



**HAL**  
open science

# Modélisation in vitro de la colonisation à staphylococcus aureus ; interactions avec l'infection à rhinovirus

Mohamed Fedy Morgene

## ► To cite this version:

Mohamed Fedy Morgene. Modélisation in vitro de la colonisation à staphylococcus aureus ; interactions avec l'infection à rhinovirus. Médecine humaine et pathologie. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSES054 . tel-02178370

**HAL Id: tel-02178370**

**<https://theses.hal.science/tel-02178370>**

Submitted on 9 Jul 2019

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

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



N° d'ordre NNT : 2018LYSES054

## **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

opérée au sein du

**Groupe sur l'Immunité des Muqueuses et Agents pathogènes  
(GIMAP EA3064, Faculté de Médecine Jacques Lisfranc,  
Université de Saint-Etienne)**

**Ecole Doctorale N° 488  
Sciences – Ingénierie - Santé**

**Spécialité de doctorat :  
Biologie moléculaire et cellulaire**

---

# **Modélisation in vitro de la colonisation nasale à *Staphylococcus aureus* ; interactions avec l'infection à rhinovirus**

---

soutenue publiquement le 07 novembre 2018, par

**Mohamed Fedy MORGENE**

devant un jury composé de

**Pr. Frédéric LAURENT,  
Pr. Caroline TAPPAREL,  
Pr. Jean-Philippe LAVIGNE,  
Pr. Florence MORFIN,  
Pr. Bruno POZZETTO,  
Dr Paul VERHOEVEN,**

PharmD PhD, Université de Lyon  
PhD, Université de Genève  
MD PhD, Université Montpellier  
PharmD PhD, Université de Lyon  
MD PhD, Université de Saint-Etienne  
MD PhD, Université de Saint-Etienne

Président  
Rapporteuse  
Rapporteur  
Examinatrice  
Directeur  
Co-directeur



*À force de chercher on finit par trouver,  
Mais quand on trouve, on n'a pas fini de chercher !*



# FINANCEMENT

Ce travail de thèse a été réalisé par M. Mohamed Fedy MORGÈNE, né le 07 décembre 1988 à Sousse (Tunisie), au laboratoire GIMAP (Groupe pour l'Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes EA3064) à la Faculté de Médecine Jacques Lisfranc de l'Université Jean Monnet, membre de l'Université de Lyon, sous la direction du Pr. Bruno POZZETTO et la co-direction du Dr Paul VERHOEVEN. L'ensemble des résultats présentés sont le fruit des recherches effectuées entre le 11 septembre 2014 et 07 novembre 2018 dans le cadre du Doctorat en Biologie moléculaire et cellulaire inscrit à l'Ecole Doctorale N° 488 SIS (Science – Ingénierie – Santé). La thèse a été financée par le programme Erasmus Mundus Al-Idrisi II sous forme d'une bourse de mobilité N° 2013-2401/001-001-EMA2 délivrée par l'Université de Grenade (Espagne) sur une durée totale de 36 mois entre 2014 et 2017. La suite de la thèse a été financée par le CHU Nord de Saint-Etienne sous forme de contrat de travail à mi-temps en tant qu'ingénieur de recherche du 12 juin 2017 au 31 octobre 2018. Une partie a été également financée grâce à un contrat étudiant au poste de moniteur à la Bibliothèque Universitaire Santé à la Faculté de Médecine de Saint-Etienne durant l'année universitaire 2017-2018.

# REMERCIEMENTS

La thèse a été pour moi un rêve et un objectif importants pour mon épanouissement personnel, l'aboutissement de mon parcours universitaire et, j'espère, la clé pour un avenir professionnel prometteur. Cette aventure, certainement la plus riche et la plus marquante de ma vie, a commencé il y a environ quatre ans quand j'ai dû quitter ma Tunisie natale et venir m'installer en France pour écrire un nouveau chapitre de ma vie, découvrir une nouvelle culture et surtout rencontrer de nouvelles personnes qui ont profondément changé ma vie. La thèse a la particularité d'être un travail basé sur l'auto-apprentissage mais aussi sur la transmission et le partage de connaissances. J'ai eu la chance de côtoyer une équipe formidable où les qualités humaines comptent autant que les qualités scientifiques. Cette aventure touchant à sa fin, je me dois de remercier toutes les personnes que j'ai connues et qui ont participé de près ou de loin, de façon directe ou indirecte à l'accomplissement de ce travail de thèse.

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse : M. le Pr. Frédéric LAURENT, Mme le Pr. Caroline TAPPAREL, M. le Pr. Jean-Philippe LAVIGNE et Mme le Pr. Florence MORFIN d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je remercie sincèrement mon directeur de thèse M. le Pr. Bruno POZZETTO de m'avoir accepté au sein de son équipe et pour ses hautes qualités scientifiques et humaines. J'espère que tu trouveras dans ce travail le témoignage de toute la reconnaissance, le respect, la considération et l'amitié que j'ai pour toi. Depuis le 11 septembre 2014, premier jour où on s'est rencontré à l'aéroport de Lyon, tu as été toujours disponible, à l'écoute et à mon soutien tant moral que professionnel et pour tout cela je te remercie du plus profond de mon cœur et j'espère que notre amitié perdurera au-delà de la thèse.

Mes remerciements vont également au Dr Paul VERHOEVEN pour m'avoir épaulé, guidé et conseillé à chaque fois que j'en avais besoin. Arriver à ces résultats n'a pas été sans difficultés mais grâce à tes remarques pertinentes et ton vif esprit scientifique et critique nous avons pu atteindre nos objectifs. Je n'oublierai jamais nos longues heures de discussion, de travail et d'échange mutuel et pour cela je te remercie profondément.

Je remercie également M. le Pr. Thomas BOURLET de m'avoir accepté au sein de son groupe, ainsi que tous les membres du GIMAP pour leur bienveillance et leur bonne humeur. Merci à Hind, Fabrice, Amélie, Marie-Ange, Charles-Antoine, Blandine, Fabienne, Nicolas, Benjamin, et tous les (ex)doctorants (Cyril, Estelle, Josselin, Corantin, Hugo, Rémi, Eva, Alexandre, Sofiane, Caroline...). J'ai eu l'honneur et le plaisir de travailler parmi vous.

Je tiens à remercier aussi Mme le Pr. Élisabeth BOTELHO-NEVERS, Mme le Dr Sylvie PILLET, Mme le Dr Florence GRATTARD et M. le Pr. Philippe BERTHELOT pour votre soutien scientifique et vos encouragements. Mes remerciements vont également à l'ensemble des docteurs et des technicien(ne)s du Laboratoire des Agents pathogènes et d'Hygiène du CHU de Saint-Etienne.

Je remercie sincèrement Mme le Dr Sana CHARAOUI d'avoir été telle une grande sœur pour moi. Merci pour notre collaboration scientifique et pour ton amitié. Je remercie aussi M. le Pr. Philippe GAIN et M. le Dr Zhiguo HE pour m'avoir fait découvrir la microscopie confocale au sein du laboratoire BiiGC.

Je tiens aussi à remercier M. Thomas GUILLOBEZ du Pôle International de l'Université Jean Monnet de son accompagnement administratif et de ses encouragements. Merci également à l'ensemble de l'Université Jean Monnet et au personnel de l'École Doctorale.

Je remercie aussi Mme Anna MATRAS-BAN, Mme Isabelle MASSACRIER et toute l'équipe de la Bibliothèque Universitaire Santé à la Faculté de Médecine de Saint-Etienne (Marc, Natasha, Bernard, Wilfried, Lucie, Lucile, Yoan...) pour tout ce qu'on a pu partager ensemble. C'était un énorme plaisir de travailler avec vous.

Finalement, je n'aurais pas pu accomplir ce travail sans les énormes sacrifices de ma famille (Thouraya, Omar, Belsam, Sonia, Jamila...) et le soutien inconditionnel de mes ami(e)s (Terence, Meriam, Benoît, Feten, Aziz, Rafea, Marie...). Mille mercis à vous tous, je vous aime très fort !

# LISTE DES ABREVIATIONS

<b>Aaa</b>	<i>Autolysin adhesin</i>
<b>AFLP</b>	<i>Amplified fragment-length polymorphism</i>
<b>agr</b>	<i>Accessory gene regulator</i>
<b>Akt</b>	Protéine kinase Akt
<b>AP-PCR</b>	<i>Arbitrarily primed polymerase chain reaction</i>
<b>Atl</b>	Autolysine
<b>Bbp</b>	<i>Bone sialoprotein-binding protein</i>
<b>CC</b>	Complexe clonal
<b>CDHR3</b>	<i>Cadherin related family member 3</i>
<b>Cg</b>	Collagène
<b>CK</b>	Cytokératine
<b>CifA/B</b>	<i>Clumping factor A/B</i>
<b>CNA</b>	<i>Collagen-binding adhesin</i>
<b>DLST</b>	<i>Double locus sequence typing</i>
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
<b>DO</b>	Densité optique
<b>EAP</b>	<i>Extracellular adherence protein</i>
<b>Ebps</b>	<i>Elastin-binding protein</i>
<b>ECP</b>	Effet cytopathique
<b>EDTA</b>	Acide éthylènediaminetétraacétique
<b>EMP</b>	<i>Extracellular matrix protein</i>
<b>FAK</b>	<i>Focal adhesion kinase</i>
<b>Fg</b>	Fibrinogène
<b>Fn</b>	Fibronectine
<b>FnBPA/B</b>	<i>Fibronectin binding protein A/B</i>
<b>GapC</b>	Glyceraldehyde-3-phosphate déhydrogénase
<b>HA</b>	Hémagglutinine
<b>HNEC</b>	<i>Human nasal epithelial cells</i>
<b>ICAM-1</b>	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IL</b>	Interleukine
<b>ILK</b>	<i>Integrin-linked kinase</i>
<b>IRES</b>	<i>Internal ribosomal entry site</i>
<b>Isd</b>	<i>Iron-regulated surface determinant</i>
<b>IV</b>	Influenza virus
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>KO</b>	<i>Knock-out</i>
<b>LDLR</b>	<i>Low density lipoprotein receptor</i>
<b>LPV</b>	Leucocidine de Pantan-Valentine
<b>LPXTG</b>	Motif leucine-proline-X-thréonine-glycine
<b>LTA</b>	<i>Lipoteichoic acid</i>
<b>MC</b>	Milieu de croissance
<b>MEC</b>	Matrice extracellulaire
<b>MI</b>	Milieu d'infection
<b>MLST</b>	<i>Multilocus sequence typing</i>
<b>MOI</b>	Multiplécité d'infection
<b>MSCRAMM</b>	<i>Microbial surface components recognising adhesive matrix molecules</i>
<b>NADPH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

<b>NFκB</b>	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
<b>NK</b>	<i>Natural killers</i>
<b>PAM</b>	<i>Peptides antimicrobiens</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate-buffered saline</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>PFGE</b>	<i>Pulsed field gel electrophoresis</i>
<b>PI3K</b>	<i>Phosphoinositide 3 kinase</i>
<b>Pls</b>	<i>Plasmin-sensitive protein</i>
<b>RAPD</b>	<i>Randomly amplified polymorphic DNA</i>
<b>RIG-1</b>	<i>Retinoic acid-inducible gene I</i>
<b>ROS</b>	<i>Reactive oxygen species</i>
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
<b>RpRd</b>	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
<b>rpm</b>	<i>Run per minute</i>
<b>RSV</b>	<i>Respiratory syncytial virus</i>
<b>RT-qPCR</b>	<i>Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i>
<b>RV</b>	<i>Rhinovirus</i>
<b>sae</b>	<i>Staphylococcus aureus exoprotein sensor</i>
<b>SARM</b>	<i>Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline</i>
<b>SARM-C</b>	<i>Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline communautaire</i>
<b>SARM-H</b>	<i>Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline hospitalier</i>
<b>SasG</b>	<i>Staphylococcus aureus surface protein G</i>
<b>SASM</b>	<i>Staphylococcus aureus sensible à la méthicilline</i>
<b>SCCmec</b>	<i>Staphylococcal cassette chromosome mec</i>
<b>SCN</b>	<i>Staphylococcus aureus à coagulase négative</i>
<b>SCP</b>	<i>Staphylococcus aureus à coagulase positive</i>
<b>SCTS</b>	<i>Syndrome de choc toxique staphylococcique</i>
<b>Sdr</b>	<i>serine-aspartate repeat protein</i>
<b>SEA/B</b>	<i>Staphylococcal enterotoxin A/B</i>
<b>SERAM</b>	<i>Secretable expanded repertoire adhesive molecules</i>
<b>SigB</b>	<i>Facteur sigma B</i>
<b>SpA</b>	<i>Staphylococcal protein A</i>
<b>spa-CC</b>	<i>Staphylococcal protein A clonal complex</i>
<b>spa-type</b>	<i>Staphylococcal protein A type</i>
<b>Src</b>	<i>Steroid receptor coactivator</i>
<b>SREC-1</b>	<i>Scavenger receptor of endothelial cells 1</i>
<b>srtA</b>	<i>Sortase A</i>
<b>ss(+)-RNA</b>	<i>Single stranded positive ribonucleic acid</i>
<b>ss(-)-RNA</b>	<i>Single stranded negative ribonucleic acid</i>
<b>SSSS</b>	<i>Staphylococcal scalded skin syndrome</i>
<b>ST</b>	<i>Sequence type</i>
<b>TLR</b>	<i>Toll-like receptor</i>
<b>TNFα</b>	<i>Tumor necrosis factor α</i>
<b>TNFR</b>	<i>Tumor necrosis factor receptor</i>
<b>TSST</b>	<i>Toxic shock syndrome toxin</i>
<b>UFC</b>	<i>Unité formant colonie</i>
<b>UTR</b>	<i>Untranslated region</i>
<b>VPg</b>	<i>Genomic viral protein</i>
<b>WTA</b>	<i>Wall teichoic acid</i>
<b>ZO-1</b>	<i>Zonula occludens-1</i>

# TABLE DES MATIERES

<b>Introduction générale et objectifs</b> .....	15
<b>Données bibliographiques</b> .....	19
<b>A. <i>Staphylococcus aureus</i></b>	
1. Caractéristiques générales .....	21
1.1. Place dans la recherche scientifique et médicale.....	21
1.2. Aperçu historique.....	22
1.3. Taxonomie.....	23
2. Caractéristiques bactériologiques.....	24
2.1. Morphologie.....	24
2.2. Culture.....	24
2.3. Biochimie .....	25
3. Caractéristiques génétiques et génotypage .....	26
3.1. Génome .....	26
3.2. Génotypage .....	27
4. <i>Staphylococcus aureus</i> : pathogène de l'Homme .....	31
4.1. Épidémiologie .....	32
4.2. Manifestations cliniques .....	34
4.3. La résistance aux antibiotiques.....	39
5. <i>Staphylococcus aureus</i> : commensal de l'homme.....	40
5.1. Épidémiologie de la colonisation.....	40
5.2. Déterminants de la colonisation .....	47
5.3. Le passage de la colonisation à l'infection.....	78
<b>B. Les interactions entre <i>Staphylococcus aureus</i> et les virus respiratoires</b>	
1. Les interactions entre <i>S. aureus</i> et le virus de la grippe .....	79
1.1. Épidémiologie des co-infections grippe/ <i>S. aureus</i> .....	79
1.2. Mécanismes de synergie entre <i>S. aureus</i> et influenza.....	83
2. Les interactions entre <i>S. aureus</i> et les virus respiratoires non influenza ...	97
2.1. Données générales sur les rhinovirus.....	97

2.2. Revue : Interactions et mécanismes de synergie entre la colonisation à <i>S. aureus</i> et les virus respiratoires non influenza.....	102
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

**Matériel et méthodes** .....117

**A. Modèle de colonisation par *S. aureus* des cellules HaCaT**

1. Principe général.....	119
2. Culture des cellules HaCaT.....	120
3. Culture bactérienne.....	122
4. Adhésion et internalisation de <i>S. aureus</i> .....	124

**B. Modèle d'infection des cellules HaCaT par rhinovirus**

1. Infection virale.....	125
2. Titrage viral.....	125
3. Détection moléculaire.....	126
4. Immunofluorescence.....	126

**C. Modèle de co-infection des cellules HaCaT par rhinovirus et *S. aureus***

**D. Modèles in vitro de colonisation par *S. aureus* des cellules en état inflammatoire**

**Résultats** .....131

**A. Validation du modèle de colonisation des cellules HaCaT par *Staphylococcus aureus* 133**

Article 1 : Adhésion et internalisation de souches cliniques de <i>Staphylococcus aureus</i> exprimant EGFP sur un modèle in vitro de kératinocytes.....	134
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Article 2 : Activité intracellulaire des molécules antimicrobiennes utilisées pour la décolonisation nasale par <i>Staphylococcus aureus</i> .....	150
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

**B. Développement du modèle de d'infection des cellules HaCaT par rhinovirus**

Article 3 : Nouveau modèle d'infection par rhinovirus sur les cellules épithéliales HaCaT et impact de la clarithromycine sur la cinétique de l'infection.....	157
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

**C. Etude in vitro de l'impact de l'infection par rhinovirus et de l'inflammation sur la colonisation à *S. aureus***

Article 4 : ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule 1) favorise l'internalisation de <i>Staphylococcus aureus</i> via EAP (Extracellular Adherence Protein) dans les cellules phagocytaires non professionnelles.....	169
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

<b>Discussion générale</b> .....	193
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	199
<b>Références bibliographiques</b> .....	205
<b>Annexes</b> .....	255



# LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Caractères biochimiques de <i>S. aureus</i> .....	25
Tableau 2. Prévalence du portage nasal de <i>S. aureus</i> dans le monde. ....	44
Tableau 3. Facteurs d'adhésion exprimés par <i>S. aureus</i> qui sont potentiellement impliqués dans la colonisation nasale chez l'homme. ....	48
Tableau 4. Différents mécanismes d'internalisation de <i>S. aureus</i> par les cellules phagocytaires non professionnelles .....	60
Tableau 5. Épidémiologie des surinfections post-grippales par <i>S. aureus</i> .....	81
Tableau 6. Mélange réactionnel pour la détection de l'ARN viral par RT-qPCR.....	126
Tableau 7. Paramètres de la RT-qPCR .....	126
Tableau 8. Liste des souches de <i>S. aureus</i> utilisées dans le modèle de co-infection....	128
Tableau 9. Liste des lignées cellulaires utilisées .....	129

# LISTE DES FIGURES

Figure 1. Évolution des publications scientifiques sur <i>S. aureus</i> .....	21
Figure 2. Frise chronologique des principaux évènements liés à l'histoire de <i>S. aureus</i> ....	23
Figure 3. Cultures de <i>S. aureus</i> sur gélose au sang.....	25
Figure 4. Cartographie structurale et fonctionnelle du pangénome de <i>S. aureus</i> . ....	26
Figure 5. Différentes pathologies causées par <i>S. aureus</i> chez l'Homme.....	32
Figure 6. Prévalence mondiale des infections causées par des souches.....	33
Figure 7. Exemples de manifestations cliniques des infections de la peau et des tissus mous dues à <i>S. aureus</i> .....	35
Figure 8. Prévalence de la colonisation par <i>S. aureus</i> au niveau des différents sites du corps humain.....	41
Figure 9. Anatomie de la cavité nasale.....	42
Figure 10. Algorithme pour définir le statut de portage nasal de <i>S. aureus</i> .....	43
Figure 11. Déterminants de la colonisation à <i>S. aureus</i> .....	47
Figure 12. Structure des MSCRAMM chez <i>S. aureus</i> .....	51
Figure 13. Structure tridimensionnelle de l'EAP. ....	57
Figure 14. Détails moléculaires de la voie majeure d'internalisation de <i>S. aureus</i> dans les cellules phagocytaires non professionnelles. ....	63
Figure 15. Réseau des gènes régulateurs chez <i>S. aureus</i> .....	71
Figure 16. Principales interactions d'antagonisme entre <i>S. aureus</i> et les autres bactéries du microbiome nasal.....	75
Figure 17. Rôle de la réponse immunitaire anti-influenza virus dans la sensibilité aux infections secondaires bactériennes.....	96
Figure 19. Principales caractéristiques structurales et organisationnelles des rhinovirus (RV). ....	100
Figure 18. Mécanismes de synergie entre rhinovirus et <i>S. aureus</i> au niveau des cellules phagocytaires non-professionnelles. ....	103
Figure 20. Principe général du modèle de colonisation des cellules HaCaT par <i>S. aureus</i> . ....	121
Figure 21. Observation des cellules HaCaT sous microscopie à épifluorescence.....	123



# **INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIFS**



*Staphylococcus aureus* est une bactérie commensale et pathogène de l'Homme qui peut être à l'origine d'une pléthore de pathologies diverses allant de simples infections cutanées à des pneumonies nécrosantes ou même des bactériémies engageant le pronostic vital. *S. aureus* est avant tout une bactérie commensale de l'Homme qui colonise la peau et différentes muqueuses. On estime que trois personnes sur dix sont porteuses de *S. aureus* de façon asymptomatique. La muqueuse nasale, et plus précisément le vestibule nasal, constitue le réservoir principal de *S. aureus*. La colonisation nasale à *S. aureus* est considérée comme un facteur de risque majeur d'infection par cette bactérie, notamment en cas de rupture de la barrière épithéliale à cause d'une blessure, de dialyse ou lors d'une intervention chirurgicale (Verhoeven et al., 2014). Faisant partie d'un microbiome complexe, les interactions possibles entre *S. aureus* et les autres microorganismes présents au niveau de la muqueuse nasale de l'hôte sont particulièrement intéressantes à étudier. Certaines bactéries comme les *Corynebacterium* et *S. epidermidis* ont été décrites comme antagonistes de *S. aureus* et auraient alors un rôle protecteur contre la colonisation par *S. aureus* (Frank et al., 2010). Cependant, certains virus respiratoires comme l'influenzavirus (IV) ou le rhinovirus (RV) semblent favoriser la colonisation par *S. aureus*. La synergie entre *S. aureus* et IV est illustrée par la survenue de pneumonies staphylococciques post-grippales qui ont tué des milliers de personnes lors des différentes pandémies qu'a connues l'humanité durant le siècle dernier (Murray et al., 2010; Robertson et al., 1958). De ce fait, de très nombreuses études ont été menées pour investiguer les mécanismes à l'origine de cette synergie entre *S. aureus* et IV (Rynda-Apple et al., 2015). Toutefois, les interactions entre *S. aureus* et les autres virus respiratoires sont nettement moins bien connues. L'analyse des données cliniques disponibles à l'heure actuelle montre que RV augmente la charge de colonisation par *S. aureus* et favorise sa dispersion dans l'environnement et le risque de transmission qui y est associé (Morgene et al., 2018a). Quelques études ont montré que RV favorise l'adhésion et l'internalisation de *S. aureus* sur des modèles *in vitro* de cellules épithéliales en augmentant l'expression de certains facteurs et récepteurs cellulaires. Cependant, les détails des mécanismes bactériens et cellulaires impliqués dans cette synergie n'ont pas été suffisamment élucidés. Leur compréhension permettrait de mieux appréhender la relation entre ces deux pathogènes et de proposer des stratégies préventives ou thérapeutiques adaptées.

