouvés tantôt inducteurs (Joo et al. 2010; Yamaki et al. 2013) tantôt inhibiteurs (Yamaki et al. 2011) sur l'expression des PSM α , avec des variations qui semblaient souche-dépendantes et concentration-dépendantes. Enfin, les mécanismes sous-jacents expliquant la modulation de l'expression étaient incomplètement étudiés, mettant en évidence une potentielle implication du système Agr (Joo et al. 2010; Yamaki et al. 2011) mais qui ne permettait pas d'expliquer l'ensemble des variations.

C'est pourquoi, nous avons entrepris d'étudier l'influence de cinq molécules anti-staphylococciques (oxacilline, clindamycine, linézolide, tigécycline et rifampicine) à concentrations sub-inhibitrices sur l'expression des PSM α 1, PSM α 3 et Hld par des clones de SARM-C producteurs de PVL (clone ST8 USA300 et clone Européen ST80) et des clones de SARM non producteurs de PVL (clone Géraldine et clone Lyon) largement répandus dans la communauté et à l'hôpital. Après 6 heures ou 24 heures d'incubation, l'étude de la modulation a été effectuée au niveau transcriptomique en analysant par RT-qPCR (Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction) la quantité d'ARNm spécifiques *psmA1* et *psmA3*, par rapport à un gène de ménage *gyrB*, et au niveau protéique en mesurant dans les

surnageants de culture la libération de PSM α 1 et d'Hld par une méthode d'HPLC-MS (Hodille et al. 2016). Afin d'évaluer les mécanismes sous-jacents à la modulation de l'expression de ces toxines par les antibiotiques, nous avons également observé l'influence des antibiotiques, après 24 heures d'incubation, sur le système Agr par l'intermédiaire du transcrite ARNIII, sur le système d'export des PSM par l'intermédiaire du transcrite *pmtB*, ARNm codant pour une partie du transporteur ABC essentiel à l'excrétion des PSM (Chatterjee et al. 2013) et sur la régulation de l'expression de ce transporteur par l'intermédiaire du transcrite *pmtR* (Joo et al. 2016).

Comme l'avaient montré Joo et al. ainsi que Rudkin et al. (Joo et al. 2010; Rudkin et al. 2014), nous avons observé que des concentrations sub-inhibitrices d'oxacilline entraînaient une diminution de l'expression de PSM α 1 et d'Hld par rapport au contrôle de croissance sans antibiotique, avec un effet inhibiteur plus marqué sur les souches de SARM-C producteurs de PVL, objectivé par une diminution progressive de l'expression des toxines au cours du temps, que sur les souches de SARM non producteurs de PVL où l'effet inhibiteur sur PSM α 1 n'était significatif qu'après 6 heures d'incubation. L'effet inhibiteur de l'oxacilline sur la production toxinique n'était pas lié à un effet bactéricide sur la bactérie. En effet, outre avoir choisi des conditions expérimentales n'entraînant pas de réduction notable de la croissance bactérienne, tous les résultats de dosages protéiques étaient normalisés sur l'aire sous la courbe de croissance afin de s'affranchir de tout effet négatif sur la croissance bactérienne. Bien qu'au final, l'effet de l'oxacilline soit constamment inhibiteur pour les SARM-C producteurs de PVL, les mécanismes sous-jacents induisant la répression de l'expression étaient différents entre les deux clones testés. Pour les deux souches appartenant au clone ST8 USA300, l'effet inhibiteur était probablement dû à une répression du système Agr par l'oxacilline, les transcrits ARNIII et les ARNm *psma1* et *psma3* étant en quantité diminuée par rapport au contrôle de croissance. A l'inverse pour les deux souches appartenant au clone Européen ST80, les transcrits ARNIII, ARNm *psma1* et *psma3* étaient fortement surexprimés ainsi que les transcrits *pmtB*, indiquant que la répression de l'expression n'avait pour origine ni un défaut de transcription, ni un défaut de transport, suggérant un possible effet inhibiteur au niveau de la synthèse des protéines, ce qui n'est pas connu pour l'oxacilline.

Concernant les autres antibiotiques (linézolide, clindamycine, tigécycline et rifampicine), aucune tendance générale ne ressortait confirmant l'effet souche-dépendant retrouvé antérieurement (Joo et al. 2010; Yamaki et al. 2011, 2013). Cependant, concernant les antibiotiques connus pour être anti-toxiques, des concentrations sub-inhibitrices de clindamycine induisaient plus fréquemment un effet inducteur qu'un effet inhibiteur sur l'expression de PSM α 1 et Hld, notamment après 24 heures d'incubation, alors que l'inverse était observé pour des concentrations sub-inhibitrices de linézolide. A propos de la tigécycline, malgré un effet inducteur constant sur la quantité d'ARNm *psma1* et *psma3*, un effet inducteur sur l'expression des toxines était observé sur le clone Européen ST80 après 24 heures d'incubation, alors que l'expression était diminuée pour le clone ST8 USA300, traduisant un

effet clone-dépendant. Enfin, nous avons noté qu'une des souches appartenant au clone Européen ST80 était particulièrement sensible à l'effet inducteur des agents inhibiteurs de la synthèse protéiques (linézolide, clindamycine, tigécycline).

De manière intéressante, nous avons donc confirmé l'effet inhibiteur de l'oxacilline sur l'expression des PSM α 1 et Hld observable sur l'ensemble des SARM-C producteurs de PVL testés, suggérant que cet effet anti-toxinique pourrait être bénéfique dans certaines infections staphylococciques où l'activité biologique des PSM α et Hld participe majoritairement à la physiopathologie. Malgré nos investigations, les mécanismes sous-jacents responsables de la modulation de l'expression des PSM α et Hld par les antibiotiques restent partiellement inexpliqués.

Les éléments supplémentaires de la publication ci-dessous sont disponibles en annexe 4.

Sub-inhibitory concentrations of oxacillin, but not clindamycin, linezolid or tigecyclin induce an inhibition on staphylococcal Phenol-soluble modulins expression for community-acquired-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Elisabeth Hodille ^{1,2}, Laetitia Beraud ¹, Séverine Périan ³, Valentine Berti¹, Michèle Bes ^{1,2,4}, Anne Tristan ^{1,2,4}, Emilie Blond⁵, Gérard Lina ^{1,2,4}, Oana Dumitrescu ^{1,2,4}

¹ Department of Bacteriology, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

² International Center for Infectiology Research (CIRI), INSERM U1111, Université Lyon 1, CNRS UMR5308, ENS Lyon, Lyon, France

³ Institut de Génomique Fonctionnelle, UMR5242, Lyon, France

⁴ National Reference Center for Staphylococci, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

Corresponding author: Elisabeth Hodille, elisabeth.hodille@chu-lyon.fr, tel: +334 72 07 16 90

Short running title: Oxacillin suppresses PSM and Hld expression

Abstract (249)

Background: *Staphylococcus aureus* is a major human pathogen producing virulence factors, such as Panton-Valentine leucocidin (PVL), alpha-toxin (α T) and phenol-soluble modulins alpha (PSM α) including delta-hemolysin (Hld). Contrary to oxacillin, sub-inhibitory concentration (sub-MIC) of clindamycin and linezolid display an anti-toxin effect on PVL and α T expression. Concerning PSM α and Hld expression modulation by antibiotics, few studies are available.

Objectives: Herein, we examined effect of antibiotics sub-MIC on PSM α and Hld expression by eight *S. aureus* strains belonging in two clones of community-acquired methicillin-resistant *S. aureus* (CA-MRSA) PVL+ and two clone of MRSA PVL-.

Methods: *S. aureus* strains were grown with sub-MIC of oxacillin, clindamycin, linezolid, tigecyclin and rifampicin. After 6 and 24h of incubation, culture pellets were used for relative quantitative RT-PCR with primers specific for *psm α 1/2*, *psm α 3*, *pmtB*, *pmtR* and RNAlII. PSM α 1 and Hld concentrations were measured in the supernatant using high performance liquid chromatography coupled mass spectrometry method.

Results: Oxacillin sub-MIC induced an inhibitory effect on PSM α 1 for CA-MRSA, inconstantly related to mRNA variations. For others antibiotics, effect on toxins expression was strain or clone-dependent and effect on mRNA didn't reflect always effect on protein expression. Variations of *pmtB*, *pmtR* and RNAlII expression were insufficient to explain toxins expression modulation.

Conclusions: Oxacillin sub-MIC inhibited PSM α production in CA-MRSA. Underlying mechanisms involved modulation of Agr system and *pmtB* expression, but also others unknown mechanism. Altogether, these data indicate that PSM α and Hld are differently regulated by antibiotics compared to PVL and α T, suggesting a potential benefic anti-toxin effect of oxacillin.

Introduction

Staphylococcus aureus is pathogen responsible to very diverse infections which can be severe, such as some skin and soft tissue infection (SSTI) or life-threatening, such as necrotizing pneumonia and bacteremia ¹. In these suppurative infections, staphylococcal toxins play an important role in physiopathology and notably the pore forming toxins, such as Panton Valentine leucocidin (PVL), alpha-toxin (α T) and phenol-soluble modulins alpha (PSM α), including delta-hemolysin (Hld) ²⁻⁶. It is well known that sub-inhibitory concentrations (sub-MIC) of antibiotics modulate in vitro toxins expression in *S. aureus*: clindamycin, linezolid and rifampicin display an anti-toxin effect on PVL ⁷⁻⁹ and α T ^{7,9-13} production while oxacillin or nafcillin has an inducing effect ^{7,14-19}. Moreover, on experimental animal model of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) necrotizing pneumonia, it had been shown that use of inhibitor-synthesis antibiotics, such as linezolid or clindamycin was superior than vancomycin for outcome of infection ^{20,21}. Thus, some guidelines even recommend using of anti-toxic drug such as clindamycin or linezolid in management of toxin-mediated staphylococcal infections ²². Modulation of virulence factors expression by sub-MIC of antibiotics involves several pathways according to molecule. Linezolid and clindamycin act mainly by blocking ribosomal function and suppressing the protein synthesis of virulence factors or regulatory system ²³. Oxacillin induces toxins gene transcription by triggering the SOS response in bacteria or by interfering with regulatory network that governs virulence expression, notably SarA, MgrA and ArlR ²³. About modulation of PSM production by sub-MIC antibiotics, few studies are available and these are controversial. Globally anti-toxic effect for oxacillin ^{24,25} had been observed but for clindamycin and linezolid, effect was variable ^{24,26,27}. These authors suggested that modulatory effect may involve Agr system, the main global regulator of *S. aureus* ²⁸, since PSM expression depends to activation of transcriptional factor AgrA while Hld is encoded by RNAlII. Nevertheless, alteration of Agr system does not allow explaining all observed variations, indicating that underlying mechanisms may be more complex ²³. PSM α extracellular export requires a special transporter, pmt composed of 4 sub-unit (ABCD) ²⁹, whose the expression is regulated by its repressor pmtR ³⁰. PSM produced during bacteria growth bind to repressor pmtR, allowing *pmtA*, *pmtB*, *pmtC*, *pmtD* and *pmtR* genes transcription ³⁰.

Here, we chose 8 *S. aureus* strains belonging to 4 clones of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) circulating in hospital, hospital-acquired MRSA (HA-MRSA) and in the community, community-acquired MRSA (CA-MRSA), and explored effect of sub-MIC of 5 anti-staphylococcal molecules,

oxacillin, clindamycin, linezolid, tigecyclin and rifampicin, on PSM α 1, PSM α 3 and Hld expression. Moreover, we studied regulatory mechanisms involved in the modulation of their expression, RNAIII expression, intracellular effector of Agr system, *pmtB* and *pmtR* expression, essential transport system for PSM α and Hld.

Materials and methods

Bacterial strains

Eight *S. aureus* clinical isolates were selected for this study, representing major MRSA clones spreading in community and in hospital: two strains belonging clone to CA-MRSA PVL+ ST8 USA300, two strains to CA-MRSA PVL+ European clone ST80, two strains to MRSA PVL- Geraldine clone CC5 (circulating in the hospital and in the community) and two strains to HA-MRSA PVL - clone CC8 Lyon (Table 1). Further, we separated *S. aureus* between strains producing PVL (PVL+) and not producing PVL (PVL-).

Antibiotics and MIC determination

The antibiotics used in this study were clindamycin, linezolid, tigecycline, oxacillin and rifampicin. Clindamycin, linezolid and tigecyclin were provided by Pfizer (Ambroise, France) and oxacillin and rifampicine were purchased from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau, France). Minimal-inhibitory concentrations (MICs) were determined with the standard microdilution method recommended by Clinical and Laboratory standards institute ³¹, in Brain-Heart infusion (BHI) broth (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Briefly, medium was inoculated with 5X10⁵ CFU/mL and incubated for 24h at 37°C without shaking.

Bacterial culture

Strains were cultured on Trypticase blood agar plate, which were incubated overnight at 37°C. Isolated colonies were resuspended in BHI broth and adjusted to a turbidity equivalent to that of a 0.5 McFarland standard. Cultures were performed at 37°C with gyratory shaking (180 rpm). When, the optical density (OD) reached a turbidity equivalent to that of a 1 McFarland standard, sub-MIC of antibiotics (1/4, 1/8, 1/16 or 1/32 MIC according to antibiotic and strain) were added to the glass cultures tubes. Tested sub-inhibitory concentrations of each antibiotic were chosen to not inhibit significantly bacterial strains growth (Figure S1). Cultures with or without antibiotics (growth control) were reincubated at 37°C with shaking. Aliquots were taken 6 and 24h later.

Relative quantitative RT-PCR

Aliquots of 2 mL of each culture were centrifuged at 4500 g for 10 min. The pellets were washed with 0.5 mL of Tris buffer (10mM) and centrifuged at 4500 g for 10 min. The turbidity was then adjusted to a turbidity equivalent to that of a 3 McFarland standard. A 1.5 mL aliquot of turbidity-adjusted and washed bacterial suspension was centrifuged at 4500 g for 10 min, and the pellets were treated with lysostaphin (Sigma-Aldrich) at a final concentration of 200 µg/mL. The total RNA of the pellets was then purified using Qiagen RNeasy Plus Mini Kit according to the manufacturer's instruction (Qiagen, Hilden, Allemagne). The RNA yield was assessed with a NanoDrop spectrophotometer, and 1 µg of total RNA was reverse transcribed using a Promega reverse transcription system with random primers as recommended by the manufacturer (Promega, Madison, Wisconsin, USA). The resulting cDNA was used as a template for real-time amplification (LightCycler 2.0; Roche, Bâle, Suisse) using the specific primers shown in Table 2. The relative amounts of amplicons specific for toxin genes (*psm α 1/2* and *psm α 3*), for a part of Pmt, *pmtB*, for Pmt regulator, *pmtR*, and for RNAIII were determined by quantitative PCR relative to an internal standard (*gyrB*) as described elsewhere³². The expression levels of the investigated genes were expressed as n-fold variations of the *psm α 1/2/gyrB*, *psm α 3/gyrB*, *pmtB/gyrB*, *pmtR/gyrB* and *RNAIII/gyrB* ratios in the presence of antibiotics relative to the *psm α 1/2/gyrB*, *psm α 3/gyrB*, *pmtB/gyrB* and *pmtR/gyrB* ratios, respectively, of the growth control. All quantitative PCR data were analyzed using the relative expression software tool REST 2009, version 2.0.13.

PSM α 1 and Hld quantification

After centrifugation of 24h-incubated aliquots at 4500 g for 10 min, bacterial supernatants were diluted 1/5 with methanol and incubated at 4°C for 15 min. Diluted supernatants were then centrifuged at 10000 g for 5 min and supernatants were recovered for PSM α 1 and Hld quantification by high-performance liquid chromatography mass spectrometry (HPLC-MS) in an Agilent® system using an adaptation of a method described elsewhere^{4,33}. PSM α 1 and Hld quantifications for each condition were normalized related to area under the curve (AUC) of growth curve to prevent any bias connecting with growth slowdown.

Statistic

Statistical analyses and graphs were performed using RStudio, version 0.99.893 (RStudio Team (2009-2016), integrated Development for R. RStudio, Inc, Boston, MA, USA). T tests were performed

to analyze results observed for each antibiotic or for compare two antibiotics. Pearson correlation tests were performed to analyze the correlation between RNAIII expression and *psm* α RNA expression.

Results

MICs

The MICs of clindamycin, linezolid, tigecycline, oxacillin and rifampicin were determined following the CLSI recommendations (Table 3). USA300 and ST80 European clones displayed MIC for oxacillin higher than Geraldine and Lyon clones, the latter displayed low MIC for oxacillin despite of *mecA* gene presence. The two strains of Lyon clones were clindamycin-resistant.

*Effect of antibiotics on *psm* α 1/2 mRNA and *psm* α 3 mRNA expression*

The 4 CA-MRSA PVL+ strains and the 4 MRSA PVL- strains were incubated with sub-MIC of antibiotics during 6H or/and 24H and the relative amounts of amplicons specific for toxin genes (*psm* α 1/2 and *psm* α 3) were determined by quantitative PCR relative to an internal standard (*gyrB*).

Oxacillin

After oxacillin treatment of CA-MRSA PVL+, none global trend upon *psm* α 1/2 or *psm* α 3 mRNA modulation emerged whatever times of incubation due to great variation between strains. Indeed, we observed a clone-dependent after 24h incubation with a significant increase of *psm* α 1/2 and *psm* α 3 mRNA for ST80 European clone but a significant decrease for ST USA 300 clone (Figure S2C and S2D), inducing a significant difference between both clones. For MRSA PVL-, oxacillin treatment resulted in a slight but significant decrease of *psm* α 1/2 mRNA after 6h incubation (Figure 1), not observed on *psm* α 3 mRNA.

Clindamycin

Clindamycin sub-MIC induced none global significant variation on *psm* α 1/2 or *psm* α 3 mRNA for CA-MRSA PVL+, whatever times of incubation due to great variation between strains. We noted a strain-dependent effect with a great decrease of *psm* α 1/2 and *psm* α 3 mRNA after 6h and 24h incubation for SF8300 strain belonging to ST8 USA300 clone (Figure S2A, S2B, S2C and S2D), while *psm* α mRNA was unmodified for LUG1799 strain belonging to ST80 European clone and strongly increased for HT20060752 strain and ST20121288 strain belonging respectively to ST8 USA300 clone and ST80

European clone (Figure S2C and S2D). For MRSA PVL-, clindamycin treatment increased significantly *psmA1/2* and *psmA3* mRNA after 6h incubation (Figure 1 and 2).

Linezolid

For CA-MRSA PVL+, sub-MIC of linezolid induced a significant increase of *psmA1/2* mRNA amount after 6h and 24h of incubation (Figure 1) and of *psmA3* mRNA after 6h incubation (Figure 2). Linezolid-induced increase of *psmA1/2* and *psmA3* mRNA was especially marked after 24h incubation for one strain belonging to European clone ST80, ST20121288 (Figure S2C and S2D). Linezolid treatment had none effect on *psmA1/2* or *psmA3* mRNA for MRSA PVL- (Figure 1 and 2).

Tigecyclin

Sub-MIC tigecyclin induced a strongly significantly increase of *psmA1/2* and *psm3* mRNA after 24H incubation (Figure 1 and 2) for CA-MRSA PVL+, notably for the ST20121288 strain belonging to European clone (Figure S2C and S2D). Sub-MIC of tigecyclin resulted in also an important significant increase of *psmA1/2* and *psm3* mRNA for MRSA PVL-, from 6H incubation (Figure 1 and 2).

Rifampicin

For CA-MRSA PVL+, sub-MIC of rifampicin induced a significant increase of *psmA1/2* mRNA amount after 6h and 24H of incubation (Figure 1) and of *psmA3* mRNA after 24h incubation (Figure 2). Rifampicin treatment had none effect on *psmA1/2* or *psmA3* mRNA for MRSA PVL- (Figure 1 and 2).

In summary on effect of antibiotics on *psmA1/2* and *psmA3* mRNA amount, we observed a systematic inducer effect with sub-MIC of tigecyclin for CA-MRSA PVL+ and MRSA PVL-. For others antibiotics, we noted clone-dependent effect (oxacillin, linezolid, rifampicin), strain-dependent effect (clindamycin) or no effect.

Effect of antibiotics on PSM α 1 and Hld production

Since the effect of sub-MIC antibiotics on toxins mRNA does not always reflect the impact on toxins expression and production we determined toxins production by HPLC-MS in supernatants. Toxin measurements were normalized related to AUC of growth curve.

Oxacillin

Oxacillin sub-MIC induced a time-dependent decrease of PSM α 1 release for CA-MRSA PVL+, since decrease was non-significant after 6h but significant after 24h incubation with 31.83% (95%CI [10.40;

53.26]) of PSM α 1 released compared to growth control (Figure 3). Likewise, Hld release was decreased according a time-dependent manner, reaching 44.55% (95%CI [16.18; 72.92]) of Hld released compared to growth control after 24h incubation (Figure 4). Interestingly, oxacillin inhibitory effect on Hld release was significantly stronger for ST80 European clone than for USA300 after 6h and 24h incubation, since these was respectively at 49.15% (95%CI [32.39; 65.91]) of Hld released compared to growth control and 14.33% (95%CI -9.76; 38.42]) for ST80 European and not significant for ST8 USA300 clone (Figure S3B and S3D). For MRSA PVL-, oxacillin sub-MIC induced non-significant inhibitory trend upon PSM α 1 production after 6h of incubation with 58.67% (95%CI [15.90; 101.43]) of PSM α 1 released compared to growth control (Figure 3). On contrary, this trend was not kept after 24 h incubation. For this incubation time, PSM α 1 release upon oxacillin treatment was not significantly compared to growth control, resulting in a significant difference between the behavior of MRSA PVL- and this of CA-MRSA PVL+ (Figure 3).

Clindamycin

For CA-MRSA PVL+, clindamycin sub-MIC induced a strain-effect on PSM α 1 and Hld expression such as observed for *psm α 1* and *psm α 3* mRNA. Thus, we observed a dramatic decrease of PSM α 1 and Hld release for SF8300 strain belonging to ST8 USA300 clone, while there was a clear trend of induced-expression (PSM α 1) or reduced inhibition (Hld) for others CA-MRSA PVL+, notably after 24h incubation (Figure S3C and S3D). Clindamycin sub-MIC resulted in a non-significant increase on PSM α 1 expression for MRSA PVL- after 6h incubation.

Linezolid

Despite of global inductor effect of linezolid treatment on *psm α 1* mRNA for CA-MRSA PVL+ strains, we observed a variable effect among strains about PSM α 1 and Hld expression. Thus, a great increase of PSM α 1 and Hld release after 24h incubation was reported only for ST80 ST20121288, while no effect or slight inhibitor effect was observed for others CA-MRSA PVL+ (Figure S3C and S3D). Linezolid sub-MIC resulted in a significant increase on PSM α 1 expression for MRSA PVL- after 6h incubation with 182.91% (95%CI [110.33; 255.49]) of PSM α 1 released compared to growth control.

Tigecyclin

After tigecyclin treatment, despite of global inductor effect on *psma* mRNA expression for CA-MRSA PVL+, effect on PSM α 1 and Hld expression appeared being clone-dependent. Thus, tigecyclin-induced PSM α 1 release were significantly higher for ST80 European clone than for USA300 clone,

with toxin release equal to 237.57% (95%CI [119.54; 355.61]) and (37.29% (95%CI [-44.50; 119.1])) respectively (Figure S3C). For Hld, we observed the same non-significant trend (mean of 98.85% for and 56.95% for ST80 European clone and ST8 USA300 respectively) (Figure S3D). For MRSA PVL-, tigecyclin induced an important significant increase of PSM α 1 expression with 446.37% (95%CI [100.26; 792.49]) of PSM α 1 released compared to growth control after 6h incubation.

Rifampicin

After Rifampicin treatment, PSM α 1 and Hld expression was unmodified for CA-MRSA PVL+ and for MRSA PVL-.

In summary, we observed a relative constant inhibitory effect of oxacillin treatment on PSM α 1 and Hld expression for all *S. aureus* strains, but larger for CA-MRSA PVL+ than for MRSA PVL-. For others antibiotics, effect on toxins release was strain or clone-dependent and effect on RNA did not reflect always effect on protein expression.

Effect of antibiotics on pmtB, pmtR mRNA and RNAlII expression

To explore the mechanism underlying of PSM α and Hld variations resulting from antibiotics sub-MIC treatment in CA-MRSA PVL+, we investigated the modulation by antibiotics of PSM transporter expression, pmt, through *pmtB* mRNA transcription (Figure 5A), of its natural repressor, *pmtR* (Figure 5B) and of RNAlII (Figure 5C), RNA effector of Agr global staphylococcal regulator. Therefore, RNAlII expression reflects activation level of Agr regulator system. Anyway, RNAlII expression was absolutely and significantly correlated with *psm α 1/2* mRNA and *psm α 3* mRNA expression for ST80 European clone and USA300 clone (Figure S4A and S4B) indicating that transcription of psm α operon was dependent to Agr activation.

Oxacillin

Effect of oxacillin sub-MIC on *pmtB*, *pmtR* mRNA and RNAlII was variable according to strain. For ST8 USA300 clone, *pmtB* and *pmtR* mRNA was not significantly modified after oxacillin treatment. However, we observed that those were slightly down-regulated for SF8300 and slightly up-regulated for HT20060752. For ST80 European clone, *pmtB* mRNA was clearly up-regulated only for ST20121288 (around 10-fold compared to growth control) and unmodified for LUG1799 while *pmtR* mRNA was unmodified for both. Interestingly, we observed a clone-effect for RNAlII, such as observed

for upon *psm α 1/2* or *psm α 3* mRNA. Thus, RNAIII was significantly up-regulated for ST80 European clone and not significantly down-regulated for ST8 USA300 clone resulting in a significant difference between both clones.

Clindamycin

Clindamycin treatment induced a significant down-regulation of *pmtR* mRNA for ST8 USA300 clone, notably for SF8300 strain. For *pmtB* mRNA and RNAIII, since down-regulation was observed only for SF8300 strain, effect was not significant. Concerning ST80 European clone, we observed a significant down-regulation of *pmtR*, while *pmtB* and RNAIII were slightly modified for LUG1799 and greatly up-regulated for ST20121288.

Linezolid

pmtR mRNA and RNAIII were significantly down-regulated by linezolid sub-MIC for ST8 USA300 clone and unmodified for *pmtB* mRNA. For ST80 European clone, *pmtR*, *pmtB* mRNA and RNAIII displayed strictly the same variations that those induced by clindamycin.

Tigecyclin

Tigecyclin treatment induced none modification related to growth control upon RNAIII for ST8 USA300 clone, a strong down-regulation of *pmtB* and *pmtR* mRNA for SF8300 strain (below to 0.1) while those were unmodified or slightly up-regulated for HT20060752. For European clone, *pmtB* mRNA was not significantly up-regulated, *pmtR* mRNA was unmodified but RNAIII was strongly up-regulated for ST20121288 (around 100-fold) and unmodified for LUG1799.

Discussion

The aim of our study was to examine effect of antibiotics sub-MIC on PSM α and Hld expression using eight *S. aureus* strains belonging in two clones of community-acquired methicillin-resistant *S. aureus* (CA-MRSA) PVL+ and two clone of MRSA PVL-.

Oxacillin

Previous studies reported an inhibitory effect of oxacillin sub-MIC on PSM α and Hld production^{24,25}, such as we observed it on this study. Interestingly, Joo et al. shown that inhibitory effect of oxacillin was observed only for LAC strain belonging to USA300 CA-MRSA clone, but not for Sanger 252 HA-MRSA clone²⁴. Although culture conditions were different between CA-MRSA clone (cultivated with 1/50 MIC) and HA-MRSA (cultivated with 1 MIC) in this study, these results were concordant with our

observations, since PSM α 1 expression were repressed by oxacillin treatment after 24H incubation for CA-MRSA PVL+ and not for MRSA PVL-. These observations were therefore contradictory with data available about modulation of others staphylococcal virulence expression by oxacillin, showing a great increase of PVL and Hla expression ^{7,14-19}. It had been shown that the underlying mechanism of increased expression of PVL induced by oxacillin was an activation of *pvl* mRNA transcription, consecutive to activation of Staphylococcal global regulators (*SarA*, *Mgr*, *Arl*) ²³. Interestingly, we observed that for a clone of CA-MRSA, the ST80 European clone, *psm α 1* and *psm α 3* mRNA expressions were largely and significantly up-regulated after 24H incubation with oxacillin sub-MIC. This increase resulted probably from activation of global regulator Agr, since RNAlII was also significantly up-regulated. Nevertheless, the ultimate decrease of PSM α 1 and Hld expression indicated that the blockage may occurring at translational level, independently of oxacillin anti-bactericidal action, or by blockage of PSM secretion, if there was default of *pmt* transporter expression ²⁹. *pmtB* mRNA was unmodified or up-regulated for ST80 European strains indicating that PSM secretion system was not repressed by oxacillin treatment and that this was not the cause of PSM decreased expression. This is indicated a possible blockage of *psm α* RNA translation by oxacillin according an unknown mechanism.

USA300 clone displayed an inhibition of PSM and Hld expression induced by oxacillin lower than this observed for ST80 European clone, in despite of decreased RNAlII expression and significant down-regulation of *psm α* mRNA expression. This indicated that underlying mechanisms were different compared to ST80 European clone. We can hypothesize that the inhibition of PSM and Hld expression resulted probably from repression at transcriptional level consecutive to repression of regulator Agr. The down-regulation of *psm α* mRNA after oxacillin treatment was not described by Joo et al. for LAC strain ²⁴. This could be explained by the difference of incubation time with oxacillin. Indeed, in study of Joo et al., *S. aureus* LAC was incubated with oxacillin for 8h and in our study, times of incubation were 6h and 24h, and down-regulation of *psm α* mRNA with oxacillin were objective for 24h incubation only. Recently, Bojer et al. shown that PSM limited persister cell populations in *S. aureus* ³⁴. During experiment, the authors used a model where *S. aureus* Newman wild-type strain (WT) or its isogenic PSM mutant (Δ PSM $\alpha\beta$ hld) was incubated with 20 X MIC of ciprofloxacin, gentamicin or oxacillin. The frequency of persister observed upon ciprofloxacin and gentamicin treatment was significant lower for WT strain than for Δ PSM $\alpha\beta$ hld strain indicating that lack of PSM induced an increase of persister

frequency. Interestingly, upon oxacillin treatment, the difference of persister frequency between WT strain and Δ PSM α β Hld strain was not significant difference because WT strain displayed already very high frequency of persisters. The authors hypothesised that tolerance of WT strain upon oxacillin treatment could be unrelated to PSM. Nevertheless, even if Bojer et al. tested concentration of antibiotics superior to MIC, our results could provide a partly of response: upon oxacillin treatment, inhibition of PSM expression could induce a lack of PSM, such as this is producing for Δ PSM α β Hld strain resulting in a tolerance phenomenon.