Plusieurs objectifs ont été définis au cours de ce travail dans le but de mieux comprendre l'effet de l'infection par RV sur la colonisation par *S. aureus* sur un modèle in vitro mimant la muqueuse nasale et essayer d'investiguer les mécanismes impliqués dans ces interactions.

Le premier objectif a été de développer, optimiser et valider un modèle in vitro de colonisation à *S. aureus* (en termes d'adhésion et d'internalisation) sur des kératinocytes humains (HaCaT) qui sont représentatifs des cellules épithéliales retrouvées au niveau du *vestibulum nasi*.

Le deuxième objectif a été d'étudier la sensibilité et la permissivité des cellules HaCaT à l'infection par RV afin de développer par la suite un modèle de co-infection RV/*S. aureus* qui permettrait d'étudier les interactions entre ces deux pathogènes.

Le troisième objectif a été d'étudier l'impact de l'infection par RV sur l'adhésion et l'internalisation de *S. aureus* sur le modèle HaCaT développé et d'investiguer quels sont les motifs bactériens, les récepteurs cellulaires et la voie de signalisation éventuellement impliqués. L'étude de l'effet de l'inflammation sur la colonisation par *S. aureus* sur les cellules HaCaT et d'autres types cellulaires permettrait de savoir si les effets observés lors de l'infection par RV sur la colonisation par *S. aureus* sont aussi valables pour d'autres infections virales respiratoires et sur d'autres tissus humains.

# **DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES**





## A. *Staphylococcus aureus*

### 1. Caractéristiques générales

#### 1.1. Place dans la recherche scientifique et médicale

*Staphylococcus aureus*, communément appelé staphylocoque doré, est une bactérie commensale et pathogène de l'homme et de l'animal responsable de nombreuses pathologies de gravité variable. Après désormais plus que 130 ans d'études intensives, *S. aureus* n'a pas encore divulgué tous ses secrets, et l'intérêt des scientifiques pour cette bactérie n'a pas cessé de croître. Son triste privilège d'être l'une des bactéries ayant causé le plus de mortalité dans l'histoire de l'humanité et d'être au premier rang des germes responsables des maladies nosocomiales a fait de *S. aureus* un grave problème de santé publique, notamment avec l'émergence de souches multi-résistantes. La recherche scientifique et médicale a investigué en profondeur les différents aspects microbiologiques et physiopathologiques de l'infection à *S. aureus* afin de mieux comprendre l'impact de cette bactérie sur la santé et de proposer des stratégies thérapeutiques. De par son importance clinique dans les pays industrialisés, *S. aureus* est l'une des bactéries le plus étudiées et la littérature scientifique à son sujet est abondante. L'interrogation de la base de données PubMed avec le mot-clé « *Staphylococcus aureus* » donne une liste de plus de 108 000 articles publiés, témoignant de l'importance de ce sujet (figure 1).

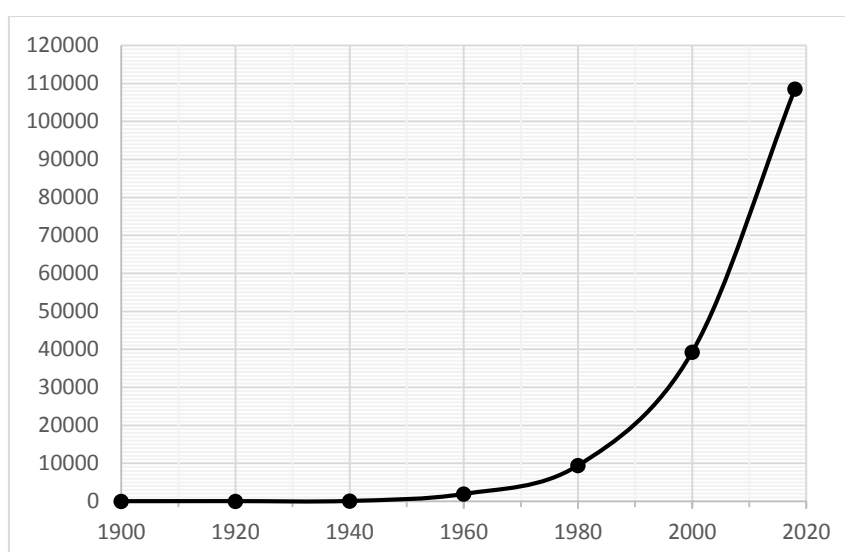


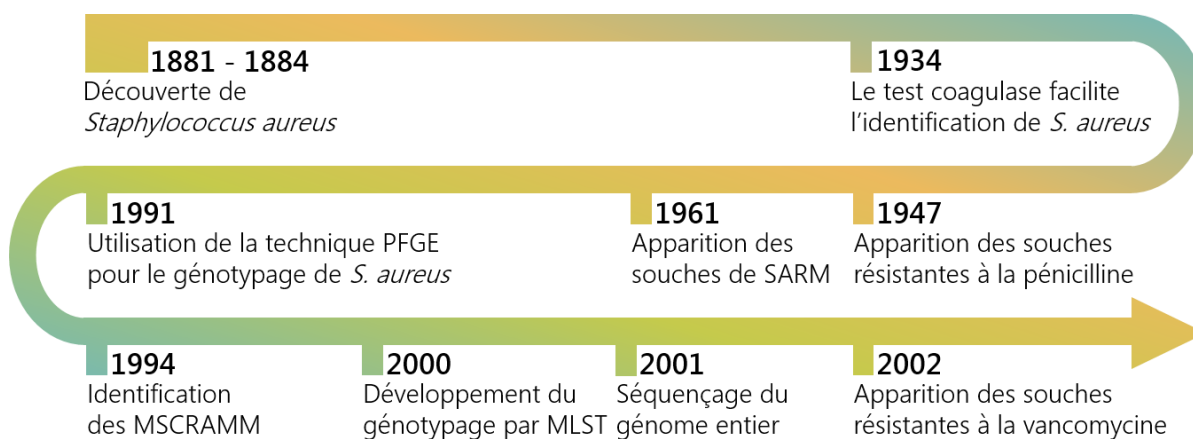
Figure 1. Évolution des publications scientifiques sur *S. aureus*.

## 1.2. Aperçu historique

L'histoire de *S. aureus* est riche en découvertes scientifiques mais également en questions de santé publique comme l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques. La figure 2 retrace les principaux événements qui ont marqué l'histoire de *S. aureus*. L'aventure scientifique de cette bactérie commença à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle quand le célèbre médecin allemand Robert Koch (1843–1910) et le pionnier français de la microbiologie Louis Pasteur (1822–1895) eurent observé pour la première fois des bactéries rondes assemblées en amas à partir de pus de furoncle. Peu de temps après, au sein du laboratoire installé dans son jardin, le chirurgien écossais Alexander Ogston (1844–1929) fit la même découverte en analysant un abcès purulent d'un de ses patients. En 1881, il réussit à développer une méthode permettant l'isolement de ces coques capables de s'agréger en amas telle une grappe de raisins, qu'il nomma alors « *Staphylococcus* » (du grec « *staphyle* » : grappe de raisin et « *kokkos* » : grains) (Newsom, 2008). En 1884 que l'allemand Anton J. F. Rosenbach (1842–1923) isola des cultures pures de deux souches de staphylocoques qu'il nomma en fonction de la couleur des colonies : *Staphylococcus aureus*, du latin « *aureum* » : or, et *Staphylococcus albus*, du latin « *albus* » : blanc, dont le nom est devenu actuellement *Staphylococcus epidermidis* (Licitra, 2013).

L'ennemi étant désormais identifié, les premiers travaux ont eu pour but d'étudier les caractéristiques bactériologiques de *S. aureus* afin de faciliter son identification. Pendant les premières décennies du siècle dernier, le développement de tests simples pour la détection de la coagulase, protéine capable de faire coaguler le plasma de lapin, avait permis de distinguer les staphylocoques à coagulase positive (SCP) des staphylocoques à coagulase négative (SCN) (Lominski and Grossfeld, 1948). Cette avancée majeure avait simplifié l'identification des souches virulentes de *S. aureus* qui sont des SCP alors que la plupart des autres espèces de staphylocoques sont des SCN souvent moins pathogènes. En même temps, la découverte de la pénicilline et de ses propriétés bactéricides par le britannique Alexander Fleming (1881–1955) et l'essor de l'industrie pharmaceutique d'après-guerre inaugurèrent l'ère des antibiotiques. La pénicilline fut alors utilisée pour traiter avec succès certaines pathologies à *S. aureus* (Lee et al., 1944).

Toutefois la victoire fut de courte durée car des souches résistant à la pénicilline furent rapidement isolées (Plough, 1945). La découverte de la méticilline, une forme modifiée de la pénicilline, relançait l'espoir dans les années 1960, mais l'émergence des premières souches de *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) ne se fit pas attendre (Barber, 1961) : suite aux premières observations au Royaume-Uni dès 1961, d'autres pays européens, les États-Unis, le Japon et l'Australie rapportèrent l'isolement de souches de SARM. A partir des années 1970, ces souches devinrent l'une des premières causes d'infections nosocomiales et connurent une « gloire » internationale (Enright et al., 2002). L'évolution de *S. aureus* continue et sa résistance à d'autres antibiotiques comme la vancomycine a été décrite en 2002 aux États-Unis (Sievert et al., 2008).



**Figure 2. Frise chronologique des principaux événements liés à l'histoire de *S. aureus*.**

MLST : *Multilocus sequence typing* ; MSCRAMM : *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* ; PFGE : *Pulsed-field Gel Electrophoresis* ; SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline.

### 1.3. Taxonomie

*S. aureus* est l'espèce la plus connue du genre *Staphylococcus* de par son implication fréquente dans l'étiologie de différentes infections et toxi-infections chez l'homme. D'autres espèces de staphylocoques peuvent cependant causer des infections opportunistes. A l'heure actuelle, d'après les rapports du système d'information taxonomique intégré (ITIS) du gouvernement fédéral américain ([www.itis.gov](http://www.itis.gov)), le genre *Staphylococcus* comporte 44 espèces et 21 sous-espèces. Du point de vue taxonomique, le genre *Staphylococcus* appartient au phylum des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Bacillales* et à la famille des *Staphylococcaceae*.

Outre *Staphylococcus*, la famille bactérienne des *Staphylococcaceae* comporte quatre autres genres moins connus : *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus*, *Nosocomiicoccus* et *Salinicoccus*.

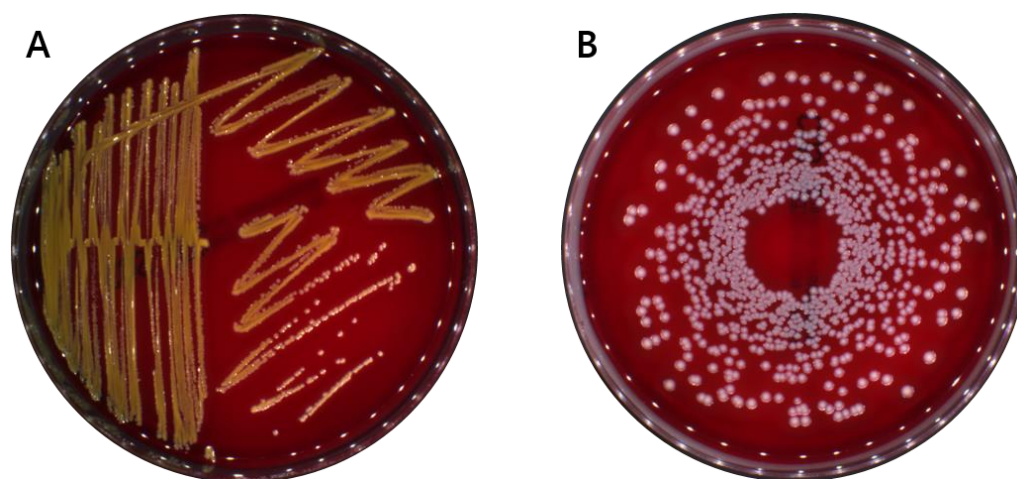
## 2. Caractéristiques bactériologiques

### 2.1. Morphologie

*S. aureus* est une bactérie en forme de coque (sphérique) immobile qui peut être isolée ou groupée en diplocoques ou, le plus souvent, en amas évoquant la forme dite en grappe de raisins. Le diamètre des cellules varie entre 0,5 et 1  $\mu\text{m}$ . A la coloration de Gram, la paroi épaisse et riche en peptidoglycanes fait apparaître les cellules de *S. aureus* en violet, les classant ainsi dans le groupe des bactéries à Gram positif (Foster, 1996).

### 2.2. Culture

*S. aureus* est une bactérie peu exigeante capable de croître dans des conditions hostiles (milieu hypersalé ou peu nutritif). Le milieu de Chapman est un milieu sélectif classiquement utilisé pour isoler *S. aureus* grâce à une teneur élevée en sel (7,5 % de NaCl). Sur gélose ordinaire, *S. aureus* présente une bonne croissance en 18 à 24 h à 37 °C et tolère une culture entre 10 et 45 °C. Les colonies obtenues sont lisses, rondes, à bords réguliers, de diamètre entre 1 et 3 mm, bombées, opaques et de couleur plus ou moins dorée selon les souches (figure 3). Sur gélose au sang, une zone claire apparaît autour des colonies permettant l'observation du caractère hémolytique de *S. aureus*. En gélose profonde, la bactérie pousse sur toute la hauteur du tube témoignant d'un caractère aéro-anaérobie facultatif. En bouillon, *S. aureus* trouble le milieu avec parfois la formation d'un dépôt. Plusieurs milieux sélectifs permettent l'isolement des staphylocoques. Classiquement, le milieu de Chapman est utilisé pour distinguer les bactéries halophiles, dont *S. aureus*, grâce à une teneur élevée en sel (7,5% de NaCl). Le milieu de Baird-Parker exploite la capacité de *S. aureus* à réduire la tellurite en tellure, les colonies apparaissant alors en noir. D'autres milieux chromogènes sont aussi commercialisés et permettent la distinction spécifique de *S. aureus*. Par exemple, les géloses ChromID® *S. aureus* et ChromID® SARM (bioMérieux®) permettent le dépistage rapide de *S. aureus* et des souches de SARM qui apparaissent, respectivement, en rose-violet ou en bleu-vert.



**Figure 3. Cultures de *S. aureus* sur gélose au sang**

(A) Isolement par cadrant de la souche SH1000. (B) Ensemencement de la souche USA300 à l'aide de l'ensemencement automatique EasySpiral Dilute™ (Intersciences®) en mode exponentiel. Photos prises par le lecteur de plaque Scan1200™ (Intersciences®) au laboratoire GIMAP.

### 2.3. Biochimie

Depuis sa découverte, de nombreuses études ont permis de dresser le profil biochimique de *S. aureus*. La quasi-totalité des souches de *S. aureus* produisent une coagulase, protéine-enzyme considérée comme facteur de virulence important permettant de différencier les SCP des SCN (Blair, 1958). Les autres principaux caractères biochimiques prennent en compte la production de catalase permettant de différencier les staphylocoques des streptocoques, le métabolisme des sucres et la production d'arginine dihydrolase. Le tableau 1 récapitule la plupart de ces caractéristiques.

**Tableau 1. Caractères biochimiques de *S. aureus*.**

Les caractères cités concernent au moins 90% des souches.

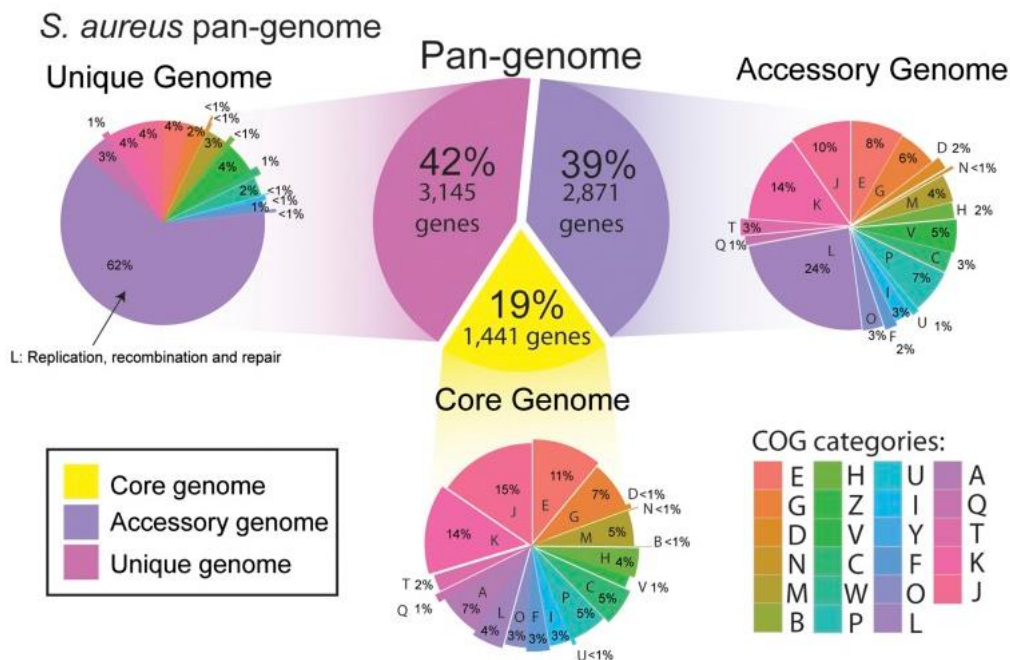
Tableau adapté de Le Loir and Gantier, 2009.

Enzymes		Métabolisme des sucres	
Positif	Négatif	Positif	Négatif
Arginine dihydrolase	Ornithine	D-Mannitol	D-Cellobiose
Catalase	décarboxylase	D-Mannose	D-Xylose
Coagulase	Oxydase	D-Tréhalose	L-Arabinose
Hémolyse	Pyrrolidonyl	D-Turanose	Raffinose
Phosphatase alcaline	arylamidase	Maltose	
Thermonucléase	$\beta$ -galactosidase	Saccharose	
$\beta$ -Glucosidase	$\beta$ -Glucuronisase		

### 3. Caractéristiques génétiques et génotypage

#### 3.1. Génome

*S. aureus* est doté d'un chromosome unique circulaire d'environ 2,9 millions de paires de base. Le génome est riche en adénines et thymines au détriment des guanines et des cytosines dont le pourcentage (%GC) ne dépasse pas 33 (Muto and Osawa, 1987). La figure 4 montre le résultat du séquençage génomique de plusieurs souches de *S. aureus* et propose une cartographie d'un pangénome de plus de 7400 gènes composé d'un génome cœur (*core genome*) (19%), d'un génome accessoire (39%) et d'un génome unique (42%) (Bosi et al., 2016).



**Figure 4. Cartographie structurale et fonctionnelle du pangénome de *S. aureus*.**

Le pangénome de *S. aureus* peut être divisée en trois catégories : (i) le génome cœur (présent dans tous les génomes), (ii) le génome accessoire (commun à certains génomes) et (iii) le génome unique (spécifique à un génome en particulier). La fonction de chaque gène est classée selon le COG (Clusters of Orthologous Groups) et réparties comme suit : A : gestion et modification des ARN, B : structure chromatinienne, C : énergie, D : contrôle du cycle cellulaire, E : métabolisme et transport des acides aminés, F : métabolisme et transport des nucléotides, G : métabolisme et transport des sucres, H : métabolisme et transport des coenzymes, I : métabolisme et transport des lipides, J : structure ribosomale et traduction, K : transcription, L : réplication, recombinaison et réparation, M : biogenèse des membranes, N : motilité cellulaire, O : modification post-traductionnelle, P : métabolisme et transport des ions inorganiques, Q : biosynthèse, transport et catabolisme des métabolites secondaires, T : mécanismes de transduction, U : trafic intracellulaire, V : mécanismes de défense, W : structure extracellulaire, Y : structure nucléaire et Z : cytosquelette. Figure empruntée à Bosi et al., 2016.