About protein synthesis inhibitory agent, results were variable according to clone or strain and sometimes discordant with known data describing these agents such as anti-toxic agent, notably clindamycin and linezolid for PVL⁷⁻⁹ and α T^{7,9-13}.

Clindamycin

Clindamycin resulted in an inhibitory effect on PSM α 1 and Hld production only for the SF8300 strain. For this strain, clindamycin induced a complete abolition of *psm α* mRNA expression, PSM α 1 and Hld production. These results indicated a potential underlying mechanism at transcriptional level, since RNAlII was down-regulated meaning potentially a repression of system Agr. Moreover, *pmtB* mRNA was also down-regulated indicating a potential default of transport of PSM. For others strains (MRSA PVL-, ST80 European clone and the other USA300 strain (HT20060752)), clindamycin induced an increase of *psm α* mRNA and PSM α 1 expression, with variable level according to strains (strongly for ST20121288 related to great activation of Agr system, moderately for LUG1799T, HT20060752 and MRSA PVL-). Although clindamycin display a ribosome-blocking action, the increase of mRNA was followed by an increase of protein production indicating that clindamycin did not inhibit translation in our experimental conditions. Previous studies studying clindamycin effect on PSM production were contradictory. While Joo et al. shown an increase of PSM α 1 production and *psm α* mRNA expression for LAC and Sanger 252 strains²⁴, concordant with observed effects on the majority of tested strains in our study, Yamaki et al. concluded firstly about an inhibitory effect of clindamycin and TR-700 (= tedizolide) on PSM production²⁶ and secondly about an inducer effect in another study²⁷.

In conclusion, effect of clindamycin on PSM and Hld expression seems being strain-dependent according to unknown mechanism, but with an inducer effect more frequent than an inhibitory effect.

Linezolid

For linezolid, inductor effect on *psm α* mRNA expression was constant for CA-MRSA PVL+. We concomitantly observed a weak but significant down-regulation of RNAlII for USA300 clone while a great increase of RNAlII was shown for ST20121288 strain supporting an important activation of regulator Agr. Accumulation of toxins mRNA following linezolid treatment was yet observed with *hla* mRNA in a study of Otto et al.⁹. This allows explaining the increase of toxin mRNA amount for USA300 clone while Agr is repressed. Indeed, linezolid is a 50S ribosome-inhibitory agent which blocks several steps of the translational process resulting in the accumulation of mRNA and other intermediate products of the translational complex³⁵. Nevertheless, effect on production of toxins was thereafter strain-dependent. Thus, translational was blocked by linezolid for all CA-MRSA PVL+ strains, except for ST20121288 strain, for which accumulation of mRNA added to Agr regulator activation should product mRNA amount superior at the linezolid blockage capacity.

Tigecyclin

In our study, tigecyclin induced greatly *psm α* mRNA expression for MRSA PVL- and CA-MRSA PVL+. Induction of *psm α* mRNA could be explained by an activation of regulator Agr only for one strain, the ST20121288 belonging to ST80 European clone, for which tigecyclin treatment induced an up-regulation of RNAlII. Although tigecyclin effect on *psm α* mRNA was constant among *S. aureus* strains tested, effect on PSM α 1 and Hld expression was significantly increased for MRSA PVL – (PSM α 1) but clone-dependent among CA-MRSA PVL + strains. Thus, we observed a significant difference between USA300 clone and ST80 European clone with an inhibitory effect on Hld production higher for USA300 clone than for ST80 European clone and an inductor effect on PSM α 1 expression for ST80 European clone while it was significantly inhibitor for USA300 clone. These observations were partly discordant with these of Yamaki et al., which found an inductor effect of tigecyclin sub-MIC²⁷. Variation of *pmtB* expression induced by tigecyclin did not permit to explain completely the different modification observed for PSM α 1 and Hld production. Indeed, although *pmtB* expression seemed increased for ST80 European clone and decreased in SF8300 strain may explain respectively a boosted transport or a blockage of PSM secretion, its expression was slightly up-regulated for HT20060752, not permitting to explain inhibitory effect of tigecyclin for this last strain. Tigecyclin is also an inhibitory of protein synthesis in blocking ribosomal function³⁶. Consequently, inhibitory effect

could be also coming from translation blockage such as linezolid, explaining relative inhibitory effect of tigecyclin for certain strains.

In conclusion, our result confirm that i) sub-MIC oxacillin inhibit constantly PSM α production for CA-MRSA PVL+ clone, in despite of underlying mechanism different according to genetic background. Hld is variably modulated by oxacillin according to CA-MRSA clone; ii) certain strain of *S. aureus* (herein ST20121288) are very susceptible to sub-MIC of inhibitory of protein synthesis agents resulting in an important increase of mRNA expression triggering an increased expression of toxins in despite of ribosome activity blockage; iii) modulation of PSM α and Hld production by antibiotic sub-MIC involve complex mechanism including Agr system, *pmtB* expression and undoubting others mechanism unknown; iv) variation on toxins mRNA expression definitively do not reflect always protein production, indicating that proteomic analyses are essential to conclude on virulence modulation by sub-MIC of antibiotic. Altogether, these data indicate that PSM α and Hld are differently regulate by antibiotics compared to others toxins previously studied (PVL and α T) with a potential benefic anti-toxic effect of oxacillin for acute staphylococcal infection, for which physiopathology is related to PSM and Hld activity. Nevertheless, if oxacillin promotes tolerance phenotype in inducing a decrease of PSM production³⁴, oxacillin inhibitory effect could be also deleterious for chronic staphylococcal infection.

Acknowledgements

Funding

This study was supported by internal funding.

Transparency declarations

None to declare.

References

1. Lowy FD. Staphylococcus aureus infections. *N Engl J Med* 1998; **339**: 520–32.
2. Diep BA, Chan L, Tattévin P, *et al.* Polymorphonuclear leukocytes mediate Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**: 5587–92.
3. Lipinska U, Hermans K, Meulemans L, *et al.* Panton-Valentine leukocidin does play a role in the early stage of Staphylococcus aureus skin infections: a rabbit model. *PLoS One* 2011; **6**: e22864.
4. Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, *et al.* Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat Med* 2007; **13**: 1510–4.
5. Kobayashi SD, Malachowa N, Whitney AR, *et al.* Comparative analysis of USA300 virulence determinants in a rabbit model of skin and soft tissue infection. *J Infect Dis* 2011; **204**: 937–41.
6. Bubeck-Wardenburg J, Bae T, Otto M, Deleo FR, Schneewind O. Poring over pores: alpha-hemolysin and Panton-Valentine leukocidin in Staphylococcus aureus pneumonia. *Nat Med* 2007; **13**: 1405–6.
7. Stevens DL, Ma Y, Salmi DB, McIndoo E, Wallace RJ, Bryant AE. Impact of antibiotics on expression of virulence-associated exotoxin genes in methicillin-sensitive and methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *J Infect Dis* 2007; **195**: 202–11.
8. Dumitrescu O, Boisset S, Badiou C, *et al.* Effect of antibiotics on Staphylococcus aureus producing Panton-Valentine leukocidin. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 1515–9.
9. Otto MP, Martin E, Badiou C, *et al.* Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 1524–32.
10. Ohlsen K, Ziebuhr W, Koller KP, Hell W, Wichelhaus TA, Hacker J. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on alpha-toxin (hla) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**: 2817–23.
11. Gemmell CG, Ford CW. Virulence factor expression by Gram-positive cocci exposed to subinhibitory concentrations of linezolid. *J Antimicrob Chemother* 2002; **50**: 665–72.
12. Bernardo K, Pakulat N, Fleeer S, *et al.* Subinhibitory concentrations of linezolid reduce Staphylococcus aureus virulence factor expression. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 546–55.
13. Pichereau S, Pantrangi M, Couet W, *et al.* Simulated antibiotic exposures in an in vitro hollow-fiber infection model influence toxin gene expression and production in community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain MW2. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 140–7.
14. Dumitrescu O, Choudhury P, Boisset S, *et al.* Beta-lactams interfering with PBP1 induce Panton-Valentine leukocidin expression by triggering sarA and rot global regulators of Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 3261–71.
15. Louie A, Vanscoy BD, Heine HS, *et al.* Differential effects of linezolid and ciprofloxacin on toxin production by Bacillus anthracis in an in vitro pharmacodynamic system. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 513–7.
16. Lorian V, Atkinson B. Killing of oxacillin-exposed staphylococci in human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; **18**: 807–13.
17. Elliott GR, Peterson PK, Verbrugh HA, Freiberg MR, Hoidal JR, Quie PG. Influence of subinhibitory concentrations of penicillin, cephalothin, and clindamycin on Staphylococcus aureus growth in human phagocytic cells. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; **22**: 781–4.
18. Kernodle DS, McGraw PA, Barg NL, Menzies BE, Voladri RK, Harshman S. Growth of Staphylococcus aureus with nafcillin in vitro induces alpha-toxin production and increases the lethal activity of sterile broth filtrates in a murine model. *J Infect Dis* 1995; **172**: 410–9.
19. Stevens DL, Wallace RJ, Hamilton SM, Bryant AE. Successful treatment of staphylococcal toxic shock syndrome with linezolid: a case report and in vitro evaluation of the production of toxic shock syndrome toxin type 1 in the presence of antibiotics. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2006; **42**: 729–30.

20. Diep BA, Afasizheva A, Le HN, *et al.* Effects of linezolid on suppressing in vivo production of staphylococcal toxins and improving survival outcomes in a rabbit model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* necrotizing pneumonia. *J Infect Dis* 2013; **208**: 75–82.
21. Croisier-Bertin D, Hayez D, Da Silva S, *et al.* In vivo efficacy of ceftaroline fosamil in a methicillin-resistant panton-valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* rabbit pneumonia model. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 1855–61.
22. Nathwani D, Morgan M, Masterton RG, *et al.* Guidelines for UK practice for the diagnosis and management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections presenting in the community. *J Antimicrob Chemother* 2008; **61**: 976–94.
23. Hodille E, Rose W, Diep BA, Goutelle S, Lina G, Dumitrescu O. The Role of Antibiotics in Modulating Virulence in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 2017; **30**: 887–917.
24. Joo H-S, Chan JL, Cheung GYC, Otto M. Subinhibitory concentrations of protein synthesis-inhibiting antibiotics promote increased expression of the agr virulence regulator and production of phenol-soluble modulins in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 4942–4.
25. Rudkin JK, Laabei M, Edwards AM, *et al.* Oxacillin alters the toxin expression profile of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 1100–7.
26. Yamaki J, Synold T, Wong-Beringer A. Antivirulence potential of TR-700 and clindamycin on clinical isolates of *Staphylococcus aureus* producing phenol-soluble modulins. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 4432–5.
27. Yamaki J, Synold T, Wong-Beringer A. Tigecycline induction of phenol-soluble modulins by invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 4562–5.
28. Bronesky D, Wu Z, Marzi S, *et al.* *Staphylococcus aureus* RNAIII and Its Regulon Link Quorum Sensing, Stress Responses, Metabolic Adaptation, and Regulation of Virulence Gene Expression. *Annu Rev Microbiol* 2016; **70**: 299–316.
29. Chatterjee SS, Joo H-S, Duong AC, *et al.* Essential *Staphylococcus aureus* toxin export system. *Nat Med* 2013; **19**: 364–7.
30. Joo H-S, Chatterjee SS, Villaruz AE, *et al.* Mechanism of Gene Regulation by a *Staphylococcus aureus* Toxin. *mBio* 2016; **7**. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5080381/>. Accessed March 8, 2017.
31. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.
32. Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, *et al.* *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science* 2007; **315**: 1130–3.
33. Hodille E, Cuercq C, Badiou C, *et al.* Delta Hemolysin and Phenol-Soluble Modulins, but Not Alpha Hemolysin or Panton-Valentine Leukocidin, Induce Mast Cell Activation. *Front Cell Infect Microbiol* 2016; **6**. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5149515/>. Accessed March 13, 2018.
34. Bojer MS, Lindemose S, Vestergaard M, Ingmer H. Quorum Sensing-Regulated Phenol-Soluble Modulins Limit Persister Cell Populations in *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol* 2018; **9**: 255.
35. Maguire BA. Inhibition of bacterial ribosome assembly: a suitable drug target? *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* 2009; **73**: 22–35.
36. da Silva LM, Nunes Salgado HR. Tigecycline: a review of properties, applications, and analytical methods. *Ther Drug Monit* 2010; **32**: 282–8.
37. Diep BA, Palazzolo-Ballance AM, Tattevin P, *et al.* Contribution of Panton-Valentine leukocidin in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *PLoS One* 2008; **3**: e3198.
38. Cardot Martin E, Michel A, Raynal B, *et al.* Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300 resists staphylococcal protein A modulation by antibiotics and antimicrobial peptides. *Int J Antimicrob Agents* 2015; **45**: 19–24.

39. Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, *et al.* Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science* 2007; **315**: 1130–3.
40. Li M, Cheung GYC, Hu J, *et al.* Comparative analysis of virulence and toxin expression of global community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains. *J Infect Dis* 2010; **202**: 1866–76.

Table

Table 1: *S. aureus* strains used in this study

Strain	Reference	Description	Clone
HT20030749	this study	CC5, agr2, mecA+, tst+, sec+, sed+	MRSA Geraldine
HT20050614	this study	CC5, agr2, mecA+, tst+, sec+, sed+	MRSA Geraldine
HT20040012	this study	CC8, agr1, mecA+, sea+, sed+	HA-MRSA Lyon
HT20061175	this study	CC8, agr1, mecA+, sea+, sed+	HA-MRSA Lyon
HT20060752	this study	ST8, agr1, mecA+, pvl+	CA-MRSA USA 300
SF8300	Diep et al. ³⁷	ST8, agr1, mecA+, pvl+	CA-MRSA USA 300
LUG1799	Otto et al. ⁹	ST80, agr3 mecA+, pvl+	CA-MRSA European
ST20121288	Cardot-Martin et al. ³⁸	ST80, agr3 mecA+, pvl+	CA-MRSA European

CC: Complex clonal; MRSA: methicillin-resistant *S. aureus*;

HA-MRSA: Hospital-acquired methicillin-resistant *S. aureus*;

ST: Sequence type; CA-MRSA: Community-acquired methicillin-resistant *S. aureus*.

Table 2: Primers used for quantitative PCR using LightCycler

Primer	Sequence (5'-3')	Reference
gyrB F	GGTGGCGACTTTGATCTAGC	Labandeira-Rey et al. ³⁹
gyrB R	TTATACAACGGTGGCTGTGC	Labandeira-Rey et al. ³⁹
psm α 1 F	TATCAAAAGCTTAATCGA	Li et al. ⁴⁰
psm α 1 R	CCCCTTCAAATAAGATGT	Li et al. ⁴⁰
psm α 3 F	ATGGAATTCGTAGCAAAATTATTC	this study
psm α 3 R	TAGTTGTTACCTAAAAATTTACC	this study
pmtB F	CGTAGAGTCAAAGTGCCATATGGT	Joo et al. ³⁰
pmtB R	TGGGAATGATGATTGACTTAGAAGAA	Joo et al. ³⁰
pmtR F	GGACATGTTGCTCCTGGAGA	this study
pmtR R	GGTCCCTTTTCCTCTAATTGTTG	this study
RNAIII F	GGGATGGCTTAATAACTCATA	Labandeira-Rey et al. ³⁹
RNAIII R	GGAAGGAGTGATTTCAATGG	Labandeira-Rey et al. ³⁹

Table 3: Minimum inhibitory concentrations (MIC) of the selected antibiotics for *S. aureus* isolates.

Strains	MIC (mg/L) in BHI broth				
	oxacillin	clindamycin	linezolid	tigecycline	rifampicin
HT20030749	0.25	0.016	0.125	0.25	0.001
HT20050614	0.25	0.016	0.25	0.25	0.002
HT20040012	1	>125	0.125	1	0.002
HT20061175	2	>125	0.25	0.5	0.0005
HT20060752	32	0.125	2	2	0.015
SF8300	32	0.25	2	4	0.007
LUG1799	16	0.125	0.5	2	0.007
ST20121288	16	0.125	1	1	0.007

Figure

Figure 1: Effects of antibiotics sub-MIC on *psmA1* mRNA expression after 6H or 24h incubation. The results were expressed as n-fold differences in the *psmA1/gyrb* ratio in the presence of antibiotics relative to the *psmA1/gyrb* ratio for the strains grown without antibiotics. The results for one antibiotics were pooled for the 4 strains community-acquired methicillin-resistant *S. aureus* PVL+ (CA-MRSA PVL+, in the left) and for the 4 strains methicillin-resistant *S. aureus* PVL- (MRSA PVL-, in the right). Conformity t test were performed to compare expression with antibiotic and control reaction expression without antibiotic (=1). For CA-MRSA PVL+ CLI: clindamycin (n=8), LIN: linezolid (n=8), OXA: oxacillin (n=8), RIF: Rifampicin (n=8), TIG: tigecyclin (n=8). For MRSA PVL- CLI (n=8), LIN (n=12), OXA (n=12), RIF (n=12), TIG (n=12). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

Figure 2: Effects of antibiotics sub-MIC on *psmA3* mRNA expression after 6H or 24h incubation. The results were expressed as n-fold differences in the *psmA3/gyrb* ratio in the presence of antibiotics relative to the *psmA3/gyrb* ratio for the strains grown without antibiotics. The results for one antibiotics were pooled for the 4 strains community-acquired methicillin-resistant *S. aureus* (CA-MRSA PVL+, in the left) and for the 4 strains hospital-acquired methicillin-resistant *S. aureus* PVL- (MRSA PVL-, in the right). Conformity t test were performed to compare expression with antibiotic and control reaction expression without antibiotic (=1). For CA-MRSA PVL+, CLI: clindamycin (n=8), LIN: linezolid (n=8), OXA: oxacillin (n=8), RIF: Rifampicin (n=8), TIG: tigecyclin (n=8). For MRSA PVL-, CLI (n=8), LIN (n=12), OXA (n=12), RIF (n=12), TIG (n=12). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

Figure 3: Effect of antibiotics sub-MIC on PSM α 1 release after 6H and 24H incubation. The results were expressed in percentage related to growth control without antibiotic. The results for one antibiotic were pooled for the 4 strains community-acquired methicillin-resistant *S. aureus* PVL+ (CA-MRSA PVL+ , in the left) and for the 4 strains hospital-acquired methicillin-resistant *S. aureus* PVL- (MRSA PVL-, in the right). Conformity t test were performed to compare expression with antibiotic and control reaction expression without antibiotic (=100). For some conditions, statistical analyses were not performed because of insufficient data (for n < 3).

For CA-MRSA PVL+, CLI: clindamycin (n=8), LIN: linezolid (n=8), OXA: oxacillin (n=10), RIF: Rifampicin (n=8), TIG: tigecyclin (n=10). For MRSA PVL- and Time 6H CLI (n=5), LIN (n=6), OXA

(n=5), RIF (n=1), TIG (n=6). For HA-MRSA and Time 24H CLI (n=3), LIN (n=3), OXA (n=3), RIF (n=3), CLI (n=2). * p < 0.05, *** p < 0.001.

Figure 4: Effect of antibiotics sub-MIC on Hld release after 6H and 24H incubation for community-acquired methicillin-resistant *S. aureus* PVL+ (CA-MRSA PVL+). The results were expressed in percentage related to growth control without antibiotic. The results for one antibiotic were pooled for the 4 strains. Conformity t test were performed to compare expression with antibiotic and control reaction expression without antibiotic (=100). CLI: clindamycin (n=8), LIN: linezolid (n=8), OXA: oxacillin (n=10), RIF: Rifampicin (n=8), TIG: tigecyclin (n=10). ** p < 0.01, *** p < 0.001.

Figure 5: Effects of antibiotics sub-MIC on *pmtB* mRNA (A), *pmtR* mRNA (B) and *RNAIII* (C) expression after 24h for community-acquired methicillin-resistant *S. aureus* PVL+ (CA-MRSA PVL+). The results are expressed as n-fold differences in the *pmtB/gyrb*, *pmtR/gyrb* or *RNAIII/gyrb* ratio in the presence of antibiotics relative to the *pmtB/gyrb*, *pmtR/gyrb* or *RNAIII/gyrb* ratio for the strains grown without antibiotics. The results for one antibiotic were pooled for the 2 strains belonging to the same genetic background, ST80 European clone in the left and USA300 clone in the right. Conformity t test were performed to compare expression with antibiotic and control reaction expression without antibiotic (=1). CLI: clindamycin (n=4), LIN: linezolid (n=4), OXA: oxacillin (n=4), TIG: tigecyclin (n=4). * p < 0.05, ** p < 0.01.

Figure 1

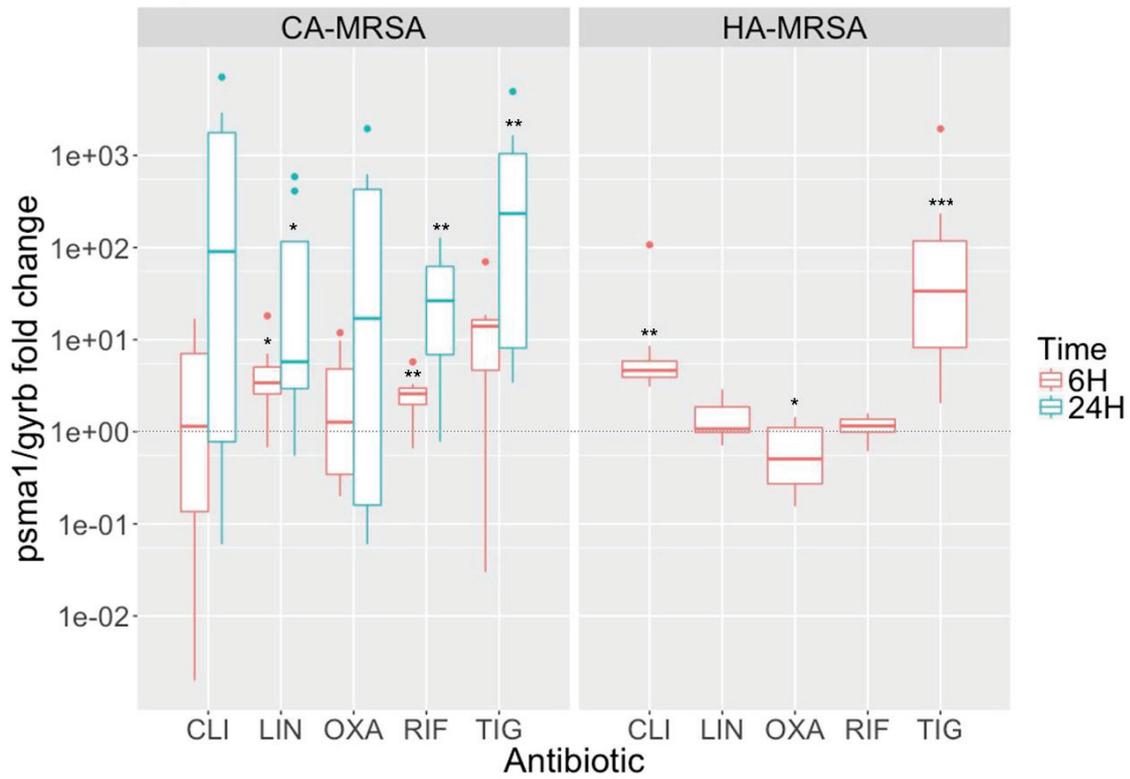


Figure 2

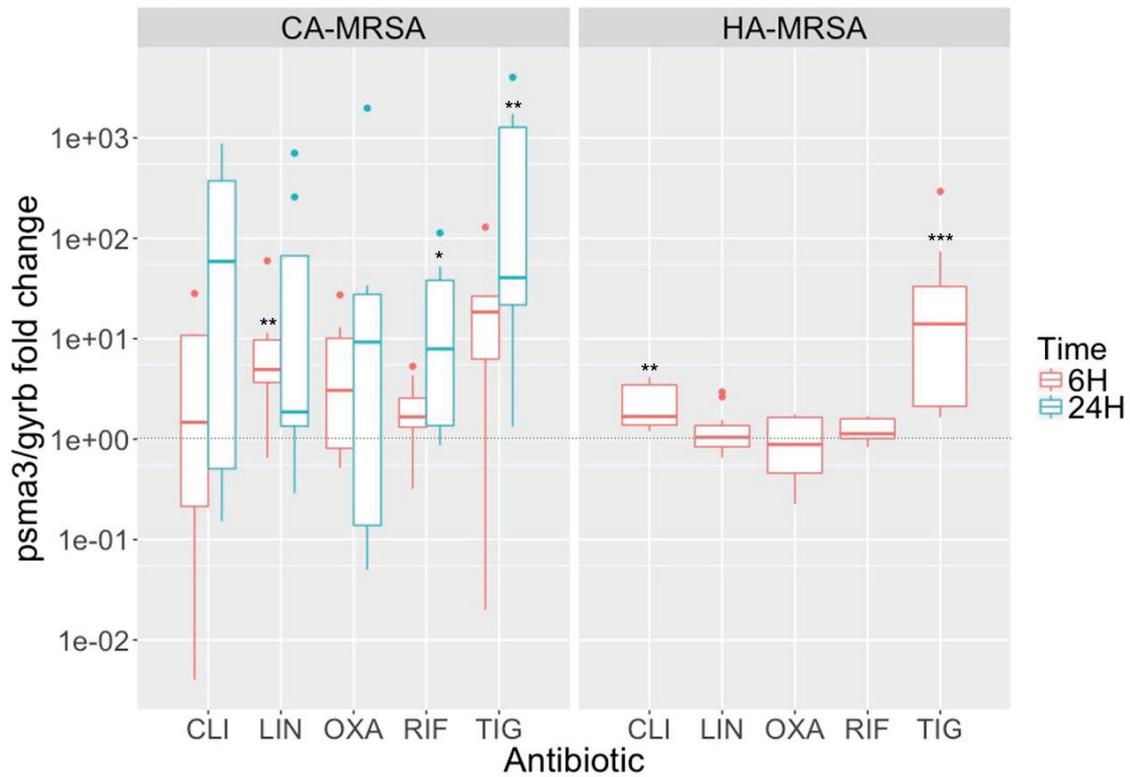


Figure 3

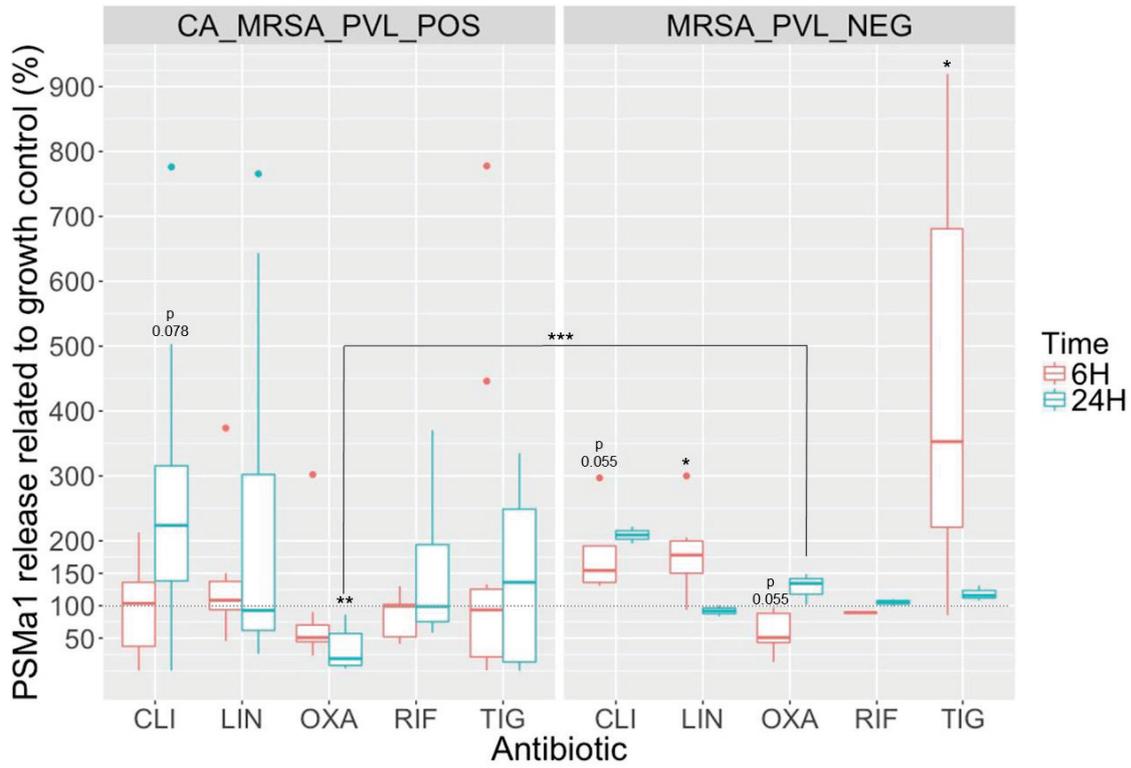


Figure 4

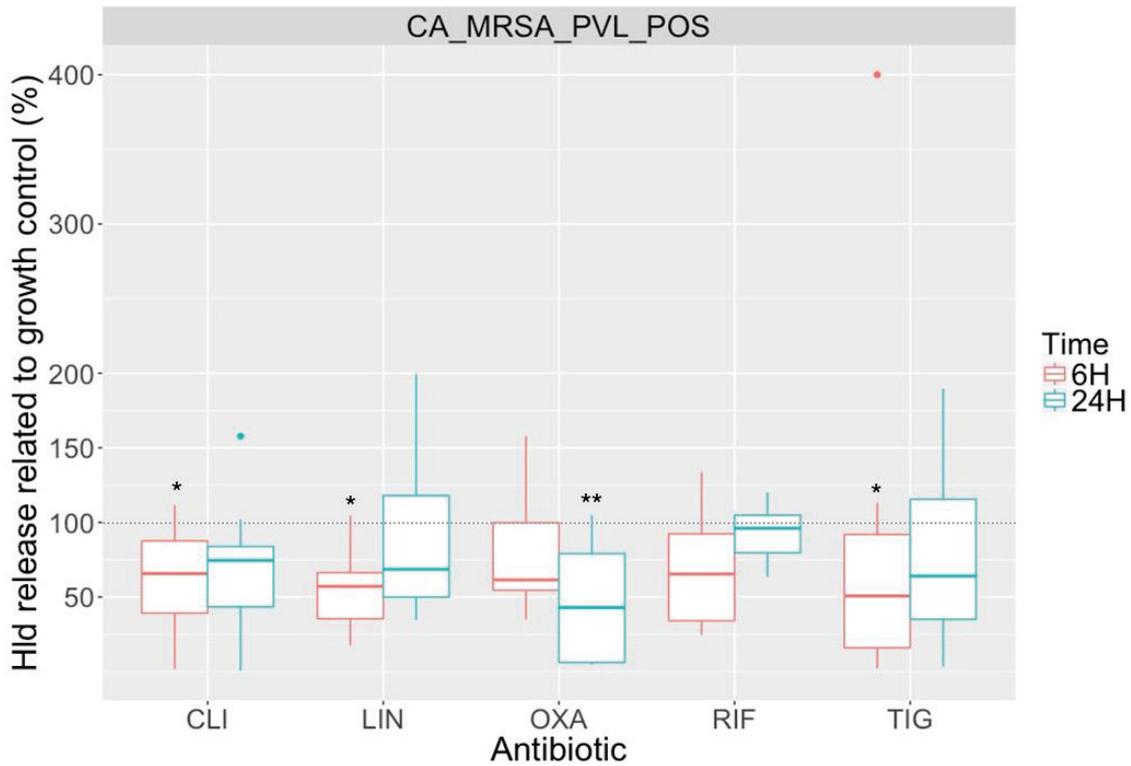
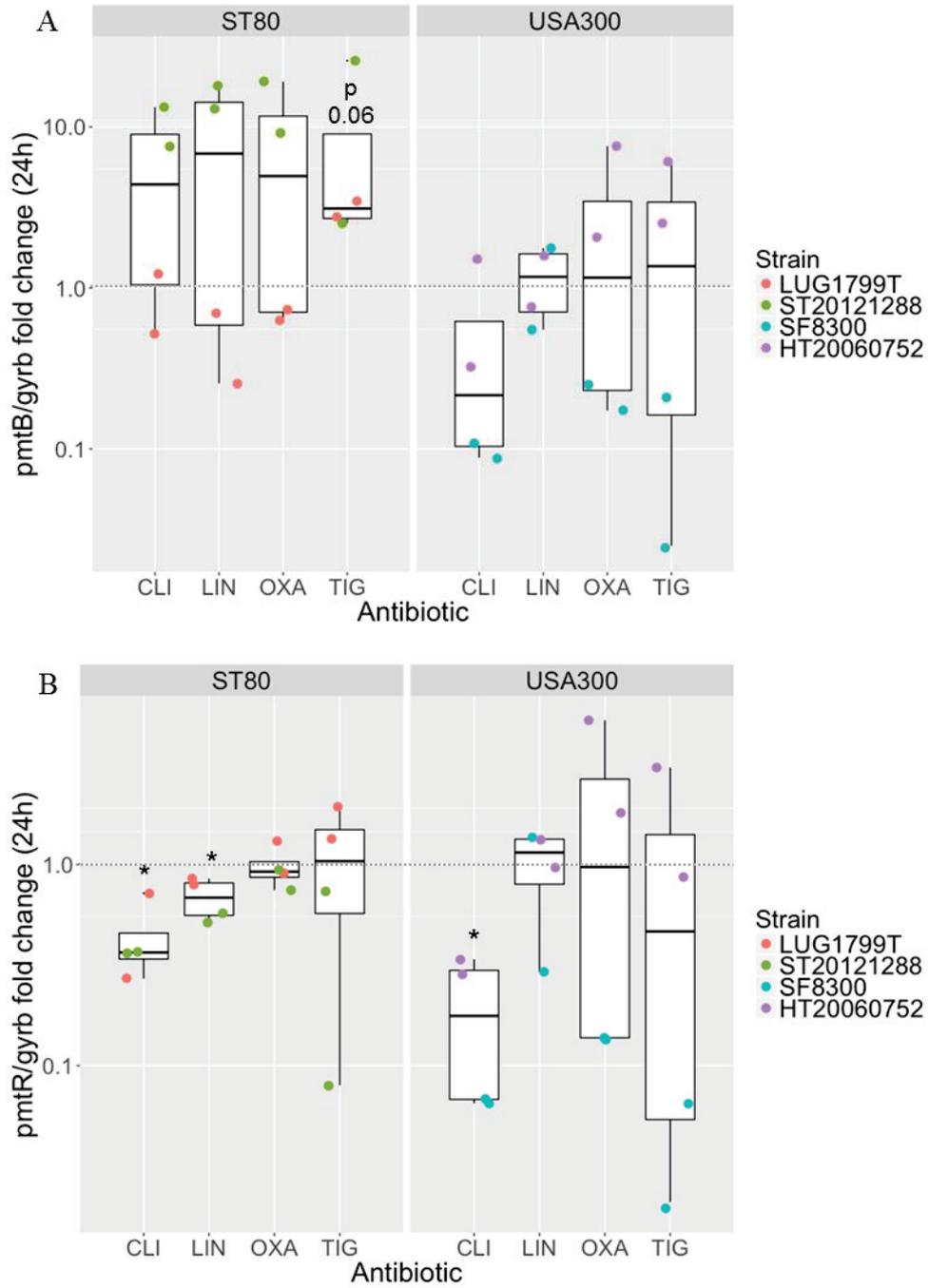
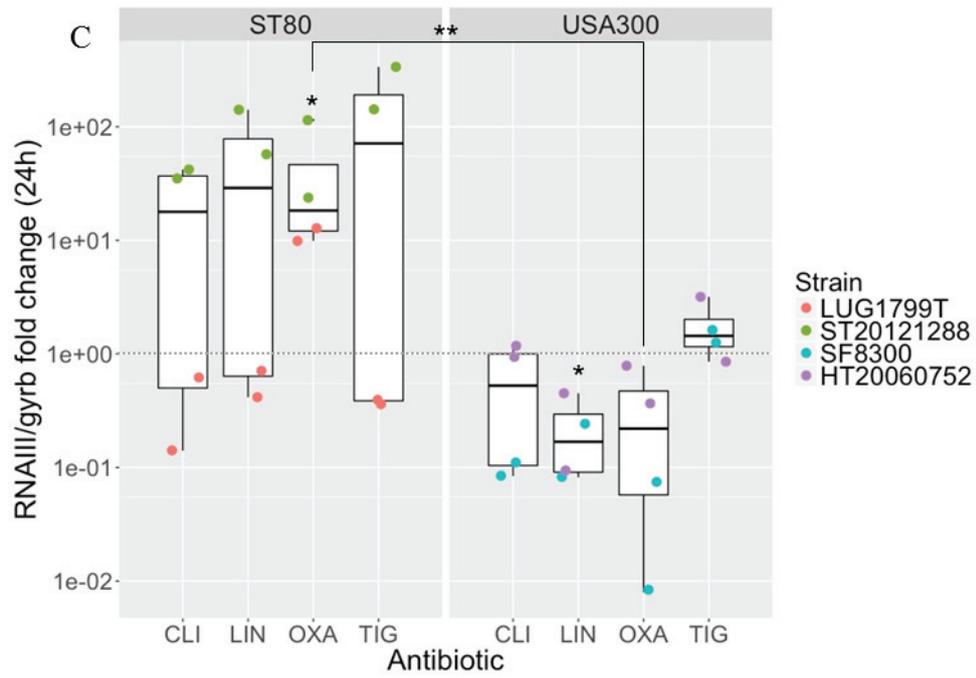


Figure 5





Discussion

Le but de ce travail était d'une part de mettre en évidence l'effet des facteurs de virulence de *S. aureus*, et en particulier des toxines formant des pores, sur les mastocytes humains ainsi que la possible implication découlant de cette interaction dans la physiopathologie et la transmission des infections cutanées aiguës staphylococciques ; et d'autre part d'étudier la modulation de l'expression de ces toxines, et notamment celle de PSM α et Hld, par des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques.

*Mise en évidence de l'implication de l'interaction entre mastocytes et Hld/PSM α 1 dans la physiopathologie et la transmission des infections cutanées à *S. aureus**

Comme nous l'avons développé dans la partie bibliographique, l'implication des toxines formant des pores de *S. aureus* dans la physiopathologie des infections staphylococciques a été le sujet de beaucoup d'études aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* et les connaissances sur le sujet se sont nettement améliorées depuis quelques années (effets biologiques des toxines, récepteurs cellulaires à la surface des cellules cibles, ...). Dans le cadre des infections cutanées aiguës staphylococciques, l'implication de la PVL (Lipinska et al. 2011), de l'Hla (Kobayashi et al. 2011) et des PSM α (Wang et al. 2007; Kobayashi et al. 2011; Syed et al. 2015) a ainsi été validée par des modèles expérimentaux animaux. Les toxines précédemment citées sont également reconnues pour leur pouvoir leucotoxique sur les PNN pour la PVL et les PSM α (Löffler et al. 2010) et sur les lymphocytes pour l'Hla (Berube et Bubeck Wardenburg 2013). Au sein de l'immunité innée et adaptative, les mastocytes présents dans les tissus « barrières » de l'organisme tiennent un rôle important, notamment dans celui de sentinelle « lanceur d'alerte » et dans l'initiation du processus inflammatoire (source de TNF- α précoce), afin de lutter contre les agents pathogènes incluant *S. aureus* (Abraham et St John 2010; Redegeld et al. 2018). La similarité dans la présentation clinique entre infection cutanée staphylococcique et morsure d'araignée, à savoir infection cutanée très inflammatoire, érythémateuse, prurigineuse avec parfois une plage de dermo-nécrose centrale (Suchard 2011), nous a conduit à émettre une hypothèse selon laquelle une origine physiopathologique pourrait être commune. Dans les morsures d'araignées, la dégranulation mastocytaire est en partie responsable de la symptomatologie (Rattmann et al. 2008; Paludo et al. 2009) et en particulier du prurit (Zhu et al. 2015; Gupta et Harvima 2018). Nous nous sommes donc intéressés à la possible interaction entre toxines staphylococciques et mastocytes. De plus, l'implication des mastocytes induisant le prurit dans les infections cutanées à *S. aureus* permettait d'émettre de nouvelles hypothèses quant à l'explication de la diffusion préférentielle de certaines souches de *S. aureus* dans la population, la transmission de ce germe étant essentiellement manu-portée.

Ainsi, nous avons montré sur une lignée de mastocytes humains (HMC-1) que PSM α 1, PSM α 3 et Hld induisaient une libération de tryptase par lyse cellulaire, de manière dose-dépendante, alors que la

PVL et Hla n'avaient aucun effet. Bien que ce soient des mastocytes immatures, le choix de cette lignée cellulaire a été guidée par la facilité de son utilisation et par l'expression à sa surface du récepteur C5aR (Werfel et al. 1996), récepteur de la PVL (Spaan et al. 2013) également exprimé par les mastocytes cutanés (Füreder et al. 1995), confirmant que cette lignée cellulaire pourrait faire un modèle valable pour mimer l'effet de la PVL sur les mastocytes cutanés. Les résultats négatifs pour la PVL nous sont donc apparus comme discordants par rapport aux résultats attendus, indiquant soit un niveau d'expression insuffisant des C5aR à la surface des cellules HMC-1, soit l'absence d'expression d'un corécepteur de la PVL inconnu jusqu'alors. Très récemment, la découverte du corécepteur de la PVL, CD45 (Spaan 2018), nous a permis de conclure sur la véracité de la deuxième hypothèse. En effet, la lignée HMC-1 n'exprimant pas le CD45 (Nilsson et al. 1994), la PVL ne peut être active sur ces cellules en l'absence d'un des deux récepteurs clés permettant son oligomérisation. Au moment du choix de travailler sur ce modèle cellulaire, cet élément était inconnu. Cependant, les mastocytes matures cutanés humains expriment le CD45 (Ghannadan et al. 1998), indiquant que la PVL pourrait être active sur ceux-ci à condition qu'ils expriment une isoforme compatible avec la fixation de LukF-PVL (Saunders et Johnson 2010). En perspective, il paraîtrait intéressant de travailler par la suite sur des mastocytes primaires matures de peau pour conclure définitivement sur l'action de la PVL sur ce type cellulaire.

Concernant PSM α 1 et PSM α 3, la dose active lytique observée dans notre modèle était comparable à celle retrouvée antérieurement dans la littérature, à savoir une dose létale 50 (DL₅₀) égale à 25 μ g/mL pour PSM α 1, même si la capacité cytotoxique de PSM α 3 à 50 μ g/mL semblait inférieure sur les mastocytes (20% de lyse) que sur les PNN (80% de lyse) (Löffler et al. 2010). Pour Hld, la dose active observée dans notre étude était également similaire à celle relevée par Nakamura et al., à savoir une libération de médiateurs de l'ordre de 10% par rapport au témoin positif pour 10 μ g/mL de toxine, la différence portant sur le mécanisme à l'origine de cette libération : lyse cellulaire dans notre modèle alors que Nakamura et al. avaient observé une activation mastocytaire sans lyse cellulaire (Nakamura et al. 2013). Cette différence pourrait être due à l'utilisation de lignées mastocytaires différentes entre les deux études : une lignée murine MC/9 pour l'étude de Nakamura et al. et une lignée mastocytaire humaine dans notre étude.

Ensuite, nous avons montré que Hld et PSM α 1 pouvaient être produits *in vivo*, ces toxines ayant été retrouvées à quantité mesurable dans des pus d'abcès collectés à *S. aureus*. Hld était retrouvée plus fréquemment dans les prélèvements cliniques que PSM α 1 (65% des pus analysés *versus* 17%), reflétant possiblement la production très élevée d'Hld observée *in vitro*. En effet, sur la collection de 46 souches de *S. aureus* étudiée, Hld était significativement plus produite que PSM α 1 (de l'ordre de dix fois plus) et que PSM α 3 (de l'ordre de trente fois plus) ce qui concordait avec l'étude de Berlon et al. (Berlon et al. 2015). Dans la partie bibliographique, nous avons insisté sur le fait que les PSM pouvaient avoir une activité *in vivo* extracellulaire seulement dans un milieu exempt de lipoprotéines

et/ou dans des conditions où les quantités de toxines produites saturent les capacités d'inhibition de celles-ci, les lipoprotéines inhibant les actions des PSM α (Surewaard et al. 2012). D'après nos résultats révélant des capacités importantes de productions d'Hld, suivi de PSM α 1, par les souches de *S. aureus* issues d'infection cutanée, et ceux d'autres études montrant également une production des PSM α , incluant Hld, significativement supérieure pour les souches responsables d'infection cutanée (Berlon et al. 2015; Qi et al. 2016), nous pouvons acceptablement conclure que les capacités d'inhibition des lipoprotéines pourraient être largement dépassées permettant ainsi une action extracellulaire d'Hld, et à moindre mesure de PSM α 1, sur les mastocytes cutanés induisant lyse et libération de médiateurs pruritogènes tels que la tryptase. D'ailleurs, le fait de les avoir détectés dans les prélèvements cliniques par une technique d'HPLC-MS, indique que les peptides (Hld et PSM α 1) étaient sous formes libres, donc non liés aux lipoprotéines, dans le milieu.

L'expression d'Hld et de PSM α 1 est sous la dépendance directe du système Agr, le facteur transcriptionnel AgrA pouvant directement déclencher la transcription de l'opéron codant les PSM et ARNIII portant le cadre de lecture du gène *hld* (Bronsky et al. 2016). De manière intéressante, nous avons observé sur notre sélection de 46 souches, que les niveaux de production en PSM α , y compris en Hld, dépendaient du type Agr : les souches appartenant au type Agr1 produisaient significativement plus d'Hld, de PSM α 1 et de PSM α 3 que les souches appartenant au type Agr2 et Agr3. De manière non significative, nous observions également une tendance quant à la supériorité de l'expression d'Hld et de PSM α 1 chez les souches de type Agr3 par rapport aux souches du type Agr2. Or, selon le dernier rapport du Centre National de Référence des Staphylocoques, parmi les 335 souches de *S. aureus* responsables d'infections cutanées suppuratives communautaires (folliculite, furoncle, abcès sous-cutané, ...), sans exclure les SARM, 141 souches appartiennent au type Agr1, soit 42,09 % (IC₉₅ [36,74-47,58]), 99 appartiennent au type Agr3, soit 29,55% (IC₉₅ [24,72-34,75]), 64 appartiennent au type Agr2, soit 19,10% (IC₉₅ [15,03-23,73]) et 31 appartiennent au type Agr4, soit 9,25% (IC₉₅ [6,37-12,88]), sachant que les clones de SARM et SARM les plus fréquemment retrouvés dans ce type d'infection sont respectivement le ST152 PVL+ appartenant au type Agr1 et le clone de SARM-C Européen ST80 PVL+ appartenant au type Agr3 (Tristan et al. 2018). Ainsi, nous observons qu'il existe une proportion significativement plus importante dans les infections cutanées communautaires de souche de *S. aureus* appartenant au type Agr1, puis viennent les souches appartenant au type Agr3 puis Agr2 et enfin Agr4. En ayant conscience des biais de ces données, à savoir qu'elles ne sont pas exhaustives et que la présence de la PVL dans les deux clones majoritaires joue sans doute un rôle, celles-ci viennent étayer l'hypothèse selon laquelle plus une souche de *S. aureus* est capable de produire de forte quantité d'Hld et de PSM α 1 grâce à un système Agr fonctionnel, plus la propension à sa diffusion dans la communauté est élevée. Cette hypothèse est alors liée à l'action de ces toxines sur les mastocytes, déclenchant la libération de médiateurs pruritogènes induisant *in fine* une transmission manuportée facilitée.

Modulation de l'expression des toxines staphylococciques formant des pores par des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques

La mise en place d'un traitement antibiotique adapté est un élément clé dans l'issue favorable d'une infection. Bien que l'objectif soit d'atteindre des concentrations d'antibiotiques sériques et sur le site de l'infection supérieures à la CMI du pathogène infectieux, il existe de multiples situations où le risque d'être à concentration sub-inhibitrice est réel (mauvaise biodisponibilité, défaut d'absorption ou de diffusion, d'autant plus important que l'infection est cloisonnée, interaction médicamenteuse, demi-vie d'élimination rapide, résistance acquise aux antibiotiques, ...). Or l'exposition des pathogènes à des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques peut modifier leur comportement et leur métabolisme entraînant des réactions potentiellement délétères pour le patient, de conséquence d'autant plus grave que la pathologie infectieuse initiale sera de mauvais pronostic. Dans le cadre des infections staphylococciques, les facteurs de virulence et notamment des toxines formant des pores jouent un rôle déterminant dans la physiopathologie de la maladie infectieuse : PVL, Hla et PSM α dans les pneumonies nécrosantes, TSST-1 dans le choc toxique staphylococcique. Une revue de la littérature abondante traitant de la modulation de l'expression des facteurs de virulence de *S. aureus* par des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques nous a permis de retenir les conclusions suivantes : les antibiotiques dits anti-toxiques tels que la clindamycine et le linézolide entraînent une inhibition franche de l'expression de la PVL, Hla et TSST-1 alors que l'oxacilline a plutôt tendance à augmenter leur expression (Hodille et al. 2017).

La capacité de la clindamycine à inhiber l'expression de la PVL, Hla et TSST-1 est abolie en présence d'une résistance constitutive aux lincosamides, codée par un gène *erm*. Le phénotype de résistance MLS_B constitutif entraîne une modification de la cible par méthylation de l'ARN ribosomal induisant une résistance aux macrolides, lincosamides et altère l'effet bactéricide des streptogramines (Jehl et al. 2012). Cependant, la résistance de type MLS_B peut être également inductible. Dans ce cas, la résistance est induite seulement par les macrolides à 14 et 15 atomes qui sont alors résistants (Jehl et al. 2012). La clindamycine conserve une activité antibactérienne mais des échecs thérapeutiques ont été rapportés avec cette molécule, notamment pour des infections où un traitement de longue durée est nécessaire (Lewis et Jorgensen 2005; Woods 2009). Dans le cas d'une résistance inductible à la clindamycine, l'effet sur la production de toxines restait à ce jour inconnu. Un des premiers objectifs du travail de recherche a donc été d'étudier l'effet de concentrations sub-inhibitrices de clindamycine sur l'expression de la PVL, Hla et TSST-1 sur une sélection de six souches de *S. aureus* présentant une résistance inductible à la clindamycine. De manière attendue, nous avons observé que la clindamycine à concentration sub-inhibitrice conservait son activité répressive sur la production de PVL, Hla et TSST-1. Cependant, nous avons observé que l'effet inhibiteur était moins prononcé sur la souche de *S. aureus* appartenant au clone de SARM-C ST8 USA300 que sur les autres souches de *S. aureus* testées. Cette observation était en concordance avec l'étude de Cardot-Martin et al. qui montrait que la souche appartenant au clone ST8 USA300 testée résistait à l'inhibition de l'expression de la protéine

A par les antibiotiques et peptides antimicrobiens (Cardot Martin et al. 2015). Pour conclure, la clindamycine conserve son effet anti-toxinique sur l'expression de la PVL, Hla et TSST-1 pour des souches de *S. aureus* présentant une résistance inductible à la clindamycine, permettant de garder son utilisation comme répresseur de l'expression des toxines en association avec d'autres molécules anti-staphylococciques dans la prise en charge des infections staphylococciques liées à la production de toxines et dues à une souche MLS_B inductible, utilisation recommandée par certaines sociétés savantes (Nathwani et al. 2008).

Concernant la modulation de l'expression des PSM α et de l'Hld par les concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques, peu d'études sont disponibles jusqu'à ce jour, présentant des résultats parfois discordants pour une même molécule en fonction de la dose d'antibiotique utilisée et des souches de *S. aureus* testées. De plus, alors que les mécanismes sous-jacents à l'effet anti-toxinique de la clindamycine et du linézolide et l'effet inducteur de l'oxacilline sur la PVL, l'Hla et la TSST-1 sont en grande partie élucidés (Hodille et al. 2017), les mécanismes à l'origine des modifications d'expression des PSM restent insuffisamment expliqués. Sur une sélection de huit souches de SARM appartenant aux principaux clones circulants en France (ST8 USA300 PVL+, clone Européen ST80 PVL+, clone Géraldine PVL- et clone Lyon PVL-) nous avons donc étudié l'effet de cinq anti-staphylococciques majeurs (oxacilline, clindamycine, linézolide, tigécycline et rifampicine) à concentration sub-inhibitrice sur l'expression de PSM α 1, PSM α 3 et Hld, au niveau transcriptomique et protéomique. Certains dosages protéiques n'étaient pas mesurables avec notre méthode pour certaines souches (clone Lyon) indiquant des niveaux d'expression faibles (< 0,1 μ g/mL, limite de détection). Afin de s'affranchir de tout biais lié à un effet bactéricide (notamment pour l'oxacilline), les conditions expérimentales ont été soigneusement étudiées afin de limiter l'inhibition de la croissance bactérienne et les dosages protéiques ont été rationalisés par rapport à l'aire sous la courbe de croissance (voir les courbes de croissance disponibles dans les données supplémentaires de la quatrième publication). D'un point de vue mécanistique, nous avons exploré différentes voies de régulation possible sur les SARM-C producteurs de PVL : l'activation du système Agr par l'intermédiaire de la quantité du transcrit ARNIII, l'évaluation du système d'export extracellulaire des PSM par la quantification du transcrit *pmtB*, codant une partie du transporteur pmt, ainsi que la régulation de la transcription de *pmtB* par la quantification du régulateur *pmtR*, réprimant normalement la production du transporteur pmt.

Ainsi, nous avons confirmé l'effet inhibiteur de concentrations sub-inhibitrices d'oxacilline sur l'expression de PSM α 1 et Hld sur la majorité des souches de *S. aureus* testées (dynamique au cours du temps pour les SARM-C producteurs de PVL et uniquement après 6 heures d'incubation pour le clone Géraldine) comme l'avaient précédemment observé deux études (Joo et al. 2010; Rudkin et al. 2014). De manière intéressante, nous observions un effet de l'oxacilline clone-dépendant pour les SARM-C producteurs de PVL. En effet, malgré une expression protéique réprimée pour les deux clones, les

deux souches appartenant au clone Européen ST80 affichaient des quantités d'ARNm de *psmA1/2* et *psmA3* surexprimés par rapport au contrôle de croissance sans antibiotique, alors que ceux-ci étaient sous-exprimés pour les souches appartenant au clone ST8 USA300. Cette observation indique que les mécanismes inhibiteurs sous-jacents sont différents pour les deux clones. Après analyse des transcrits ARNIII, *pmtB* et *pmtR*, il est probable que l'inhibition d'expression provienne d'une répression du système Agr pour le clone USA300 et qu'elle provienne d'une inhibition de la traduction pour le clone Européen ST80, le système de transport n'étant pas réprimé pour ce clone. Cependant, la faculté de l'oxacilline à inhiber la synthèse protéique n'a jamais été montrée. De ce fait, soit elle interfère indirectement sur la traduction des ARNm, soit interfère avec les peptides une fois traduits, par un mécanisme de fixation, empêchant leur libération dans le milieu extracellulaire.

Parmi les autres antibiotiques étudiés, aucun ne présentait de modulation uniforme sur l'expression des PSM α et Hld, comme observé avec l'oxacilline : en effet, soit nous observions un effet clone-dépendant (tigécycline) soit un effet souche-dépendant (clindamycine et linézolide).

Ainsi, bien que la tigécycline induisait une surexpression des ARNm *psmA1/2* et *psmA3* pour l'ensemble des souches de *S. aureus* testées, l'analyse protéique effectuée pour les SARM-C producteurs de PVL a permis de distinguer un effet clone. En effet, après 24 heures d'incubation, l'expression de PSM α 1 était significativement augmentée pour le clone Européen ST80 et avait une tendance non significative à être diminuée pour le clone USA300. De plus, la différence de production de PSM α 1 entre le clone USA300 et le clone européen ST80 était significative et nous observions la même tendance (non significative) pour la production d'Hld, avec une production supérieure pour le clone Européen ST80. L'effet inducteur de la tigécycline avait été auparavant rapporté par Yamaki et al. (Yamaki et al. 2013). La différence de comportement entre ces deux clones n'a pas pu être entièrement expliquée par les mécanismes étudiés, avec sans doute plusieurs mécanismes intercurrents mis en œuvre.

Pour la clindamycine, nous observions un effet souche très marqué. En effet, dès 6 heures d'incubation, une complète abolition de la quantité des transcrits *psmA1/2* et *psmA3* ainsi que de l'expression des peptides PSM α 1 et Hld était observée pour la souche SF8300, alors que pour les autres souches de SARM-C producteurs de PVL, une augmentation des ARNm et des peptides était observée. Cette induction était notamment très marquée pour la souche ST20121288 appartenant au clone Européen ST80. L'effet inducteur de la clindamycine avait été déjà observé par Joo et al. (Joo et al. 2010) et Yamaki et al. (Yamaki et al. 2013). Cependant, ce dernier auteur décrivait également un effet inhibiteur dans sa première étude (Yamaki et al. 2011) indiquant une différence de comportement en fonction des souches, concordant avec les résultats de notre étude. Malgré l'effet souche observé, en prenant en compte nos résultats ainsi que ceux disponibles antérieurement dans la littérature, nous pouvons cependant conclure que la clindamycine à concentration sub-inhibitrice entraîne plus souvent une induction de l'expression des PSM α qu'une inhibition de leur production.

Un effet souche-dépendant était également observé avec le linézolide au sein des SARM-C producteurs de PVL. A l'inverse de la clindamycine et malgré un effet inducteur quasi-constant sur la quantité d'ARNm *psm α 1/2* et *psm α 3* pour l'ensemble des SARM-C producteurs de PVL, le linézolide entraînait une légère tendance (non significative) à la répression de l'expression de PSM α 1 et d'Hld, excepté pour la souche ST20121288 appartenant au clone Européen ST80. Il a déjà été observé pour d'autres toxines (Hla), une accumulation d'ARNm suite au traitement par le linézolide ne se traduisant pas par une augmentation de l'expression protéique (Otto et al. 2013). Ce phénomène peut être expliqué par le blocage de l'activité ribosomale par le linézolide au niveau de la sous-unité 50-S du ribosome. D'un point de vue mécanistique, nous pouvons supposer que ce phénomène se produisait également dans notre modèle expérimental pour la majorité des souches de SARM-C producteurs de PVL, expliquant ainsi le découplage entre la surexpression des transcrits ARNm *psm α 1/2* et l'inhibition de l'expression de PSM α 1. Nous pouvons également supposer que les capacités bloquantes du linézolide aient été dépassées pour la souche ST20121288 où l'accumulation d'ARNm était très importante, bien plus que pour les autres souches.

Dans notre schéma expérimental, le choix d'utiliser deux souches par clones et d'interpréter les résultats en séparant les SARM-C producteurs de PVL et les SARM non producteurs de PVL, permettait d'avoir des répliques biologiques de haute significativité pour chacun des groupes, si les souches évoluaient similairement pour une condition donnée. Ainsi les résultats protéiques obtenus avec l'oxacilline pour les SARM-C producteurs de PVL peuvent être considérés comme assez puissants pour avancer des conclusions. De même, les effets clones-dépendants peuvent être considérés avec une bonne valeur biologique, comme deux souches appartenant aux mêmes clones évoluent de manière identique. Par contre, les effets souche-dépendants (SF8300 et clindamycine, ST20121288 et linézolide) mériteraient d'être confirmés en répétant les expérimentations sur la souche évoluant différemment des autres, rendant les résultats des autres souches évoluant de manière similaire, de bonne valeur biologique malgré la non significativité des résultats.

Ainsi, nos résultats ont confirmé l'effet inhibiteur de concentrations sub-inhibitrices d'oxacilline sur l'expression de PSM α 1 et Hld ainsi que l'effet plutôt inducteur de la clindamycine. Il est plutôt surprenant que les PSM α soient différemment régulés par ces antibiotiques comparé aux autres toxines formant des pores (PVL et Hla). Ces observations pourraient nous pousser à reconsidérer, dans certaines situations, l'utilisation de molécule telle que la clindamycine pour son effet anti-toxinique. Pour des infections aiguës nécrosantes à souche productrice de PVL ou lors de choc toxique staphylococcique, où la PVL et la TSST-1 sont respectivement majoritairement responsables de la physiopathologie de la (toxi)-infection, l'utilisation de la clindamycine comme inhibiteur de l'expression de ces toxines semble très pertinente. Dans le cas d'infections suppuratives et nécrosantes à souche non productrice de PVL, où les facteurs de virulence exprimés sont majoritairement l'Hla et les PSM α , l'utilisation de la clindamycine pour son effet anti-toxinique pourrait ne pas être aussi

efficace qu'attendu. Dans ce cas, il serait peut-être préférable d'orienter le choix vers le linézolide pour son effet inhibiteur sur l'Hla et probablement également sur les PSM α . Dans tous les cas lors de la prise en charge d'infections graves telles que la pneumonie nécrosante, la clindamycine ou le linézolide ne doivent pas être utilisés en monothérapie et s'ajoutent généralement à d'autres molécules anti-staphylococciques (oxacilline ou vancomycine), voir à des immunoglobulines polyvalentes permettant de neutraliser les toxines. Enfin, l'oxacilline pourrait finalement avoir un effet bénéfique sur la production de toxines, en inhibant la production de PSM α , en plus de son effet bactéricide rapide dans les infections aiguës. Pour les infections chroniques à *S. aureus*, le risque de l'effet inhibiteur de l'oxacilline sur les PSM α serait la possible facilitation de l'émergence de la tolérance avec l'apparition plus fréquente de bactéries persistantes (Bojer et al. 2018).