Les gènes du génome cœur sont conservés chez les différentes souches de *S. aureus* et sont indispensables car ils interviennent dans la structure, le métabolisme, la multiplication, la régulation et la survie des bactéries. D'autre part, deux composants variables entre les souches constituent le génome unique dont le %GC est proche de celui du pangénome, et le génome accessoire dont le % GC est très différent, témoignant d'une acquisition antérieure et extérieure (plasmides, prophages, etc.). Comme pour le génome cœur, le génome unique code principalement les gènes indispensables, notamment pour la réplication, la recombinaison et la réparation. Le génome accessoire, quant à lui, représente 39% du pangénome et code essentiellement les gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques, les facteurs de virulence et la survie face aux conditions de stress environnementaux (Bosi et al., 2016; Moon et al., 2016).

## 3.2. Génotypage

Avec l'avancée rapide des techniques de biologie moléculaire au cours des deux dernières décennies, les méthodes de typage phénotypique comme l'antibiogramme ont été laissées de côté au profit du typage génétique. L'antibiogramme reste cependant une technique de première ligne pour établir des profils de résistance et identifier les souches de SARM. Le génotypage offre un pouvoir discriminant plus important que le typage phénotypique permettant de réaliser des études de micro-épidémiologie (au niveau régional et sur une période de quelques jours à quelques années), de macro-épidémiologie (au niveau national ou international et sur une période entre quelques années et quelques décennies) ou de génétique de population (évolution de l'espèce sur toute son étendue géo-écologique depuis des milliers d'années). Différentes méthodes de génotypage ont été proposées au fil du temps présentant chacune ses avantages et ses limites. D'une façon générale, ces méthodes se basent sur le polymorphisme génétique détecté grâce à des techniques de restriction, d'amplification ou de séquençage de l'ADN.

### 3.2.1. Génotypage par restriction ou amplification

#### 3.2.1.1. Macro-restriction

Le principe des méthodes de génotypage par restriction se base sur le polymorphisme de l'ADN bactérien total (génomique et plasmidique) mis en évidence



grâce à la digestion enzymatique par des enzymes de restriction dont la fréquence des sites d'action est rare (par exemple *SmaI* qui reconnaît la séquence CCCGGG). Le produit de restriction est alors migré sur un gel d'électrophorèse en champs pulsé (PFGE : *pulsed-field gel electrophoresis*) et le résultat obtenu est appelé profil de macro-restriction. Cette technique est connue pour son haut pouvoir discriminant et elle est souvent utilisée pour caractériser la diversité génétique des souches de *S. aureus*.

Comparé aux autres méthodes de typage phénotypique et génotypique, le profil de macro-restriction par PFGE est probablement la technique la plus performante en termes de pouvoir discriminant entre les différentes souches, notamment en micro-épidémiologie lors de la survenue d'infections par des souches de SARM dans un hôpital ou la transmission entre deux hôpitaux (Deurenberg and Stobberingh, 2008; Xie et al., 2011). Toutefois, la reproductibilité inter-laboratoire reste problématique et ne dépasse pas 85% malgré une bonne reproductibilité au sein d'un même laboratoire (van Belkum et al., 1998). Différentes propositions ont été faites pour standardiser cette technique et établir une nomenclature commune à l'échelle internationale, mais ces objectifs n'ont été atteints que dans certains pays européens, les Etats-Unis et le Canada (McDougal et al., 2003; Mulvey et al., 2001; Murchan et al., 2003).

#### 3.2.1.2. Amplification par PCR

Les méthodes de génotypage utilisant la PCR sont basées sur l'amplification aléatoire des fragments d'ADN (comme les techniques AP-PCR : *arbitrary prime polymerase chain reaction* et RAPD : *random amplification polymorphism DNA*) ou sur l'amplification spécifique des fragments d'ADN (comme la technique AFLP : *amplified fragment length polymorphism*). Les avantages de ces méthodes par rapport aux techniques de PFGE sont la rapidité et le coût (Ross et al., 2005). Cependant plusieurs études comparatives et multicentriques ont montré que le pouvoir discriminatoire et la reproductibilité intra- et inter-laboratoires de ces techniques restent inférieurs à ceux des techniques de PFGE et nécessitent donc une amélioration et une standardisation des protocoles (van Belkum et al., 1995; Deplano et al., 2000; Ross et al., 2005; Senna et al., 2002).

### 3.2.2. Génotypage par séquençage

#### 3.2.2.1. Typage *spa*

La première technique de génotypage de *S. aureus* basée sur le séquençage a été proposée en 1996 par Frénay et ses collaborateurs au Pays-bas (Frénay et al., 1996). Cette technique se base sur le séquençage du gène *spa* qui code la protéine A, une protéine de surface présente sur les parois de *S. aureus*. Le polymorphisme de la région X du gène *spa* est alors exploité pour dresser des profils génotypiques (*spa*-type). Cette région contient entre 3 et 15 répétitions de 24 paires de bases. Une valeur est attribuée à chaque unité répétitive différente et chaque *spa*-type est alors défini par la combinaison obtenue. Un algorithme informatique ainsi qu'une base de données internationale ont été développés pour standardiser le typage *spa* (<https://www.ridom.de/staphtype/> et <http://spa.ridom.de/spatypes.shtml>).

Globalement, le *spa*-type t032 semble être le plus répandu avec une prévalence de 10,39%. En Europe, les *spa*-types les plus prévalents sont t032, t008 et t002. Tous les *spa*-type t032 isolés en Europe étaient des souches de SARM. La prévalence dans le reste du monde est différente et se répartit comme suit : t037, t084 et t064 en Afrique ; t008, t002 et t242 en Amérique ; t037 et t002 en Asie et t020 en Australie (Asadollahi et al., 2018).

Le typage *spa* permet de regrouper les différents *spa*-types en complexes clonaux (CC) appelées *spa*-CC. Par exemple, Les souches USA300 (SARM) et USA100 (SASM) appartiennent aux *spa*-CC008 et *spa*-CC002, respectivement (O'Hara et al., 2012, 2016). Différentes études ont montré que le typage *spa* est très reproductible et que les *spa*-CC présentent une bonne concordance avec les complexes clonaux issus d'autres techniques de génotypage par séquençage, montrant ainsi la validité de cette technique pour le typage de *S. aureus* et son utilité pour les études de macro-épidémiologie (Hallin et al., 2007; Koreen et al., 2004; O'Hara et al., 2016; Strommenger et al., 2008). Cependant, certains auteurs insistent sur les limites de l'utilisation d'un locus unique pour le génotypage dans les études épidémiologiques à grande échelle (Nübel et al., 2008).

### 3.2.2.2. Typage double locus

Le génotypage basé sur le séquençage d'un locus unique comme le typage *spa* peut avoir certaines limites liées au fait que le polymorphisme du gène séquencé peut être dû également à des phénomènes de recombinaisons homologues entre les souches de *S. aureus* et pas seulement à des mutations intrinsèques comme les mutations ponctuelles, les délétions ou la duplication au sein des séquences répétées (Nübel et al., 2008). A l'instar du gène *spa*, d'autres gènes codant aussi des protéines de surface et contenant également des régions répétitives ont été alors proposés pour augmenter le pouvoir discriminant du génotypage (Gomes et al., 2005; Koreen et al., 2005; Shopsin et al., 1999). Le génotypage par DLST (double locus sequence typing) est obtenu en combinant les résultats de séquençage du gène *spa* avec un autre gène (par exemple le gène *clfB*). La technique de DLST a montré un pouvoir discriminant plus important que celui du typage *spa* et son association aux techniques de PFGE permet d'analyser des collections d'isolats pour des études épidémiologiques locales ou sur le long terme (Koreen et al., 2005).

### 3.2.2.3. Typage multi-locus

Le typage par séquençage multi-locus (MLST : *multilocus sequence typing*) est une technique de biologie moléculaire basée sur le polymorphisme de sept gènes de ménage (*loci*) de *S. aureus* qui permet de dresser des profils alléliques uniques appelés séquences types (ST). Les premiers travaux sur le MLST des souches de *S. aureus* ont été fait par Mark Enright et ses collaborateurs sur 155 isolats cliniques de *S. aureus* dans la zone d'Oxford en Royaume-Uni (Enright et al., 2000).

Depuis, le MLST a été intensivement utilisé à l'échelle internationale pour étudier l'évolution et la dynamique des populations de *S. aureus* (Larsen et al., 2012). Des bases de données accessibles en ligne ont été créées pour recenser les différents ST, permettre l'échange des informations et suivre l'évolution et la dissémination des souches dans le monde (<https://pubmlst.org/saureus/> et <http://saureus.mlst.net/>). A l'heure actuelle, 166 souches de *S. aureus* isolées en France ont été déposées dans la base de données *S. aureus* MLST dont la majorité (15%) appartiennent au ST8.

Sur la base des données de MLST, la population de *S. aureus* a été classée en groupes de souches apparentées formant des CC. Chaque CC est composé alors de différents ST qui partagent au moins cinq des sept *loci* séquencés (Feil et al., 2003). L'analyse d'une collection internationale de 912 isolats de *S. aureus* avait montré que la plupart des souches de SARM appartiennent à cinq CC majeurs (CC5, CC8, CC22, CC30 et CC45) (Enright et al., 2002). Plus récemment, le développement de l'algorithme eBURST (<http://eburst.mlst.net/>) a permis d'analyser un ensemble de données de MLST de n'importe quelle taille afin d'isoler des CC, prédire le génotype ancestral de chaque CC et de faire des analyses statistiques (Feil et al., 2004). Grâce à cet outil, CC1, CC5, CC8, CC15 et CC97 forment actuellement le plus grand groupe des lignées de *S. aureus*, comprenant 911 ST différents (Dabul and Camargo, 2014). Les CC CC1, CC5 et CC8 sont présents partout dans le monde et regroupent différentes souches de SARM, tandis que CC15 comprend essentiellement des souches de *S. aureus* sensibles à la méthicilline (SASM). La plupart des souches appartenant au CC97 ont été isolées chez les animaux (Monecke et al., 2011). L'analyse de la relation phylogénétique entre les différentes souches est essentielle pour suivre l'épidémiologie et permettre la compréhension de la pathogénèse des infections à *S. aureus*. L'enrichissement de la technique MLST avec d'autres *loci*, voire le séquençage du génome cœur entier, pourraient améliorer encore le pouvoir discriminant du génotypage de *S. aureus* et faire progresser l'épidémiologie moléculaire.

#### 4. *Staphylococcus aureus* : pathogène de l'Homme

*S. aureus* est une bactérie commensale de l'Homme et de l'animal, mais il possède également un pouvoir pathogène très important causant toute une panoplie de maladies différentes le classant parmi les bactéries les plus fréquemment incriminées en pathologie humaine et vétérinaire. *S. aureus* est considéré comme l'agent causal majeur de diverses infections communautaires et nosocomiales de gravité variable, allant de banales infections de la peau ou de la muqueuse jusqu'à des bactériémies et des endocardites infectieuses parfois mortelles, en passant par des intoxications alimentaires et des infections pulmonaires, ostéo-articulaires ou liées aux prothèses et autres matériels médicaux (figure 5).

Cette partie s'intéresse au pouvoir pathogène de *S. aureus* et résume très succinctement les manifestations cliniques, l'épidémiologie et la physiopathologie des infections par *S. aureus* chez l'Homme.

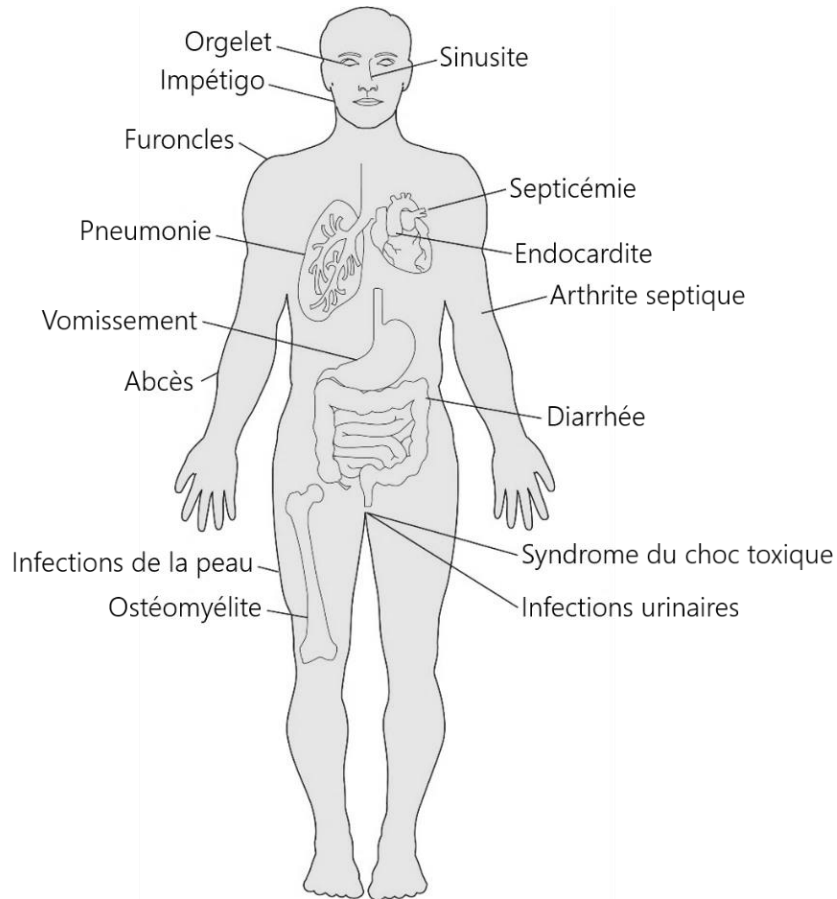


Figure 5. Différentes pathologies causées par *S. aureus* chez l'Homme.

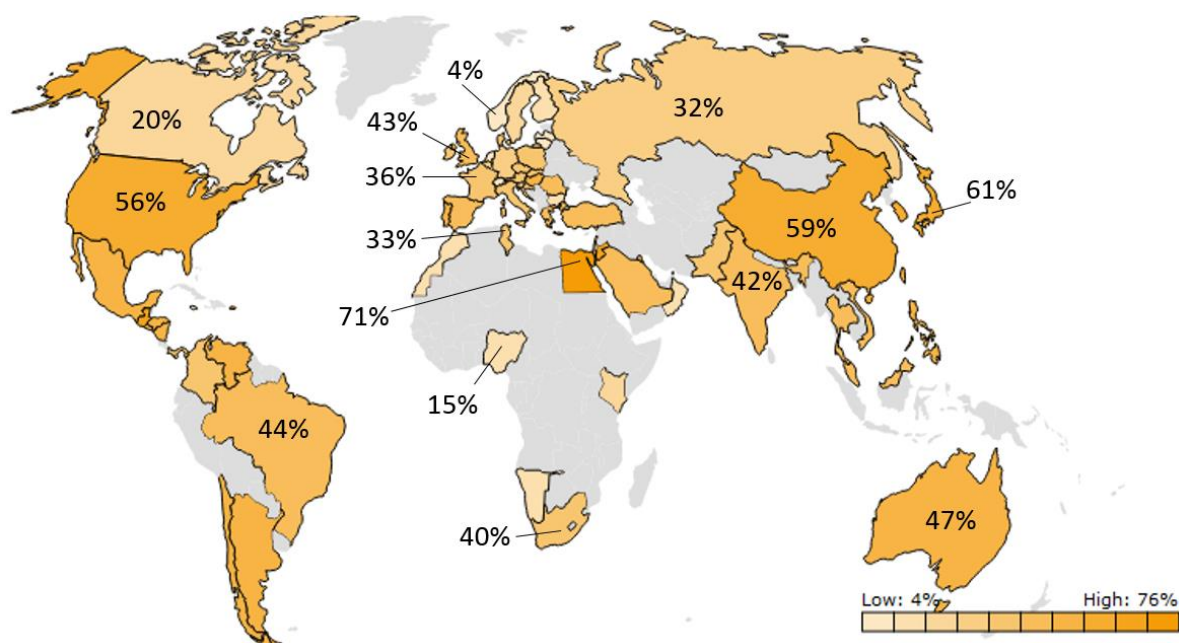
Figure adaptée de Wertheim et al., 2005.

#### 4.1. Épidémiologie

L'épidémiologie clinique et moléculaire des infections à *S. aureus* a bien évolué au cours des deux dernières décennies. Après l'émergence des souches de SARM dans les années 1960, les infections à *S. aureus* étaient principalement liées à l'hospitalisation (SARM-H). Au milieu des années 1990, il y a eu une explosion du nombre des infections par *S. aureus* chez des patients non hospitalisés. Cette augmentation a été en grande partie associée avec de nouvelles souches de SARM qu'on appelle SARM communautaires (SARM-C).

Cliniquement, la distinction entre les infections par des souches de SARM-C et les infections par des souches de SARM-H est très difficile. Cependant, ces deux groupes sont relativement différents sur le plan moléculaire (David and Daum, 2010). Les souches de SARM-H possèdent une cassette chromosomique staphylococcique *mec* (SCC*mec* : *staphylococcal chromosomal cassette mec*) de grande taille appartenant aux types I, II ou III. Ces souches possèdent rarement les gènes codant la toxine LPV (Leucocidine de Penton-Valentine). En revanche, les souches de SARM-C possèdent des éléments SCC*mec* de tailles relativement plus petites qui appartiennent le plus souvent aux types IV ou V, et arborent plus fréquemment les gènes de la toxine LPV (David and Daum, 2010).

La prévalence générale des infections causées par souches de SARM dans la population mondiale est très variable d'un pays à un autre (figure 6). Cette variabilité épidémiologique est due essentiellement d'une part à la différence du pouvoir économique et des outils technologiques entre les pays industrialisés qui accordent beaucoup d'importance à ce sujet et les pays en voie de développement où les études sont très rares voire indisponibles, et d'autre part, à la différence des stratégies thérapeutiques et des conditions d'hygiène de vie générales entre les pays.



**Figure 6. Prévalence mondiale des infections staphylococciques causées par des souches de *S. aureus* résistant à la méthicilline entre 2004 et 2016.**

Source : base de données Pfizer ATLAS (Antimicrobial Testing Leadership And Surveillance).

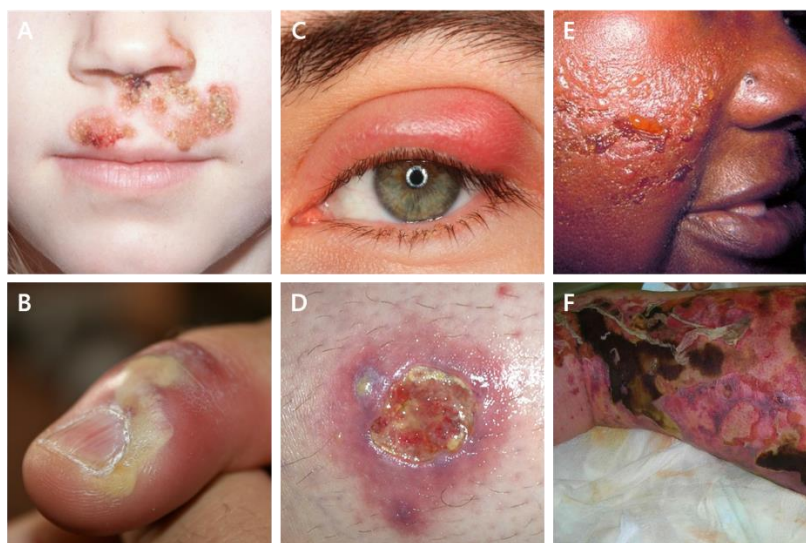
Sur le plan mondial, la proportion la plus élevée des souches de SARM parmi les différents isolats de *S. aureus* est observée en Australie, aux États-Unis, en Chine et au Japon (entre 47 et 61%). En Europe, elle suit une tendance croissante du nord vers le sud. Les taux sont aux alentours de 5% dans les pays scandinaves et entre 25 et 50% dans les pays nord-méditerranéens (Köck et al., 2010). Alors que ces taux étaient en augmentation dans certains pays européens, en France, la prévalence des souches de SARM a significativement diminué de 33,4% à 25,7% durant la période de 2001 à 2007 (Carlet et al., 2009). Depuis, la tendance est à nouveau à la hausse atteignant 46,3 % en 2016 et suggérant que le programme national de contrôle des infections nécessite une nouvelle amélioration. Le clone USA300 (ST8) est le principal responsable des épidémies communautaires à *S. aureus* aux États-Unis, causant des infections cutanées, des pneumonies nécrosantes et des endocardites (Planet, 2017). Une variante latine du clone USA300 et le clone USA1100 (ST30) sont largement répandus en Amérique du sud (Reyes et al., 2009). De l'autre côté du Pacifique, les clones Queensland (ST93) et le SARM-C ST835 prédominent en Australie ; ils sont responsables d'infections cutanées chez les enfants et les adultes. En Europe, malgré une plus faible prévalence générale des souches de SARM par rapport au reste du monde, il existe une très grande variabilité génétique entre les souches isolées. Les souches résistantes à la kanamycine et à l'amikacine appartenant au clone ST80 semblent les plus répandues et sont à l'origine d'infections de la peau et des tissus mous (Otter and French, 2010). Ce clone a également été identifié en Afrique du nord et au Moyen-Orient (Stegger et al., 2014). En Afrique et en Asie, la très grande hétérogénéité des isolats de *S. aureus* et le manque de données de surveillance ne permettent pas d'identifier clairement les clones prédominants dans ces deux continents (Junie et al., 2018).