Conclusion et perspectives

Au cours ce travail, nous avons montré dans un premier temps que les PSM α et en premier lieu l'Hld, toxines staphylococciques formant des pores produites par toutes les souches de *S. aureus*, pouvaient interagir avec les mastocytes humains et induire la libération de médiateurs pruritogènes. Ces toxines, notamment l'Hld, ont été retrouvées dans les prélèvements cliniques (pus d'abcès) démontrant leur production *in vivo* au cours d'une infection cutanée à *S. aureus*. Bien que les gènes codant ces toxines soient présents chez toutes les souches de *S. aureus*, leur production est dépendante d'un système Agr fonctionnel, principal mécanisme régulateur régissant la production des facteurs de virulence staphylococciques. Nous avons montré que les souches de *S. aureus* possédant un système Agr de type 1 produisaient significativement plus de PSM α et Hld que les souches appartenant au système Agr 2 et Agr3. La transmission de *S. aureus* étant essentiellement manu-portée, une souche ayant une propension à produire des toxines déclenchant la libération par les mastocytes cutanés de médiateurs pruritogènes, pourrait avoir une transmission facilitée. D'après les données 2017 du centre national de référence des Staphylocoques concernant les infections cutanées suppuratives, cette hypothèse tend à être vérifiée. En effet, les souches de *S. aureus* appartenant au type Agr1 et donc produisant plus de PSM α 1 et d'Hld, sont plus fréquemment retrouvées dans ce type d'infection que les souches appartenant aux autres types d'Agr (Agr2, Agr3 et Agr4). L'inaction de la PVL sur les mastocytes utilisés dans notre modèle était inattendue parce que ceux-ci exprimaient le récepteur C5aR, d'abord considéré comme l'unique récepteur de la PVL. Cette inaction a été expliquée par la suite par l'absence à la surface des HMC-1, du corécepteur de la PVL, le CD45. Les mastocytes humains cutanés matures exprimant le C5aR et le CD45, pourraient cependant être sensibles à la PVL et participer également à la libération de médiateurs pruritogènes ainsi qu'à la diffusion des clones producteurs de PVL. Des investigations supplémentaires devraient être réalisées sur des mastocytes humains primaires de peau pour affirmer cette hypothèse.

Dans un second temps, nous avons étudié la modulation de l'expression des facteurs de virulence staphylococciques par des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques. La connaissance du comportement de *S. aureus* vis à vis des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques peut avoir son importance dans le choix d'une thérapeutique adaptée pour le traitement d'une infection staphylococcique à composante toxinique. Après une revue exhaustive de la littérature, nous avons montré que des concentrations sub-inhibitrices de clindamycine conservaient un effet inhibiteur sur l'expression de la PVL, l'Hla et de la TSST-1 pour des souches de *S. aureus* exprimant une résistance inductible aux macrolides. Ceci valide donc son utilisation comme traitement adjuvant anti-toxinique lors d'une infection staphylococcique à composante toxinique à souche MLS_B inductible. Néanmoins, dans la suite du travail, nous avons montré que des concentrations sub-inhibitrices de clindamycine pouvaient entraîner une augmentation de l'expression de PSM α et Hld chez certaines souches de

S. aureus, avec un effet inducteur plus fréquemment observé qu'un effet inhibiteur. A l'inverse, l'oxacilline à dose sub-inhibitrice entraînait une répression quasi-constante de l'expression des PSM α et Hld, contrastant avec l'effet inducteur retrouvé avec la PVL, l'Hla et la TSST-1. Ces observations posent plusieurs nouvelles questions : à quoi sont dus les effets souches-dépendants observés avec la clindamycine et le linézolide sur l'expression des PSM α et Hld ? L'effet inducteur sur l'expression des PSM α et Hld plus fréquemment retrouvé avec la clindamycine doit-il remettre en question son utilisation en tant que molécule anti-toxinique ? Doit-on préférer l'utilisation du linézolide comme anti-toxinique, comme cette molécule a une activité inhibitrice sur l'expression de la PVL, Hla et TSST-1 et moins fréquemment inductrice sur l'expression des PSM α et Hld ? La réponse devrait sans doute être modulée en fonction du panel de toxines produites par la souche de *S. aureus* responsable de l'infection, et notamment du caractère producteur de PVL ou non. Enfin, l'effet inhibiteur de l'oxacilline sur l'expression des PSM α n'augmenterait-il pas le risque de développement de bactéries persistantes, ces derniers limitant la fréquence d'apparition de la tolérance aux antibiotiques ? De nouvelles investigations seront nécessaires afin de répondre à l'ensemble de ces questions.

Annexes

Annexe 1 : Liste des principaux médiateurs libérés par les mastocytes, leurs fonctions biologiques ainsi que les stimuli permettant leur libération/excrétion par les mastocytes. D'après (Urb et Sheppard 2012; St John et Abraham 2013; Gupta et Harvima 2018; Mukai et al. 2018; Piliponsky et Romani 2018).

Médiateurs	Rôle / fonction biologique	Principaux stimuli déclenchant la libération
Enzymes lysosomales		
β -hexosaminidase		Stimuli entraînant la dégranulation mastocytaire
Protéases	<p>La spécificité des cibles des protéases libérées par les mastocytes a été conservée pendant des millions d'années lors de l'évolution des mammifères. Leurs rôles sont donc majeurs :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Détoxification de peptides endogènes formés lors d'une infection bactérienne ou parasitaire. - Clivage de protéines endogènes de jonction augmentant la perméabilité intestinale. - Destruction de molécules endogènes permettant l'interaction/attachement hôte-pathogène. - Remodelage tissulaire. 	
Chymase	Protéase pouvant générer du TGF- β 1 actif à partir de la forme latente inactive.	Stimuli entraînant la dégranulation mastocytaire
Tryptase	Médiateur pruritogène et algogénique.	
Protéoglycane		
Héparine	Amélioration des fonctions des chimiokines et cytokines.	Stimuli entraînant la dégranulation mastocytaire
Amines biogéniques		
Histamine	<p>Médiateur vaso-actif augmentant la perméabilité vasculaire, améliorant la transmigration des phagocytes.</p> <p>Induction de l'expression des molécules d'adhésion à la surface de l'endothélium permettant de capturer les phagocytes.</p> <p>Amélioration de la production de mucus par les cellules épithéliales.</p> <p>Médiateur pruritogène et algogénique.</p>	Stimuli entraînant la dégranulation mastocytaire
Sérotinine	Neurotransmetteur impliqué dans la communication mastocyte-système nerveux.	

		Médiateur algogénique et vaso-actif.
Dopamine	Neurotransmetteur	
Cytokines		
TNF- α préformé/ néoformé	Cytokine pro-inflammatoire initiant le processus inflammatoire et le recrutement des PNN.	<p>Stimuli entraînant la dégranulation mastocytaire</p> <p><i>Mastocytes humains cutanés et pulmonaires :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Complexe IgE-anti-IgE (FcϵRI) <p><i>Mastocytes humains cutanés :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Libération à l'état basal - Sulfate de morphine - Substance P - SCF - Composé 48/80 - UVB - LPS et PGN (mastocytes pré-stimulés à l'IL-4) <p><i>Mastocytes murins :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Complexe IgE-Ag (FcϵRI) - LPS - PGN
IL-1 β	Interleukine pro-inflammatoire.	<p><i>Mastocytes humains et murins :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - LPS - PGN <p><i>Mastocytes murins :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Complexe IgE-Ag (FcϵRI) - IgG <i>via</i> FcγR - ATP extracellulaire
IL-2	Développement des LTreg et maintien de l'homéostasie.	<p><i>Mastocytes humains :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - IL-33 - IL-9 <p><i>Mastocytes murins :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Complexe IgE-Ag (FcϵRI)
IL-3	Effet autocrine promouvant la croissance, la survie et l'expansion des mastocytes.	<p><i>Mastocytes humains :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Libération à l'état basal dans la muqueuse gastroduodénale <p><i>Mastocytes murins et humains :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Complexe IgE-Ag (FcϵRI)

IL-4	Favorisation du développement de la réponse immunitaire T de type Th2 avec production d'IgE (promotion de la réaction allergique).	<p>Mastocytes humains :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Libération à l'état basal - Complexe IgE-anti-IgE (FcεRI) - IL-33 <p>Mastocytes murins :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Complexe IgE-Ag (FcεRI) - PGN - LPS
IL-5	Interleukine de type 2 permettant le développement et la survie des PNEo.	<p>Mastocytes humains et murins :</p> <ul style="list-style-type: none"> - IL-33 - PGN - LPS <p>Mastocytes humains :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Libération à l'état basal dans les muqueuses bronchique et gastroduodénale - Complexe IgE-anti-IgE (FcεRI) <p>Mastocytes murins :</p> <p>Complexe IgE-Ag (FcεRI)</p>
IL-6	Interleukine pro-inflammatoire. Effet autocrine favorisant la croissance des mastocytes.	<p>Mastocytes humains :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Libération à l'état basal dans les muqueuses nasale et bronchique - IL-33 <p>Mastocytes murins :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Complexe IgE-Ag (FcεRI) - LPS
IL-9	Effet autocrine promouvant les maladies allergiques médiées par les IgE.	<p>Mastocytes murins :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Complexe IgE-Ag (FcεRI) - IL-1β
IL-10	Interleukine anti-inflammatoire permettant de réguler le processus inflammatoire et immun.	<p>Mastocytes humains :</p> <ul style="list-style-type: none"> - IL-33 <p>Mastocytes murins :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Complexe IgE-Ag (FcεRI) - LPS

IL-12	Favorisation du développement de la réponse immunitaire T de type Th1 avec production d'IFN γ (promotion de l'activité antibactérienne et antivirale).	<p>Mastocytes humains :</p> <ul style="list-style-type: none"> - LPS - SCF <p>Mastocytes murins :</p> <ul style="list-style-type: none"> - LPS - IFNγ
IL-13	Favorisation du développement de la réponse immunitaire T de type Th2 avec production d'IgE (promotion de la réaction allergique).	<p>Mastocytes humains et murins :</p> <ul style="list-style-type: none"> - LPS - PGN <p>Mastocytes humains :</p> <ul style="list-style-type: none"> - IL-33 - IL-1β <p>Mastocytes murins :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Complexe IgE-Ag (FcϵRI) - SCF - IgG via FcγR
IL-16	Interleukine pro-inflammatoire, chimio-attractant pour les lymphocytes T, les monocytes, les PNEo et les cellules dendritiques. Effet autocrine promouvant la maturation et la différenciation des mastocytes à partir de cellules immatures.	<p>Mastocytes humains :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Libération à l'état basal
IL-33	Effet autocrine favorisant la production d'IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, GM-CSF et autres chimiokines et promouvant la maturation et différenciation des mastocytes à partir de cellules souches hématopoïétique.	<p>Mastocytes murins :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Complexe IgE-Ag (FcϵRI)
IFN γ	Cytokine antibactérienne et antivirale.	<p>Mastocytes murins :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Libération à l'état basal <i>in vivo</i> - Complexe IgE-Ag (FcϵRI) - Complexe IgE-anti-IgE (FcϵRI) - IL-12

**Facteurs de
croissances
cellulaires**

GM-CSF	Cytokine favorisant le développement des granulocytes et macrophages à partir de précurseurs immatures.	<p>Mastocytes humains :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Libération à l'état basal dans la muqueuse gastro-duodénale - Complexe IgE-anti-IgE (FcεRI) - LPS - PGN - IL-33 <p>Mastocytes murins :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Complexe IgE-Ag (FcεRI)
NGF	<p>Promotion du développement, croissance, survie et fonctions des nerfs périphériques, favorisés par une proximité tissulaire des deux types cellulaires.</p> <p>Effet autocrine favorisant le développement et la maturation des mastocytes.</p> <p>Médiateur indispensable à la communication mastocytes-système nerveux : pruritogène et algogénique</p>	<p>Mastocytes humains et murins :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Libération à l'état basal
EGF	Promotion de la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales, endothéliales et des fibroblastes.	<p>Mastocytes humains de la thyroïde :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Libération à l'état basal
FGF2/bFGF	Facteur pro-angiogénique associé à l'héparine dans les granules mastocytaires.	<p>Mastocytes humains et murins :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Libération à l'état basal <p>Mastocytes humains :</p> <ul style="list-style-type: none"> - IL-17A
SCF	Effet autocrine, indispensable à la différenciation et maturation des mastocytes.	<p>Mastocytes humains :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Libération à l'état basal dans le derme, la muqueuse bronchique et cardiaque - Complexe IgE-anti-IgE (FcεRI)
PDGF	Facteur mitogène contribuant à l'angiogenèse en facilitant la croissance des vaisseaux sanguins.	<p>Mastocytes humains de la thyroïde :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Libération à l'état basal

VEGF	Facteur de croissance stimulant l'angiogenèse.	<p>Mastocytes humains :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Libération à l'état basal - Complexe IgE-anti-IgE (FcεRI) - IL-17A - IL-1 - IL-33 - Substance P <p>Mastocytes murins :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Libération à l'état basal - Complexe IgE-Ag (FcεRI)
TGF-β1	Facteur contribuant à l'angiogenèse, la fibrose et la réparation tissulaire. Influence également l'immunité cellulaire T, B les cellules NK, les cellules dendritiques et les PNEo. Effet inhibiteur autocrine et paracrine sur les mastocytes inhibant la libération de médiateurs suite à la stimulation par les IgE. Médiateur anti-inflammatoire.	<p>Mastocytes murins :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Complexe IgE-Ag (FcεRI) - Composé 48/80 - IL-33 - IL-9
Chimiokines (CCL1-CCL5, CCL7-CCL9, CCL11, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL2, CXCL8, CXCL10)	Molécules attractives pour les cellules de l'immunité et régulant la réponse immunitaire.	<p>Mastocytes humains et murins :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Complexe IgE-anti-IgE et IgE-Ag (FcεRI) - IL-33 <p>Mastocytes humains</p> <ul style="list-style-type: none"> - LPS - IL-1β - SCF - Substance P - Composé 48/80 <p>Mastocytes murins :</p> <ul style="list-style-type: none"> - IgG via FcγR
Eicosanoïdes Prostaglandines (PGD2, PGE2) Leucotriènes (LTC4, LTB4)	Médiateurs pro-inflammatoires, vaso-actifs et promouvant l'expression d'adhésines par les cellules endothéliales facilitant le recrutement des phagocytes (PNN pour LTC4, PNEo pour LTB4). Promotion de l'angiogénèse. Induction de la contraction des muscles lisses sous-jacents aux muqueuses.	<p>Mastocytes humains et murins :</p> <ul style="list-style-type: none"> - PGN - LPS



Supplementary Material

Delta Hemolysin and Phenol-soluble Modulins, but not Alpha Hemolysin or Panton-Valentine Leukocidin, Induce Mast Cell Activation

Elisabeth Hodille^{a,b}, Charlotte Cuercq^{b,d}, Cédric Badiou^a, Françoise Bienvenu^{b,e}, Jean-Paul Steghens^{b,d}, Régine Cartier^{b,f}, Michèle Bes^{a,b,c}, Anne Tristan^{a,b,c}, Adriana Plesa^{b,g}, Vien T.M. Le^h, Binh An Diep^h, Gérard Lina^{a,b,c,*}, Oana Dumitrescu^{a,b,c}

^a Centre International de Recherche en Infectiologie, Inserm U1111, Université Lyon 1, CNRS UMR5308, ENS Lyon, Lyon, France

^b Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

^c Centre National de Référence des Staphylocoques, Bron, France

^d Laboratoire de Biochimie, Centre de Biologie Sud, Lyon, France

^e Laboratoire d'Immunologie, Centre de Biologie Sud, Lyon, France

^f Laboratoire de Biochimie, Groupement Hospitalier Est, Lyon, France

^g Laboratoire d'hématologie, Centre de Biologie Sud, Lyon, France

^h Division of Infectious Diseases and Vaccinology, School of Public Health, University of California Berkeley, California, USA

* **Correspondence:** Corresponding Author: gerard.lina@univ-lyon1.fr

1 Supplementary Data

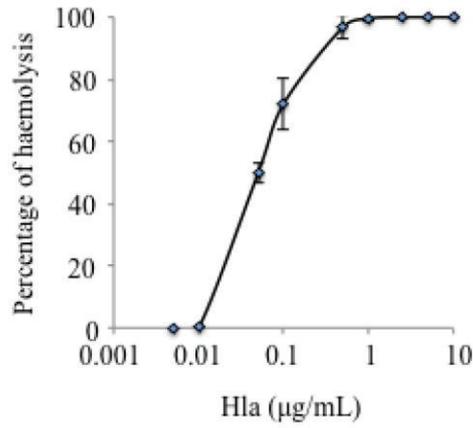
Supplementary Material

Flow cytometric analysis of CD88 expression on HMC-1

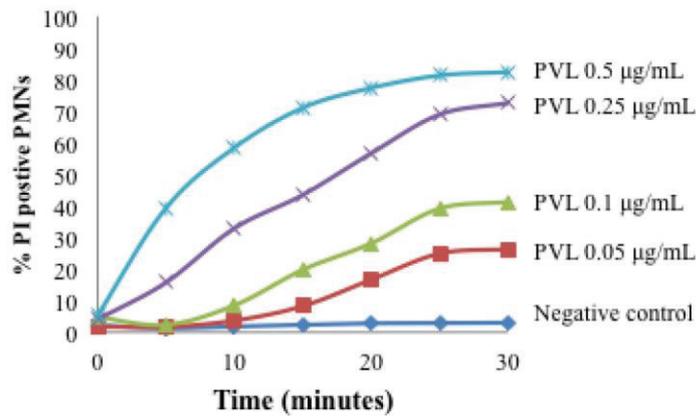
The CD88 expression on HMC-1 was analyzed by multi-parameter cytometry, using FACSCanto II flow cytometer and monoclonal antibodies (MoAb) anti-CD88 FITC (clone P12/1, AbDSerotec). HMC-1 cells (5×10^5 cells in 100 μ L) were incubated with 5 μ L of monoclonal antibodies anti-CD88 or without (control) during 15 min at dark, then HMC-1 cells were washed with PBS buffer and pelleted at $2000 \times g$ for 5 min. Supernatant was removed and pellet was resuspended with 200 μ L of PBS buffer and analyzed.

2 Supplementary Figures and Tables

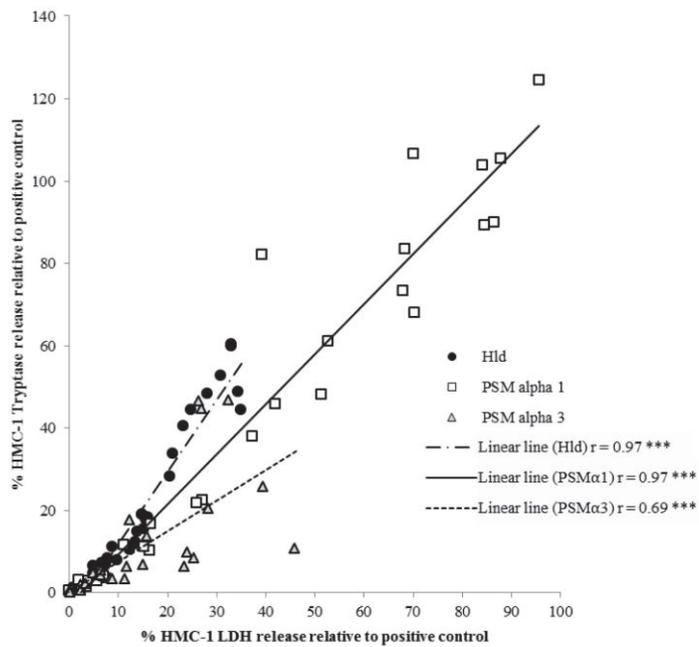
2.1 Supplementary Figures



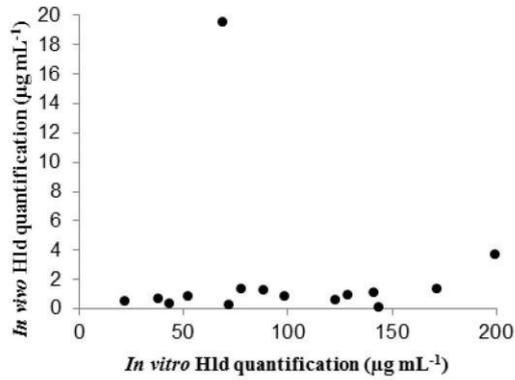
Supplementary Figure 1. Hla induces pore formation in rabbit erythrocytes. 0.001 µg/mL = 3×10^{-11} M; 0.01 µg/mL = 3×10^{-10} M; 0.1 µg/mL = 3×10^{-9} M; 1 µg/mL = 3×10^{-8} M; 10 µg/mL = 3×10^{-7} M



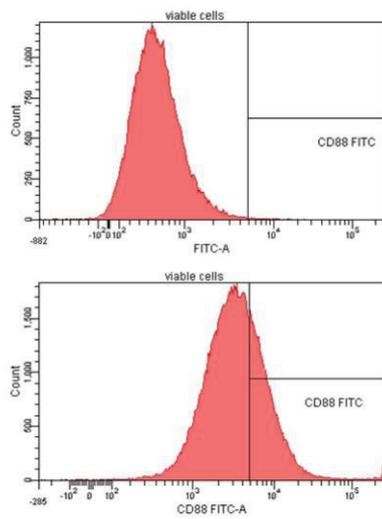
Supplementary Figure 2. PVL induces pore formation in human PMNs. 0.05 µg/mL = 1.5×10^{-9} M; 0.1 µg/mL = 3×10^{-9} M; 0.25 µg/mL = 7.8×10^{-9} M; 0.5 µg/mL = 1.5×10^{-8} M



Supplementary Figure 3. Tryptase release according to LDH release for PSM α 1, PSM α 3, and Hld. To evaluate correlation between tryptase and LDH release, we performed correlation tests with Pearson method for each toxin. r = correlation coefficient. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.



Supplementary Figure 4. *In vivo* H1d quantification according to *in vitro* H1d production. H1d was quantified by HPLC-MS. To evaluate correlation between tryptase and LDH release, we performed correlation tests with Pearson method for each toxin.



Supplementary Figure 5. Binding of anti-CD88 MoAb 12/1 to HMC-1 cells. FACS histograms performed on 5×10^5 cells. Upper: Negative control without MoAb. Lower: anti-CD88 MoAb assay.

Table S1. Oligonucleotides used for constructing in-frame gene deletions using the pKOR1 allelic replacement system (Diep et al., 2010; Bae and Schnewind, 2006).

Oligo ID	Nucleotide sequence 5' to 3'
<i>For inactivation of hld gene by changing its start codon, ATG, to ATT (the G to T change is underlined)</i>	
hld-X1	ctgtacttaataaccactaattatagctg
hld-X2	CACCGATTGTTGAAATGATATCTTGTGC <u>A</u> ATTGAAATCACTCCTTCC
hld-X3	GGAAGGAGTGATTTC AAT <u>I</u> GCACAAGATATCATTTC AACAATCGGTG
hld-X4	CCCAACTTATCTGTTATGATTACG
hld-X5	GGGG ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT ccacctactatcacactetc
hld-X6	GGGG ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT GATATCCTGCTCGTAGTGGTGC
hld-S1	ccaaaaagaagaaggtgcatgtgc
hld-S2	CATTACAAAAAGGCCGCGAG
<i>For in-frame deletion of genes encoding phenol soluble modulins α-type 1,2,3,4 (psmA1-4)</i>	
psmA-X1	TACCCGCCACTCGCCAGTC
psmA-X2	GTATGTCCCACTAAGAACGTCCTATACCCCTCTTTGCTTATGAGTTAACTTC
psmA-X3	GAAGTTAACTCATAAGCAAAGGAGGGTATAGGACGTTCTTAGTGGGACATAC
psmA-X4	GAGCGAGTCAGCAGGATGG
psmA-X5	GGGG ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT CAACCACATAAAAAATGTCATGCTTG
psmA-X6	GGGG ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CATCGCATAACCTGAAACAGAAG
psmA-S1	CAATAGTAGATTCTGTACATAATGG
psmA-S2	CATATCAATGGCAAATTAGACCAGC
<i>For in-frame deletion of agrA</i>	
agrA-X1	gcacaccatatctaactaactaacaagg
agrA-X2	CACCGATGCATAGCAGTGTTCCTCATAAGGATTATCAGTTGCGAG
agrA-X3	CTCGCAACTGATAATCCTTATGAGGAACACTGCTATGCATCGGTG
agrA-X4	gaagcaaacactgcgttagc
agrA-X5	GGGG ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT gttatttcgactatctactgcttac
agrA-X6	GGGG ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT cctctgctgatggtattgaacc
agrA-S1	gattagtatcgaatacccgatgaag
agrA-S2	gcaggatttagcaaccgatg

Effect of sub-inhibitory antibiotic concentrations in <u>PVL</u> synthesis						
Antibiotics	Growth conditions/Added antibiotics point	Concentration	<i>S. aureus</i> strain	Effect	Method	Reference
Nafcillin	BHI broth, shaking, 37°C / Exponential phase	1/3 MIC	CA-MRSA (clinical isolate), ST1 USA 400	After 24h of culture, PVL mRNA remained modestly expressed unlike control	Northern Blot	Stevens et al. 2007 (1)
				Stimulation of PVL production after 10, 24 and 34h of culture	Western Blot	
Oxacillin	CCY broth, static conditions, 24h	1/2; 1/4; 1/8 MIC	LUG855, 5	Significant increase of PVL production at 24h	ELISA	Dumitrescu et al. 2007 (2)
			CA-MRSA (2 ST80, ST1, ST8, ST59)			
			LUG1124 (RN6390 with plasmid carrying PVL::lacZ fusion)	Increase of <i>pv</i> / promoter activation	Reporter fusion	
	CCY broth, 24h	1/2; 1/4; 1/8 MIC	LUG855	Significant increase of PVL production for 1/4 and 1/8 MIC at 24h	ELISA	Dumitrescu et al. 2008 (3)
	CCY broth, shaking, 37°C, 6h	1/4 MIC	LUG855, 4 CA-MRSA (2 ST80, ST1, ST8)	Significant increase of PVL production at 6h (X 2.10 – 6.5)	ELISA	Dumitrescu et al. 2011 (4)
CCY broth, shaking, 37°C, 10h and 20h	0.5µg/mL	LUG855	Significant increase of PVL mRNA at 6h (X 17.3)	qPT-PCR	Rudkin et al. 2014 (5)	
		CA-MRSA, LAC ST8 USA-300	Significant increase of PVL mRNA at 10h (X3.11) and 20h (X51.75)	qRT-PCR		
				Significant increase of PVL production at 20h (X 3.01)	Western Blot	

				CA-MRSA, MW2 ST1 USA400	Significatn increase of PVL mRNA at 20h (X2.15)		qRT-PCR		Turner et al. 2015 (6)
					Significant increase of PVL production at 20h (X 4.1)	None significant effect on PVL mRNA	Western Blot	Western Blot	
Flucloxacillin	CCY broth, shaking, 37°C / Exponential phase	1/4; 1/2 MIC	1 clinical MSSA	1 clinical MSSA	None significant effect on PVL mRNA	None significant effect on PVL production	qRT-PCR	Western Blot	Turner et al. 2015 (6)
	CCY broth, shaking, 37°C, 6h	1/4 MIC	LUG855, 4	LUG855, 4 CA-MRSA (2 ST80, ST1, ST8)	Significant increase of PVL production at 6h (X 2.5 – 6.5)		ELISA		
Imipenem	CCY broth, static conditions, 24h	1/2; 1/4; 1/8 MIC	LUG855, 5	LUG855, 5 CA-MRSA (2 ST80, ST1, ST8, ST59)	Significant concentration-dependant decrease of PVL production		ELISA		Dumitrescu et al. 2007 (2)
	CCY broth, 24h	1/2; 1/4; 1/8 MIC	LUG855	LUG855	Significant increase of PVL mRNA at 6h (X 22.5)		qPT-PCR		Dumitrescu et al. 2008 (3)
Clindamycin	MH broth, shaking, 4 and 6h / Exponential phase	1/2; 1/4; 1/8 MIC	4 CA-MRSA (ST1, ST8, ST80, ST30)	4 CA-MRSA (ST1, ST8, ST80, ST30)	Significant strong concentration-dependant decrease of PVL mRNA at 4h and 6h (- 2.2 to 11.76 X)		qRT-PCR		Otto et al. 2013 (7)
	CCY broth, static conditions, 24h	1/2; 1/4 MIC			Significant concentration-dependant decreased of PVL production at 24h (max - 81%)		ELISA		
	CCY broth, shaking, 37°C / Exponential phase	1/4; 1/2 MIC	1 clinical MSSA	1 clinical MSSA	None significant effect on PVL mRNA		qRT-PCR		Turner et al. 2015 (6)

				None significant effect on PVL production	Western Blot	
Linezolid	CCY broth, static conditions, 24h	1/2; 1/4; 1/8 MIC	LUG855, 2 CA-MRSA (ST1, ST8)	Significant concentration-dependant decrease of PVL production	ELISA	Dumitrescu et al. 2007 (2)
		1/2 MIC	LUG1124 (RN6390 with plasmid carrying PVL:: <i>lacZ</i> fusion)	Significant decrease of <i>pvl</i> promoter activation	Reporter fusion	
	CCY broth, 24h	1/2; 1/4; 1/8 MIC	LUG855	Significant concentration-dependant decrease of PVL production from 1/4 to 1/2 MIC at 24h	ELISA	Dumitrescu et al. 2008 (3)
	MH broth, shaking, 4 and 6h / Exponential phase	1/2; 1/4; 1/8 MIC	5 CA-MRSA (ST1, ST8, ST80, ST30, ST398)	Significant concentration-dependant decrease of PVL mRNA, only constant for 1/2 MIC	qRT-PCR	Otto et al. 2013 (7)
		1/2; 1/4 MIC			ELISA	
	CCY broth, shaking, 37°C / Exponential phase	1/4; 1/2 MIC	1 clinical MSSA	None significant effect on PVL mRNA	qRT-PCR	Turner et al. 2015 (6)
			3 CA-MRSA (2 ST80, ST8)	None significant effect on PVL production, except a slight decrease after 3h	Western Blot	
	Fusidic acid	CCY broth, static conditions, 24h	1/2; 1/4; 1/8 MIC	Significant concentration-dependant decrease of PVL production	ELISA	Dumitrescu et al. 2007 (2)

	CCY broth, 24h	1/2; 1/4; 1/8 MIC	LUG855	Significant concentration- dependant decrease of PVL production from 1/4 to 1/2 MIC at 24h	ELISA	Dumitrescu et al. 2008 (3)
Tigecycline	MH broth, shaking, 4 and 6h / Exponential phase	1/2; 1/4; 1/8 MIC	5 CA-MRSA (ST1, ST8, ST80, ST30, ST398)	Significant decrease of PVL mRNA for 3 strains on 5 at 4h	qRT-PCR	Otto et al. 2013 (7)
	CCY broth, static conditions, 24h	1/2 ; 1/4 MIC			ELISA	
Rifampicin	CCY broth, 24h	1/2; 1/4; 1/8 MIC	LUG855-R5 (intermediate susceptibility to rifampicin)	Significant concentration- dependant decrease of PVL production from 1/8 to 1/2 MIC at 24h	ELISA	Dumitrescu et al. 2008 (3)
Pristinamycin	CCY broth, 24h	1/2; 1/4; 1/8 MIC	LUG855	Significant concentration- dependant decrease of PVL production only for 1/2 MIC	ELISA	Dumitrescu et al. 2008 (3)
Tetracyclin	CCY broth, 24h	1/2; 1/4; 1/8 MIC	LUG855	Significant concentration- dependant decrease of PVL production only for 1/2 MIC	ELISA	Dumitrescu et al. 2008 (3)
Ofloxacin	CCY broth, 24h	1/2; 1/4; 1/8 MIC	LUG855	Significant concentration- dependant decrease of PVL production only for 1/2 MIC	ELISA	Dumitrescu et al. 2008 (3)
Co-trimoxazole	CCY broth	1/2; 1/4; 1/8 MIC	LUG855	Unmodified PVL production	ELISA	Dumitrescu et al. 2008 (3)
Vancomycin	CCY broth, static conditions	1/2; 1/4; 1/8 MIC	LUG855, 5 CA-MRSA (2 ST80, ST1, ST8, ST59)	Unmodified PVL production	ELISA	Dumitrescu et al. 2007 (2)
		1/2 MIC	LUG1124 (RN6390 with plasmid carrying	Unmodified pvl promoter activation	Reporter fusion	

Effect of sub-inhibitory antibiotic concentrations in <u>PSM</u> synthetis						
Antibiotics	Growth conditions/Added antibiotics point	Concentration	<i>S. aureus</i> strain	Effect	Method	Reference
Oxacillin	TSB broth, shaking, 24h	1/50 MIC	CA-MRSA (ST8 USA 300): LAC	Significant decrease of PSM α 1-4 production	HPLC-MS	Joo et al. 2010 (8)
				<i>psmα</i> mRNA unmodified, significant decreased of <i>psmβ</i> mRNA	qRT-PCR	
	TSB, shaking, 20h	0.5 μ g/mL	2 CA-MRSA (1ST8 USA 300 and 1 ST1 USA 400)	Decrease of PSM α 1-4 and Hld production	HPLC-MS	Rudkin et al. 2014 (5)
Clindamycin	TSB broth, shaking, 24h	1/2 MIC	CA-MRSA (ST8 USA 300): LAC	Significant increase of PSM α 1-4 production	HPLC-MS	Joo et al. 2010 (8)
				Significant increase of <i>psmα</i> and <i>psmβ</i> mRNA	qRT-PCR	
		1/13 MIC	HA-MRSA Sanger 252	Significant increase of PSM α 1-4 production	HPLC-MS	
Clindamycin	Tryptic soy broth, shaking, 24h	1/2; 1/4; 1/8 MIC	7 MSSA or MRSA PVL + from SSTIs (clinical isolates)	Significant decrease of PSM α 1-4 production for 1/2 MIC, significant decrease of PSM α 3 production for 1/4 MIC on 5 strains /7, unmodified for 1/8 MIC	HPLC-MS	Yamaki et al. 2011 (9)
				Significant increased production at PSM α 1-4 for 1/8 MIC and only for 7 isolates	HPLC-MS	
	TSB broth, shaking, 24h	1/4; 1/8 MIC	11 MRSA clinical isolates + ST8 USA 300 + USA 600			

Linezolid	TSB broth, shaking, 24h	1/10 MIC	CA-MRSA (ST8 USA 300): LAC	Significant increase of PSM α 1-4 production	HPLC-MS	Joo et al. 2010 (8)
	TSB broth, shaking, 24h	1/5 MIC	HA-MRSA Sanger 252	Significant increase of PSM α 1-4 production		
TR-700 (Tedizolid)	TSB broth, shaking, 24h	1/4; 1/8 MIC	11 MRSA clinical isolates + ST8 USA 300 + USA 600	Significant increased production for PSM α 1-4 at 1/8 MIC only for 3 isolates and inhibitory effect for 5 isolates	HPLC-MS	Yamaki et al. 2013 (10)
		1/2; 1/4; 1/8 MIC	21 MSSA or MRSA PVL + from SSTIs (clinical isolates)	Significant decrease of PSM α 1-4 production for 1/2 MIC, unmodified for 1/4 and 1/8 MIC		
Erythromycin	Tryptic soy broth, shaking, 24h	1/10 MIC	CA-MRSA (ST8 USA 300): LAC	Significant increase of PSM α 1-4 production	HPLC-MS	Joo et al. 2010 (8)
		1 MIC	HA-MRSA Sanger 252	Significant increase of PSM α 1-4 production		
Tetracycline	TSB broth, shaking, 24h	1/12 MIC	CA-MRSA (ST8 USA 300): LAC	Significant increase of PSM α 1-4 production	HPLC-MS	Joo et al. 2010 (8)
		1/20 MIC	HA-MRSA Sanger 252	Significant increase of PSM α 1-4 production		
Tigécycline	TSB broth, shaking, 24h	1/4; 1/8 MIC	11 MRSA clinical isolates + ST8 USA 300 + USA 600	Increased production for PSM α 1-4 at 1/4 and 1/8 MIC, for 11 isolates	HPLC-MS	Yamaki et al. 2013 (10)

Vancomycin	BHI broth, 4h and 11h	1 MIC	10 MRSA SCCmec II clinical isolates	Significant increase of hld mRNA (X 2.07) at 4 h and at 11h (X 2.53)	qRT-PCR	Cazares- Dominguez et al. 2015 (11)
Co-trimoxazole	TSB broth, shaking, 24h	1/2 MIC	CA-MRSA (ST8 USA 300): LAC	No relevant effect	HPLC-MS	Joo et al. 2010 (8)
		1 MIC	HA-MRSA Sanger 252			

Effect of sub-inhibitory antibiotic concentrations in <i>SpA</i> synthetis						
Antibiotics	Growth conditions/Added antibiotics point	Concentration	<i>S. aureus</i> strain	Effect	Method	Reference
Clindamycin	MH broth, 2h	1/2; 1/4 MIC	Cowan I and 3 clinical isolates	Significant decrease of SpA production	Indirect Hemagglutination (sheep erythrocyte previously sensitized with immunoglobulin G)	Veringa et al. 1986 (12)
	CYGP broth, shaking, from 0 to 6h	0.02 or 0.04 µg/mL	NCTC 8325 background with fused gene <i>spa</i> <i>::blaZ</i>	Concentration-dependant moderate inhibition of SpA mRNA transcription over time (BlaZ activity decreased with clindamycin)	reporter fusion gene	
	CYGP broth, shaking, from 0 to 6h	0.02 µg/mL	NCTC 8325 background with <i>tetM</i> replacing <i>agr</i> and WCUH29 (clinical isolate)	Decrease of SpA mRNA over time (stronger effect than reporter BlaZ fusion)	Nothern Blot	Herbert et al. 2001 (13)
	MH broth, shaking, 4 and 6h	1/2; 1/4; 1/8 MIC	4 CA-MRSA (ST1, ST8, ST80, ST30)	Significant strong concentration-dependant decrease of SpA mRNA from 1/8 MIC to 1/2 at 4 and 6 h (from 2.11 to 50 X)	qRT-PCR	Otto et al. 2013 (7)

	MH broth, shaking, 18h	1/2; 1/4 MIC	4 CA-MRSA (ST1, ST8, ST80, ST30)	Significant decrease of SpA production (from 2.15 to 10 X depending strains) for 1/2 and 1/4 MIC	ELISA	Cardot-Martin et al. 2015 (14)
	MH broth, shaking, 6h	1/4 MIC	6 CA-MRSA (2 ST80, 2 ST8, 2 ST30)	Significant decrease of SpA mRNA for CA-MRSA ST80, ST30 but not ST8	qRT-PCR	
	MH broth, shaking, 18h	1/4 MIC	6 CA-MRSA (2 ST80, 2 ST8, 2 ST30)	Significant decrease of SpA production for all strains	ELISA	
	TSB broth, shaking, 24h	1/4; 1/8 MIC	11 MRSA clinical isolates + ST8 USA 300 + USA 600	Concentration-dependant decrease of SpA production for all isolates	Western Blot	Yamaki et al. 2013 (10)
	LB broth, shaking, to log growth	9/10; 1/2; 1/4; 1/8 MIC	ATCC 29213	Complete inhibition of SpA production at 1/2 and 9/10 MIC	gel electrophoresis followed by MALDI-TOF	Bernardo et al. 2004 (15)
	MH broth, shaking, 4 and 6h	1/2; 1/4; 1/8 MIC	5 CA-MRSA (ST1, ST8, ST80, ST30, ST398)	Significant concentration and time-dependant decrease of SpA mRNA (from 2 to 9.57 X)	qRT-PCR	Otto et al. 2013 (7)
Linezolid	MH broth, shaking, 18h	1/2; 1/4 MIC	5 CA-MRSA (ST1, ST8, ST80, ST30, ST398)	Significant decrease of SpA production for 1/2 MIC (-25.2%)	ELISA	
	MH broth, shaking, 6h	1/4 MIC	6 CA-MRSA (2 ST80, 2 ST8, 2 ST30)	Significant decrease of SpA mRNA for CA-MRSA ST80, ST30 but not ST8	qRT-PCR	Cardot-Martin et al. 2015 (14)
	MH broth, shaking, 18h	1/4 MIC	6 CA-MRSA (2 ST80, 2 ST8, 2 ST30)	Significant decrease of SpA production for CA-MRSA ST80, ST30 but not ST8	ELISA	

	TSB broth, shaking, 24h	1/4; 1/8 MIC	11 MRSA clinical isolates + ST8 USA 300 + USA 600	Concentration-dependant decrease of SpA production for all isolates	Western Blot	Yamaki et al. 2013 (10)
	MH broth, shaking, 4 and 6h	1/2; 1/4; 1/8 MIC	5 CA-MRSA (ST1, ST8, ST80, ST30, ST398)	Significant decrease of SpA mRNA, only for one strain (ST 398) at 4 h for 1/2 and 1/4 MIC	qRT-PCR	Otto et al. 2013 (7)
	MH broth, shaking, 18h	1/2; 1/4 MIC	5 CA-MRSA (ST1, ST8, ST80, ST30, ST398)	Significant decrease of SpA production for all strains except ST8 USA 300 for 1/2MIC	ELISA	
Tigecycline	MH broth, shaking, 6h	1/4 MIC	6 CA-MRSA (2 ST80, 2 ST8, 2 ST30)	Significant decrease of SpA mRNA for ST 80 but significant increase for ST8	qRT-PCR	Cardot-Martin et al. 2015 (14)
	MH broth, shaking, 18h	1/4 MIC	6 CA-MRSA (2 ST80, 2 ST8, 2 ST30)	Significant decrease of SpA production for ST 80 but significant increase for ST8	ELISA	
	TSB broth, shaking, 24h	1/4; 1/8 MIC	11 MRSA clinical isolates + ST8 USA 300 + USA 600	Concentration-dependant decrease of SpA production for all isolates	Western Blot	Yamaki et al. 2013 (10)
Oxacillin	NYEC plate with antibiotics discs, 20h	luciferase activity measured around inhibition zone	Newman background with fused gene spa::lux	Slight stimulation of SpA mRNA transcription	reporter fusion gene	Subrt et al. 2011 (16)
	Tryptic soy plate (containing X-gal) with antibiotics discs, 16h	Galactosidase activity measured around inhibition zone	PC203: NCTC 8325 background with fused gene spa::lacZ	Increase of SpA mRNA transcription	reporter fusion gene	Nielsen et al. 2012 (17)

Cloxacillin, Cefoperazone	NYEC plate with antibiotics discs, 20h	Luciferase activity measured around inhibition zone	Newman background with fused gene spa::lux	No relevant effect of SpA mRNA transcription	reporter fusion gene	Subrt et al. 2011 (16)
Methicillin	NYEC plate with antibiotics discs, 20h	Luciferase activity measured around inhibition zone	Newman background with fused gene spa::lux	Moderate stimulation of SpA transcription	reporter fusion gene	Subrt et al. 2011 (16)
Nafcillin	NYEC plate with antibiotics discs, 20h	Luciferase activity measured around inhibition zone	Newman background with fused gene spa::lux	Moderate stimulation of SpA transcription	reporter fusion gene	Subrt et al. 2011 (16)
	NYEC plate with antibiotics discs, 16h	Colonies stimulated with sub-inhibitory concentration of antibiotics removed immediately outside of th zone of inhibition	Newman	Increase of SpA mRNA (X 2.68)	qRT-PCR	Subrt et al. 2011 (16)
Penicillin	Tryptic soy plate (containing X-gal) with antibiotics discs, 16h	Galactosidase activity measured around inhibition zone	PC203: NCTC 8325 background with fused gene spa::lacZ	Increase of SpA mRNA transcription	reporter fusion gene	Nielsen et al. 2012 (17)
	NYEC plate with antibiotics discs, 20h	Luciferase activity measured around inhibition zone	Newman background with fused gene spa::lux	Strong stimulation of SpA transcription	reporter fusion gene	Subrt et al. 2011 (16)
Cefalotin	NYEC plate with antibiotics discs, 20h	Luciferase activity measured around inhibition zone	Newman background with fused gene spa::lux	Strong stimulation of SpA transcription	reporter fusion gene	Subrt et al. 2011 (16)

	Colonnies stimulated with sub-inhibitory concentration of antibiotics removed immediately outside of the zone of inhibition	Newman	Increase of SpA mRNA (X 4.56)	qRT-PCR	Nielsen et al. 2012 (17)
Vancomycin	NYEC plate with antibiotics discs, 16h	PC203: NCTC 8325 background with fused gene spa::lacZ	Increase of SpA mRNA transcription	reporter fusion gene	
	Tryptic soy broth	NCTC 8325	Increase of SpA mRNA	qRT-PCR	
	NYEC plate with antibiotics discs, 20h	Newman background with fused gene spa::lux	No relevant effect of SpA mRNA transcription	reporter fusion gene	Subrt et al. 2011 (16)
	NYEC plate with antibiotics discs, 16h	Newman	No relevant effect of SpA mRNA	qRT-PCR	Subrt et al. 2011 (16)
	MH broth, shaking, 4 and 6h	5 CA-MRSA (ST1, ST8, ST80, ST30, ST398)	No relevant effect on SpA mRNA	qRT-PCR	Otto et al. 2013 (7)
	MH broth, shaking, 18h		No relevant effect on SpA production	ELISA	
	BHI, 4h and 11h	10 MRSA SCCmec II clinical isolates	Significant decrease of SpA mRNA at 4h (- x 2.42), but significant increase at 11h (X 4.10)	qRT-PCR	Cazares-Dominguez et al. 2015 (11)

					Significant increase of SpA production at 4h (X 1.23) and at 11h (X 4.10)	ELISA	Cardot-Martin et al. 2015 (14)
	MH broth, shaking, 6h	1/4 MIC	6 CA-MRSA (2 ST80, 2 ST8, 2 ST30)	No relevant effect on SpA mRNA	qRT-PCR		
	MH broth, shaking, 18h	1/4 MIC	6 CA-MRSA (2 ST80, 2 ST8, 2 ST30)	No relevant effect on SpA production	ELISA		
Daptomycin	MH broth, shaking, 4 and 6h	1/2; 1/4; 1/8 MIC	5 CA-MRSA (ST1, ST8, ST80, ST30, ST398)	No relevant effect on SpA mRNA	qRT-PCR		Otto et al. 2013 (7)
	MH broth, shaking, 18h	1/2; 1/4 MIC		No relevant effect on SpA production	ELISA		
Quinuprostin/ Dalfopristin	LB broth, shaking, 1,5 and 3 h with antibiotic since culture beginning	9/10; 3/4; 1/2; 1/4; 1/8 MIC	ATCC 29213	Concentration-dependant inhibition of SpA production if addition of antibiotic before quorum sensing	Western Blot		Koszczol et al. 2006 (18)
	LB broth, shaking, with antibiotic stress in the course of growing			No relevant effect on SpA production if addition of antibiotics at later time point in mod-logarithmic phase			
Imipénème	NYEC plate with antibiotics discs, 20h	luciferase activity measured around inhibition zone	Newman background with fused gene spa::lux	Slight stimulation of SpA mRNA transcription	reporter fusion gene		Subrt et al. 2011 (16)
Amikacin, Kanamycin, Gentamicin, Spectinomycin, Streptomycin, Tobramycin	Tryptic soy plate (containing X-gal) with antibiotics discs, 16h	Galactosidase activity measured around inhibition zone	PC203: NCTC 8325 background with fused gene spa::lacZ	Decrease of SpA mRNA transcription	reporter fusion gene		Nielsen et al. 2012 (17)

Ciprofloxacin	Tryptic soy plate (containing X-gal) with antibiotics discs, 16h	Galactisidase activity measured around inhibition zone	PC203: NCTC 8325 background with fused gene spa::lacZ	Increase of SpA mRNA transcription	reporter fusion gene	Nielsen et al. 2012 (17)
Ampicillin, Amox/clav, Ticarcillin	Tryptic soy plate (containing X-gal) with antibiotics discs, 16h	Galactisidase activity measured around inhibition zone	PC203: NCTC 8325 background with fused gene spa::lacZ	Increase of SpA mRNA transcription	reporter fusion gene	Nielsen et al. 2012 (17)
Cefamandole, Cefoxitin, Cefprozidime, Cefixime	Tryptic soy plate (containing X-gal) with antibiotics discs, 16h	Galactisidase activity measured around inhibition zone	PC203: NCTC 8325 background with fused gene spa::lacZ	Increase of SpA mRNA transcription	reporter fusion gene	Nielsen et al. 2012 (17)
Cefepime, Cefuroxime	Tryptic soy plate (containing X-gal) with antibiotics discs, 16h	Galactisidase activity measured around inhibition zone	PC203: NCTC 8325 background with fused gene spa::lacZ	Decrease of SpA mRNA transcription	reporter fusion gene	Nielsen et al. 2012 (17)
Cefotaxime	Tryptic soy plate (containing X-gal) with antibiotics discs, 16h	Galactisidase activity measured around inhibition zone	PC203: NCTC 8325 background with fused gene spa::lacZ	Decrease of SpA transcription	reporter fusion gene	Nielsen et al. 2012 (17)
	Tryptic soy broth	1/100 MIC	NCTC 8325	Decrease of SpA mRNA	qRT-PCR	Nielsen et al. 2012 (17)

Effect of sub-inhibitory antibiotic concentrations in Fnbp , Fnba synthesis						
Antibiotics	Growth conditions/Added antibiotics point	Concentration	<i>S. aureus</i> strain	Effect	Method	Reference
Clindamycin	CYGP broth, shaking, from 0 to 6h	0.02 µg/mL	NCTC 8325 and WCUH29 (clinical isolate)	Increase of fnbp mRNA	Northern Blot	Herbert et al. 2001 (13)
	BHI broth, shaking, to early, mid or post exponential growth	1/2 MIC	Newman (ATCC 25904)	Increase of Fnbp mRNA for mid and post exponential phase (around X 2), no relevant effect on Fnba mRNA	Northern Blot	Blickwede et al. 2005 (19)
	BHI broth, shaking, 2h	1/2 MIC	8325-4	No relevant effect on fnba and fnbb mRNA	qRT-PCR	Rasigade et al. 2011 (20)
Ciprofloxacin	MH broth, 5h	1/4 MIC	NCTC 8325 background, ciprofloxacin resistant and sensible mutants with fused gene fnbp::lux	Significant increase of fnbp promoter activation (X 2) in FQ resistant mutant but not in FQ susceptible mutant	reporter fusion gene	Bisognano et al. 2000 (21)
			NCTC 8325 background, ciprofloxacin resistant and sensible mutants with fused gene fnba::lux	No relevant effect on fnba promoter activation		
	MH broth 5h	1/4 MIC; 1/8 MIC; 1/16 MIC	NCTC 8325 background ciprofloxacin	Increase of Fnbpb production for 1/4 and 1/8 MIC but not 1/16	Western Blot	

			resistant mutant			
		1/4 MIC	2 MRSA clinical isolates	Increase of Fnbpb production (X 3.5)		
	MH broth, 5h	1/4 MIC	NCTC 8325 background, ciprofloxacin resistant mutants	Increase of Fnbpb production depending of mutations of FQ-resistance	Western Blot	Bisognano et al. 1997 (22)
Moxifloxacin	BHI broth, shaking, 2h	1/2 MIC	8325-4	Significant increase of fnba mRNA (X2.7) and fnbb mRNA (X4.5)	qRT-PCR	Rasigade et al. 2011 (20)
Florfenicol	BHI broth, shaking, to early, mid or post exponential growth	1/2 MIC	Newman (ATCC 25904)	Maximale increase of Fnbpb mRNA for mid exponential phase (X7), and Fnba mRNA for early phase (X4)	Nothern Blot	Blickwede et al. 2005 (23)
Oxacillin	BHI broth, shaking, 2h	1/2 MIC	8325-4	Significant increase of fnba mRNA (X5.5) and fnbb mRNA (X8.5)	qRT-PCR	Rasigade et al. 2011 (20)
Linezolid	BHI broth, shaking, 2h	1/2 MIC	8325-4	Significant increase of fnba (X3.8) and fnbb (X6.5)	qRT-PCR	Rasigade et al. 2011 (20)
Gentamicin, Vancomycin, Rifampicin	BHI broth, shaking, 2h	1/2 MIC	8325-4	No relevant effect on fnba and fnbb mRNA	qRT-PCR	Rasigade et al. 2011 (20)

Effect of sub-inhibitory antibiotic concentrations in coagulase synthethis						
Telithromycin	BHI broth	1/2; 1/4; 1/8; /16 MIC	MRSA clinical isolate	Decrease of coagulase production (decrease of titre) for 1/2, 1/4 and 1/8 MIC	Coagulase activity (titre)	Yanagihara et al. 2008 (24)
Clarithromycin						
Azithromycin						
Linezolid	Yest medium, 24h	1/2; 1/4; 1/8 MIC	Wood 46	Decrease of coagulase production (decrease of titre) for 1/2, 1/4 and 1/8 MIC	Coagulase activity (titre)	Gemmell et al. 2002 (25)
Clindamycin	CYGP broth, shaking, from 0 to 6h	0.02 µg/mL	NCTC 8325 and WCUH29 (clinical isolate)	Apparent increase of coa mRNA	Nothern Blot	Herbert et al. 2001 (13)
	CYGP broth, shaking, from 0 to 6h	0.02 µg/mL	NCTC 8325 and WCUH29 (clinical isolate)	Decrease of coagulase activity	Coagulase activity (titre)	
	BHI broth, shaking, to early, mid or post exponential growth	1/2 MIC	Newman	Increase of coa mRNA during early exponential growth phase (X2)	Nothern Blot	
Florfenicol	BHI broth, shaking, to early, mid or post exponential growth	1/2 MIC	Newman (ATCC 25904)	Increase of coa mRNA during early et mid exponential growth phase (X2)	Nothern Blot	Blickwede et al. 2005 (23)

Effect of sub-inhibitory antibiotic concentrations in capsule synthesis						
Antibiotics	Growth conditions/Added antibiotics point	Concentration	<i>S. aureus</i> strain	Effect	Method	Reference
Florfenicol	BHI broth, shaking, to early, mid or post exponential growth	1/2 MIC	Newman (ATCC 25904)	Decrease of cap5 mRNA (to 0.1) during post-exponential growth phase	Nothern Blot	Blickwede et al. 2005 (23)
				Significant decrease of CP5 expression	Indirect Immunofluorescence microscopy with monoclonal antibodies anti-CP5	
Clindamycin	BHI broth, shaking, to early, mid or post exponential growth	1/2 MIC	Newman	No significantly effect of CP5 expression	Indirect Immunofluorescence microscopy with monoclonal antibodies anti-CP5	Blickwede et al. 2005 (19)

Effect of sub-inhibitory antibiotic concentrations in <i>Hla</i> synthethis						
Antibiotics	Growth conditions	Concentration	<i>S. aureus</i> Strain	Effect	Method	Reference
Methicillin	BHI broth, shaking, 18h	1/4 MIC	Wood 46.3	Significant increase of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Ohlsen et al. 1998 (26)
			Wood 46.3 + 5 clinical strains MSSA	Increase of Hla mRNA	Nothern Blot	
	LB broth, 8h	1/2; 1/5; 1/20; 1/100; 1/200; 1/2000; 1/10000 MIC	A clinical MRSA strains	Concentration- dependant increase of Hla production from 1/10000 MIC (threefold) to 1/200 MIC (X 15), then stable increase	ImmunoBlot	
Nafcilin	BHI broth, shaking	2/3; 1/3 MIC	MRSA clinical isolate	Extension of Hla mRNA expression inducing a increase of Hla mRNA	Nothern Blot	Stevens et al. 2007 (1)
			Wood 46 MSSA	Extension of Hla mRNA expression, inducing a increase of Hla mRNA		
	BHI broth, shaking, 18h	1/4 MIC	Wood 46.3	Significant increase of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Ohlsen et al. 1998 (26)
			Wood 46 + 3 clinical isolates (1MRSA, 2MSSA)	Strong increase of Hla mRNA	DNA-RNA hybridization	

Oxacillin	Tryptic soy plate (containing X-gal) with antibiotics discs, 16h	Galactosidase activity measured around inhibition zone	PC203: NCTC 8325 background with fused gene <i>hla::lacZ</i>	Increase of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Nielsen et al. 2012 (17)
	BHI broth, shaking, 18h	1/4 MIC	Wood 46.6	Significant increase of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Ohlsen et al. 1998 (26)
	BHI broth, shaking, 10h or 20h	0.5µg/mL	2 CA-MRSA (ST8 and ST1)	Non significant decrease of Hla mRNA at 10h and a non significant increase at 20h	qRT-PCR	Rudkin et al. 2014 (5)
Cloxacillin	BHI broth, shaking, 10h or 20h	0.5µg/mL	2 CA-MRSA (ST8 and ST1)	Slight increase of Hla production	Western Blot	
	BHI broth, shaking, 18h	1/4 MIC	Wood 46.4	Significant increase of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Ohlsen et al. 1998 (26)
Imipenem	BHI broth, shaking, 18h	1/4 MIC	Wood 46.15	Significant increase of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Ohlsen et al. 1998 (26)
	MH agar plate with antibiotics E-test strips	Luciferase activity measured around inhibition zone	Newman background with fused gene <i>hla::luxABCDE</i>	Activation of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Steinhuber et al. 2008 (20)
	BHI broth, shaking, 18h	1/4 MIC	Wood 46.3	Significant major decrease of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Ohlsen et al. 1998 (26)
Clindamycin	MH broth, shaking, 4 and 6h	1/2; 1/4; 1/8 MIC	4 CA-MRSA (ST1, ST8, ST80, ST30)	Significant strong decrease of Hla mRNA after 4 and 6h of incubation except for ST80	qRT-PCR	Otto et al. 2013 (7)
	MH broth, shaking, 18h	1/2; 1/4 MIC		Significant strong decrease of Hla production for all strains at 1/4 and 1/2 MIC	ELISA	
	MH agar plate with antibiotics E-test strips	Luciferase activity measured around inhibition zone	Newman background with fused	No activation of Hla mRNA transcription (inhibition)	reporter fusion gene	Steinhuber et al. 2008 (20)

			gene hla::luxABCDE						
		0.02 or 0.04 µg/mL	NCTC 8325 background with fused gene spa::blaZ	Concentration-dependant strong inhibition of Hla mRNA transcription over time (Blaz activity decreased with clindamycin)	reporter fusion gene			Herbert et al. 2001 (13)	
	CYGP broth, shaking, from 0 to 6h	0.02 µg/mL	NCTC 8325 background with replacing <i>agr</i> and WCUH29 (clinical isolate)	Decrease of Hla mRNA over time	Nothern Blot				
	TSB broth, shaking, 24h	1/4; 1/8 MIC	11 MRSA clinical isolates + ST8 USA 300 + USA 600	Concentration-dependant decrease of SpA production for all isolates	Western Blot			Yamaki et al. 2013 (10)	
Quinuprostin/ Dalfopristin	LB broth, shaking, 1,5 and 3 h with antibiotic since culture beginning	9/10; 3/4; 1/2; 1/4; 1/8 MIC	ATCC 29213	Concentration-dependant inhibition of Hla production if addition of antibiotic before quorum sensing	Western Blot			Koszczol et al. 2006 (18)	
	LB broth, shaking, with antibiotic stress in the course of growing								
Erythromycin	BHI broth, shaking, 18h	1/4 MIC	Wood 46.22	Significant decrease of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene			Ohlsen et al. 1998 (26)	
Linezolid	MH broth, shaking, 4 and 6h	1/2; 1/4; 1/8 MIC	5 CA-MRSA (ST1, ST8,	Significant decrease of Hla mRNA for ST8 and ST30 after 4	qRT-PCR			Otto et al. 2013 (7)	