## 4.2. Manifestations cliniques

### 4.2.1. Les infections de la peau et des tissus mous

*S. aureus* est considéré comme le principal agent étiologique des infections de la peau et des tissus mous chez l'adulte et l'enfant provoquant différentes manifestations cliniques. Les maladies cutanées provoquées par *S. aureus* sont principalement l'impétigo, les furoncles et l'orgelet, mais il peut être également responsable d'autres pathologies plus graves comme l'érysipèle et la fasciite nécrosante (Cardona and Wilson,

2015). La figure 7 représente des photographies de quelques infections de la peau et des tissus mous à *S. aureus*.



**Figure 7. Exemples de manifestations cliniques des infections de la peau et des tissus mous dues à *S. aureus***

A : impétigo ; B : panaris ; C : orgelet ; D : furoncle ; E érysipèle et F : fasciite nécrosante

L'impétigo est l'infection cutanée d'origine bactérienne la plus commune chez les enfants. Il se présente comme des lésions bulleuses ou papulaires qui évoluent en lésions croûteuses principalement au niveau du visage et des extrémités. Les principaux germes isolés à partir des lésions impétigineuses sont *S. aureus* (57 à 81%) et *Streptococcus pyogenes* (29 à 90%)(Tong et al., 2015).

Le furoncle est une infection aiguë du follicule pilo-sébacé provoquant une accumulation locale de pus et de tissu nécrosé. Les lésions sont douloureuses et laissent des cicatrices en creux. Le furoncle peut se manifester sur tout le corps mais il est favorisé par les zones de frottements comme le dos, les fesses et les cuisses. D'autres folliculites peuvent être causées par *S. aureus* comme la furunculose (infection chronique et répétition de nombreux furoncles), l'anthrax (confluence et prolifération de plusieurs furoncles), l'orgelet (au niveau de la paupière) et le sycosis (au niveau de la barbe)(Le Loir and Gantier, 2009).

L'infection cutanée à *S. aureus* peut s'étendre au niveau des tissus mous sous-jacents provoquant différentes pathologies comme l'érysipèle, la fasciite nécrosante et la pyomyosite.



L'érysipèle, appelé aussi cellulite, est une dermo-hypodermite non nécrosante qui touche environ 20 personnes sur 10 000 en Europe avec une morbidité significative (Inghammar et al., 2014). Il s'agit d'une réaction inflammatoire aiguë associée à un érythème important principalement localisé au niveau des jambes ou du visage. Les streptocoques bêta-hémolytiques sont la principale cause de cette maladie, mais *S. aureus* peut également jouer un rôle jusque dans 62% des cas (Bläckberg et al., 2015).

Contrairement à l'érysipèle, la fasciite est une infection mortelle à progression rapide qui provoque une nécrose de l'hypoderme et nécessite donc une intervention médicale et chirurgicale urgente. Une étude rétrospective sur des patients atteints de fasciite nécrosante a montré que *S. aureus* était isolé en monoculture dans 37% des cas (Lee et al., 2007). La pyomyosite est une infection purulente des muscles squelettiques qui survient principalement dans les régions tropicales. *S. aureus* est l'agent causal principal de cette maladie isolé dans 90% des cas (Chauhan et al., 2004).

#### 4.2.2. Les infections ostéo-articulaires

*S. aureus* est le pathogène le plus commun pour les trois principales classes d'infections ostéo-articulaires, à savoir l'ostéomyélite, l'arthrite septique et les infections des prothèses articulaires (Tong et al., 2015). L'ostéomyélite est une pathologie qui touche aussi bien les enfants que les adultes. Il s'agit d'une infection de l'os qui provoque sa destruction, sa nécrose et la formation d'un nouvel os. Ces infections sont classées en trois catégories : l'ostéomyélite hématogène (infection de l'os par voie sanguine), l'ostéomyélite contigüe (infection de l'os à partir des structures adjacentes comme les espaces articulaires et les tissus mous) et l'ostéomyélite par insuffisance vasculaire (principalement chez les patients diabétiques ou atteints de maladies vasculaires périphériques). *S. aureus* est la cause prédominante de ces trois catégories d'ostéomyélites pouvant représenter jusqu'à 76% des cas chez les enfants et 73% des cas chez les adultes (Byren et al., 2009; Howard-Jones et al., 2013).

L'arthrite septique est une infection bactérienne mono- ou poly-articulaire causée par *S. aureus* dans 40 à 80% des cas. Les articulations les plus touchées sont les genoux, les hanches et les épaules (Goldenberg, 1998).

Les patients atteints d'arthrite septique présentent des articulations gonflées, rouges, chaudes et tendues avec une incapacité de faire des mouvements. L'arthrite septique à *S. aureus* est considérée comme une urgence médicale car elle provoque la destruction de l'articulation de façon rapide et irréversible en l'absence d'un traitement approprié.

Les opérations de pose de prothèse articulaire, principalement de hanche ou de genou, sont très fréquentes dans les pays industrialisés. Le risque d'infection suite à ces opérations est évalué à près de 2% et constitue un problème à la fois sanitaire et économique. Plusieurs microorganismes peuvent être à l'origine de ces infections, principalement *S. aureus* et les streptocoques bêta-hémolytiques (Kurtz et al., 2010; Ong et al., 2009).

#### 4.2.3. Les infections cardiovasculaires

*S. aureus* est responsable d'environ un cas sur quatre de bactériémie (présence de bactéries dans la circulation sanguine). Il s'agit du pathogène bactérien le plus isolé chez les patients hospitalisés et le deuxième après *Escherichia coli* chez les patients non hospitalisés (Styers et al., 2006). La bactériémie à *S. aureus* représente un vrai challenge clinique notamment avec l'incidence des bactériémies causées par des souches de SARM estimées à 26% en France (Naber, 2009). Dans 76% des cas, les bactériémies sont dues à une infection primaire extra- ou intravasculaire. Les principales sources de bactériémies sont les infections vasculaires liées à la pose d'un cathéter (26%), aux infections de la peau et des tissus mous (19%), aux infections pleuropulmonaires (9%), aux infections ostéo-articulaires (8%), à l'endocardite infectieuse (5%) ou à d'autres infections (11%) (Tong et al., 2015).

*S. aureus* est aussi l'une des principales causes d'endocardites infectieuses dans les pays industrialisés. Il s'agit d'une inflammation de l'endocarde et des valves cardiaques souvent due à une infection bactérienne. Une étude rétrospective multicentrique incluant plus de 2300 cas d'endocardites infectieuses issues de quinze populations différentes en Europe et aux États-Unis sur la période de 1970 – 2000 avait estimé que la proportion d'endocardites causées par *S. aureus* était comprise entre 16 et 34% (Tleyjeh et al., 2007).

Les manifestations cliniques de l'endocardite à *S. aureus* se caractérisent principalement par une forte fièvre associée à une rapide destruction des tissus cardiaques. L'origine des endocardites infectieuses est une lésion élémentaire au niveau de l'*endocardium* ou des valves du cœur, notamment après une chirurgie cardiaque, la pose d'un cathéter intravasculaire ou des injections avec des produits contenant des débris contaminés chez les toxicomanes (McDonald, 2009).

#### 4.2.4. Les infections des voies respiratoires

*S. aureus* n'est pas considéré comme l'une des causes importantes de pneumonie. Cependant, les pneumopathies aiguës à *S. aureus* sont des pathologies sévères avec une mortalité très élevée (De la Calle et al., 2016). L'implication de *S. aureus* dans les maladies respiratoires a été initialement décrite pendant la pandémie d'influenza en 1918 (Chickering and Park, 1919). Depuis, son rôle dans les infections pulmonaires a été bien documenté, même en l'absence d'infection virale primaire (Wunderink and Waterer, 2017). *S. aureus* a un rôle prédominant dans les infections respiratoires chez les patients hospitalisés et principalement dans les pneumonies nosocomiales, les pneumonies associées à la ventilation mécanique et les pneumonies associées aux soins (Tong et al., 2015). *S. aureus* est aussi l'une des bactéries responsables de pneumonie chez les patients atteints de mucoviscidose (Goss and Muhlebach, 2011). Par ailleurs, *S. aureus* est responsable d'environ 10% des cas de sinusite bactérienne et est parfois responsable d'otite ou d'angine, loin derrière *S. pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* (Payne and Benninger, 2007).

#### 4.2.5. Les pathologies toxiques

Les pathologies causées par *S. aureus* chez l'homme sont très diverses et ne se limitent pas aux infections suppuratives. *S. aureus* a également la capacité de provoquer des pathologies toxiques, c'est-à-dire des pathologies qui ne sont pas causées directement par la multiplication de la bactérie, mais par la production de toxines leucotoxiques, superantigéniques ou épidermolytiques. L'une des exotoxines produites par *S. aureus* les plus connues est la LPV. Cette toxine leucotoxique est biologiquement capable de former des pores et d'induire une leucopénie.

Cliniquement, LPV est souvent associée à la pneumonie nécrosante caractérisée par une détérioration rapide de l'état de santé avec une leucopénie, une hémorragie des voies respiratoires, une insuffisance respiratoire grave et une forte mortalité avoisinant 75% (Löffler et al., 2013)

Une autre famille d'exotoxines est responsable du syndrome du choc toxique staphylococcique (SCTS). Il s'agit d'une pathologie liée à l'action des toxines superantigéniques produites par *S. aureus*. Le SCTS a été décrit pour la première fois en 1978 chez des enfants (Todd et al., 1978). Avec l'introduction sur le marché des tampons hygiéniques super absorbants dans les années 1980, le SCTS a été associé aux infections dues à l'utilisation de ces tampons chez les femmes en période menstruelle (Osterholm and Forfang, 1982). Actuellement, les progrès technologiques ont nettement augmenté la qualité des tampons hygiéniques et le taux d'incidence des SCTS chez les femmes en période menstruelle est quasiment le même que dans la population globale. Hors contexte menstruel, la principale source primaire de SCTS est constituée par les infections cutanées à *S. aureus* (DeVries et al., 2011). Cliniquement, un cas confirmé de SCTS doit avoir la symptomatologie suivante : une fièvre supérieure à 38,9 °C, une hypotension (choc), un œdème généralisé et une défaillance d'au moins trois organes (Tong et al., 2015).

D'autres pathologies toxiques sont causées par *S. aureus* comme par exemple le syndrome d'exfoliation généralisée (SSSS : *staphylococcal scalded skin syndrome*). Il s'agit d'une maladie provoquée par des toxines épidermolytiques produites par *S. aureus* appelées exfoliatines. L'activité biologique de ces toxines provoque des lésions cutanées graves qui peuvent engager le pronostic vital, principalement chez les nouveau-nés et les enfants de moins de cinq ans (Mishra et al., 2016).

### 4.3. La résistance aux antibiotiques

Les différentes souches de SARM résultent de l'acquisition indépendante de la cassette chromosomique staphylococcique *mec* (*SCCmec* : *staphylococcal chromosomal cassette mec*) par de nombreux clones de *S. aureus* (Lee et al., 2018). Cet élément génétique mobile contient des gènes *mec* qui codent les protéines impliquées dans la résistance à la plupart des  $\beta$ -lactamines (incluant la méthicilline).

A l'heure actuelle, on distingue onze types de SCCmec (de I à XI) en se basant sur la combinaison de six classes des complexes du gène *mec* (A, B, C1, C2, D et E) et des cinq types des complexes du gène *ccr* (de 1 à 8) codant des recombinases qui assurent la mobilité de SCCmec. Une nomenclature universelle et une procédure standardisée ont été proposées par le groupe international travaillant sur la classification des éléments de la cassette chromosomique staphylococcique (IWG-SCC). Toutes les informations et les données mises à jour sont accessibles en ligne via leur site internet ([http://www.sccmec.org/Pages/SCC\\_HomeEN.html](http://www.sccmec.org/Pages/SCC_HomeEN.html)).

Les principales cibles des antibiotiques chez *S. aureus* sont la paroi cellulaire, le ribosome et les acides nucléiques. La résistance aux antibiotiques peut se développer grâce au transfert horizontal des déterminants de résistance codés par des éléments génétiques mobiles comme des plasmides, des transposons ou la SCCmec, ou à des mutations au niveau du génome. L'acquisition horizontale de gènes peut induire un des mécanismes de résistance suivants : (i) modification ou inactivation enzymatique de l'antibiotique, (ii) modification enzymatique du site de liaison de l'antibiotique, (iii) efflux de l'antibiotique, (iv) acquisition d'une nouvelle cible résistante à l'antibiotique, et (v) détournement de l'antibiotique pour protéger la cible. L'acquisition de la résistance par mutation génomique peut induire (i) la modification de la structure de la cible de l'antibiotique, ce qui empêche sa liaison, (ii) la modification de la fonction des pompes d'efflux, et (iii) la modification de la structure de la paroi ou la membrane bactérienne, ce qui réduit l'accès de l'antibiotique à sa cible (Foster, 2017).

## 5. *Staphylococcus aureus* : commensal de l'homme

### 5.1. Epidémiologie de la colonisation

*S. aureus* est une bactérie connue pour son pouvoir pathogène, mais il s'agit avant tout d'une bactérie commensale qui fait partie de la flore normale de plus d'un tiers de la population générale. *S. aureus* colonise principalement la muqueuse nasale mais également la peau et les muqueuses pharyngée, vaginale et intestinale de l'Homme (Figure 8).

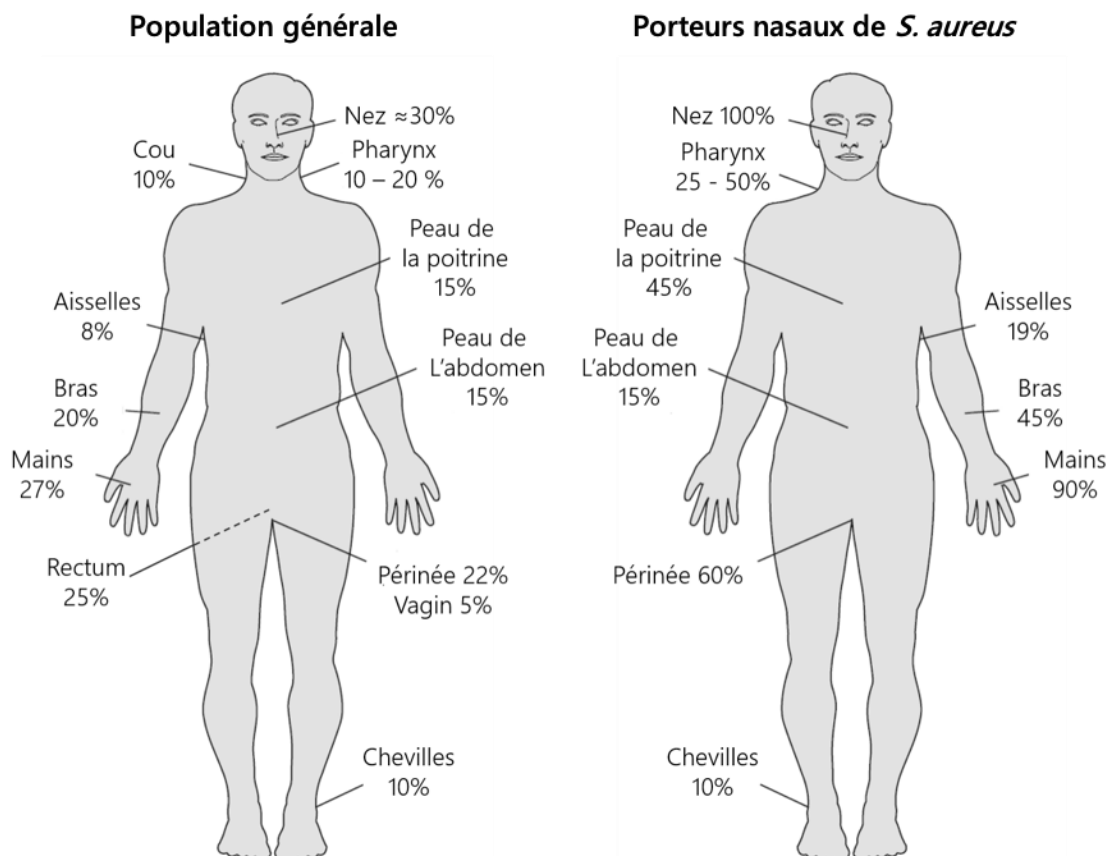


Figure 8. Prévalence de la colonisation par *S. aureus* au niveau des différents sites du corps humain.

Schéma adapté de Botelho-Nevers et al., 2016; Gagnaire et al., 2017 et Wertheim et al., 2005.

### 5.1.1. Colonisation nasale à *Staphylococcus aureus*

Plusieurs arguments sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle la muqueuse nasale est le site principal de la colonisation par *S. aureus* chez l'Homme (Verhoeven et al., 2014; Wertheim et al., 2005). Par exemple, la charge bactérienne est beaucoup plus élevée dans le nez que dans les autres sites de portage ; de plus, le risque de portage extra-nasal est d'autant plus important que la charge nasale de *S. aureus* est importante (Mermel et al., 2011). De même, le portage nasal est souvent la source de l'inoculation des autres sites de portage et la décolonisation locale du nez induit également la décolonisation des autres sites (Kluytmans and Wertheim, 2005). Les études histologiques ont montré que *S. aureus* colonise principalement la partie antérieure de la muqueuse nasale appelée *vestibulum nasi* en adhérant aux cellules kératinisées de l'épithélium squameux, en association avec les débris de kératine et de mucus ou avec les fibres des follicules pileux (ten Broeke-Smits et al., 2010; Cole et al., 2001a).

Il s'agit du vestibule nasal antérieur qui représente la première région de la muqueuse nasale à l'entrée de chaque narine et qui est constitué de cellules épithéliales squameuses stratifiées et kératinisées comme celles de la peau (Figure 6). *S. aureus* a été également retrouvé au niveau intracellulaire dans des biopsies de parties antérieures de la muqueuse nasale de patients atteints de rhino-sinusite chronique ou d'amygdalite (Clement et al., 2005; Zautner et al., 2010).

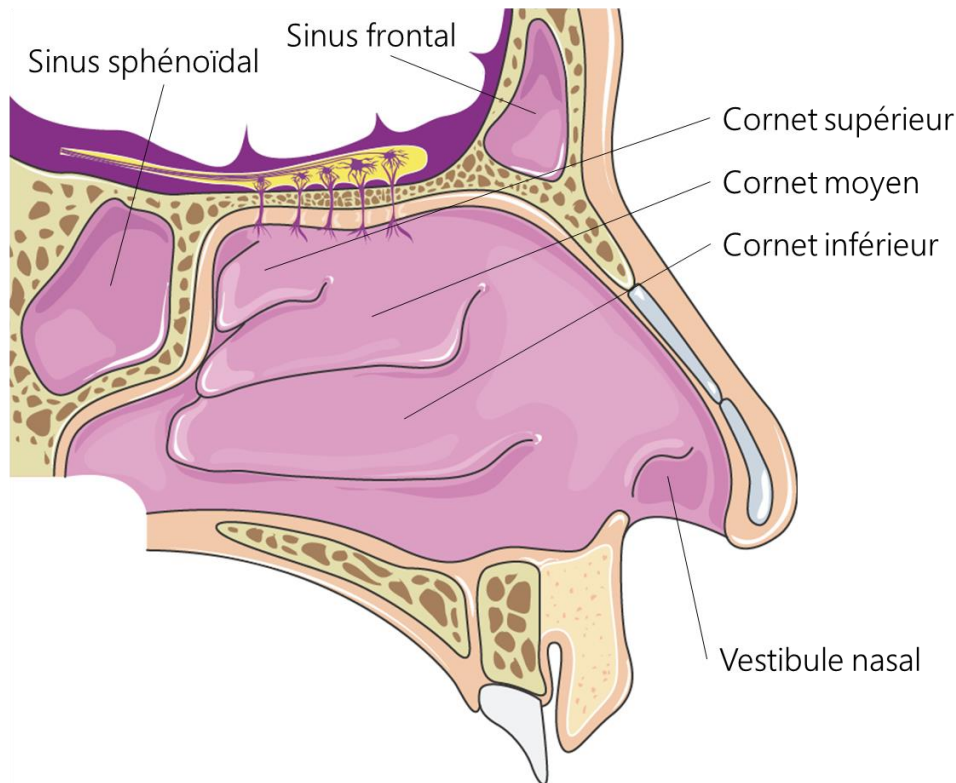


Figure 9. Anatomie de la cavité nasale

De nombreuses études réalisées sur le portage nasal de *S. aureus* ont permis de distinguer deux types de portage en fonction de la dynamique du portage et de sa durée, à savoir le portage persistant et le portage intermittent. Par définition les porteurs persistants sont colonisés par *S. aureus* sur de longues périodes (des mois, voire des années) alors que les porteurs intermittents ne sont colonisés par *S. aureus* que sur des brefs périodes de leurs vies détectés aux moments du dépistage. De plus, il a été démontré que la charge bactérienne de *S. aureus* chez les porteurs persistants est supérieure à celle mesurée chez les porteurs intermittents (environ  $10^5$  et  $10^2$  UFC/écouvillon, respectivement) (Nouwen et al., 2004; Verhoeven et al., 2012).

Suite à ces observations, un algorithme a été proposé par l'équipe du GIMAP à Saint-Etienne pour identifier de façon simple et rapide les porteurs persistants à *S. aureus* basé sur seulement un ou deux écouvillons nasaux (figure 10) (Verhoeven et al., 2012).

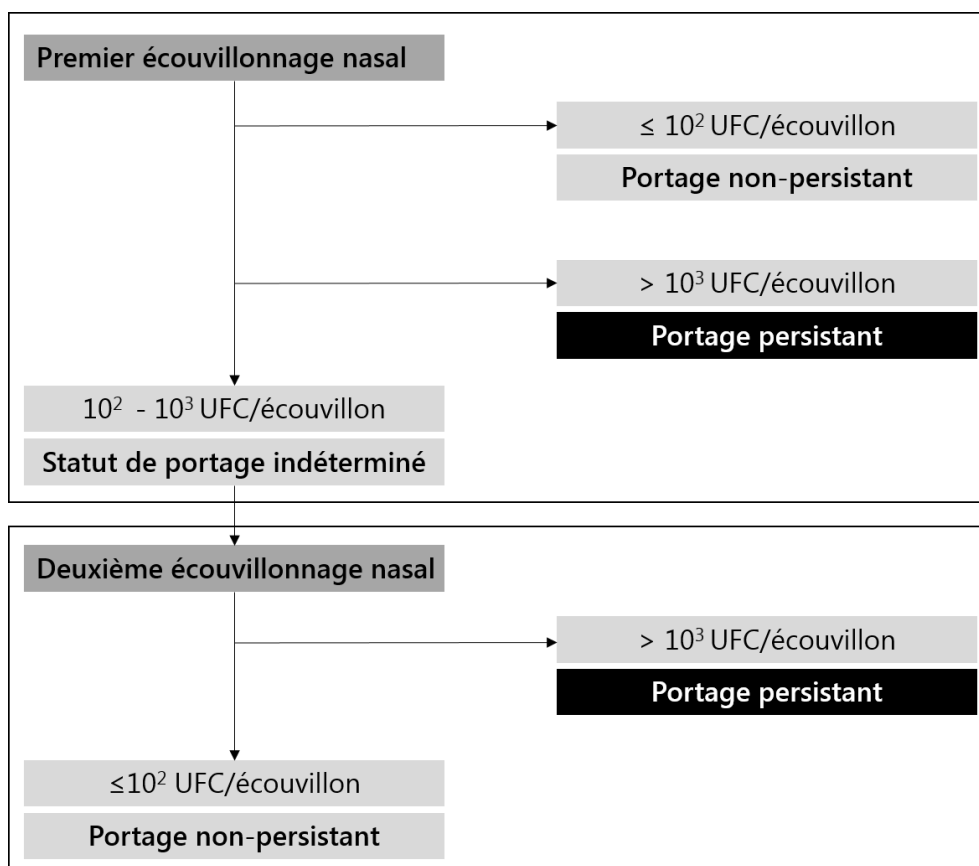


Figure 10. Algorithme pour définir le statut de portage nasal de *S. aureus*.

Figure adaptée de Verhoeven et al., 2012

Jusqu'en 2005, la prévalence générale de la colonisation nasale à *S. aureus* a été évaluée à 27% avec une grande variabilité entre les études allant de 19 à 55% (Wertheim et al., 2005). En 2014, la prévalence du portage nasal a été évaluée à 24 % (Verhoeven et al., 2014). Toutefois, la prévalence du portage nasal est très variable selon les études et les pays, probablement à cause de la variabilité des techniques d'écouvillonnage et de dépistage utilisées, des groupes de populations étudiés ainsi que des conditions d'hygiène et de vie (Tableau 2).



**Tableau 2. Prévalence du portage nasal de *S. aureus* dans le monde.**

Pays	Population	Année	N	Age (ans)	PPN	Référence
<b>Afrique</b>						
Algérie	Patients hospitalisés et non hospitalisés	2017	663	Enfants et adultes	21,6%	(Ouidri, 2018)
Burkina Faso	Volontaires sains et patients hospitalisés	2014	119	Adultes	32,9%	(Ouedraogo et al., 2016)
Égypte	Patients non hospitalisés	2011	103	1-59	52,0%	(Abou Shady et al., 2015)
Gabon	Population générale	2009	500	1 - 90	29,0%	(Ateba Ngoa et al., 2012)
Kenya	Personnel de santé	2010	246	Adultes	18,3%	(Omuse et al., 2012)
Tunisie	Volontaires sains	2008 - 2009	423		13,0%	(Slama et al., 2011)
<b>Moyenne en Afrique</b>					<b>27,8%</b>	
<b>Amérique</b>						
États-Unis	Population générale (étude NEHANES)	2001 - 2004	18626	Enfants et adultes	30,4%	(Gorwitz et al., 2008)
Brésil	Population générale	2010	686	Enfants et adultes	32,7%	(Pires et al., 2014)
Canada	Utilisateur de drogue par injection	2006	301	Adultes	39,5%	(Al-Rawahi et al., 2008)
Guinée française	Population rurale	2006 - 2008	163	18 - 81	57,8%	(Ruimy et al., 2010)
Mexique	Population générale	1998 - 2006	1243	1 - 96	37,1%	(Hamdan-Partida et al. 2010)
<b>Moyenne en Amérique</b>					<b>39,5%</b>	
<b>Asie</b>						
Arabie Saoudite	Patients non hospitalisés	2011	103	1-60	48,5%	(Abou Shady et al., 2015)
Chine	Étudiants en médecine	2008 - 2009	2103	19 - 23	23,1 %	(Ma et al., 2011)
Inde	Parents	2003	319	Adultes	29,4%	(Saxena et al., 2003)
Indonésie	Patients divers	2001 - 2002	3995	Enfant et adultes	09,1%	(Lestari et al., 2008)
Japon	Étudiants et personnel sains	2001	157	Adultes	35,7%	(Uemura et al., 2004)
Malaisie	Volontaires sains	2006	346	Adultes	23,4%	(Choi et al., 2006)
Pakistan	Volontaires sains	2002 - 2003	1660	Adultes	14,8%	(Anwar et al., 2004)
Taiwan	Patients et personnel de santé	2001	2231	1 - 93	24,1%	(Lu et al., 2005)
<b>Moyenne en Asie</b>					<b>26,0%</b>	
<b>Europe</b>						
Allemagne	Patients non hospitalisés	2014	389	20 - 69	21,9%	(Mehraj et al., 2014)
France	Patients admis pour pieds diabétique	2010 - 2012	276	Adultes	39,5%	(Dunyach-Remy et al., 2017)
France	Personnel de santé volontaire	2010	152	Adultes	36,8%	(Boisseau et al., 2012)

-Suite du tableau 2-

Pays	Population	Année	N	Age (ans)	PPN	Référence
<b>Europe</b>						
France	Pèlerins volontaires	2012	158	Adultes	46,2%	(Verhoeven et al., 2015a)
Italie	Patients en pédiatrie	2010	785	Enfants	20,9%	(Gesualdo et al., 2014)
Italie	Population générale	2000 - 2001	812	16 - 83	30,5%	(Zanelli et al., 2002)
Norvège	Visiteurs de centre commercial	2001 - 2005	348	15 - 90	27,3 %	(Skråmm et al., 2011)
Norvège	Population générale (l'étude Tromsø)	2007 - 2008	4026	30 - 87	27,6%	(Sangvik et al., 2011)
Pays-Bas	Population générale (l'étude Rotterdam)	1997 - 1999	3851	61 - 101	18,0%	(Emonts et al., 2008)
Pays-Bas	Population générale	1999 - 2001	14008	Enfants et adultes	24,0%	(Wertheim et al., 2004)
Pays-Bas	Mères et enfants	2010	511	Mères Enfants	25,2% 13,5%	(Lebon et al., 2010)
Royaume-Uni	Patients de médecine générale	2008 - 2009	1123	Adultes	32,0%	(Miller et al., 2014)
Suède	Patients et personnel de santé (service d'orthopédie)	2003	346	Adultes	32,0%	(Nilsson and Ripa, 2006)
Suisse	Population générale	2000 - 2006	3464	37 - 81	36,4%	(Mertz et al., 2009)
<b>Moyenne en Europe</b>					<b>28,8%</b>	
<b>Océanie</b>						
Australie	Volontaires sains	2005 - 2006	699	Adultes	28,9%	(Munckhof et al., 2009)
Nouvelle-Zélande	Population générale	2006	424	Enfants et adultes	18,0%	(Best et al., 2011)
<b>Moyenne en Océanie</b>					<b>23,4%</b>	
<b>Moyenne mondiale</b>					<b>29,1%</b>	

N : taille de la population étudiée ; PPN : prévalence du portage nasal de *S. aureus*

## 5.1.2. Colonisation extra-nasale par *S. aureus*

### 5.1.2.1. Colonisation pharyngée

La prévalence générale de la colonisation pharyngée par *S. aureus* a été estimée entre 10 et 20 % dans la population mondiale (Wertheim et al., 2005). Des taux plus élevés pouvant atteindre jusqu'à 54% ont été rapportés par des études utilisant des techniques d'enrichissement en bouillon avant la mise en culture (Andrews et al., 2009; Lee et al., 2011a; Nilsson and Ripa, 2006). Une étude sur la colonisation par *S. aureus* chez les femmes enceintes aux Etats-Unis a montré que le pré-enrichissement augmente la prévalence du portage par rapport aux techniques de culture directe de 33 à 52% au

niveau nasal et de 38 à 50% au niveau pharyngé (Andrews et al., 2009). Certains auteurs suggèrent que le pharynx est le site principal de colonisation par *S. aureus* chez l'Homme (Nilsson and Ripa, 2006). Entre 12 et 38% des individus sont porteurs de *S. aureus* exclusivement au niveau de la gorge (Hamdan-Partida et al., 2010; Mertz et al., 2009). Cependant, la charge bactérienne pharyngée est nettement plus faible que celle retrouvée au niveau du nez. De plus, la persistance de la colonisation nasale par *S. aureus* est estimée à 20%, comparée à 7% au niveau de la gorge (Stark et al., 2014). Plusieurs études récentes ont montré que la combinaison de l'écouvillonnage nasal et pharyngé permet d'améliorer la sensibilité du dépistage de la colonisation par *S. aureus* d'environ 25% (Mertz et al., 2007; Nilsson and Ripa, 2006; Verhoeven et al., 2015a).

#### 5.1.2.2. Colonisation intestinale

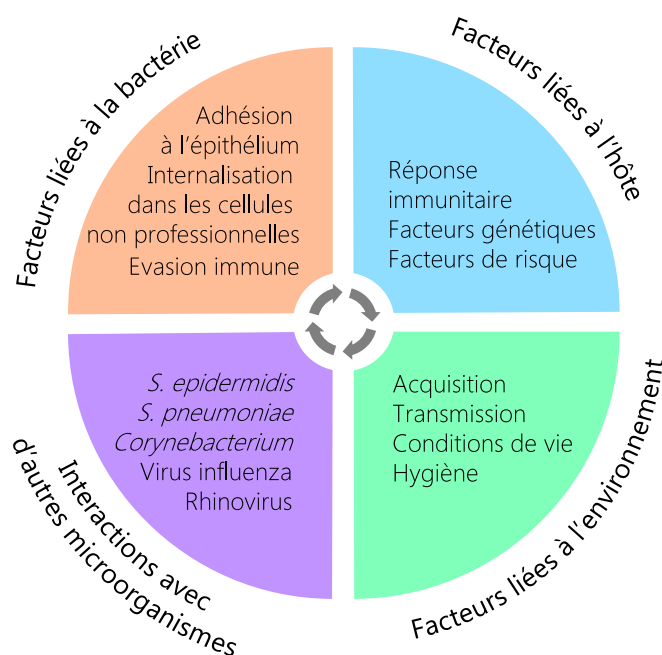
La détection du portage intestinal de *S. aureus* repose principalement sur l'identification de cette bactérie à partir de cultures de selles ou d'écouvillons rectaux ou anaux. L'écouvillonnage au niveau du périnée est suggéré comme représentatif de la colonisation rectale vue sa proximité de la zone anale. Cependant, les résultats obtenus avec ce type d'écouvillonnage restent discutables et peuvent être considérés comme représentatifs de la colonisation de la peau. D'après une revue de la littérature publiée en 2009, la prévalence du portage intestinal dans la population générale est estimée à 20% pour *S. aureus* dont 9% pour les souches de SARM (Acton et al., 2009). Chez différents groupes de patients hospitalisés, le portage intestinal varie de 8 à 31% (Acton et al., 2009). Une revue systématique plus récente a montré que la prévalence du portage intestinal de *S. aureus* est de 25% dans la population générale, 14% chez les adultes sains, 21% chez les patients hospitalisés, 39% chez les enfants et jusqu'à 73% chez les nouveau-nés (Gagnaire et al., 2017). Le portage exclusif de *S. aureus* au niveau intestinal a été rapporté dans 0 à 26% des cas (Gagnaire et al., 2017).

#### 5.1.2.3. Colonisation vaginale

Le portage vaginal de *S. aureus* est évalué pour étudier le risque de choc-toxique staphylococcique menstruel ou le risque de transmission aux nouveau-nés. La prévalence générale du portage vaginal varie entre 5 et 15 % selon les études (Andrews et al., 2009; Bourgeois-Nicolaos et al., 2010; Guinan et al., 1982).

## 5.2. Déterminants de la colonisation

L'évolution de *S. aureus* comme colonisateur de l'Homme est le résultat des interactions complexes d'une multitude de paramètres qui déterminent la colonisation de l'hôte par cette bactérie. *S. aureus* a développé une relation très spécifique avec son hôte, au point que certains porteurs persistants inoculés avec une mixture de souches de *S. aureus* après une décolonisation finissent par réacquérir leur souche autologue (van Belkum et al., 2009). La figure 11 illustre les principaux déterminants de la colonisation à *S. aureus*. Des facteurs aussi bien liés à l'hôte qu'à la bactérie sont impliqués vu que seulement 20% de la population sont colonisés par *S. aureus* de façon persistante et que certains clones de *S. aureus* sont plus souvent identifiés que d'autres (Kluytmans and Wertheim, 2005). Les déterminants bactériens contribuent à l'adhésion ou l'internalisation dans les tissus humains et à l'évasion au rôle du système immunitaire de l'hôte. En plus des facteurs de risque corrélés avec la colonisation à *S. aureus*, des déterminants liés à l'hôte jouent également un rôle important, notamment dans l'élimination de la bactérie par le système immunitaire, ainsi que des facteurs génétiques prédisposant à la colonisation. Les interactions avec d'autres micro-organismes ainsi que des facteurs environnementaux peuvent également agir sur la colonisation par *S. aureus*.



**Figure 11. Déterminants de la colonisation à *S. aureus*.**

La colonisation à *S. aureus* est déterminée par des interactions complexes entre des facteurs liés à la bactérie, à l'hôte, à l'environnement, au microbiome et à des pathogènes viraux.

## 5.2.1. Déterminants liés à *S. aureus*

### 5.2.1.1. Adhésion à l'épithélium

L'une des étapes clés de la colonisation est l'adhésion de *S. aureus* aux tissus de son hôte. La surface stratifiée de l'épithélium du vestibule nasal est constituée principalement de kératinocytes comme la peau. La couche supérieure subit un processus de cornification qui transforme les kératinocytes en cornéocytes. Ces cellules expriment à leur surface plusieurs protéines comme la loricrine (environ 85%), l'involucrine, des kératines (principalement les cytokératines 8 et 10 (CK8 et CK10)), la filaggrine, et d'autres petites protéines riches en proline (Candi et al., 2005). Du côté bactérien, *S. aureus* exprime toute une batterie de protéines qui lui permettent d'adhérer aux surfaces vivantes ou inertes. Ces protéines peuvent être classées en deux principales familles : les protéines ancrées à la paroi bactérienne de façon covalente communément appelées MSCRAMM (*Microbial Surface Components Recognising Adhesive Matrix Molecules*) et les protéines secrétées par la bactérie mais qui peuvent se lier à sa paroi grâce à des liaisons faibles qu'on appelle les SERAM (*Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules*). D'autres protéines et d'autres molécules non protéiques exprimées par *S. aureus* peuvent avoir un rôle dans l'adhésion aux épithéliums. De nombreux facteurs d'adhésion impliqués dans la colonisation nasale par *S. aureus* ont été clairement mis en évidence, d'autres sont encore mal étudiés et leur rôle dans la colonisation chez l'homme est hypothétiquement basé sur quelques observations *in vitro*, notamment leur capacité à adhérer aux cellules épithéliales (Tableau 3).

**Tableau 3. Facteurs d'adhésion exprimés par *S. aureus* qui sont potentiellement impliqués dans la colonisation nasale chez l'homme.**

Tableau de synthèse adapté de Clarke and Foster, 2006; Mulcahy et al., 2012 et Sollid et al., 2014

Facteur d'adhésion	Ligand cellulaire	Rôle dans la colonisation et autres fonctions
<b>MSCRAMM</b>		
Bbp	Fg	Rôle hypothétique dans la colonisation chez l'Homme Liaison au sialoprotéines osseuses
ClfA	Fg	Facteur de virulence important de l'ostéomyélite Faible expression au cours de la colonisation persistante Facteur d'agglutination
ClfB	Fg, CK8, CK10, loricrine, plakophiline	Rôle important dans l'immuno-évasion Facteur majeur nécessaire à la colonisation nasale chez l'Homme Hautement exprimé durant la colonisation nasale chez l'Homme Facteur d'agglutination

-Suite du tableau 3-

Facteur d'adhésion	Ligand cellulaire	Rôle dans la colonisation et autres fonctions
<b>MSCRAMM</b>		
CNA	Cg	Rôle hypothétique dans la colonisation chez l'Homme Forte prévalence chez les souches de portage nasal Facteur de virulence important des infections osseuses
EbpS	Elastine, tropoélastine	Rôle hypothétique dans la colonisation chez l'Homme Liaison aux cellules épithéliales in vitro
FnBPA/B	Fn, Fg, élastine	Fortement exprimé durant la colonisation nasale chez l'Homme Facteur majeur nécessaire à l'adhésion aux cellules épithéliales et à l'internalisation dans les cellules phagocytaires non-professionnelles in vitro Facteur majeur de l'activation des plaquettes
IsdA	Fg, Fn, involucrine, loricrine, CK10, trasferrine, hémoglobine, hémine, fetuine	Facteur important pour la colonisation nasale dans les conditions pauvres en fer in vivo (modèle murin) Fortement exprimé durant la colonisation nasale chez l'Homme Liaison aux cellules épithéliales in vitro
IsdB	Fn, hémoglobine, hémine	Rôle non étudié dans la colonisation chez l'Homme Participe à l'adhésion et à l'internalisation dans les cellules épithéliales et endothéliales
Pls	Lipides, glycolipides	Rôle non étudié dans la colonisation chez l'Homme Participe à l'adhésion aux cellules épithéliales in vitro
SasG	Inconnu (protéines de la MEC ?)	Rôle non-étudié dans la colonisation chez l'Homme Participe à l'adhésion aux cellules épithéliales in vitro Formation de biofilm
SdrC	$\beta$ -neurexine	Rôle non étudié dans la colonisation chez l'Homme Participe à l'adhésion aux cellules épithéliales in vitro
SdrD	Desmogléine 1	Rôle non étudié dans la colonisation chez l'Homme Participe à l'adhésion aux cellules épithéliales in vitro
SdrE	Inconnu	Forte prévalence chez porteurs nasaux Facteur d'agglutination
SpA	Ig	Rôle hypothétique dans la colonisation chez l'Homme Forte expression durant la colonisation nasale Facteur important pour l'immuno-évasion
<b>SEARM</b>		
EAP	Fg, Fn, ICAM-1, vitronectine, prothrombine, autres protéines de la MEC	Rôle secondaire dans la colonisation chez l'Homme Participe à l'adhésion et l'internalisation sur des modèles de cellules épithéliales in vitro Impliqué dans la formation de biofilm Facteur important pour l'immuno-évasion
EMP	Fg, Fn, Cg, autres protéines de la matrice extracellulaire	Rôle inconnu dans la colonisation chez l'Homme Participe à l'adhésion et l'internalisation sur des modèles de cellules épithéliales in vitro Impliqué dans la formation de biofilm
<b>Autres adhésines protéiques</b>		
Aaa	Fg, Fn, vitronectin	Rôle hypothétique dans la colonisation chez l'Homme Liaison aux cellules épithéliales in vitro Rôle important dans la division cellulaire et la lyse de la bactérie

-Suite du tableau 3-

Facteur d'adhésion	Ligand cellulaire	Rôle dans la colonisation et autres fonctions
<b>Autres adhésines protéiques</b>		
Atl	Fn	Rôle hypothétique dans la colonisation chez l'Homme Liaison aux cellules épithéliales et endothéliales in vitro Rôle important dans la division cellulaire et la lyse de la bactérie
<b>Adhésines non protéiques</b>		
LTA	Inconnu	Rôle hypothétique dans la colonisation chez l'Homme Liaison aux cellules épithéliales in vitro Constituant majeur de la paroi bactérienne
WTA	SREC-1	Facteur majeur dans la colonisation nasale in vivo (modèle murin) Forte expression durant la colonisation nasale chez l'Homme Liaison aux cellules épithéliales et endothéliales in vitro Rôle important dans la structure de la paroi et la division cellulaire

*Aaa : autolysin adhesin ; Atl : autolysin ; Bbp : bone sialoprotein-binding protein ; Cg : collagène ; Clf : clumping factor ; CNA : collagen-binding adhesin ; EAP : extracellular adherence protein ; Ebps : elastin-binding protein ; EMP : extracellular matrix protein ; Fg : fibrinogène ; Fn : fibronectine ; FnBP : fibronectin-binding protein ; ICAM-1 : intracellular adhesion molecule 1 ; Isd : iron-regulated surface determinant ; LTA : lipoteichoic acid ; MEC : matrice extracellulaire ; MSCRAMM : microbial surface components recognising adhesive matrix molecules ; Pls : plasmin-sensitive protein ; SasG : Staphylococcus aureus surface protein G ; Sdr : serine-aspartate repeat protein ; SERAM : secretable expanded repertoire adhesive molecules ; SpA : staphylococcal protein A ; SREC-1 : scavenger receptor of endothelial cells 1 ; WTA : wall teichoic acid*

#### 5.2.1.1.1. Rôle des MSCRAMM dans l'adhésion

Les MSCRAMM sont présents chez plusieurs bactéries à Gram positif incluant *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, les staphylocoques à coagulase négative, les streptocoques et les entérocoques (Josse et al., 2017). Chez *S. aureus*, il existe plus de vingt protéines MSCRAMM, mais le rôle de chacune d'entre elles n'a pas encore été identifié. Actuellement, l'acronyme MSCRAMM définit une famille de protéines ancrées à la paroi de certaines bactéries sur la base de similarités structurales et d'un mécanisme commun pour se lier aux ligands cellulaires. En plus de leur rôle principal dans l'adhésion aux composants de la matrice extracellulaire de l'hôte, certaines protéines MSCRAMM ont des fonctions supplémentaires.