				ST80, ST30, ST398)	and 6h of incubation and increase for ST80		
	MH broth, shaking, 18h	1/2; 1/4 MIC			Significant decrease of Hla production for all strains for 1/2 MIC	ELISA	
	TSB broth, shaking, 24h	1/4; 1/8 MIC		11 MRSA clinical isolates + ST8 USA 300 + USA 600	Concentration-dependant decrease of SpA production for all isolates	Western Blot	Yamaki et al. 2013 (10)
	BHI broth, shaking, 18h	1/4 MIC		Wood 46.24	Significant decrease of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Ohlsen et al. 1998 (26)
Rifampicin	MH agar plate with antibiotics E-test strips	Luciferase activity measured around inhibition zone		Newman background with fused gene hla::luxABCDE	No activation of Hla mRNA transcription (inhibition)	reporter fusion gene	Steinhuber et al. 2008 (28)
	BHI broth, shaking, 18h	1/4 MIC		Wood 46.16	No relevant effect of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Ohlsen et al. 1998 (26)
Teicoplanin	MH agar plate with antibiotics E-test strips	Luciferase activity measured around inhibition zone		Newman background with fused gene hla::luxABCDE	Slight activation of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Steinhuber et al. 2008 (20)
	BHI broth, shaking, 18h	1/4 MIC		Wood 46.3	No relevant effect on Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Ohlsen et al. 1998 (26)
	MH broth, shaking, 4 and 6h	1/2; 1/4; 1/8 MIC		5 CA-MRSA (ST1, ST8, ST80, ST30, ST398)	No relevant effect on SpA mRNA	qRT-PCR	Otto et al. 2013 (7)
Vancomycin	MH broth, shaking, 18h	1/2; 1/4 MIC			No relevant effect on SpA production	ELISA	
	MH broth, shaking, 4 and 6h	1/2; 1/4; 1/8 MIC		5 CA-MRSA (ST1, ST8,	No relevant effect on SpA mRNA	qRT-PCR	Otto et al. 2013 (7)
Daptomycin							

	MH broth, shaking, 18h	1/2; 1/4 MIC	ST80, ST30, ST398)	No relevant effect on SpA production	ELISA	
Tigecyclin	MH broth, shaking, 4 and 6h	1/2; 1/4; 1/8 MIC	5 CA-MRSA (ST1, ST8, ST80, ST30, ST398)	Significant decrease of Hla mRNA for ST1 and ST30 for 1/8 and 1/4 MIC, increase for ST 80	qRT-PCR	Otto et al. 2013 (7)
	MH broth, shaking, 18h	1/2; 1/4 MIC		Significant decrease of Hla production for ST8 and ST 30 at 1/2 MIC	ELISA	
	TSB broth, shaking, 24h	1/4; 1/8 MIC	11 MRSA clinical isolates + ST8 USA 300 + USA 600	Concentration-dependant decrease of SpA production for all isolates	Western Blot	Yamaki et al. 2013 (10)
Tetracyclin	BHI broth, shaking, 18h	1/4 MIC	Wood 46.23	Significant slight decrease of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Ohlsen et al. 1998 (26)
Ciprofloxacin	Tryptic soy plate (containing X-gal) with antibiotics discs, 16h	Galactosidase activity measured around inhibition zone	PC203: NCTC 8325 background with fused gene hla::lacZ	Increase of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Nielsen et al. 2012 (17)
	BHI broth, shaking, 18h	1/4 MIC	Wood 46.27	No relevant effect on Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Ohlsen et al. 1998 (26)
Moxifloxacin	MH agar plate with antibiotics E-test strips	Luciferase activity measured around inhibition zone	Newman background with fused gene hla::luxABCDE	Slight activation of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Steinhuber et al. 2008 (20)
	TS broth, shaking, 4,25h and 10,25h	1/12.5; 1/125	Laboratory strains 8325.4	No relevant effect on Hla mRNA production	Nothern Blot Western Blot	Worlitzsch et al. 2001 (29)
Ofloxacin	BHI broth, shaking, 18h	1/4 MIC	Wood 46.25	Significant slight increase of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Ohlsen et al. 1998 (26)

Kanamycin	Tryptic soy plate (containing X-gal) with antibiotics discs, 16h	Galactosidase activity measured around inhibition zone	PC203: NCTC 8325 background with fused gene hla::lacZ	Decrease of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Nielsen et al. 2012 (17)
	BHI broth, shaking, 18h	1/4 MIC	Wood 46.18	Significant slight decrease of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Ohlsen et al. 1998 (26)
Gentamicin	Tryptic soy plate (containing X-gal) with antibiotics discs, 16h	Galactosidase activity measured around inhibition zone	PC203: NCTC 8325 background with fused gene hla::lacZ	Decrease of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Nielsen et al. 2012 (17)
	BHI broth, shaking, 18h	1/4 MIC	Wood 46.17	Significant slight decrease of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Ohlsen et al. 1998 (26)
Tobramycin	TS broth, shaking, 4,25h and 10,25h	1/20; 1/200	Laboratory strains 8325.4	No relevant effect on Hla mRNA production	Nothern Blot Western Blot	Worlitzsch et al. 2001 (21)
	Tryptic soy plate (containing X-gal) with antibiotics discs, 16h	Galactosidase activity measured around inhibition zone	PC203: NCTC 8325 background with fused gene hla::lacZ	Decrease of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Nielsen et al. 2012 (17)
Amikacin	BHI broth, shaking, 18h	1/4 MIC	Wood 46.21	Significant slight decrease of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Ohlsen et al. 1998 (26)
	Tryptic soy plate (containing X-gal) with antibiotics discs, 16h	Galactosidase activity measured around inhibition zone	PC203: NCTC 8325 background with fused gene hla::lacZ	Decrease of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Nielsen et al. 2012 (17)
Netilmicin	BHI broth, shaking, 18h	1/4 MIC	Wood 46.19	Significant slight decrease of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Ohlsen et al. 1998 (26)

Streptomycin	BHI broth, shaking, 18h	1/4 MIC	Wood 46.20	Significant slight decrease of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Ohlsen et al. 1998 (26)
Penicilline V	Tryptic soy plate (containing X-gal) with antibiotics discs, 16h	Galactisidase activity measured around inhibition zone	PC203: NCTC 8325 background with fused gene hla::lacZ	Increase of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Nielsen et al. 2012 (17)
	BHI broth, shaking, 18h	1/4 MIC	Wood 46.8	Significant increase of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Ohlsen et al. 1998 (26)
Ampicillin	Tryptic soy plate (containing X-gal) with antibiotics discs, 16h	Galactisidase activity measured around inhibition zone	PC203: NCTC 8325 background with fused gene hla::lacZ	Increase of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Nielsen et al. 2012 (17)
	BHI broth, shaking, 18h	1/4 MIC	Wood 46.3	Significant increase of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Ohlsen et al. 1998 (26)
Amoxicillin	TS broth, shaking, 4,25h and 10,25h	1/25; 1/150	Laboratory strains 8325.4	No relevant effect on Hla mRNA production	Nothern Blot	Worlitzsch et al. 2001 (21)
					Western Blot	
Amoxiciline + ac. Clavulanique	Tryptic soy plate (containing X-gal) with antibiotics discs, 16h	Galactisidase activity measured around inhibition zone	PC203: NCTC 8325 background with fused gene hla::lacZ	Increase of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Nielsen et al. 2012 (17)
Ticarillin	Tryptic soy plate (containing X-gal) with antibiotics discs, 16h	Galactisidase activity measured around inhibition zone	PC203: NCTC 8325 background with fused gene hla::lacZ	Increase of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Nielsen et al. 2012 (17)
Cefalotin	Tryptic soy plate (containing X-gal) with antibiotics discs, 16h	Galactisidase activity measured around inhibition zone	PC203: NCTC 8325 background	Increase of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Nielsen et al. 2012 (17)

Cefamandole	Tryptic soy plate (containing X-gal) with antibiotics discs, 16h	Galactosidase activity measured around inhibition zone	with fused gene hla::lacZ PC203: NCTC 8325 background with fused gene hla::lacZ	Increase of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Nielsen et al. 2012 (17)
	Tryptic soy plate (containing X-gal) with antibiotics discs, 16h	Galactosidase activity measured around inhibition zone	PC203: NCTC 8325 background with fused gene hla::lacZ	Increase of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Nielsen et al. 2012 (17)
Cefoxitin	BHI broth, shaking, 18h	1/4 MIC	Wood 46.14	Significant increase of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Ohlsen et al. 1998 (26)
	Tryptic soy plate (containing X-gal) with antibiotics discs, 16h	Galactosidase activity measured around inhibition zone	PC203: NCTC 8325 background with fused gene hla::lacZ	Increase of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Nielsen et al. 2012 (17)
Cefuroxime	Tryptic soy plate (containing X-gal) with antibiotics discs, 16h	Galactosidase activity measured around inhibition zone	PC203: NCTC 8325 background with fused gene hla::lacZ	Increase of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Nielsen et al. 2012 (17)
	BHI broth, shaking, 18h	1/4 MIC	Wood 46.11	Significant increase of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Ohlsen et al. 1998 (26)
Cefotaxime	Tryptic soy plate (containing X-gal) with antibiotics discs, 16h	Galactosidase activity measured around inhibition zone	PC203: NCTC 8325 background with fused gene hla::lacZ	Increase of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Nielsen et al. 2012 (17)
	BHI broth, shaking, 18h	1/4 MIC	Wood 46.12	Significant increase of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Ohlsen et al. 1998 (26)

Ceftazidime	Tryptic soy plate (containing X-gal) with antibiotics discs, 16h	Galactosidase activity measured around inhibition zone	PC203: NCTC 8325 background with fused gene hla::lacZ	Increase of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Nielsen et al. 2012 (17)
Cefixime	Tryptic soy plate (containing X-gal) with antibiotics discs, 16h	Galactosidase activity measured around inhibition zone	PC203: NCTC 8325 background with fused gene hla::lacZ	Increase of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Nielsen et al. 2012 (17)
Penicillin G	BHI broth, shaking, 18h	1/4 MIC	Wood 46	Significant increase of Hla mRNA transcription	reporter fusion gene	Ohlsen et al. 1998 (26)
Pipéracillin						
Cefazolin						
Ceftriaxone						
Triméthoprim						

Effect of sub-inhibitory antibiotic concentrations in TSST-1 synthesis						
Antibiotics	Growth conditions	Concentration	<i>S. aureus</i> Strain	Effect	Method	Reference
Nafcilin	BHI broth, shaking	2/3; 1/3 MIC	MRSA clinical isolate	Extension of TSST-1 mRNA expression inducing a increase of TSST-1 mRNA	Nothern Blot	Stevens et al. 2006 (30)
				Significant increase of TSST-1 production for 1/3 MIC		
		1/4 MIC	MSSA clinical isolate	Extension of TSST-1 mRNA expression inducing a increase of TSST-1 mRNA	Nothern Blot	
				Significant increase of TSST-1 production		
Clindamycin	CYGP broth, shaking, from 0 to 6h	0.02 or 0.04 µg/mL	NCTC 8325 background with fused gene spa ::blaZ	Concentration-dependant strong inhibition of TSST-1 mRNA transcription over time (BlaZ activity decreased with clindamycin)	reporter fusion gene	Herbert et al. 2001 (13)
				Decrease of TSST-1 mRNA over time		
	CYGP broth, shaking, from 0 to 6h	0.02 µg/mL	NCTC 8325 background with replacing agr and WCUH29 (clinical isolate)	Concentration-dependant decrease of TSST-1 production	Nothern Blot	
				Concentration-dependant decrease of TSST-1 production		
Lincomycin Erythromycin	MH broth, 20h and 24h	1/4; 1/16; 1/64; 1/256 MIC	MN8, WT2, MT36, MT40, MT42, MT46	Concentration-dependant decrease of TSST-1 production	Ouchterlony/immunodiffusion	Dickgiesser and Waalach, 1987 (31)
				Concentration-dependant decrease of TSST-1 production		

Kanamycin			MN8, WT2, MT36, MT40, MT42, MT47	Concentration-dependant decrease of TSST-1 production only for 1/4 and 1/16 MIC	Waalach, 1987 (31)
Tetracyclin				Concentration-dependant decrease of TSST-1 production only for 1/4	

Effect of sub-inhibitory antibiotic concentrations in <u>Enterotoxins</u> synthesithis					
Antibiotics	Growth conditions	Concentration	S. aureus Strain	Effect	Reference
Quinuprostin/D alfopristin	LB broth, shaking, 1,5 and 3 h with antibiotic since culture beginning	9/10 ; 3/4 ; 1/2 ; 1/4 ; 1/8 MIC	ATCC 29213	Concentration-dependant inhibition of SEA and SEB production if addition of antioctic before quorum sensing	Koszczol et al. 2006 (18)
	LB broth, shaking, with antibiotic stress in the course of growing			Concentration-dependant inhibition of SEA and SEB production if addition of antibiotics at later time point in mod-logarithmic phase	
Linezolid	LB both to OD = 0,05 to OD = 1	9/10 ; 1/2 ; 1/4 ; 1/8	ATCC 29213	Concentration-dependant inhibition of SEA and SEB production	Bernardo et al. 2004 (15)

References

1. Stevens DL, Ma Y, Salmi DB, McIndoo E, Wallace RJ, Bryant AE. 2007. Impact of antibiotics on expression of virulence-associated exotoxin genes in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 195:202–211.
2. Dumitrescu O, Boisset S, Badiou C, Bes M, Benito Y, Reverdy M-E, Vandenesch F, Etienne J, Lina G. 2007. Effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin. *Antimicrob Agents Chemother* 51:1515–1519.
3. Dumitrescu O, Badiou C, Bes M, Reverdy M-E, Vandenesch F, Etienne J, Lina G. 2008. Effect of antibiotics, alone and in combination, on Panton-Valentine leukocidin production by a *Staphylococcus aureus* reference strain. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 14:384–388.

4. Dumitrescu O, Choudhury P, Boisset S, Badiou C, Bes M, Benito Y, Wolz C, Vandenesch F, Etienne J, Cheung AL, Bowden MG, Lina G. 2011. Beta-lactams interfering with PBP1 induce Panton-Valentine leukocidin expression by triggering sarA and rot global regulators of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 55:3261–3271.
5. Rudkin JK, Laabei M, Edwards AM, Joo H-S, Otto M, Lennon KL, O’Gara JP, Waterfield NR, Massey RC. 2014. Oxacillin alters the toxin expression profile of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 58:1100–1107.
6. Turner CE, Sriskandan S. 2015. Panton-Valentine leukocidin expression by *Staphylococcus aureus* exposed to common antibiotics. *J Infect* 71:338–346.
7. Otto MP, Martin E, Badiou C, Lebrun S, Bes M, Vandenesch F, Etienne J, Lina G, Dumitrescu O. 2013. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 68:1524–1532.

8. Joo H-S, Chan JL, Cheung GYC, Otto M. 2010. Subinhibitory concentrations of protein synthesis-inhibiting antibiotics promote increased expression of the agr virulence regulator and production of phenol-soluble modulins cytolytically in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 54:4942–4944.
9. Yamaki J, Synold T, Wong-Beringer A. 2011. Antivirulence potential of TR-700 and clindamycin on clinical isolates of *Staphylococcus aureus* producing phenol-soluble modulins. *Antimicrob Agents Chemother* 55:4432–4435.
10. Yamaki J, Synold T, Wong-Beringer A. 2013. Tigecycline induction of phenol-soluble modulins by invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 57:4562–4565.
11. Cázares-Domínguez V, Ochoa SA, Cruz-Córdova A, Rodea GE, Escalona G, Olivares AL, Olivares-Trejo J de J, Velázquez-Guadarrama N, Xicohtencatl-Cortés J. 2015. Vancomycin modifies the expression of the agr system in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Front Microbiol* 6:369.
12. Veringa EM, Verhoef J. 1986. Influence of subinhibitory concentrations of clindamycin on opsonophagocytosis of *Staphylococcus aureus*, a protein-A-dependent process. *Antimicrob Agents Chemother* 30:796–797.

13. Herbert S, Barry P, Novick RP. 2001. Subinhibitory clindamycin differentially inhibits transcription of exoprotein genes in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 69:2996–3003.
14. Cardot Martin E, Michel A, Raynal B, Badiou C, Laurent F, Vandenesch F, Etienne J, Lina G, Dumitrescu O. 2015. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300 resists staphylococcal protein A modulation by antibiotics and antimicrobial peptides. *Int J Antimicrob Agents* 45:19–24.
15. Bernardo K, Pakulat N, Fleer S, Schnaith A, Utermöhlen O, Krut O, Müller S, Krönke M. 2004. Subinhibitory concentrations of linezolid reduce *Staphylococcus aureus* virulence factor expression. *Antimicrob Agents Chemother* 48:546–555.
16. Subrt N, Mesak LR, Davies J. 2011. Modulation of virulence gene expression by cell wall active antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 66:979–984.
17. Nielsen LN, Roggenbuck M, Haaber J, Ifrah D, Ingmer H. 2012. Diverse modulation of spa transcription by cell wall active antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *BMC Res Notes* 5:457.

18. Koszczol C, Bernardo K, Krönke M, Krut O. 2006. Subinhibitory quinupristin/dalfopristin attenuates virulence of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 58:564–574.
19. Blickwede M, Wolz C, Valentin-Weigand P, Schwarz S. 2005. Influence of clindamycin on the stability of *coa* and *fnbB* transcripts and adherence properties of *Staphylococcus aureus* Newman. *FEMS Microbiol Lett* 252:73–78.
20. Rasigade JP, Moulay A, Lhoste Y, Tristan A, Bes M, Vandenesch F, Etienne J, Lina G, Laurent F, Dumitrescu O. 2011. Impact of sub-inhibitory antibiotics on fibronectin-mediated host cell adhesion and invasion by *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol* 11:263.
21. Bisognano C, Vaudaux P, Rohner P, Lew DP, Hooper DC. 2000. Induction of fibronectin-binding proteins and increased adhesion of quinolone-resistant *Staphylococcus aureus* by subinhibitory levels of ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 44:1428–1437.

22. Bisognano C, Vaudaux PE, Lew DP, Ng EY, Hooper DC. 1997. Increased expression of fibronectin-binding proteins by fluoroquinolone-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to subinhibitory levels of ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 41:906–913.
23. Blickwede M, Goethe R, Wolz C, Valentin-Weigand P, Schwarz S. 2005. Molecular basis of florfenicol-induced increase in adherence of *Staphylococcus aureus* strain Newman. *J Antimicrob Chemother* 56:315–323.
24. Yanagihara K, Morinaga Y, Nakamura S, Seki M, Izumikawa K, Takeya H, Yamamoto Y, Yamada Y, Kamihira S, Kohno S. 2008. Subinhibitory concentrations of telithromycin, clarithromycin and azithromycin reduce methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* coagulase in vitro and in vivo. *J Antimicrob Chemother* 61:647–650.
25. Gemmell CG, Ford CW. 2002. Virulence factor expression by Gram-positive cocci exposed to subinhibitory concentrations of linezolid. *J Antimicrob Chemother* 50:665–672.

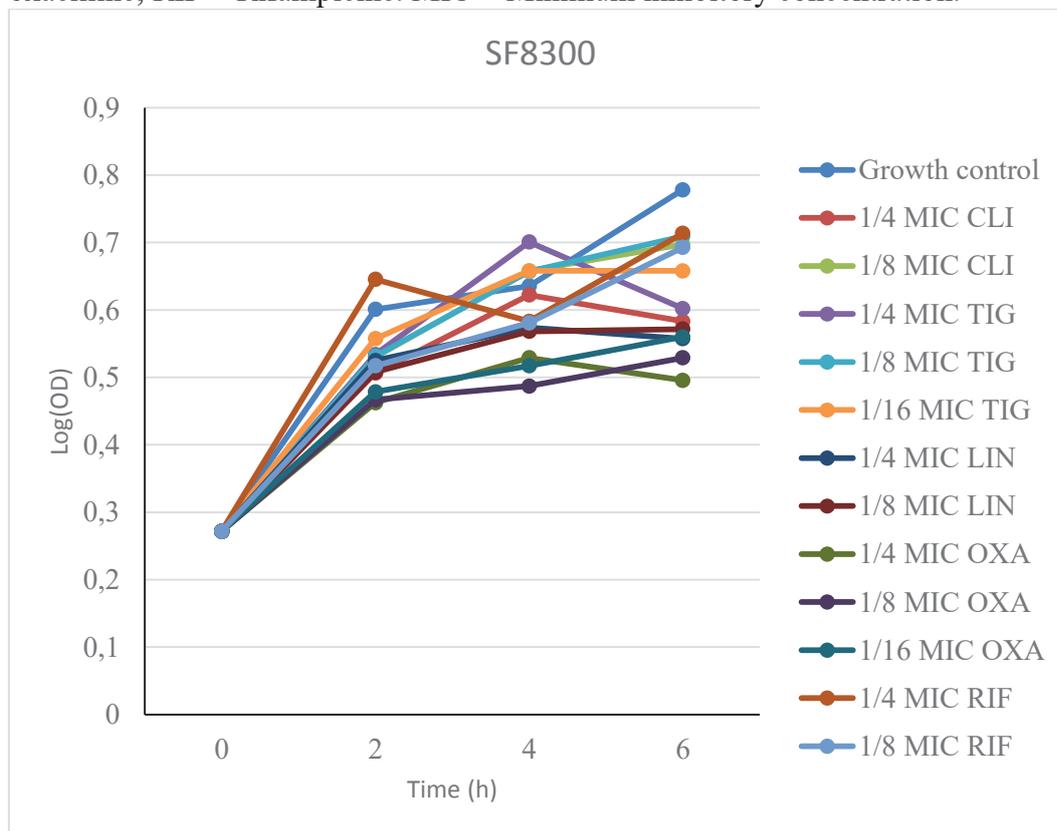
26. Ohlsen K, Ziebuhr W, Koller KP, Hell W, Wichelhaus TA, Hacker J. 1998. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on alpha-toxin (hla) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 42:2817–2823.
27. Kernodle DS, McGraw PA, Barg NL, Menzies BE, Voladri RK, Harshman S. 1995. Growth of *Staphylococcus aureus* with nafcillin in vitro induces alpha-toxin production and increases the lethal activity of sterile broth filtrates in a murine model. *J Infect Dis* 172:410–419.
28. Steinhuber A, Landmann R, Goerke C, Wolz C, Flückiger U. 2008. Bioluminescence imaging to study the promoter activity of hla of *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo. *Int J Med Microbiol IJMM* 298:599–605.
29. Worlitzsch D, Kaygin H, Steinhuber A, Dalhoff A, Botzenhart K, Döring G. 2001. Effects of amoxicillin, gentamicin, and moxifloxacin on the hemolytic activity of *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 45:196–202.

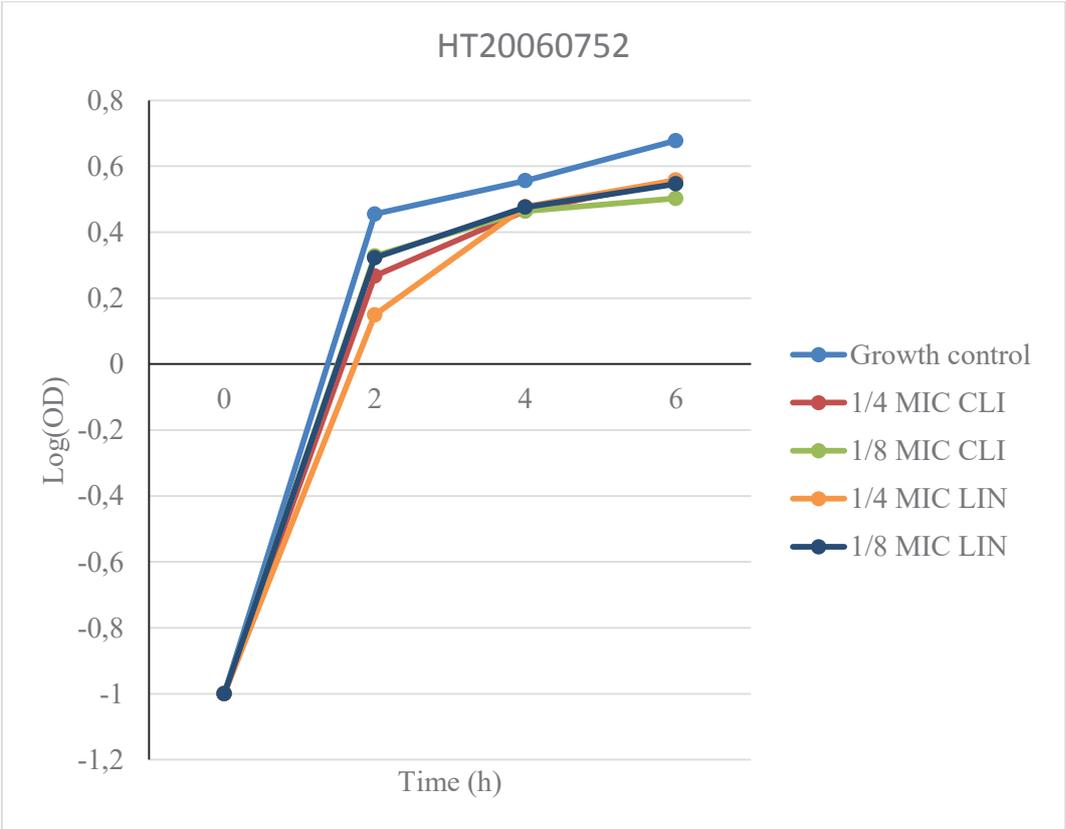
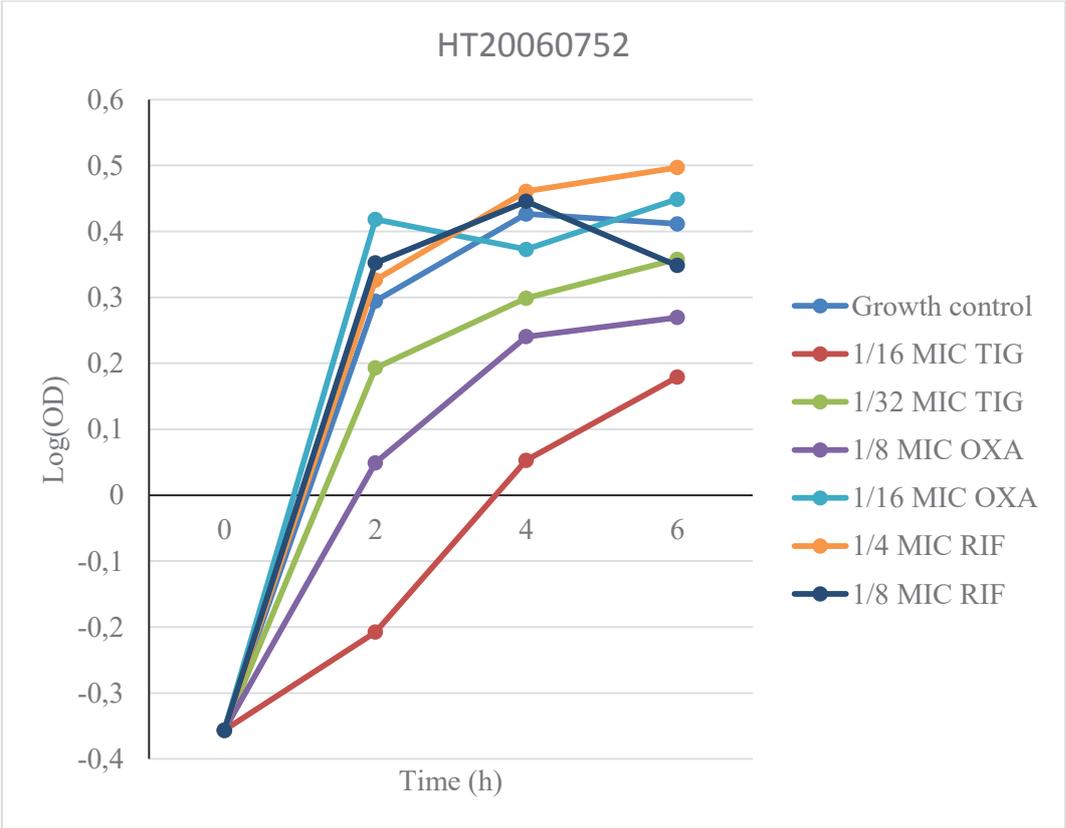
30. Stevens DL, Wallace RJ, Hamilton SM, Bryant AE. 2006. Successful treatment of staphylococcal toxic shock syndrome with linezolid: a case report and in vitro evaluation of the production of toxic shock syndrome toxin type 1 in the presence of antibiotics. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 42:729–730.
31. Dickgiesser N, Wallach U. 1987. Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1): influence of its production by subinhibitory antibiotic concentrations. *Infection* 15:351–353.

Annexe 4 : Données supplémentaires de la publication n°4 intitulée «Sub-inhibitory concentrations of oxacillin, but not clindamycin, linezolid or tigecyclin induce an inhibition on staphylococcal Phenol-soluble modulins expression for community-acquired-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* »

Supplementary data

Figure S1: Growth curves for community-acquired methicillin-resistant *S. aureus*. Growth control: without antibiotic. CLI = clindamycin; TIG = tigecyclin; LIN = linezolid; OXA = oxacilline; RIF = Rifampicine. MIC = Minimum inhibitory concentration.