La structure générale commune des MSCRAMM comporte depuis son extrémité extra-membranaire (niveau N-terminal) jusqu'à son extrémité transmembranaire (niveau C-terminal) un peptide signal, un domaine de liaison aux ligands qui comporte souvent des séquences répétées, un domaine transmembranaire hydrophobe qui comporte un motif LPXTG responsable de son ancrage à la paroi cellulaire et une queue chargée positivement (Figure 12).

Figure protégée par des droits d'auteurs.

### Figure 12. Structure des MSCRAMM chez *S. aureus*

ClfA, ClfB, FnBPA, FnBPB et CNA ont une structure commune à leur extrémité N-terminale comprenant une séquence signal (S) suivie par le domaine de liaison aux ligands (A) composé de trois sous-domaines N1, N2 et N3. L'extrémité C-terminale est constituée d'une région de liaison à la paroi (W), d'une région transmembranaire (M) et d'une queue chargée (C). ClfA et ClfB contiennent une région R constituée de répétition de dipeptide sérine-aspartate. ClfB possède en plus une région riche en proline entre A et R. FnBPA et FnBPB possède une région B qui comporte 10 ou 11 répétitions de liaison à la fibronectine entre le domaine A et l'extrémité C-terminale. La région B de CNA est composée de trois répétitions dont le rôle est inconnu. Le domaine de liaison aux ligands de SpA est composé de cinq répétitions (A-E). Xr représente la région de répétitions de courtes séquences constituée d'un nombre variable de motifs octapeptidiques. Les domaines de liaison à la paroi, le domaine transmembranaire et la queue cytoplasmique de SpA sont représentés par Wr/Wc, M et C, respectivement. La position du motif LPXTG permettant l'ancrage de la protéine à la paroi par la sortase A est indiquée pour chaque protéine. La position de l'acide aminé résiduel délimitant les différents domaines est indiquée. Clf : *clumping factor*; CNA : *collagen-binding protein*; FnBP : *fibronectin-binding protein*; MSCRAMM : *microbial surface component recognizing adhesive matrix molecule*; SpA : *staphylococcal protein A*. Figure adaptée d'après Speziale et al., 2009.



L'ancrage à la paroi cellulaire est assuré par une transpeptidase appelée sortase A (SrtA) qui clive le peptide entre la thréonine (T) et la glycine (G) du motif LPXTG et lie de façon covalente le groupe carboxyle de la thréonine avec le groupe amine des peptidoglycanes de la paroi cellulaire (Schneewind et al., 1993). Le domaine de liaison aux ligands est caractérisé par au moins deux sous-domaines adjacents appelés « *IgG-folded domains* » qui peuvent se plier et attacher le ligand suite à des changements conformationnels. Parmi les MSCRAMM impliquées dans l'adhésion de *S. aureus* aux cellules de l'hôte, on peut citer : ClfA/B (*clumping factors A and B*), FnBPA/B (*fibronectin binding proteins A and B*), CNA (*collagen adhesin*) et SpA (*staphylococcal protein A*). La structure de ces protéines est représentée sur la figure 12. La diminution des capacités de *S. aureus* à coloniser la muqueuse nasale en cas de délétion du gène codant la SrtA suggère que toutes les MSCRAMM sont potentiellement impliquées dans la colonisation nasale (Schaffer et al., 2006).

- **Facteurs d'agglutination A et B (ClfA/B)**

*S. aureus* possède plusieurs protéines capables de se lier spécifiquement aux molécules de fibrinogène de l'hôte dont ClfA et ClfB qui font partie des MSCRAMM et sont codées par les gènes *clfA* et *clfB*, respectivement. Ces deux protéines ont d'abord été reconnues comme des facteurs capables d'agglutiner les cellules en présence de plasma humain d'où leur appellation (McDevitt et al., 1997; Ní Eidhin et al., 1998). En plus des caractéristiques structurales communes entre les MSCRAMM, ClfA et ClfB sont caractérisées par une région R localisée entre le domaine de liaison à la paroi et le domaine de liaison au ligand (A) et contenant des répétitions serine-aspartate (SD) les classant au sein d'une sous-famille des MSCRAMM appelée la famille des protéines contenant des répétitions SD (Sdr). Malgré les similitudes structurales et fonctionnelles, les domaines A de ClfA et ClfB sont identiques à seulement 26% (Heilmann, 2011). ClfA se lie exclusivement à la chaîne  $\gamma$  du fibrinogène (McDevitt et al., 1997) alors que, ClfB se lie aux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du fibrinogène (Ní Eidhin et al., 1998). Vu sa capacité à se lier au fibrinogène, ClfA est considéré comme un des facteurs d'adhésion pouvant participer à la colonisation nasale de *S. aureus*. Cependant, son expression post-exponentielle au cours de la colonisation nasale persistante est relativement faible (Burian et al., 2010a).

En revanche, ClfB est considéré comme un facteur d'adhésion majeur nécessaire à la colonisation nasale persistante de *S. aureus*, exprimé de façon tardive (Burian et al., 2010b; Schaffer et al., 2006; Wertheim et al., 2008). En plus de sa capacité à se lier au fibrinogène, plusieurs études ont montré que ClfB peut se lier également aux CK8, CK10 et à la loricrine qui sont des composants importants des cellules épithéliales squameuses de la partie antérieure de la muqueuse nasale (Haim et al., 2010; Mulcahy et al., 2012; O'Brien et al., 2002b; Wertheim et al., 2008). Les protéines extracellulaires dermokiné et plakophiline qui sont présentes à la surface des cellules épithéliales de la peau sont des ligands potentiels de ClfB qui participent à l'attachement de *S. aureus* à l'épithélium de l'hôte (Ganesh et al., 2011).

- **Autres protéines de la famille des Sdr**

En plus des ClfA et ClfB, les autres MSCRAMM membres de la famille des Sdr sont SdrC, SdrD, SdrE, Pls (« *plasmin sensitive* ») SasG (« *Staphylococcus aureus* surface protein G ») et Bbp (« *bone sialoprotein-binding protein* ») (Clarke and Foster, 2006). Au niveau structural et par rapport aux ClfA/B, les autres protéines de la famille des Sdr ont au moins deux domaines B supplémentaires et consécutifs entre le domaine A et le domaine contenant des répétitions SD (Heilmann, 2011). Sdr C et SdrD semblent jouer un rôle dans l'adhésion de *S. aureus* aux cellules épithéliales humaines (Corrigan et al., 2009). Des études *in vitro* ont montré que SdrC et SdrD interagissent spécifiquement avec la  $\beta$ -neurexine et la desmogléine 1, respectivement (Askarian et al., 2016; Barbu et al., 2010).

SdrE n'est pas considéré comme un facteur d'adhésion aux cellules épithéliales mais plutôt comme un facteur d'agrégation des plaquettes, une fonction que partagent aussi ClfA et ClfB (O'Brien et al., 2002a). Cependant, la forte prévalence de son gène *sdrE* (90%) chez les souches issues d'une grande cohorte de porteurs nasaux de différents pays plaide en faveur de la participation de SdrE à la colonisation nasale par *S. aureus* (Sabat et al., 2006). Pls et son homologue SasG participent également à la colonisation de l'épithélium nasal *in vitro* (Roche et al., 2003). Pls semble favoriser l'adhésion de *S. aureus* aux cellules épithéliales en se liant aux lipides et glycolipides cellulaires (Huesca et al., 2002). Le ligand cellulaire de SasG est toujours inconnu.

Bbp est une protéine de surface de *S. aureus* impliquée principalement dans l'attachement de *S. aureus* aux cellules osseuses et dans la pathogenèse des ostéomyélites (Tung et al., 2000). Son rôle dans la colonisation nasale est hypothétiquement basé sur sa capacité, comme les autres protéines Sdr, à fixer le fibrinogène.

- **Protéines de liaison à la fibronectine A et B (FnBPA/B)**

Parmi les MSCRAMM les plus connues et les mieux étudiés, FnBPA et FnBPB sont deux protéines produites par *S. aureus* de structures très proches, capables de se lier de façon covalente à la fibronectine de l'hôte, codées par les gènes *fnbA* et *fnbB*, respectivement (Jönsson et al., 1991). Les FnBP sont des adhésines multifonctionnelles capables de se lier non seulement à la fibronectine mais aussi au fibrinogène, au plasminogène et à l'élastine et participent à l'adhésion, l'internalisation, l'activation des plaquettes et la formation de biofilm (Foster, 2016). Leur rôle est critique dans l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules phagocytaires non professionnelles (Josse et al., 2017). L'adhésion aux cellules épithéliales étant une étape obligatoire avant l'internalisation, les FnBP sont alors considérées également comme des facteurs d'adhésion qui peuvent influencer la colonisation.

Une étude a analysé l'expression des FnBP sur une importante collection d'isolats cliniques de *S. aureus* et a montré que la quasi-totalité des souches expriment au moins une des deux FnBP, et que 76% d'entre elles expriment les deux FnBP à la fois (Peacock et al., 2000). Cependant, la capacité à fixer la fibronectine reste inchangée indépendamment de l'expression d'une ou deux FnBP (Peacock et al., 2000). Dans cette étude, 100% des isolats issus de porteurs nasaux exprimaient des FnBP avec une forte capacité à fixer la fibronectine, suggérant que ces adhésines sont importantes pour la colonisation nasale. Une autre étude a montré que les gènes *fnbA* et *fnbB* sont retrouvés chez respectivement 100% et 37% des souches issus des porteurs investigués (Nashev et al., 2004). Le gène *fnbA* fait partie des gènes codant des adhésines les plus transcrites par *S. aureus* au cours de la colonisation nasale chez tous les porteurs investigués (Burian et al., 2010a).

Structuralement, la partie extracellulaire des FnBP comprend le domaine de liaison au ligand A (composé de trois régions N1, N2, et N3) et une région de répétitions en tandem (FnBR). Le domaine A présente une similarité en acides aminés de 40% entre FnBPA et FnBPB (Heilmann, 2011). Malgré ces différences, les deux FnBP sont capables de lier la chaîne  $\gamma$  du fibrinogène (comme ClfA) grâce aux régions N2 et N3 (Pietrocola et al., 2016; Wann et al., 2000). Le domaine A permet également la liaison au plasminogène et à l'élastine (Keane et al., 2007; Pietrocola et al., 2016). La liaison à la fibronectine est quant à elle assurée par la région FnBR selon un mécanisme dit en « fermeture éclair » (« *tandem  $\beta$ -zipper* ») (Schwarz-Linek et al., 2003). La région FnBR de FnBPA et FnBPB contient 11 et 10 répétitions, respectivement. La perte de la répétition 2 de la région FnBR de FnBPB est due probablement à une recombinaison homologue entre les répétitions 1 et 3. Une molécule FnBP peut fixer, avec une très haute affinité, jusqu'à neuf molécules de fibronectine grâce au repliement de type feuillet  $\beta$  d'une répétition de FnBR avec les cinq premières répétitions de type F1 au niveau N-terminal d'une molécule de fibronectine (Bingham et al., 2008).

- **Déterminants de surface régulés par le fer (Isd)**

Les Isd (*iron-regulated surface determinant*) font partie d'une sous-famille de MSCRAMM appelée « NEAT family » qui doit son nom à la présence d'un ou plusieurs motifs NEAT (*near iron transporters*) capables de transporter le fer environnant. Le rôle principal de ces protéines est de permettre la croissance de *S. aureus* dans les conditions faibles en fer en captant l'hème grâce aux motifs NEAT et de le transporter jusqu'au cytoplasme où les hémoxygénases se chargent de libérer les ions de fer (Hammer and Skaar, 2011).

Il existe neuf protéines Isd codées par des gènes différents présents dans le génome de toutes les souches de *S. aureus*. Parmi ces protéines, IsdA possède un grand spectre d'activité lui permettant de lier différents ligands. En plus de son rôle dans l'acquisition du fer, Isd peut lier différents composants de la matrice extracellulaire des cellules épithéliales squameuses y compris le fibrinogène, la fibronectine, l'involucrine, la loritrine et CK10 (Clarke et al., 2004, 2009). Des études *in vivo* sur des modèles murins ont montré qu'une souche déficiente en *isdA* possède des capacités réduites à coloniser la muqueuse nasale et que la vaccination avec cet antigène a permis de réduire la

colonisation (Clarke et al., 2006; Schaffer et al., 2006). IsdA contribue également à l'adhésion *in vitro* de *S. aureus* aux cellules épithéliales nasales humaines issues de volontaires sains (Corrigan et al., 2009). En plus de ses capacités adhésives, IsdA participe à la colonisation grâce à sa charge négative qui réduit la sensibilité de *S. aureus* aux lipides bactéricides, aux peptides cationiques antimicrobiens et aux protéases bactéricides (Clarke and Foster, 2008; Clarke et al., 2007). L'expression du gène *isdA* au cours de la colonisation nasale chez l'homme plaide en faveur de l'importance de cette adhésine dans la colonisation à *S. aureus* (Burian et al., 2010b).

- **Protéine de liaison au collagène (CNA)**

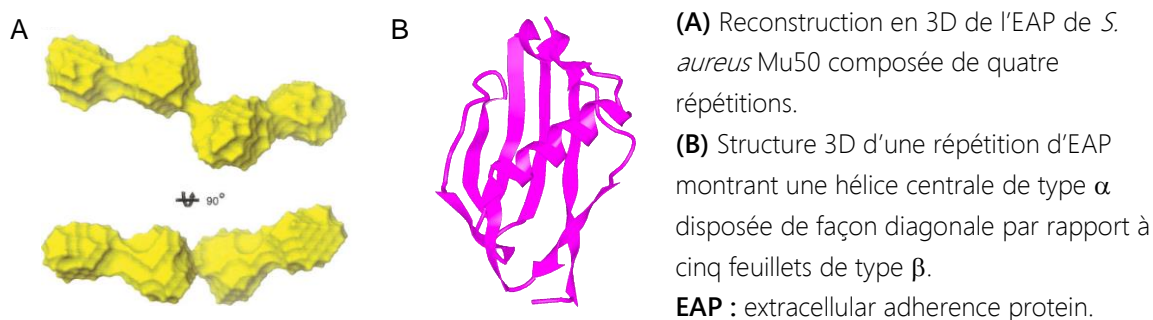
CNA est une MSCRAMM capable de lier le collagène grâce à son domaine A composé de trois régions N1, N2 et N3. Le domaine A est lié au domaine d'ancrage par un nombre variable de répétitions B. La liaison au collagène se fait selon un mécanisme appelé « collagen hug » au cours duquel les régions N1 et N2 enlacent et attachent la molécule de collagène (Zong et al., 2005). La fonction exacte des répétitions B est inconnue mais cette région permet d'allonger la protéine CNA pour mieux atteindre son ligand (Speziale et al., 2009b). Très peu d'études ont investigué l'implication de CNA dans la colonisation nasale par *S. aureus*. Le gène *cna* codant cette protéine a été retrouvé chez environ la moitié des souches issues de porteurs nasaux sains ou des prothèses orthopédiques et chez presque la totalité des souches de patients atteints d'infections osseuses (Arciola et al., 2005; Nashev et al., 2004; Switalski et al., 1993).

- **Autres MSCRAMM**

*S. aureus* exprime au moins 22 MSCRAMM différentes. Bien que le rôle de certaines d'entre elles comme les FnBPA/B, ClfA/B, Sdr, Isd et CNA soient plus ou moins bien étudié, peu de données existent pour les autres, notamment en ce qui concerne leur participation dans la colonisation nasale. La diminution des capacités de *S. aureus* à coloniser en cas de délétion du gène *srtA* codant la sortase A suggère que d'autres MSCRAMM pourraient être impliquées dans les capacités de *S. aureus* à coloniser les muqueuses (Schaffer et al., 2006).

## 5.2.1.1.2. Rôle des SERAM dans l'adhésion

*S. aureus* secrète plusieurs protéines qui ont la capacité d'adhérer à la paroi bactérienne appelées SERAM. Parmi ces protéines, on peut citer EAP (*extracellular adherence protein*) de taille comprise entre 45 et 75 kDa (appelée aussi MAP « *MHC class II analogous protein* » ou P70) et EMP (*extracellular matrix and plasma binding protein*) d'une taille de 40 kDa. EAP et EMP peuvent lier plusieurs protéines de la matrice extracellulaire comme le fibrinogène, la fibronectine et la vitronectine (Chavakis et al., 2005). EAP est une protéine multifonctionnelle exprimée chez *S. aureus* de façon ubiquitaire. En plus de son rôle dans l'adhésion, elle semble jouer un rôle dans la formation de biofilm, l'internalisation, l'immuno-évasion et la pathogénèse (Chavakis et al., 2002; Hagggar et al., 2003; Hussain et al., 2002; Lee et al., 2002; Palma et al., 1999; Xie et al., 2006). EAP a la capacité unique de former des réactions protéine-protéine avec une douzaine de ligands différents, y compris des protéines de la matrice extracellulaire et des récepteurs cellulaires comme ICAM-1 (*Intracellular adhesion molecule 1*) (Chavakis et al., 2002). Structuralement, EAP est constitué de 4 à 6 répétitions d'une centaine d'acides aminés liées entre elles par des jonctions d'une dizaine d'acides aminés (Geisbrecht et al., 2005). La figure 13 propose une représentation tridimensionnelle de l'EAP. Il a été montré *in vitro* que les souches  $\Delta eap$  et  $\Delta emp$  ont des capacités réduites de colonisation des cellules épithéliales et de liaison au fibrinogène et à la fibronectine (Bur et al., 2013; Chavakis et al., 2005; Hagggar et al., 2003). Chez l'Homme, le gène *eap* fait partie des gènes codant les protéines adhésives les plus exprimées durant la colonisation nasale (Burian et al., 2010a). Cependant son niveau d'expression est plus faible que celui de *clfB*, *fnbA* et *isdA*, suggérant ainsi qu'EAP participe plus accessoirement à la colonisation nasale chez les porteurs sains.



**Figure 13. Structure tridimensionnelle de l'EAP.**

Figure adaptée de Geisbrecht et al., 2005 et Hammel et al., 2007.

#### 5.2.1.1.3. Rôles des autres adhésines non liées à la paroi de façon covalente

Une autre classe d'adhésines staphylococciques est représentée par les autolysines (comme Atl et Aaa) qui sont associées à la surface bactérienne par des interactions ioniques ou hydrophobes et possèdent à la fois des activités enzymatiques de type peptidoglycane hydrolytique et des propriétés adhésives (Biswas et al., 2006). D'une façon générale les autolysines jouent des rôles importants dans la division cellulaire et la lyse de la bactérie. Des études *in vitro* ont montré que Atl et Aaa peuvent se fixer à certains composants de la matrice extracellulaire comme le fibrinogène, la fibronectine et la vitronectine (Hirschhausen et al., 2010, 2012). Atl semble également jouer un rôle dans l'adhésion et l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules endothéliales (Hirschhausen et al., 2010). D'autres protéines sont ancrées à la surface de *S. aureus* de façon non covalente grâce à leur domaine transmembranaire C-terminal chargé positivement. Par exemple, Ehb (extracellular matrix-binding protein homologue) est une protéine géante d'environ 1100 kDa codée par le plus long gène du génome de *S. aureus* (Clarke and Foster, 2006). Ehb est capable de fixer spécifiquement la fibronectine grâce à un site différent de celui des FnBP. Cette protéine semble jouer un rôle dans la colonisation face aux changements physiologiques en cas d'hyperosmolarité.