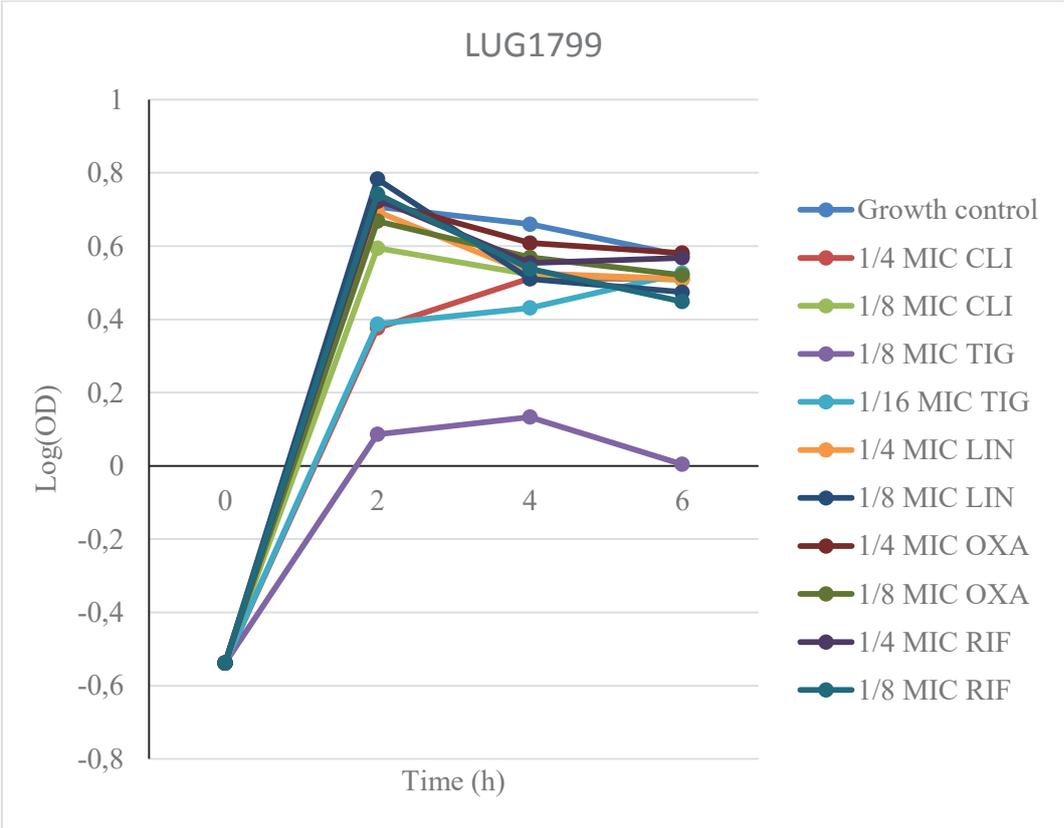
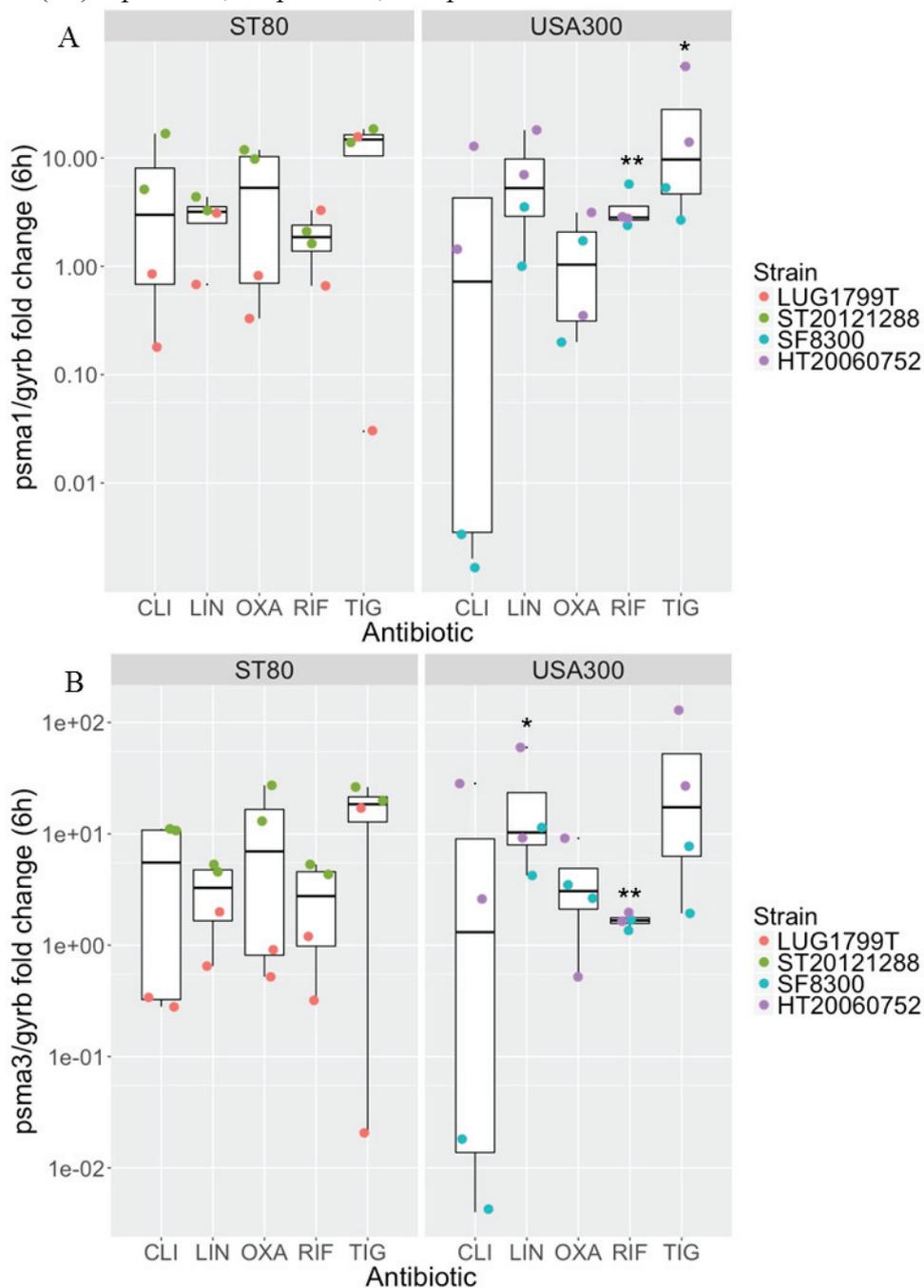


Figure S2: Effects of antibiotics sub-MIC on *psma1/2* mRNA expression after 6h incubation (A), *psma3* mRNA expression after 6h incubation (B), *psma1/2* mRNA expression after 24h incubation (C) and *psma3* mRNA expression after 24h incubation (D) for community-acquired methicillin-resistant *S. aureus* PVL+ (CA-MRSA PVL+). The results are expressed as n-fold differences in the *psma1/2/gyrb* or *psma3/gyrb* ratio in the presence of antibiotics relative to the *psma1/2/gyrb* or *psma3/gyrb* ratio for the strains grown without antibiotics. The results for one antibiotic were pooled for the 2 strains belonging to the same genetic background, ST80 European clone in the left and USA300 clone in the right. Conformity t test were performed to compare expression with antibiotic and control reaction expression without antibiotic (=1). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.



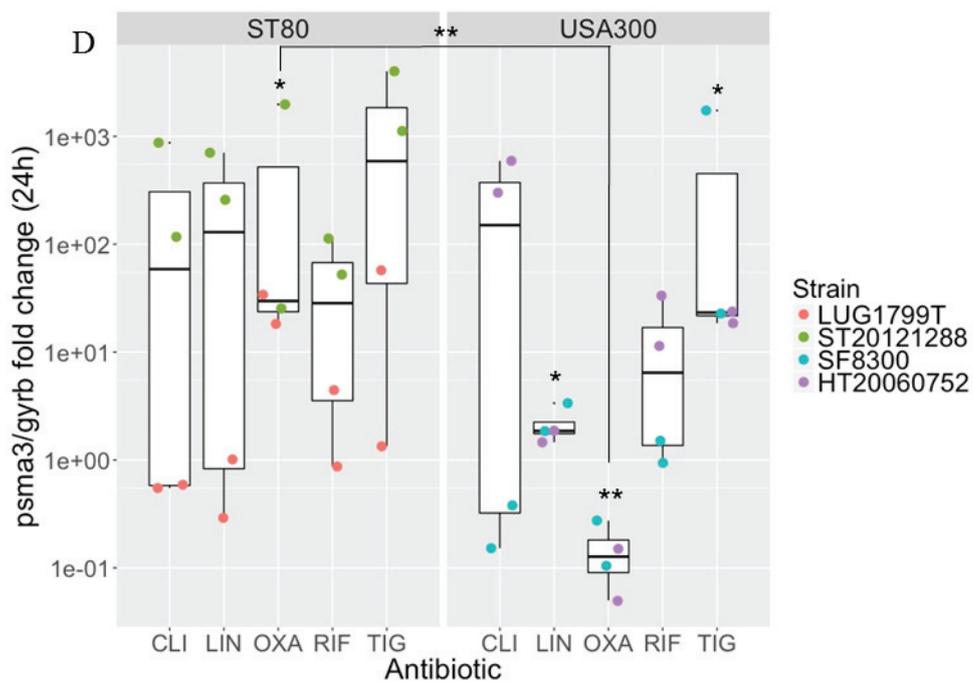
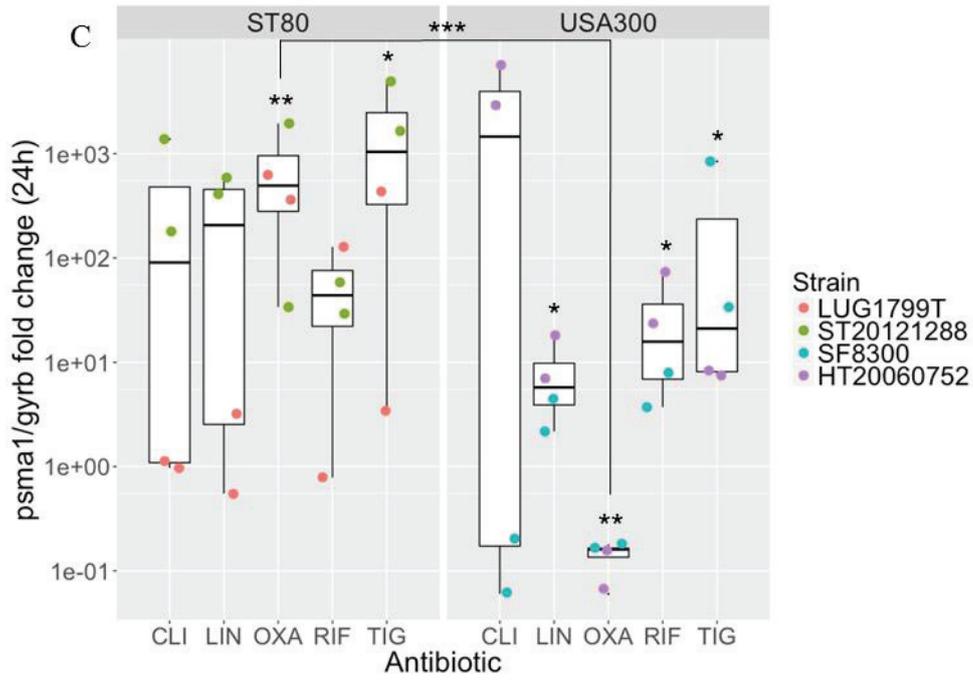
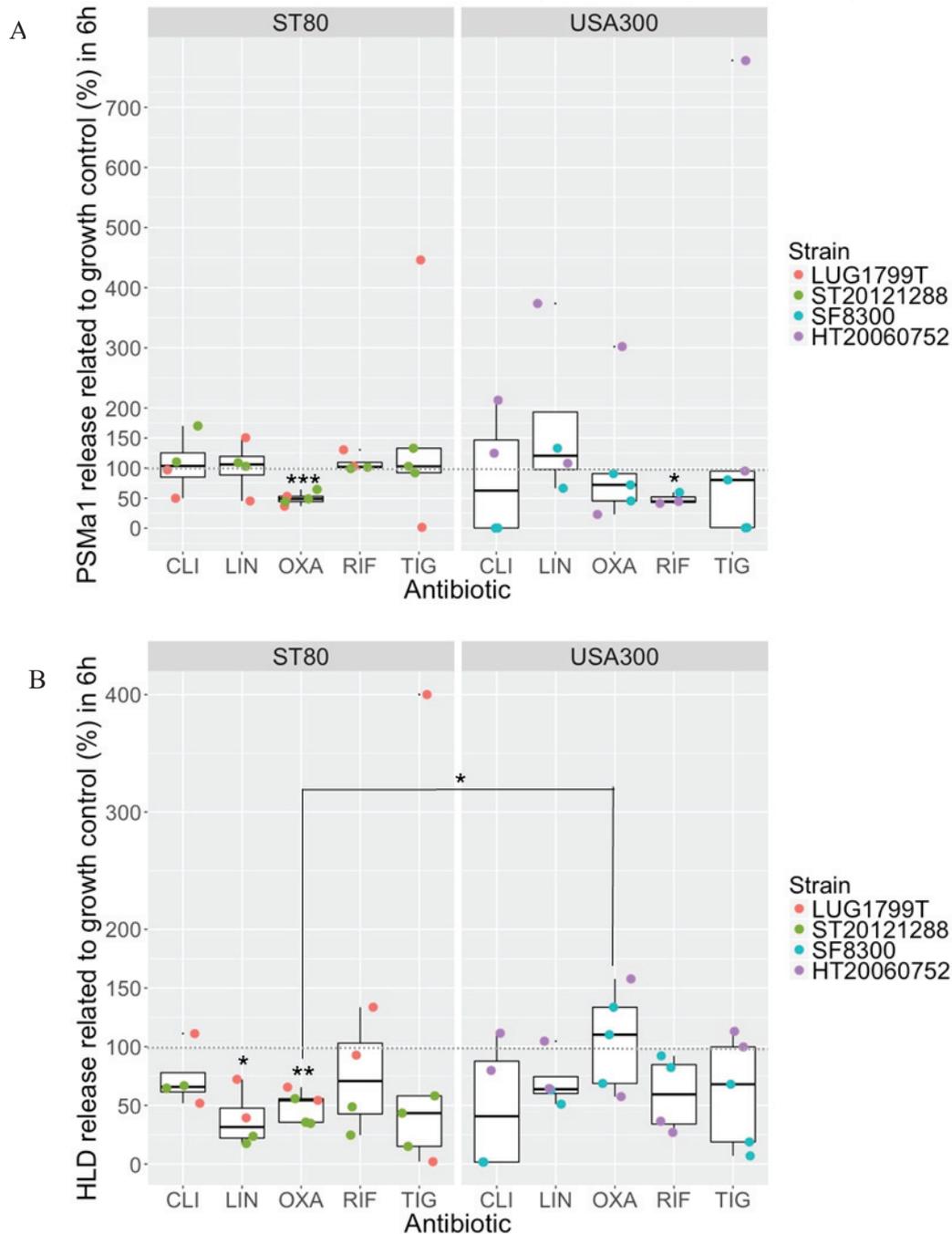


Figure S3: Effects of antibiotics sub-MIC on PSM α 1 release after 6h incubation (A), Hld release after 6h incubation (B), PSM α 1 release after 6h incubation after 24h incubation (C) and Hld release after 24h incubation (D) for community-acquired methicillin-resistant *S. aureus* PVL+ (CA-MRSA PVL+). The results are expressed in percentage compared to growth control without antibiotics. The results for one antibiotic were pooled for the 2 strains belonging to the same genetic background, ST80 European clone in the left and USA300 clone in the right. Conformity t test were performed to compare toxin release with antibiotic and control release without antibiotic (=100).* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.



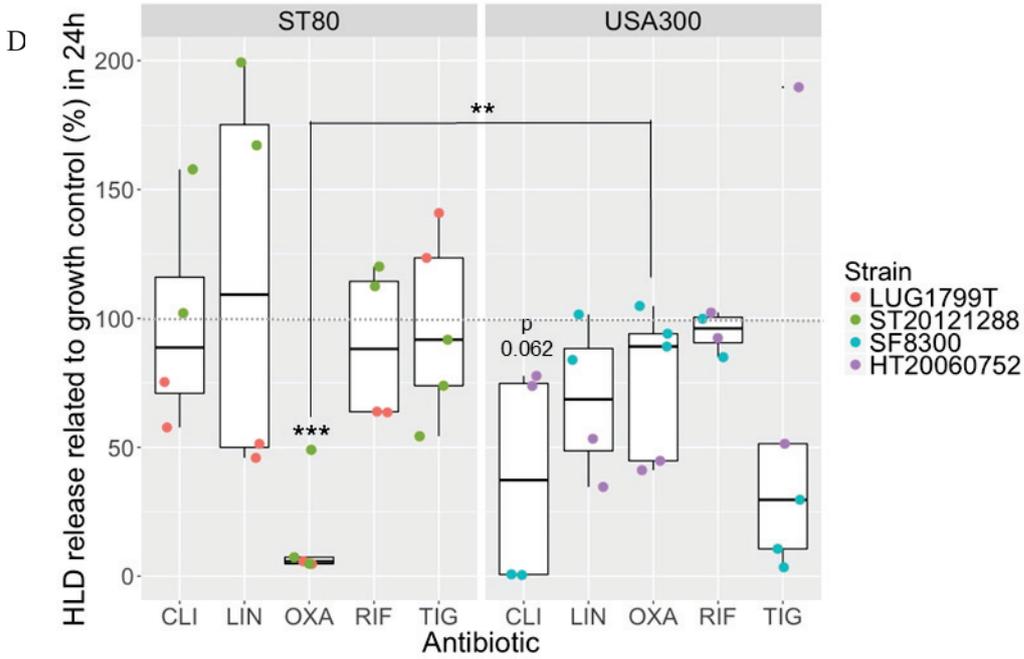
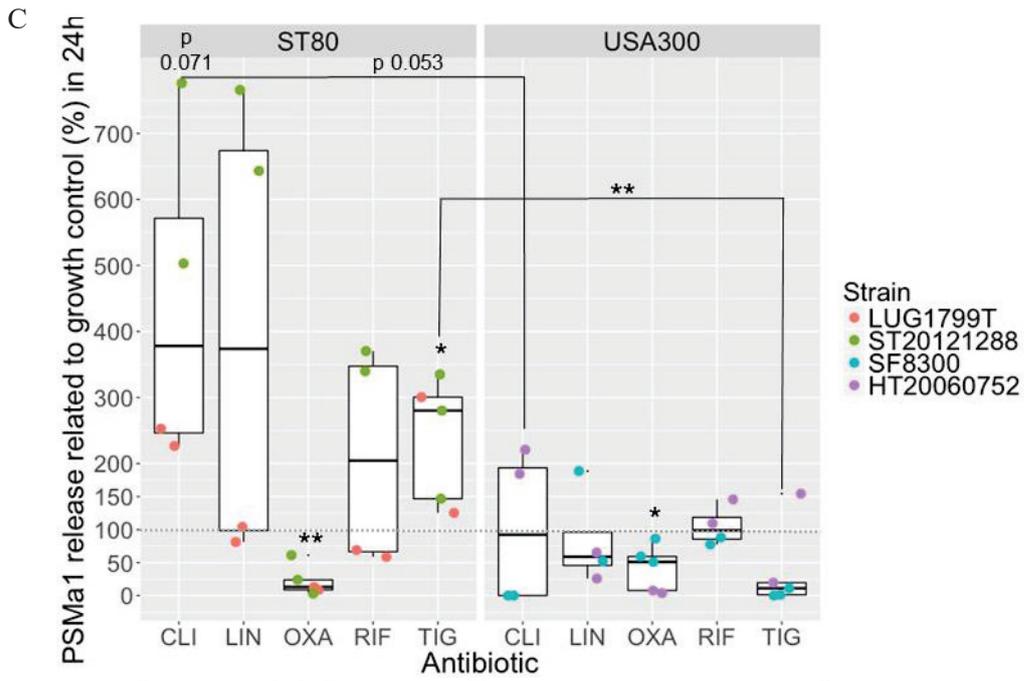
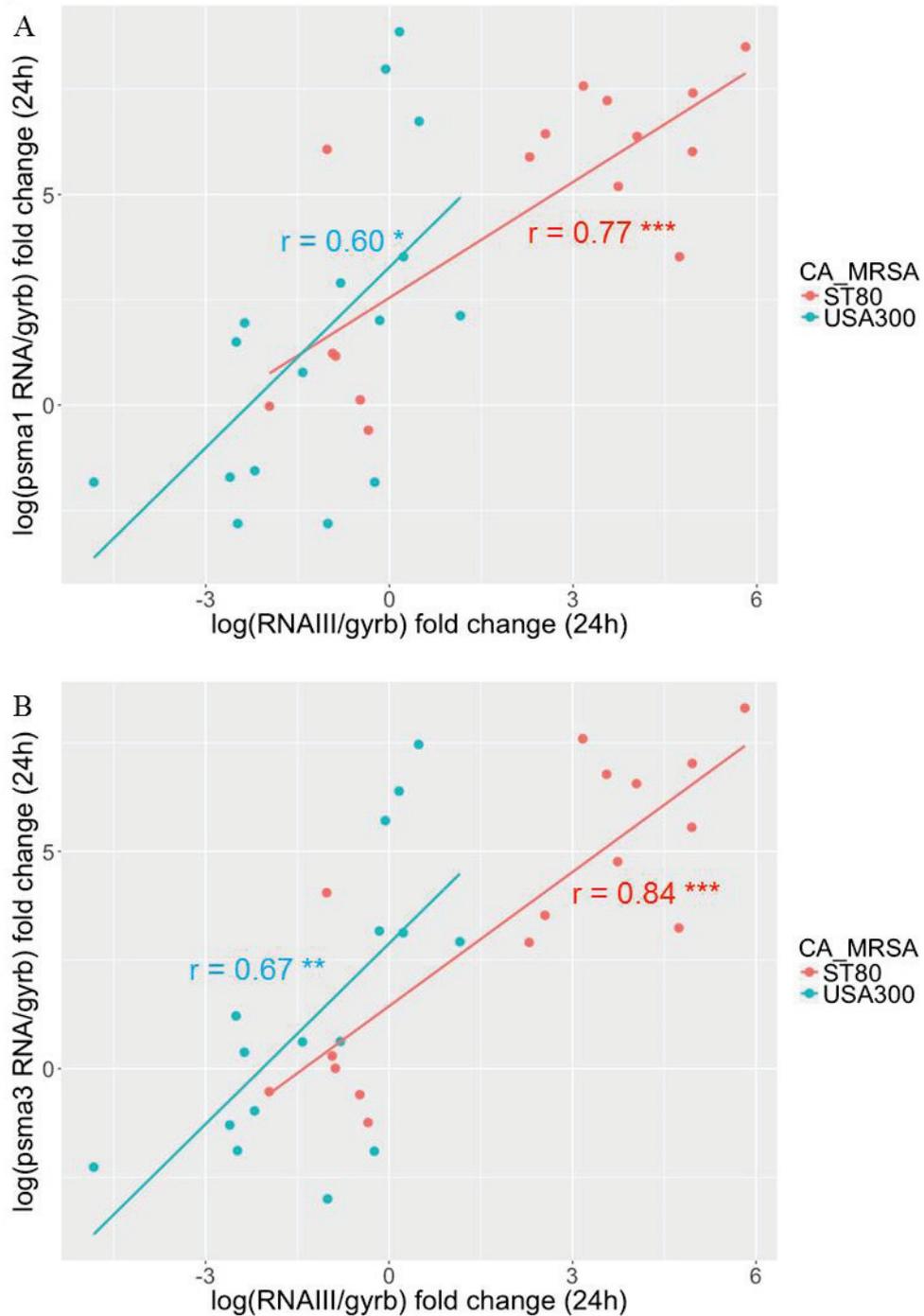


Figure S4: correlation between expression of *psma1* RNA/gyrb (expressed in log) (A) or *psma3* RNA/gyrb (expressed in log) (B) and *RNAIII*/gyrb (expressed in log) for community-acquired methicillin-resistant *S. aureus* PVL+ (CA-MRSA PVL+) according to genetic background, ST80 European clone in red and USA300 clone in blue. Correlation links were tested by Pearson correlation test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.



Bibliographie

Abel J, Goldmann O, Ziegler C, Höltje C, Smeltzer MS, Cheung AL, et al. Staphylococcus aureus evades the extracellular antimicrobial activity of mast cells by promoting its own uptake. *J Innate Immun.* 2011;3(5):495-507.

Abraham SN, St John AL. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol.* juin 2010;10(6):440-52.

Alonzo F 3rd, Kozhaya L, Rawlings SA, Reyes-Robles T, DuMont AL, Myszka DG, et al. CCR5 is a receptor for Staphylococcus aureus leukotoxin ED. *Nature.* 3 janv 2013;493(7430):51-5.

Bąbolewska E, Witczak P, Pietrzak A, Brzezińska-Błaszczyk E. Different potency of bacterial antigens TLR2 and TLR4 ligands in stimulating mature mast cells to cysteinyl leukotriene synthesis. *Microbiol Immunol.* 1 mars 2012;56(3):183-90.

Badiou C, Dumitrescu O, Croze M, Gillet Y, Dohin B, Slayman DH, et al. Panton-Valentine leukocidin is expressed at toxic levels in human skin abscesses. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* déc 2008;14(12):1180-3.

Badiou C, Dumitrescu O, George N, Forbes ARN, Drougka E, Chan KS, et al. Rapid detection of Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin in clinical specimens by enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic tests. *J Clin Microbiol.* avr 2010;48(4):1384-90.

Berlon NR, Qi R, Sharma-Kuinkel BK, Joo H-S, Park LP, George D, et al. Clinical MRSA isolates from skin and soft tissue infections show increased in vitro production of phenol soluble modulins. *J Infect.* 14 juin 2015;

Bernardo K, Pakulat N, Fleer S, Schnaith A, Utermöhlen O, Krut O, et al. Subinhibitory concentrations of linezolid reduce Staphylococcus aureus virulence factor expression. *Antimicrob Agents Chemother.* févr 2004;48(2):546-55.

Berube BJ, Bubeck Wardenburg J. Staphylococcus aureus α -toxin: nearly a century of intrigue. *Toxins.* juin 2013;5(6):1140-66.

Björnsdóttir H, Dahlstrand Rudin A, Klose FP, Elmwall J, Welin A, Stylianou M, et al. Phenol-Soluble Modulin α Peptide Toxins from Aggressive Staphylococcus aureus Induce Rapid Formation of Neutrophil Extracellular Traps through a Reactive Oxygen Species-Independent Pathway. *Front Immunol.* 2017;8.

Bloomfield SF, Scott E. Cross-contamination and infection in the domestic environment and the role of chemical disinfectants. *J Appl Microbiol.* juill 1997;83(1):1-9.

Bojer MS, Lindemose S, Vestergaard M, Ingmer H. Quorum Sensing-Regulated Phenol-Soluble Modulins Limit Persister Cell Populations in Staphylococcus aureus. *Front Microbiol.* 2018;9:255.

Bourigault C, Corvec S, Brulet V, Robert P-Y, Mounoury O, Goubin C, et al. Outbreak of Skin Infections Due to Panton-Valentine Leukocidin-Positive Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus in a French Prison in 2010-2011. *PLoS Curr.* 7 mars 2014;6.

Bronesky D, Wu Z, Marzi S, Walter P, Geissmann T, Moreau K, et al. Staphylococcus aureus RNAIII and Its Regulon Link Quorum Sensing, Stress Responses, Metabolic Adaptation, and Regulation of Virulence Gene Expression. *Annu Rev Microbiol.* 8 sept 2016;70:299-316.

Brzezińska-Błaszczyk E, Rdzany RS. Lipoteichoic acids selectively stimulate rat mast cells to cysteinyl leukotriene generation and affect mast cell migration after tumor necrosis factor (TNF)-priming. *Immunol Lett.* 15 avr 2007;109(2):138-44.

Cardot Martin E, Michel A, Raynal B, Badiou C, Laurent F, Vandenesch F, et al. Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain USA300 resists staphylococcal protein A modulation by antibiotics and antimicrobial peptides. *Int J Antimicrob Agents.* janv 2015;45(1):19-24.

Chatterjee SS, Joo H-S, Duong AC, Dieringer TD, Tan VY, Song Y, et al. Essential Staphylococcus aureus toxin export system. *Nat Med.* mars 2013;19(3):364-7.

Cheung AL, Nishina KA, Trotonda MP, Tamber S. The SarA protein family of Staphylococcus aureus. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(3):355-61.

Cheung GYC, Duong AC, Otto M. Direct and synergistic hemolysis caused by Staphylococcus phenol-soluble modulins: implications for diagnosis and pathogenesis. *Microbes Infect Inst Pasteur.* avr 2012;14(4):380-6.

Chi C-Y, Lin C-C, Liao I-C, Yao Y-C, Shen F-C, Liu C-C, et al. Panton-Valentine Leukocidin Facilitates the Escape of Staphylococcus aureus From Human Keratinocyte Endosomes and Induces Apoptosis. *J Infect Dis.* 6 sept 2013;

Chini V, Petinaki E, Foka A, Paratiras S, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I. Spread of Staphylococcus aureus clinical isolates carrying Panton-Valentine leukocidin genes during a 3-year period in Greece. *Clin Microbiol Infect.* 1 janv 2006;12(1):29-34.

Chua KY, Monk IR, Lin Y-H, Seemann T, Tuck KL, Porter JL, et al. Hyperexpression of α -hemolysin explains enhanced virulence of sequence type 93 community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *BMC Microbiol.* 10 févr 2014;14:31.

Colin DA, Mazurier I, Sire S, Finck-Barbançon V. Interaction of the two components of leukocidin from Staphylococcus aureus with human polymorphonuclear leukocyte membranes: sequential binding and subsequent activation. *Infect Immun.* août 1994;62(8):3184-8.

Couvé-Deacon E, Tristan A, Pestourie N, Faure C, Doffoel-Hantz V, Garnier F, et al. Outbreak of Panton-Valentine Leukocidin-Associated Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus Infection in a Rugby Team, France, 2010-2011. *Emerg Infect Dis.* janv 2016;22(1):96-9.

Crémieux A-C, Dumitrescu O, Lina G, Vallee C, Côté J-F, Muffat-Joly M, et al. Panton-valentine leukocidin enhances the severity of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus rabbit osteomyelitis. *PloS One.* 25 sept 2009;4(9):e7204.

Crémieux A-C, Saleh-Mghir A, Danel C, Couzon F, Dumitrescu O, Lilin T, et al. α -Hemolysin, not Panton-Valentine leukocidin, impacts rabbit mortality from severe sepsis with methicillin-resistant Staphylococcus aureus osteomyelitis. *J Infect Dis.* 1 juin 2014;209(11):1773-80.

DeLeo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF. Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Lancet.* 1 mai 2010;375(9725):1557-68.

Di Nardo A, Vitiello A, Gallo RL. Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 mars 2003;170(5):2274-8.

Dickgiesser N, Wallach U. Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1): influence of its production by subinhibitory antibiotic concentrations. *Infection*. 1987;15(5):351-3.

Diep BA, Chan L, Tattevin P, Kajikawa O, Martin TR, Basuino L, et al. Polymorphonuclear leukocytes mediate Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23 mars 2010;107(12):5587-92.

Dohin B, Gillet Y, Kohler R, Lina G, Vandenesch F, Vanhems P, et al. Pediatric bone and joint infections caused by Panton-Valentine leukocidin-positive Staphylococcus aureus. *Pediatr Infect Dis J*. nov 2007;26(11):1042-8.

Dominguez TJ. It's not a spider bite, it's community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *J Am Board Fam Pract Am Board Fam Pract*. juin 2004;17(3):220-6.

Dumitrescu O, Badiou C, Bes M, Reverdy M-E, Vandenesch F, Etienne J, et al. Effect of antibiotics, alone and in combination, on Panton-Valentine leukocidin production by a Staphylococcus aureus reference strain. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. avr 2008;14(4):384-8.

Dumitrescu O, Boisset S, Badiou C, Bes M, Benito Y, Reverdy M-E, et al. Effect of antibiotics on Staphylococcus aureus producing Panton-Valentine leukocidin. *Antimicrob Agents Chemother*. avr 2007;51(4):1515-9.