#### 5.2.1.1.4. Rôle des adhésines non protéiques

*S. aureus* exprime des adhésines non protéiques qui sont attachées à sa paroi de façon covalente au peptidoglycane comme l'acide téichoïque (WTA : wall teichoic acid) ou via un glycolipide comme l'acide lipotéichoïque (LTA : lipoteichoic acid). Le rôle des acides téichoïques dans l'adhésion aux cellules épithéliales nasales humaines a été décrit pour la première fois dans les années 1980. Les auteurs ont montré que le traitement des cellules épithéliales avec WTA ou LTA réduisait significativement l'adhésion de *S. aureus* (Aly et al., 1980). WTA semble avoir un rôle majeur dans la colonisation nasale à *S. aureus* (Burian et al., 2010a; Weidenmaier et al., 2004, 2008). La délétion de *tagO*, un gène impliqué dans la synthèse de WTA chez *S. aureus*, réduit significativement sa capacité à adhérer aux cellules primaires humaines épithéliales nasales et respiratoires et abolit sa capacité à coloniser les narines du modèle murin utilisé (Weidenmaier et al.,

2004). WTA est impliqué également dans l'adhésion aux cellules endothéliales (Weidenmaier et al., 2005). Les gènes *tagO* et *tagK*, impliqués dans la synthèse de WTA, font partie des gènes les plus exprimés par *S. aureus* in vivo chez les porteurs nasaux (Burian et al., 2010a). Ces gènes sont également exprimés dès la phase initiale (24 heures) d'établissement de la colonisation nasale chez le rat *S. hispidus* (Burian et al., 2010b). Contrairement aux adhésines protéiques, WTA ne fixe pas les composants de la matrice extracellulaire comme la kératine et la fibronectine mais semble reconnaître un récepteur cellulaire de type « scavenger » (Weidenmaier et al., 2008). Le récepteur scavenger de type F (SREC-I) exprimé par les cellules épithéliales humaines nasales a été identifié récemment comme principal ligand de WTA (Baur et al., 2014). Le rôle de LTA dans la colonisation nasale à *S. aureus* est encore mal connu.

#### 5.2.1.2. Internalisation dans les cellules non professionnelles

Longtemps considéré comme bactérie exclusivement extracellulaire, plusieurs études ont montré que *S. aureus* est capable de s'internaliser dans différents types de cellules phagocytaires non professionnelles comme les cellules épithéliales et endothéliales, les fibroblastes et les ostéoblastes (Tableau 4). L'internalisation dans les cellules non professionnelles permet à *S. aureus* d'échapper au système immunitaire et aux antibiotiques (la plupart d'entre eux n'ayant pas une bonne diffusion intracellulaire) et de survivre à l'intérieur de ces cellules (Alva-Murillo et al., 2014; Fraunholz and Sinha, 2012; Rigai et al., 2018).

La première étape avant l'internalisation est l'adhésion de la bactérie à la membrane cellulaire grâce à des adhésines qui reconnaissent des récepteurs cellulaires différents capables de déclencher un réarrangement du cytosquelette d'actine et faire entrer la bactérie à l'intérieur de la cellule. Une fois internalisé, des interactions hôte-pathogène complexes définissent le sort de *S. aureus* qui peut adopter des stratégies de survie à l'état quiescent sous forme de « *small colony variant* » (SCV) ou en état répliatif qui finit par tuer la cellule hôte, les nouvelles bactéries pouvant alors s'internaliser dans les cellules environnantes. Les cellules hôtes peuvent également déclencher des stratégies de défense innée et dégrader les bactéries grâce aux peptides antimicrobiens ou par des mécanismes d'autophagie ou d'apoptose (Garzoni and Kelley, 2009; Horn et al., 2017).



Bien que l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules non professionnelles in vitro ne laisse plus aucun doute, l'existence de bactéries intracellulaires chez l'Homme, son importance dans la colonisation nasale in vivo et son implication clinique dans la survenue des infections staphylococciques restent très peu étudiées vues les complexités techniques et éthiques des expériences nécessaires pour ce type d'investigation. Quelques études récentes ont montré l'existence de formes intracellulaires de *S. aureus* dans les cellules épithéliales issues de biopsies cutanées, de prélèvements chez des patients atteints de rhinosinusite ou d'amygdalite chroniques ou encore chez des porteurs sains (Clement et al., 2005; Kisich et al., 2007; Plouin-Gaudon et al., 2006; Rigaille et al., 2018; Zautner et al., 2010). Différents mécanismes d'internalisation de *S. aureus* dans les cellules non professionnelles ont été proposés avec plus ou moins de détails moléculaires (Tableau 4). L'une des premières voies d'internalisation, et vraisemblablement la plus importante, est celle mettant en œuvre les protéines FnBPA/B et l'intégrine cellulaire  $\alpha 5\beta 1$  (Sinha et al., 1999). Cependant les délétion des gènes *fnbA* et *fnbp* ou du gène *srtA* n'abolissent pas complètement l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules épithéliales, suggérant ainsi que des mécanismes alternatifs mettant en œuvre d'autres adhésines staphylococciques participent également au phénomène d'internalisation (Hagggar et al., 2003; Mempel et al., 2002).

**Tableau 4. Différents mécanismes d'internalisation de *S. aureus* par les cellules phagocytaires non professionnelles**

Adhésine bactérienne	Ligand intermédiaire	Récepteur cellulaire	Type cellulaire	Lignée cellulaire	Référence
FnBPA/B	Fibronectin	Intégrine $\alpha 5\beta 1$	Endothéliales <sup>H</sup>	HUVEC	(Massey et al., 2001)
				EA.hy926	(Edwards et al., 2010)
			Épithéliales <sup>B</sup>	MAC-T	(Dziewanowska et al., 1999)
			Épithéliales <sup>H</sup>	HCEC	(Jett and Gilmore, 2002)
				A549	(Wang et al., 2013)
			Épithéliales <sup>M</sup>	GD25beta1A	(Fowler et al., 2000)
			Fibroblastes <sup>H</sup>	293T	(Sinha et al., 1999)
			Kératinocytes <sup>H</sup>	HaCaT	(Mempel et al., 2002)
				UP	(Kintarak et al., 2004)
				NHK <sup>P</sup>	
	Mastocytes <sup>H</sup>	HMC-1	(Abel et al., 2011)		
	Ostéoblastes <sup>H</sup>	MG63	(Ahmed et al., 2001)		
FnBPA/B	Non	Hsp60	Épithéliales <sup>B</sup>	MAC-T	(Dziewanowska et al., 2000)
			Épithéliales <sup>H</sup>	HEp-2	
				CaCo-2	

- Suite du tableau 4 -

Adhésine bactérienne	Ligand intermédiaire	Récepteur cellulaire	Type cellulaire	Lignée cellulaire	Référence
EAP	Inconnu	Inconnu	Fibroblastes <sup>H</sup> Kératinocytes <sup>H</sup>	HEL HaCaT NHEK	(Hagggar et al., 2003) (Bur et al., 2013; Hagggar et al., 2003) (Bur et al., 2013)
Atl	Non Fibronectine*	Hsc70 Intégrine $\alpha 5\beta 1$ *	Endothéliales <sup>H</sup>	EA.hy926	(Hirschhausen et al., 2010)
IsdB	Inconnu	Intégrine $\alpha 5\beta 1$ *	Fibroblastes <sup>H</sup> Épithéliales <sup>H</sup>	293T HeLa	(Zapotoczna et al., 2013)
Tet38*	Non	CD36 TLR2/6*	Épithéliales <sup>H</sup>	A549 HMEC-1	(Truong-Bolduc et al., 2015, 2017a)
GapC	Inconnu	Inconnu	Épithéliales <sup>B</sup>	MAC-T	(Kerro-Dego et al., 2012)

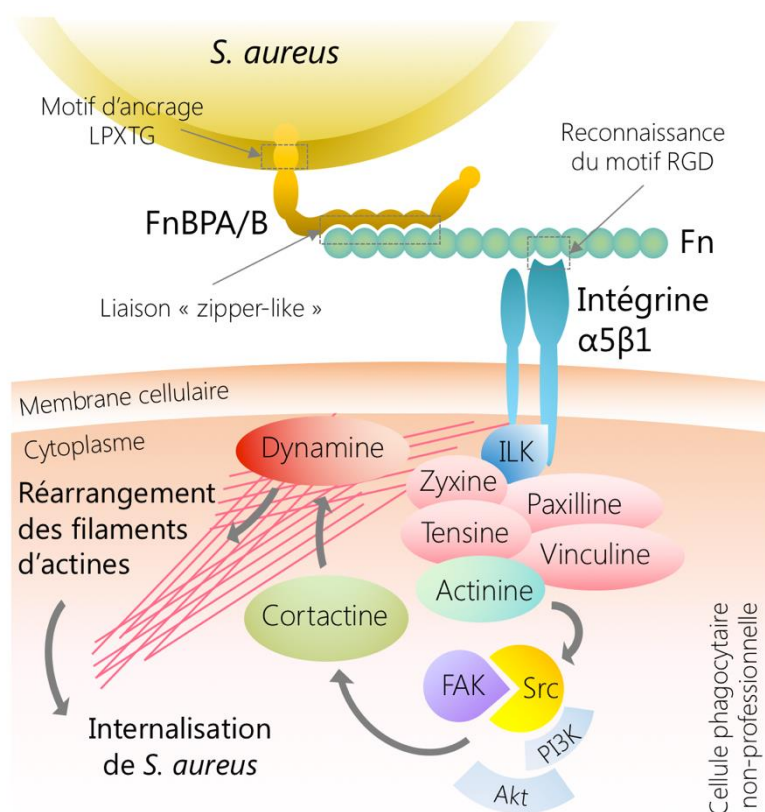
<sup>B</sup> cellules d'origine bovine ; <sup>H</sup> cellules d'origine humaines ; <sup>M</sup> cellules d'origine murine ; <sup>P</sup> cellules primaires ;  
\* mécanisme mal connu ou hypothétique.

- **Rôle des FnBPA/B dans l'internalisation de *S. aureus***

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires ubiquitaires chez tous les mammifères. Elles sont constituées de deux sous-unités glycoprotéiques  $\alpha$  et  $\beta$  associées de façon non covalente. Chez l'Homme, il existe au moins 18 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$ . De façon générale, les intégrines possèdent un domaine extracellulaire qui reconnaît des motifs RGD ou LVD de plusieurs ligands cellulaires comme la fibronectine, le fibrinogène, la vitronectine et la laminine (Kumar, 1998). Ces récepteurs sont impliqués dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques comme l'adhésion cellulaire, la migration, la différenciation, l'apoptose, la phagocytose, la cicatrisation et le cancer (Takada et al., 2007). De plus, certaines intégrines participent à la reconnaissance, la défense ou l'endocytose de certains pathogènes bactérien comme c'est le cas pour l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et *S. aureus* (Sinha et al., 1999). En effet, les FnBPA/B de *S. aureus* peuvent lier de façon spécifique la fibronectine qui agit à son tour comme pont en se liant à l'intégrine  $\beta 1$  via son motif RGD. Ce mode de liaison entre *S. aureus* et la cellule hôte est connu sous le nom de « zipper-like » (fermeture éclair) et déclenche toute une cascade de signalisations intracellulaires qui aboutit au réarrangement du cytosquelette d'actine et à l'internalisation de la bactérie au sein de la cellule (Foster, 2016). Le mécanisme de l'internalisation de *S. aureus* via FnBPA/B et  $\alpha 5\beta 1$  est schématisé dans la figure 14. Les différents détails actuellement connus sur le mécanisme « zipper-like » de l'internalisation de *S. aureus* par les cellules non

professionnelles ont été mis en évidence principalement grâce à aux expériences suivantes : (i) La délétion des gènes codant les protéines FnBPA/B de souches invasives réduit significativement l'internalisation, (ii) la supplémentation de ces gènes dans les souches non invasives leur confère la capacité à s'internaliser, (iii) l'ajout des peptides recombinants solubles du domaine de liaison de FnBP à la fibronectine (D1-D4) ou de liaison de la fibronectine à l'intégrine  $\beta 1$  (RGD), ou le blocage de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  ou de la fibronectine par des anticorps bloquants inhibent l'internalisation, (iv) le traitement des cellules par la cytochalasine D paralyse le cytosquelette d'actine et empêche l'internalisation, (v) le traitement des cellules avec des inhibiteurs chimiques spécifiques de certaines tyrosines kinases inhibe aussi l'internalisation, (vi) *S. aureus* a des difficultés à s'internaliser in vitro dans les cellules épithéliales dont l'expression de  $\beta 1$  a été préalablement inhibée par des ARN interférents ou in vivo dans les cellules de souris KO (*knock-out*) pour  $\beta 1$ , et finalement (vii) l'étude in silico des interactions allostériques et des forces atomiques entre FnBPA/B, la fibronectine et l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  permet de mieux comprendre les relations entre ces facteurs (Dziewanowska et al., 1999; Fowler et al., 2000; Hauck and Ohlsen, 2006; Kintarak et al., 2004; Liang et al., 2016; Mempel et al., 2002; Prystopiuk et al., 2018; Sinha et al., 1999; Wang et al., 2013).

La voie FnBP-fibronectine- $\alpha 5\beta 1$  est considérée comme la voie majeure de l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules phagocytaires non professionnelles. Cependant FnBP peut également induire l'internalisation de *S. aureus* via un autre récepteur cellulaire appelé Hsp60 (*heat shock protein 60*) (Dziewanowska et al., 2000). D'une façon générale, Hsp sont des protéines membranaires chaperonnes archaïques hautement conservées chez la plupart des cellules eucaryotes et procaryotes qui jouent un rôle important dans la réponse au stress mécanique ou thermique, le transport intracellulaire des protéines, la présentation des antigènes et l'activation des cellules immunitaires (Tsan and Gao, 2009). Le blocage de Hsp60 par un anticorps neutralisant réduit significativement l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules épithéliales (Dziewanowska et al., 2000). Jusqu'à présent, le mécanisme impliqué dans cette voie reste inconnu et on ne sait pas si Hsp60 agit comme un co-récepteur de FnBP pour favoriser l'internalisation via l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  ou s'il est capable à lui seul de déclencher une signalisation intracellulaire permettant l'internalisation de *S. aureus*.



**Figure 14. Détails moléculaires de la voie majeure d'internalisation de *S. aureus* dans les cellules phagocytaires non professionnelles.**

FNBPA/B : *fibronectin binding protein A/B* ; Fn : *fibronectine* ; ILK : *integrin-linked kinase* ;

FAK : *focal adhesion kinase* ; Src : *steroid receptor coactivator* ;

PI3K : *phosphoinositide 3 kinase* ; Akt : *protéine kinase Akt*.

Figure adaptée de Alva-Murillo et al., 2014, Josse et al., 2017 et Wright and Nair, 2010.

- **Rôle d'EAP dans l'internalisation de *S. aureus***

EAP est une SERAM multifonctionnelle de *S. aureus*. En plus de son rôle dans l'adhésion à la matrice extracellulaire, la formation de biofilm et l'inhibition du recrutement des lymphocytes, EAP semble jouer un rôle secondaire important dans l'internalisation de *S. aureus* par les cellules phagocytaires non professionnelles. Différentes souches  $\Delta eap$  avaient montré des capacités d'adhésion et d'internalisation réduites par rapport aux souches parentales dans les cellules humaines épithéliales primaires (HNEC) ou immortelles (HaCaT) et les fibroblastes embryonnaires pulmonaires (HEL) (Bur et al., 2013; Haggart et al., 2003).

De plus, le traitement préalable des cellules par EAP augmente non seulement l'internalisation des souches de *S. aureus* mais aussi celle de SCN ainsi que celle d'*E. coli* (Bur et al., 2013; Hagggar et al., 2003). La pré-incubation de la souche de laboratoire Newman ainsi que d'autres isolats cliniques exprimant EAP avec un anticorps anti-EAP réduit significativement l'internalisation de ces souches (Hagggar et al., 2003). D'autre part, l'internalisation de *S. aureus* par le biais d'EAP dans les cellules HaCaT est inhibée par la cytochalasine D, ce qui suggère que le récepteur cellulaire d'EAP est capable de déclencher une signalisation cellulaire aboutissant au réarrangement du cytosquelette d'actine, comme c'est le cas pour l'internalisation via FnBPA/B et l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Cependant, aucune autre étude n'a été publiée sur ce mécanisme d'internalisation de *S. aureus* et le récepteur cellulaire d'EAP reste inconnu (Josse et al., 2017).

- **Rôle des autres adhésines dans l'internalisation de *S. aureus***

D'autres molécules exprimées à la surface de *S. aureus* comme Atl, IsdB et Tet38 semblent jouer un rôle mineur dans l'internalisation de cette bactérie par les cellules phagocytaires non professionnelles. Atl est une autolysine décrite précédemment comme un des facteurs d'adhésion de *S. aureus* aux cellules épithéliales. Cette hydrolase semble également jouer un rôle dans l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules non professionnelles en agissant directement (sans intermédiaire comme la fibronectine) avec une autre Hsp appelée Hsc70 (*heat shock cognate 70*)(Hirschhausen et al., 2010). Hsc70 est connu comme récepteur d'entrée de différents agents pathogènes comme le virus T-lymphotropique humain (HTLV-1) ou la bactérie responsable de la fièvre méditerranéenne (*Brucella abortus*) suggérant ainsi qu'il s'agit d'un récepteur « universel » d'internalisation.

IsdB est l'une des adhésines staphylococcique appartenant à la famille NEAT et joue un rôle dans l'acquisition du fer. Son rôle dans l'internalisation de *S. aureus* a été récemment décrit en utilisant une souche  $\Delta isdB$  sur des modèles in vitro de cellules épithéliales humaines cervicales (HeLa) et rénales (293T) (Zapotoczna et al., 2013). Dans cette étude, la participation d'IsdB dans l'internalisation de *S. aureus* était valable seulement dans les conditions pauvres en fer.

Dans ces conditions expérimentales, IsdB favorise l'internalisation de *S. aureus* dans ces cellules indépendamment des FnBPA/B et de la présence de fibronectine mais nécessite un récepteur cellulaire reconnaissant des motifs RGD (Zapotoczna et al., 2013). Les auteurs supposent alors qu'il s'agirait de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  mais des études supplémentaires sont sans doute nécessaires pour conforter cette hypothèse.

Il a été démontré récemment que Tet38, une pompe d'efflux qui extrude la tétracycline et les acides gras insaturés libres, participe à l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules épithéliales pulmonaires A549 en interagissant avec le récepteur cellulaire CD36, et semble favoriser l'échappement de la bactérie des phagosomes, facilitant ainsi sa réplication et sa persistance (Truong-Bolduc et al., 2015, 2017b). Cependant le mécanisme d'entrée dans la cellule n'est pas clair. CD36 et CD14 sont connus comme co-récepteurs du complexe TLR2/6 (« *toll-like receptors 2/6* ») dans la reconnaissance des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP : « pathogen associated molecular patterns ») comme des diacylglycérides et LTA, pour permettre l'endocytose des bactéries par les macrophages dans le contexte d'une réponse immunitaire innée induisant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Alva-Murillo et al., 2014).

### 5.2.1.3. Évasion du système immunitaire

*S. aureus* exprime différents facteurs qui compromettent les défenses des cellules immunitaires. Il est capable de sécréter des protéines qui (i) inhibent l'activation du complément et la chimiotaxie des neutrophiles, (ii) détruisent les cellules immunitaires, (iii) neutralisent les peptides antimicrobiens ou (iv) modifient la structure de la surface bactérienne pour réduire l'efficacité de la réponse immunitaire (Foster, 2005). Il est également capable de survivre dans les phagosomes, d'exprimer des polysaccharides ou des protéines qui inhibent l'opsonisation par les anticorps ou d'augmenter la résistance de sa paroi au lysozyme. De plus, *S. aureus* exprime différents types de superantigènes qui détournent la réponse immunitaire humorale en provoquant l'anergie ou l'immunosuppression (Goldmann and Medina, 2018; Thammavongsa et al., 2015).

- **Inhibition de l'activation du complément et de la chimiotaxie des neutrophiles**

L'une des réponses immunitaires de l'hôte face à *S. aureus* est la libération de plusieurs molécules chimioattractives pour recruter les neutrophiles. Les fragments de peptides issus de l'activation du complément ainsi que les peptides formylés sécrétés par les bactéries en phase de croissance sont reconnus par les neutrophiles à travers des récepteurs spécifiques. Cette activation induit différentes cascades de signalisation qui permettent aux neutrophiles de migrer jusqu'au site de l'inflammation (Murdoch and Finn, 2000). *S. aureus* sécrète une protéine appelée SCIN (*Staphylococcus complement inhibitor*) qui peut bloquer l'activation du complément en liant et stabilisant certaines protéines du complément (Rooijackers et al., 2005a). La protéine extracellulaire (SERAM) EfB (*extracellular fibrinogen binding protein*) a été décrite récemment comme étant capable de fixer le facteur C3 du complément et bloquer l'activation de ce facteur (Lee et al., 2004a, 2004b). Une autre stratégie de *S. aureus* pour inhiber l'activation du complément est la dégradation du plasminogène de l'hôte en plasmine grâce aux staphylokinases. La fonction sérine protéase de la plasmine néoformée a une activité protéolytique des peptides du complément, permettant ainsi de réduire le recrutement des neutrophiles (Rooijackers et al., 2005b).

L'auréolysine est une métalloprotéase spécifique de *S. aureus* capable de dégrader directement la protéine centrale du complément C3 et d'inhiber efficacement la chimiotaxie (Laarman et al., 2011). De plus, environ 60% des souches de *S. aureus* sécrètent des protéines inhibitrices de la chimiotaxie appelées CHIPS (*chemotaxis inhibitory protein of staphylococci*) pouvant se lier aux récepteurs qui reconnaissent les peptides du complément et les peptides formylés, bloquant ainsi le recrutement des neutrophiles (Haas et al., 2004; de Haas et al., 2004). EAP participe également à l'inhibition du recrutement des neutrophiles en se liant aux récepteurs ICAM-1 des cellules endothéliales, agissant ainsi comme antagoniste de l'antigène LFA-1 exprimé à la surface des neutrophiles (Chavakis et al., 2002). EAP agit alors à côté de CHIPS pour inhiber le recrutement des neutrophiles jusqu'au site de l'inflammation.