Dumitrescu O, Choudhury P, Boisset S, Badiou C, Bes M, Benito Y, et al. Beta-lactams interfering with PBPI induce Panton-Valentine leukocidin expression by triggering sarA and rot global regulators of Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother*. juill 2011;55(7):3261-71.

DuMont AL, Yoong P, Day CJ, Alonzo F, McDonald WH, Jennings MP, et al. Staphylococcus aureus LukAB cytotoxin kills human neutrophils by targeting the CD11b subunit of the integrin Mac-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25 juin 2013;110(26):10794-9.

Faber TW, Pullen NA, Fernando JFA, Kolawole EM, McLeod JJA, Taruselli M, et al. ADAM10 is required for SCF-induced mast cell migration. *Cell Immunol*. juill 2014;290(1):80-8.

Feng B-S, He S-H, Zheng P-Y, Wu L, Yang P-C. Mast cells play a crucial role in Staphylococcus aureus peptidoglycan-induced diarrhea. *Am J Pathol*. août 2007;171(2):537-47.

Forsman H, Christenson K, Bylund J, Dahlgren C. Receptor-dependent and -independent immunomodulatory effects of phenol-soluble modulins from Staphylococcus aureus on human neutrophils are abrogated through peptide inactivation by reactive oxygen species. *Infect Immun*. juin 2012;80(6):1987-95.

Fowler VG, Sakoulas G, McIntyre LM, Meka VG, Arbeit RD, Cabell CH, et al. Persistent bacteremia due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection is associated with agr dysfunction and low-level in vitro resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein. *J Infect Dis*. 15 sept 2004;190(6):1140-9.

Frossi B, Mion F, Sibilano R, Danelli L, Pucillo CEM. Is it time for a new classification of mast cells? What do we know about mast cell heterogeneity? *Immunol Rev*. 1 mars 2018;282(1):35-46.

Füreder W, Agis H, Willheim M, Bankl HC, Maier U, Kishi K, et al. Differential expression of complement receptors on human basophils and mast cells. Evidence for mast cell heterogeneity and CD88/C5aR expression on skin mast cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 sept 1995;155(6):3152-60.

Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol*. nov 2011;12(11):1035-44.

Galli SJ, Tsai M, Marichal T, Tchougounova E, Reber LL, Pejler G. Approaches for analyzing the roles of mast cells and their proteases in vivo. *Adv Immunol*. 2015;126:45-127.

Gemmell CG, Ford CW. Virulence factor expression by Gram-positive cocci exposed to subinhibitory concentrations of linezolid. *J Antimicrob Chemother*. nov 2002;50(5):665-72.

Genestier A-L, Michallet M-C, Prévost G, Bellot G, Chalabreysse L, Peyrol S, et al. Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J Clin Invest*. nov 2005;115(11):3117-27.

Geoghegan JA, Irvine AD, Foster TJ. Staphylococcus aureus and Atopic Dermatitis: A Complex and Evolving Relationship. *Trends Microbiol*. 9 déc 2017.

Ghannadan M, Baghestanian M, Wimazal F, Eisenmenger M, Latal D, Kargül G, et al. Phenotypic characterization of human skin mast cells by combined staining with toluidine blue and CD antibodies. *J Invest Dermatol*. oct 1998;111(4):689-95.

Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet J-C, Lina G, Bes M, et al. Association between Staphylococcus aureus strains carrying gene for Pantone-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet*. 2 mars 2002;359(9308):753-9.

del Giudice P, Blanc V, de Rougemont A, Bes M, Lina G, Hubiche T, et al. Primary skin abscesses are mainly caused by Pantone-Valentine leukocidin-positive Staphylococcus aureus strains. *Dermatol Basel Switz*. 2009;219(4):299-302.

Goldmann O, Tuchscher 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*. 2016;18(6):807-19.

Gong J, Yang N-S, Croft M, Weng I-C, Sun L, Liu F-T, et al. The antigen presentation function of bone marrow-derived mast cells is spatiotemporally restricted to a subset expressing high levels of cell surface Fc ϵ RI and MHC II. *BMC Immunol*. 30 juin 2010;11:34.

Grosz M, Kolter J, Paprotka K, Winkler A-C, Schäfer D, Chatterjee SS, et al. Cytoplasmic replication of Staphylococcus aureus upon phagosomal escape triggered by phenol-soluble modulins. *Cell Microbiol*. 24 oct 2013;

Gupta K, Harvima IT. Mast cell-neural interactions contribute to pain and itch. *Immunol Rev*. mars 2018;282(1):168-87.

Herbert S, Barry P, Novick RP. Subinhibitory clindamycin differentially inhibits transcription of exoprotein genes in Staphylococcus aureus. *Infect Immun*. mai 2001;69(5):2996-3003.

Hilliard JJ, Datta V, Tkaczyk C, Hamilton M, Sadowska A, Jones-Nelson O, et al. Anti-alpha-toxin monoclonal antibody and antibiotic combination therapy improves disease outcome and accelerates

healing in a *Staphylococcus aureus* dermonecrosis model. *Antimicrob Agents Chemother.* janv 2015;59(1):299-309.

Hodille E, Cuerq C, Badiou C, Bienvenu F, Steghens J-P, Cartier R, et al. Delta Hemolysin and Phenol-Soluble Modulins, but Not Alpha Hemolysin or Panton-Valentine Leukocidin, Induce Mast Cell Activation. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016;6:180.

Hodille E, Rose W, Diep BA, Goutelle S, Lina G, Dumitrescu O. The Role of Antibiotics in Modulating Virulence in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev.* oct 2017;30(4):887-917.

Hogan AD, Schwartz LB. Markers of mast cell degranulation. *Methods San Diego Calif.* sept 1997;13(1):43-52.

Holmes A, Ganner M, McGuane S, Pitt TL, Cookson BD, Kearns AM. *Staphylococcus aureus* isolates carrying Panton-Valentine leukocidin genes in England and Wales: frequency, characterization, and association with clinical disease. *J Clin Microbiol.* mai 2005;43(5):2384-90.

Hu D-L, Nakane A. Mechanisms of staphylococcal enterotoxin-induced emesis. *Eur J Pharmacol.* janv 2014;722:95-107.

Ikeda T, Funaba M. Altered function of murine mast cells in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Immunol Lett.* 3 juill 2003;88(1):21-6.

Imajo N, Kurihara D, Fukuishi N, Inukai A, Matsushita S, Noda S, et al. Lipoteichoic acid improves the capability of mast cells in the host defense system against bacteria. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al.* nov 2009;58(11):797-807.

Inoshima I, Inoshima N, Wilke GA, Powers ME, Frank KM, Wang Y, et al. A *Staphylococcus aureus* pore-forming toxin subverts the activity of ADAM10 to cause lethal infection in mice. *Nat Med.* 18 sept 2011;17(10):1310-4.

Janssens AS, Heide R, Hollander JC den, Mulder PGM, Tank B, Oranje AP. Mast cell distribution in normal adult skin. *J Clin Pathol.* 1 mars 2005;58(3):285-9.

Jehl F, Chomar M, Tankovic J, Gérard A. De l'Antibiogramme à la Prescription. *BioMérieux.* 2012. (BioMérieux University).

Jiang B, Wang Y, Feng Z, Xu L, Tan L, Zhao S, et al. Panton-Valentine Leukocidin (PVL) as a Potential Indicator for Prevalence, Duration, and Severity of *Staphylococcus aureus* Osteomyelitis. *Front Microbiol.* 2017;8:2355.

Johnzon C-F, Rönnerberg E, Guss B, Pejler G. Live *Staphylococcus aureus* Induces Expression and Release of Vascular Endothelial Growth Factor in Terminally Differentiated Mouse Mast Cells. *Front Immunol.* 2016;7.

Joo H-S, Chan JL, Cheung GYC, Otto M. Subinhibitory concentrations of protein synthesis-inhibiting antibiotics promote increased expression of the agr virulence regulator and production of phenol-soluble modulins in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* nov 2010;54(11):4942-4.

Joo H-S, Chatterjee SS, Villaruz AE, Dickey SW, Tan VY, Chen Y, et al. Mechanism of Gene Regulation by a *Staphylococcus aureus* Toxin. *mBio [Internet].* 25 oct 2016;7(5).

- Joo H-S, Cheung GYC, Otto M. Antimicrobial activity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is caused by phenol-soluble modulins derivatives. *J Biol Chem*. 18 mars 2011;286(11):8933-40.
- Kambe N, Kambe M, Kochan JP, Schwartz LB. Human skin-derived mast cells can proliferate while retaining their characteristic functional and protease phenotypes. *Blood*. 1 avr 2001;97(7):2045-52.
- Kobayashi SD, Malachowa N, Whitney AR, Braughton KR, Gardner DJ, Long D, et al. Comparative analysis of USA300 virulence determinants in a rabbit model of skin and soft tissue infection. *J Infect Dis*. 15 sept 2011;204(6):937-41.
- von Köckritz-Blickwede M, Goldmann O, Thulin P, Heinemann K, Norrby-Teglund A, Rohde M, et al. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood*. 15 mars 2008;111(6):3070-80.
- Komisar J, Rivera J, Vega A, Tseng J. Effects of staphylococcal enterotoxin B on rodent mast cells. *Infect Immun*. 7 janv 1992;60(7):2969-75.
- König B, Prévost G, Piémont Y, König W. Effects of *Staphylococcus aureus* leukocidins on inflammatory mediator release from human granulocytes. *J Infect Dis*. mars 1995;171(3):607-13.
- Kretschmer D, Gleske A-K, Rautenberg M, Wang R, Köberle M, Bohn E, et al. Human formyl peptide receptor 2 senses highly pathogenic *Staphylococcus aureus*. *Cell Host Microbe*. 25 juin 2010;7(6):463-73.
- Kulka M, Metcalfe DD. Isolation of tissue mast cells. *Curr Protoc Immunol Ed John E Coligan Al*. août 2010;Chapter 7:Unit 7.25.
- Kurashima Y, Amiya T, Fujisawa K, Shibata N, Suzuki Y, Kogure Y, et al. The Enzyme Cyp26b1 Mediates Inhibition of Mast Cell Activation by Fibroblasts to Maintain Skin-Barrier Homeostasis. *Immunity*. 17 avr 2014;40(4):530-41.
- Le VTM, Tkaczyk C, Chau S, Rao RL, Dip EC, Pereira-Franchi EP, et al. Critical Role of Alpha-Toxin and Protective Effects of Its Neutralization by a Human Antibody in Acute Bacterial Skin and Skin Structure Infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 10 janv 2016;60(10):5640-8.
- Lei Z, Zhang D, Lu B, Zhou W, Wang D. Activation of mast cells in skin abscess induced by *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) infection in mice. *Res Vet Sci*. 25 janv 2018;118:66-71.
- Leung DY, Harbeck R, Bina P, Reiser RF, Yang E, Norris DA, et al. Presence of IgE antibodies to staphylococcal exotoxins on the skin of patients with atopic dermatitis. Evidence for a new group of allergens. *J Clin Invest*. sept 1993;92(3):1374-80.
- Lewis JS, Jorgensen JH. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococci*: should clinicians and microbiologists be concerned? *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 15 janv 2005;40(2):280-5.
- Li M, Cheung GYC, Hu J, Wang D, Joo H-S, DeLeo FR, et al. Comparative Analysis of Virulence and Toxin Expression of Global Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *J Infect Dis*. 15 déc 2010;202(12):1866-76.
- Liang X, Hall JW, Yang J, Yan M, Doll K, Bey R, et al. Identification of single nucleotide polymorphisms associated with hyperproduction of alpha-toxin in *Staphylococcus aureus*. *PloS One*. 8 avr 2011;6(4):e18428.

Lin T-J, Garduno R, Boudreau RTM, Issekutz AC. *Pseudomonas aeruginosa* activates human mast cells to induce neutrophil transendothelial migration via mast cell-derived IL-1 alpha and beta. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 oct 2002;169(8):4522-30.

Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. nov 1999;29(5):1128-32.

Lipinska U, Hermans K, Meulemans L, Dumitrescu O, Badiou C, Duchateau L, et al. Panton-Valentine leukocidin does play a role in the early stage of *Staphylococcus aureus* skin infections: a rabbit model. *PloS One*. 2011;6(8):e22864.

Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, et al. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1 févr 2011;52(3):e18-55.

Liu Q, Yeo W-S, Bae T. The SaeRS Two-Component System of *Staphylococcus aureus*. *Genes*. 3 oct 2016;7(10).

Löffler B, Hussain M, Grundmeier M, Brück M, Holzinger D, Varga G, et al. *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS Pathog*. janv 2010;6(1):e1000715.

Lotfi-Emran S, Ward BR, Le QT, Pozez AL, Manjili MH, Woodfolk JA, et al. Human mast cells present antigen to autologous CD4+ T cells. *J Allergy Clin Immunol*. janv 2018;141(1):311-321.e10.

Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*. 20 août 1998;339(8):520-32.

Ma YJ, Kim C-H, Ryu K-H, Kim M-S, So Y-I, Lee K-J, et al. Adenosine derived from *Staphylococcus aureus*-engulfed macrophages functions as a potent stimulant for the induction of inflammatory cytokines in mast cells. *BMB Rep*. mai 2011;44(5):335-40.

Malaviya R, Ross EA, MacGregor JI, Ikeda T, Little JR, Jakschik BA, et al. Mast cell phagocytosis of FimH-expressing enterobacteria. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 févr 1994;152(4):1907-14.

Malbec O, Roget K, Schiffer C, Iannascoli B, Dumas AR, Arock M, et al. Peritoneal cell-derived mast cells: an in vitro model of mature serosal-type mouse mast cells. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 mai 2007;178(10):6465-75.

Matsui K, Nishikawa A. Percutaneous application of peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* induces an increase in mast cell numbers in the dermis of mice. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. mars 2005;35(3):382-7.

Maurer M, Pucillo C. What we know (and don't know) about the biology and functions of mast cells and basophils. *Immunol Rev*. 1 mars 2018;282(1):5-7.

Mee-Marquet N van der, Poisson D-M, Lavigne J-P, Francia T, Tristan A, Vandenesch F, et al. The incidence of *Staphylococcus aureus* ST8-USA300 among French pediatric inpatients is rising. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1 mai 2015;34(5):935-42.

Menzies BE, Kernodle DS. Site-directed mutagenesis of the alpha-toxin gene of *Staphylococcus aureus*: role of histidines in toxin activity in vitro and in a murine model. *Infect Immun*. mai

1994;62(5):1843-7.

Metz M, Magerl M, Köhl NF, Valeva A, Bhakdi S, Maurer M. Mast cells determine the magnitude of bacterial toxin-induced skin inflammation. *Exp Dermatol.* févr 2009;18(2):160-6.

Möllerherm H, von Köckritz-Blickwede M, Branitzki-Heinemann K. Antimicrobial Activity of Mast Cells: Role and Relevance of Extracellular DNA Traps. *Front Immunol.* 2016;7:265.

Montgomery CP, Boyle-Vavra S, Daum RS. Importance of the global regulators Agr and SaeRS in the pathogenesis of CA-MRSA USA300 infection. *PloS One.* 2010;5(12):e15177.

Motakis E, Guhl S, Ishizu Y, Itoh M, Kawaji H, Hoon M de, et al. Redefinition of the human mast cell transcriptome by deep-CAGE sequencing. *Blood.* 24 avr 2014;123(17):e58-67.

Mukai K, Tsai M, Saito H, Galli SJ. Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors. *Immunol Rev.* mars 2018;282(1):121-50.

Nakamura Y, Oscherwitz J, Cease KB, Chan SM, Muñoz-Planillo R, Hasegawa M, et al. Staphylococcus δ -toxin induces allergic skin disease by activating mast cells. *Nature.* 21 nov 2013;503(7476):397-401.

Nathwani D, Morgan M, Masterton RG, Dryden M, Cookson BD, French G, et al. Guidelines for UK practice for the diagnosis and management of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) infections presenting in the community. *J Antimicrob Chemother.* mai 2008;61(5):976-94.

Nilsson G, Blom T, Kusche-Gullberg M, Kjellén L, Butterfield JH, Sundström C, et al. Phenotypic characterization of the human mast-cell line HMC-1. *Scand J Immunol.* mai 1994;39(5):489-98.

Novick RP, Jiang D. The staphylococcal saeRS system coordinates environmental signals with agr quorum sensing. *Microbiol Read Engl.* oct 2003;149(Pt 10):2709-17.

Nygaard TK, Pallister KB, DuMont AL, DeWald M, Watkins RL, Pallister EQ, et al. Alpha-toxin induces programmed cell death of human T cells, B cells, and monocytes during USA300 infection. *PloS One.* 2012;7(5):e36532.

Nygaard TK, Pallister KB, Zurek OW, Voyich JM. The impact of α -toxin on host cell plasma membrane permeability and cytokine expression during human blood infection by CA-MRSA USA300. *J Leukoc Biol.* nov 2013;94(5):971-9.

O'Hara FP, Amrine-Madsen H, Mera RM, Brown ML, Close NM, Suaya JA, et al. Molecular characterization of Staphylococcus aureus in the United States 2004-2008 reveals the rapid expansion of USA300 among inpatients and outpatients. *Microb Drug Resist Larchmt N.* déc 2012;18(6):555-61.

Ohlsen K, Ziebuhr W, Koller KP, Hell W, Wichelhaus TA, Hacker J. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on alpha-toxin (hla) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* nov 1998;42(11):2817-23.

Ono HK, Nishizawa M, Yamamoto Y, Hu D-L, Nakane A, Shinagawa K, et al. Submucosal mast cells in the gastrointestinal tract are a target of staphylococcal enterotoxin type A. *FEMS Immunol Med Microbiol.* avr 2012;64(3):392-402.

- Otto MP, Martin E, Badiou C, Lebrun S, Bes M, Vandenesch F, et al. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* juill 2013;68(7):1524-32.
- Paludo KS, Biscaia SMP, Chaim OM, Otuki MF, Naliwaiko K, Dombrowski PA, et al. Inflammatory events induced by brown spider venom and its recombinant dermonecrotic toxin: a pharmacological investigation. *Comp Biochem Physiol Toxicol Pharmacol CBP.* avr 2009;149(3):323-33.
- Panton PN, Valentine FCO. STAPHYLOCOCCAL TOXIN. *The Lancet.* 5 mars 1932;219(5662):506-8.
- Peschel A, Otto M. Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nat Rev Microbiol.* oct 2013;11(10):667-73.
- Pichereau S, Pantrangi M, Couet W, Badiou C, Lina G, Shukla SK, et al. Simulated antibiotic exposures in an in vitro hollow-fiber infection model influence toxin gene expression and production in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain MW2. *Antimicrob Agents Chemother.* janv 2012;56(1):140-7.
- Piliponsky AM, Romani L. The contribution of mast cells to bacterial and fungal infection immunity. *Immunol Rev.* mars 2018;282(1):188-97.
- Pinke KH, Lima HG de, Cunha FQ, Lara VS. Mast cells phagocyte *Candida albicans* and produce nitric oxide by mechanisms involving TLR2 and Dectin-1. *Immunobiology.* févr 2016;221(2):220-7.
- Powers ME, Kim HK, Wang Y, Bubeck Wardenburg J. ADAM10 mediates vascular injury induced by *Staphylococcus aureus* α -hemolysin. *J Infect Dis.* 1 août 2012;206(3):352-6.
- Prevost G, Couppie P, Prevost P, Gayet S, Petiau P, Cribier B, et al. Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. *J Med Microbiol.* avr 1995;42(4):237-45.
- Qi R, Joo H-S, Sharma-Kuinkel B, Berlon NR, Park L, Fu C-L, et al. Increased in vitro phenol-soluble modulin production is associated with soft tissue infection source in clinical isolates of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *J Infect.* mars 2016;72(3):302-8.
- Qiao H, Andrade MV, Lisboa FA, Morgan K, Beaven MA. Fc ϵ psilonR1 and toll-like receptors mediate synergistic signals to markedly augment production of inflammatory cytokines in murine mast cells. *Blood.* 15 janv 2006;107(2):610-8.
- Rattmann YD, Pereira CR, Cury Y, Gremski W, Marques MCA, da Silva-Santos JE. Vascular permeability and vasodilation induced by the *Loxosceles intermedia* venom in rats: involvement of mast cell degranulation, histamine and 5-HT receptors. *Toxicol Off J Int Soc Toxicology.* 1 mars 2008;51(3):363-72.
- Redegeld FA, Yu Y, Kumari S, Charles N, Blank U. Non-IgE mediated mast cell activation. *Immunol Rev.* mars 2018;282(1):87-113.
- Reyes-Robles T, Alonzo F 3rd, Kozhaya L, Lacy DB, Unutmaz D, Torres VJ. *Staphylococcus aureus* Leukotoxin ED Targets the Chemokine Receptors CXCR1 and CXCR2 to Kill Leukocytes and Promote Infection. *Cell Host Microbe.* 16 oct 2013;14(4):453-9.

Robert J, Tristan A, Cavalié L, Decousser J-W, Bes M, Etienne J, et al. Panton-valentine leukocidin-positive and toxic shock syndrome toxin 1-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a French multicenter prospective study in 2008. *Antimicrob Agents Chemother.* avr 2011;55(4):1734-9.

Romilly C, Lays C, Tomasini A, Caldelari I, Benito Y, Hammann P, et al. A non-coding RNA promotes bacterial persistence and decreases virulence by regulating a regulator in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog.* mars 2014;10(3):e1003979.

Rönnberg E, Johnzon C-F, Calounova G, Garcia Faroldi G, Grujic M, Hartmann K, et al. Mast cells are activated by *Staphylococcus aureus* in vitro but do not influence the outcome of intraperitoneal *S. aureus* infection in vivo. *Immunology.* oct 2014;143(2):155-63.

Rouzic N, Janvier F, Libert N, Javouhey E, Lina G, Nizou J-Y, et al. Prompt and successful toxin-targeting treatment of three patients with necrotizing pneumonia due to *Staphylococcus aureus* strains carrying the Panton-Valentine leukocidin genes. *J Clin Microbiol.* mai 2010;48(5):1952-5.

Rudkin JK, Laabei M, Edwards AM, Joo H-S, Otto M, Lennon KL, et al. Oxacillin alters the toxin expression profile of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(2):1100-7.

Saïd-Salim B, Dunman PM, McAleese FM, Macapagal D, Murphy E, McNamara PJ, et al. Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot. *J Bacteriol.* janv 2003;185(2):610-9.

Saunders AE, Johnson P. Modulation of immune cell signalling by the leukocyte common tyrosine phosphatase, CD45. *Cell Signal.* mars 2010;22(3):339-48.

Schreiner J, Kretschmer D, Klenk J, Otto M, Bühring H-J, Stevanovic S, et al. *Staphylococcus aureus* Phenol-Soluble Modulin Peptides Modulate Dendritic Cell Functions and Increase In Vitro Priming of Regulatory T Cells. *J Immunol.* 1 avr 2013;190(7):3417-26.

Schwartz K, Syed AK, Stephenson RE, Rickard AH, Boles BR. Functional Amyloids Composed of Phenol Soluble Modulins Stabilize *Staphylococcus aureus* Biofilms. *PLoS Pathog.* 7 juin 2012;8(6).

Shallcross LJ, Fragaszy E, Johnson AM, Hayward AC. The role of the Panton-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* janv 2013;13(1):43-54.

Shopsin B, Drlica-Wagner A, Mathema B, Adhikari RP, Kreiswirth BN, Novick RP. Prevalence of agr dysfunction among colonizing *Staphylococcus aureus* strains. *J Infect Dis.* 15 oct 2008;198(8):1171-4.

Spaan AN. Hiding in plain sight - host-cell receptors that determine toxin tissue specificity. Communication orale présenté à: ECCMID 2018; 2018.

Spaan AN, Henry T, van Rooijen WJM, Perret M, Badiou C, Aerts PC, et al. The staphylococcal toxin Panton-Valentine Leukocidin targets human C5a receptors. *Cell Host Microbe.* 15 mai 2013;13(5):584-94.

Spaan AN, Reyes-Robles T, Badiou C, Cochet S, Boguslawski KM, Yoong P, et al. *Staphylococcus aureus* Targets the Duffy Antigen Receptor for Chemokines (DARC) to Lyse Erythrocytes. *Cell Host Microbe.* 9 sept 2015a;18(3):363-70.

Spaan AN, Schiepers A, de Haas CJC, van Hooijdonk DDJJ, Badiou C, Contamin H, et al. Differential Interaction of the Staphylococcal Toxins Panton-Valentine Leukocidin and γ -Hemolysin CB with

Human C5a Receptors. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 août 2015b;195(3):1034-43.

Spaan AN, Vrieling M, Wallet P, Badiou C, Reyes-Robles T, Ohneck EA, et al. The staphylococcal toxins γ -haemolysin AB and CB differentially target phagocytes by employing specific chemokine receptors. *Nat Commun*. 2014;5:5438.

St John AL, Abraham SN. Innate immunity and its regulation by mast cells. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 mai 2013;190(9):4458-63.

Steinhuber A, Landmann R, Goerke C, Wolz C, Flückiger U. Bioluminescence imaging to study the promoter activity of hla of *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo. *Int J Med Microbiol IJMM*. oct 2008;298(7-8):599-605.

Stelekati E, Bahri R, D'Orlando O, Orinska Z, Mittrücker H-W, Langenhaun R, et al. Mast cell-mediated antigen presentation regulates CD8⁺ T cell effector functions. *Immunity*. 16 oct 2009;31(4):665-76.

Stevens DL, Ma Y, Salmi DB, McIndoo E, Wallace RJ, Bryant AE. Impact of antibiotics on expression of virulence-associated exotoxin genes in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*. 15 janv 2007;195(2):202-11.

Stevens DL, Wallace RJ, Hamilton SM, Bryant AE. Successful treatment of staphylococcal toxic shock syndrome with linezolid: a case report and in vitro evaluation of the production of toxic shock syndrome toxin type 1 in the presence of antibiotics. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1 mars 2006;42(5):729-30.

Suchard JR. « Spider bite » lesions are usually diagnosed as skin and soft-tissue infections. *J Emerg Med*. nov 2011;41(5):473-81.

Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Akira S, Okumura K, Ra C, et al. Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J Clin Invest*. mai 2002;109(10):1351-9.

Sur R, Cavender D, Malaviya R. Different approaches to study mast cell functions. *Int Immunopharmacol*. mai 2007;7(5):555-67.

Surewaard BGJ, Nijland R, Spaan AN, Kruijtzter JAW, de Haas CJC, van Strijp JAG. Inactivation of staphylococcal phenol soluble modulins by serum lipoprotein particles. *PLoS Pathog*. 2012;8(3):e1002606.

Syed AK, Reed TJ, Clark KL, Boles BR, Kahlenberg JM. *Staphylococcus aureus* phenol soluble modulins stimulate the release of pro-inflammatory cytokines from keratinocytes and are required for induction of skin inflammation. *Infect Immun*. 15 juin 2015;

Tavares A, Nielsen JB, Boye K, Rohde S, Paulo AC, Westh H, et al. Insights into Alpha-Hemolysin (Hla) Evolution and Expression among *Staphylococcus aureus* Clones with Hospital and Community Origin. *PLOS ONE*. 17 juill 2014;9(7):e98634.

Traber KE, Lee E, Benson S, Corrigan R, Cantera M, Shopsin B, et al. agr function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbiol Read Engl*. août 2008;154(Pt 8):2265-74.

Tristan A, Ranc A-G, Gustave C-A, Dupieux-Chabert C, Bes M, Lina G, et al. Rapport annuel d'activité du Centre National de Référence des Staphylocoques - Année 2017. 2018.

- Tuchscher L, Löffler B. *Staphylococcus aureus* dynamically adapts global regulators and virulence factor expression in the course from acute to chronic infection. *Curr Genet*. févr 2016;62(1):15-7.
- Urb M, Sheppard DC. The role of mast cells in the defence against pathogens. *PLoS Pathog*. 2012;8(4):e1002619.
- Valour F, Rasigade J-P, Trouillet-Assant S, Gagnaire J, Bouaziz A, Karsenty J, et al. 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 Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. juin 2015;21(6):568.e1-11.
- Varricchi G, Raap U, Rivellese F, Marone G, Gibbs BF. Human mast cells and basophils—How are they similar how are they different? *Immunol Rev*. 1 mars 2018;282(1):8-34.
- Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, Bach T-HL, Queck SY, Li M, et al. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat Med*. déc 2007;13(12):1510-4.
- Wang Z, Mascarenhas N, Eckmann L, Miyamoto Y, Sun X, Kawakami T, et al. Skin microbiome promotes mast cell maturation by triggering stem cell factor production in keratinocytes. *J Allergy Clin Immunol*. 1 avr 2017;139(4):1205-1216.e6.
- Werfel T, Oppermann M, Butterfield JH, Begemann G, Elsner J, Götze O, et al. The human mast cell line HMC-1 expresses C5a receptors and responds to C5a but not to C5a(desArg). *Scand J Immunol*. juill 1996;44(1):30-6.
- Wilke GA, Bubeck Wardenburg J. Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 27 juill 2010;107(30):13473-8.
- Woods CR. Macrolide-inducible resistance to clindamycin and the D-test. *Pediatr Infect Dis J*. déc 2009;28(12):1115-8.
- Wu L, Feng B-S, He S-H, Zheng P-Y, Croitoru K, Yang P-C. Bacterial peptidoglycan breaks down intestinal tolerance via mast cell activation: the role of TLR2 and NOD2. *Immunol Cell Biol*. oct 2007;85(7):538-45.
- Wulff BC, Wilgus TA. Mast cell activity in the healing wound: more than meets the eye? *Exp Dermatol*. août 2013;22(8):507-10.
- Yamaki J, Synold T, Wong-Beringer A. Antivirulence potential of TR-700 and clindamycin on clinical isolates of *Staphylococcus aureus* producing phenol-soluble modulins. *Antimicrob Agents Chemother*. sept 2011;55(9):4432-5.
- Yamaki J, Synold T, Wong-Beringer A. Tigecycline induction of phenol-soluble modulins by invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. sept 2013;57(9):4562-5.
- Yarwood JM, McCormick JK, Schlievert PM. Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. févr 2001;183(4):1113-23.

Yarwood JM, Schlievert PM. Quorum sensing in Staphylococcus infections. J Clin Invest. déc 2003;112(11):1620-5.

Zhu Y, Pan WH, Wang XR, Liu Y, Chen M, Xu XG, et al. Tryptase and protease-activated receptor-2 stimulate scratching behavior in a murine model of ovalbumin-induced atopic-like dermatitis. Int Immunopharmacol. sept 2015;28(1):507-12.