- **Inhibition de l'opsonisation et de la phagocytose**

La persistance du portage de *S. aureus* chez certains individus peut être liée à la capacité de ces souches persistantes à exprimer de façon importante des protéines immunomodulatrices. L'analyse de l'exoprotéome de souches de *S. aureus* issues de porteurs persistants a montré que la protéine staphylococcique A (SpA : *staphylococcic protein A*) (membre de la famille des MSCRAMM) était présente de façon significativement plus importante chez les souches de portage que chez les souches non associées au portage (Muthukrishnan et al., 2011).

Une autre étude récente a souligné le rôle de SpA dans la colonisation chez l'Homme. Des souches  $\Delta spA$  isolées de porteurs persistants étaient éliminées plus rapidement du nez des volontaires chez qui les marqueurs pro-inflammatoires étaient surexprimés par rapport aux volontaires inoculés avec les souches persistantes sauvages (Cole et al., 2016). Des études in vitro ont montré que SpA interfère avec TNF $\alpha$  en interagissant avec son récepteur 1 (TNFR1) exprimé à la surface des cellules humaines épithéliales respiratoires, diminuant ainsi la réponse inflammatoire (Giai et al., 2013; Gómez et al., 2004). Cependant, le rôle de ce mécanisme dans la persistance de la colonisation nasale chez l'Homme reste à préciser.

SpA joue également un rôle important dans l'inhibition de l'opsonisation par les anticorps. Plusieurs études ont montré que SpA a une forte affinité pour le fragment constant Fc des immunoglobulines G (IgG) (sauf IgG<sub>3</sub>) et pour le domaine VH3 de la chaîne lourde du fragment variable Fab des IgM, IgA, IgG et IgE sans interférer avec le site de fixation des antigènes (Falugi et al., 2013). La fixation de SpA sur Fc rend impossible les interactions avec le récepteur Fc $\gamma$  des cellules immunitaires de l'hôte et protège ainsi la bactérie de l'opsonisation. ClfA et potentiellement ClfB jouent aussi un rôle dans l'inhibition de la phagocytose grâce à leur capacité à fixer le fibrinogène pour se dissimuler des macrophages (Higgins et al., 2006). *S. aureus* peut également échapper à la phagocytose et à l'opsonisation grâce à la synthèse d'une capsule polysaccharidique qui protège *S. aureus* et empêche la phagocytose par les cellules immunitaires (Nilsson et al., 1997).



- **Lyse des leucocytes**

*S. aureus* secrète différentes toxines cytolytiques qui endommagent les membranes des cellules de l'hôte et peuvent également tuer les leucocytes qui tentent de les phagocyter. L' $\alpha$ -toxine est une toxine monomérique secrétée par plus de 95% des souches de *S. aureus*. Cette toxine appelée aussi  $\alpha$ -hémolysine forme des pores heptamériques dans la membrane des cellules eucaryotes (y compris les leucocytes) en se fixant sur le récepteur ADAM10 (von Hoven et al., 2016). Bien que la prévalence des anticorps neutralisants anti- $\alpha$ -toxine soit élevée dans la population générale, le rôle de cette toxine dans la colonisation est encore inconnu (Bröker et al., 2016). Les leucotoxines sont des oligomères hexa- ou heptamériques composés de deux sous-unités secrétées séparément et qui possèdent une forte affinité pour les leucocytes. Il existe quatre types de leucotoxines :  $\gamma$ -toxine (ou  $\gamma$ -hémolysine), LPV, leucocidine E/D et leucocidine M/F. LPV est codée par un bactériophage présent uniquement chez moins de 2% des souches de *S. aureus* alors que les autres leucotoxines sont codées par des gènes du génome core et sont secrétées par environ 90% des souches (Foster, 2005). Le rôle des leucotoxines dans l'aggravation des infections aiguës à *S. aureus* est bien connu ; cependant leur rôle dans la colonisation est encore hypothétique.

- **Résistance aux peptides antimicrobiens et au lysozyme**

Quand les cellules immunitaires de l'hôte arrivent à éviter les différents pièges de *S. aureus* qui empêche sa phagocytose, ce dernier est capable de résister aux mécanismes cellulaires de mise à mort. Cela est en partie dû à des modifications de la composition de certaines molécules de la membrane phospholipidique et de la paroi comme WTA et LTA. Ces modifications sont principalement effectuées par les protéines Dlt et MprF qui modifient les charges négatives des protéines de surface et réduisent alors la sensibilité de ces derniers aux peptides cationiques antimicrobiens produits par les neutrophiles (Peschel et al., 1999, 2001; Staubitz et al., 2004). Les souches mutantes de *S. aureus* déficientes en Dlt et MprF sont moins virulentes et éliminées plus facilement par les neutrophiles sur des modèles murins (Collins et al., 2002; Kristian et al., 2003). Aucune étude n'a encore investigué le rôle de ces protéines dans la colonisation chez l'Homme. En plus des changements des charges de ces protéines de surface, *S. aureus* secrète des enzymes capables de dégrader les défensines humaines, comme la staphylokinase et

l'auréolysine (Bokarewa and Tarkowski, 2004; Sieprawska-Lupa et al., 2004). Le lysozyme est une protéine bactéricide sécrétée par les cellules hôtes lors de la réponse innée contre les agents bactériens, notamment en présence de cytokines pro-inflammatoires. Il s'agit d'une muramidase qui clive les liaisons glycosidiques des peptidoglycane des parois bactériennes provoquant la lyse de ces pathogènes (Kraus and Peschel, 2008). *S. aureus* produit une O-acétyltransférase qui modifie le groupement hydroxyle C6 de l'acide muramique de la paroi bactérienne qui n'est autre que le site d'activité du lysozyme (Bera et al., 2005). Ainsi, *S. aureus* échappe efficacement à la dégradation par le lysozyme. D'une façon générale, *S. aureus* possède une pléthore de facteurs de virulence qui agissent ensemble pour assurer sa survie face aux cellules de l'immunité en manipulant les différents mécanismes de l'immunité innée et adaptative ou en leur échappant. La colonisation asymptomatique représente un pacte de paix entre l'hôte et le pathogène au cours duquel le système immunitaire de l'hôte ne parvient pas à éliminer la bactérie de façon définitive tandis que la bactérie module sa réplication pour rester discrète. Le rôle des facteurs bactériens d'immuno-évasion dans la persistance de la colonisation reste cependant difficile à évaluer.

#### 5.2.1.4. Formation de biofilm

La formation de biofilm est un mécanisme de protection qui permet aux bactéries de survivre dans un environnement hostile en établissant une structure complexe composée de plusieurs couches de bactéries en amas protégées par un réseau protéique et polysaccharidique inclus dans une matrice extracellulaire de l'hôte ou sur des surfaces inertes. Certains auteurs estiment que le biofilm pourrait jouer un rôle dans la persistance de la colonisation par *S. aureus* au niveau de la muqueuse nasale (Iwase et al., 2010; Quinn et al., 2009; Sonesson et al., 2017). Cependant, les observations microscopiques de prélèvements de muqueuse nasale chez des porteurs sains montre que *S. aureus* adopte plutôt un mode de vie solitaire ou dispersé au niveau du *vestibulum nasi* mal adapté au mode de croissance communautaire qui définit la formation de biofilm, même s'il a été retrouvé associé au mucus, à des débris et à d'autres composants de la matrice extracellulaire (Krismer and Peschel, 2011). La visualisation de *S. aureus* au niveau de la cavité nasale chez des modèles murins a révélé la présence de bactéries isolées ou en petits amas (Burian et al., 2010b).

L'absence de coloration spécifique des protéines ou des polysaccharides de la matrice du biofilm ne permet pas de conclure à l'existence d'un biofilm au cours de la colonisation chez les sujets sains. Chez les patients atteints de rhinosinusite chronique, la formation de biofilm par *S. aureus* a été détectée in vivo chez la plupart des patients par hybridation in situ ou de façon indirecte par détection du polysaccharide poly-N-acétylglucosamine, un composant majeur du réseau de biofilm chez *S. aureus* (Foreman et al., 2013). Les biofilms contenant *S. aureus* ont été détectés également sur des prélèvements nasopharyngés issus d'enfants atteints d'otite chronique ou récurrente ou de patients présentant des signes cliniques d'infection par *S. aureus* (Kania et al., 2008; Swidsinski et al., 2007). D'autres études ont montré la présence de biofilm polymicrobien incluant *S. aureus* et d'autres espèces bactériennes seulement chez les patients atteints de rhinosinusite chronique mais pas chez les sujets sains du groupe contrôle (Psaltis et al., 2007; Sanclement et al., 2005; Sanderson et al., 2006). Une étude récente a identifié une protéase appelée staphopaine qui serait impliquée dans la formation de biofilm de *S. aureus* au cours de la colonisation de la peau chez les patients présentant des signes de dermatite atopique (Sonesson et al., 2017). A l'heure actuelle, il semble que le biofilm soit un mode de croissance plutôt associé à la dissémination et au développement des infections à *S. aureus* qu'à la colonisation asymptomatique. D'autres études plus approfondies sont encore nécessaires pour investiguer le rôle physiopathologique du biofilm au cours de la colonisation.

#### 5.2.1.5. Systèmes de régulation

*S. aureus* possède un système de régulation complexe gouverné par différents gènes qui contrôlent ses capacités d'adhésion, d'immuno-évasion et de toxicité (Figure 10) (Priest et al., 2012). Les principaux gènes régulateurs sont *agr* (*accessory gene regulator*), *sae* (*Staphylococcus aureus exoprotein sensor*) et *sigB* (*sigma factor B*). Ils contrôlent l'expression de plusieurs facteurs de virulence et d'adhésion. La figure 15 illustre la complexité du réseau des gènes régulateurs chez *S. aureus*.

Figure protégée par des droits d'auteurs.

**Figure 15. Réseau des gènes régulateurs chez *S. aureus*.**

Les interactions entre les différents gènes régulateurs connus et leurs effets sur l'adhésion (A), la toxicité (T) et l'immuno-évasion (E) sont représentées sur ce schéma. Les flèches grises indiquent un effet positif (activation) alors que les barres rouges indiquent un effet négatif (inhibition). Les points d'interrogation signifient que l'effet est inconnu ou que les données disponibles dans la littérature sont contradictoires.

Figure de Priest et al., 2012.

L'étude de l'expression des gènes par des souches isolées de porteurs persistants sains a montré que les gènes régulateurs *agr* et *sae* sont réprimés au cours de la colonisation nasale contrairement aux gènes *tagO*, *tarK*, *atIA*, *sceD* et *oatA* codant différentes enzymes impliquées dans la synthèse des protéines de la paroi et d'autres gènes codant des facteurs d'adhésion (Burian et al., 2010a). Ces observations sont en faveur d'une adaptation des systèmes de régulation permettant la réplication active et la synthèse des facteurs d'adhésion nécessaires à la colonisation persistante dans la cavité nasale et une répression des facteurs de virulence associés aux infections aiguës. Les gènes régulateurs *agr* et *sae* sont exprimés de façon précoce au cours de la phase initiale d'infection in vivo dans des modèles murins, ce qui augmente l'expression des facteurs de virulence et réprime l'expression des facteurs d'adhésion.

Cela suggère que ces deux régulateurs pourraient influencer l'établissement de la colonisation (l'invasion) et non sa persistance (Goerke et al., 2005; Wright et al., 2005). Le système de régulation *sigB* est fortement transcrit en situation intracellulaire *in vitro* et contrôle négativement les systèmes *agr* et *sae*, ce qui permettrait l'augmentation de l'expression des facteurs de survie intracellulaire au profit des facteurs de toxicité (Pfortner et al., 2014). Une étude récente a montré que SigB est un facteur essentiel qui permet à *S. aureus* de passer d'un phénotype hautement agressif (associé aux infections aiguës) à un phénotype silencieux de type SCV qui permet une persistance intracellulaire sur le long terme (Tuchscher et al., 2015).

D'une façon générale et malgré le manque d'études *in vivo* chez l'Homme et la complexité des systèmes de régulation, les données actuelles permettent de conclure que *S. aureus* adapte l'expression de ses gènes en fonction de la situation dans laquelle il se trouve soit en favorisant les gènes codant des facteurs de virulence et de toxicité permettant l'invasion de la muqueuse ou l'établissement des infections aiguës, ou en favorisant les gènes codant des facteurs d'adhésion permettant une colonisation persistante.

## 5.2.2. Les déterminants liés à l'hôte

### 5.2.2.1. Les facteurs de risque de la colonisation

Plusieurs facteurs humains semblent liés au risque de colonisation nasale à *S. aureus*, et notamment l'âge, le sexe, les origines ethniques, les habitudes alimentaires, les pratiques quotidiennes et certaines pathologies. Le portage nasal varie en fonction de l'âge. D'une façon générale, la prévalence est plus importante chez les enfants par rapport aux adultes et chez les jeunes adultes par rapport aux séniors (Wertheim et al., 2005). A la naissance, environ 70% des nouveau-nés sont colonisés par *S. aureus*. Cette prévalence diminue durant les deux premières années de la vie passant à 40-50% au cours des huit premières semaines, à 21% à l'âge de 6 mois puis à seulement 11% à l'âge de 14 mois (Lebon et al., 2008; Peacock et al., 2003). La prévalence du portage augmente à nouveau pendant l'adolescence (environ 40%) puis diminue progressivement avec l'âge (Wertheim et al., 2005).

Des études basées sur de grandes populations ont montré que les sujets de sexe masculin ont plus de risque d'être porteurs de *S. aureus* que les sujets de sexe féminin (Graham et al., 2006; Lebon et al., 2008; Olsen et al., 2013; Zanger et al., 2012). Par ailleurs, les sujets d'origine caucasienne et les américains indigènes sont plus fréquemment colonisés que les sujets d'origines ethniques différentes (Cole et al., 2001a; Kuehnert et al., 2006).

L'obésité semble favoriser la colonisation par *S. aureus*, contrairement à la consommation de tabac qui aurait un rôle protecteur (Olsen et al., 2012, 2013). Certaines pathologies sont également associées positivement au portage nasal de *S. aureus* comme le diabète (Tamer et al., 2006), les affections ou infections cutanées (Demos et al., 2012; Williams et al., 1998), l'hémodialyse ou la dialyse péritonéale (Luzar et al., 1990; Yu et al., 1986), la cirrhose (Chapoutot et al., 1999) ou encore l'infection à VIH (Nguyen et al., 2012; Sissolak et al., 2002).

#### 5.2.2.2. Les facteurs génétiques prédisposant à la colonisation

Plusieurs données supportent l'idée que certains individus ne sont jamais ou rarement colonisés par *S. aureus* alors que d'autres sont colonisés de façon fréquente et sur des périodes importantes. Cette distribution de l'état de portage dans la population suggère l'influence de facteurs génétiques qui prédisposeraient ou non à la colonisation. Les premières études sur la colonisation nasale par *S. aureus* ont montré que les jumeaux monozygotes ou encore les membres d'une même famille ont plus de chance d'avoir le même statut de portage (Hoeksma and Winkler, 1963; Noble et al., 1967). De plus, *S. aureus* a une capacité d'adhésion plus importante aux cellules épithéliales nasales issues de porteurs qu'à celles issues de non porteurs (Aly et al., 1977). Ces associations phénotypiques laissent penser que des facteurs génétiques participent à la détermination du statut de portage de *S. aureus*. Il a fallu attendre la démocratisation des techniques moléculaires comme l'étude du polymorphisme nucléotidique simple ou le séquençage génomique de nouvelle génération pour pouvoir identifier certains marqueurs génétiques associés au portage de *S. aureus*.

Durant la dernière décennie, plusieurs études ont proposé des variantes alléliques qui définissent l'expression de facteurs impliqués dans l'adhésion bactérienne, ou de récepteurs cellulaires associés avec la colonisation par *S. aureus* (Sollid et al., 2014). Parmi ces polymorphismes, les gènes codant l'interleukine 4 (IL-4), les  $\beta$ -défensines (peptides antimicrobiens), le récepteur aux glucocorticoïdes, le récepteur TLR2, le récepteur de la vitamine D, la protéine de liaison au mannose et la protéine C réactive ont été décrits comme associés au portage nasal de *S. aureus* (van den Akker et al., 2006; van Belkum et al., 2007; Emonts et al., 2008; Messaritakis et al., 2014; Nurjadi et al., 2013; Ruimy et al., 2010; Vuononvirta et al., 2011).

#### 5.2.2.3. La réponse immunitaire anti-staphylococcique

L'hypothèse selon laquelle les porteurs de *S. aureus* ont une réponse immunitaire défectueuse par rapport aux non porteurs et tolèrent la colonisation est remise en question. Il a été démontré que les sécrétions nasales des porteurs de *S. aureus* contiennent significativement moins de peptides antimicrobiens que celles des non porteurs (Cole et al., 1999). Cette activité antimicrobienne réduite pourrait être liée à une sécrétion d' $\alpha$ - et  $\beta$ -défensines, de cathélicidine ou de RNase 7 chez les porteurs qui ne permettrait pas d'éviter la colonisation à *S. aureus* (Cole et al., 2001b; Hui et al., 2011; Kisich et al., 2007; Nurjadi et al., 2013; Zanger et al., 2009). Toutefois, ce rôle des peptides antimicrobiens est spéculatif et basé sur des observations in vitro ou sur des effectifs très limités de sujets. Pour conforter ces hypothèses, différentes études ont montré que les porteurs persistants de *S. aureus* avaient des taux d'IgG ou d'IgA anti-*S. aureus* plus élevés que les non porteurs (Colque-Navarro et al., 2010; Holtfreter et al., 2006; Kolata et al., 2011; Swierstra et al., 2015; Verkaik et al., 2011). Cependant, la colonisation expérimentale à court terme n'induit pas de réponse humorale systémique chez les volontaires sains (Holtfreter et al., 2009). Le rôle de l'immunité adaptative dans la colonisation par *S. aureus* reste très controversé (Holtfreter et al., 2009; Swierstra et al., 2015).

#### 5.2.3. Les interactions avec le microbiome

Des corrélations négatives entre *S. aureus* et d'autres espèces bactériennes présentes au niveau de la muqueuse nasopharyngée ont été rapportées par de nombreuses études.

*Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus epidermidis* sont les principales bactéries de la flore nasale et pharyngée qui réduiraient la colonisation par *S. aureus* (Bogaert et al., 2004; Frank et al., 2010; Uehara et al., 2000). L'hypothèse initiale stipulait que ces bactéries sont en état de compétition dans l'environnement hostile que constitue la muqueuse nasale de fait de la pauvreté des nutriments. Cependant, cette explication est sans doute très simpliste et les interactions sont probablement plus complexes et spécifiques (figure 16) (Krismer et al., 2017).



Figure protégée par des droits d'auteurs.

**Figure 16. Principales interactions d'antagonisme entre *S. aureus* et les autres bactéries du microbiome nasal**

Les staphylocoques à coagulase négative (SCN) inhibent la colonisation nasale à *S. aureus* en sécrétant des molécules antimicrobiennes ou en sécrétant une protéase Esp (par *S. epidermidis*) qui dégrade les adhésines de surface de *S. aureus* ou leurs ligands cellulaires. *S. pneumoniae* induit la lyse de *S. aureus* par des phages activés par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Corynebacterium* et *Propionibacterium* peuvent moduler les capacités d'adhésion de *S. aureus* au niveau de la muqueuse nasale à travers des mécanismes encore mal connus.

Figure adaptée de Krismer et al., 2017.



*S. epidermidis* est l'espèce bactérienne la plus communément présente au niveau de la peau humaine saine. Des études in vivo sur des modèles murins et chez l'Homme ont révélé que la production de la sérine protéase Esp par *S. epidermidis* corrèle négativement avec la colonisation nasale à *S. aureus* (Iwase et al., 2010). En effet, Esp est capable de détruire et d'inhiber le biofilm formé par *S. aureus* et a une activité bactéricide contre *S. aureus* qui est potentialisée par la présence de bêta-défensine 2. De manière intéressante, l'inoculation intra-nasale de *S. epidermidis* producteur d'Esp permet de décoloniser les volontaires porteurs de *S. aureus* (Iwase et al., 2010). D'autres études ont montré que *S. epidermidis* produit des modulines solubles de type  $\delta$ -toxines qui exercent des activités antimicrobiennes sur un large spectre de bactéries, y compris *S. aureus* (Cogen et al., 2010a, 2010b). De plus, LTA de *S. epidermidis* induit une réponse inflammatoire en interagissant avec les récepteurs TLR des kératinocytes. Cette réponse inflammatoire aboutit à l'expression des peptides antimicrobiens de type  $\beta$ -défensines 2 et 3 qui inhibent la croissance de *S. aureus* et d'autres espèces bactériennes appartenant au groupe A des streptocoques (Lai et al., 2010). *S. epidermidis* pourrait également "protéger" l'hôte de la colonisation par *S. aureus* en inhibant tout un ensemble de mécanismes régulateurs (quorum sensing). *S. epidermidis* produit des peptides qui affectent spécifiquement les fonctions du gène *agr* de *S. aureus* (Otto et al., 2001).

L'antagonisme entre *S. aureus* et *S. pneumoniae* au niveau du nasopharynx peut être expliqué par des interférences bactériennes liées à la production d'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ). Une étude a montré que la production d' $H_2O_2$  par *S. pneumoniae* au niveau du nasopharynx induit la lyse de *S. aureus* par des bactériophages (Selva et al., 2009). Il a aussi été montré que la production d' $H_2O_2$  par les streptocoques inhibe la colonisation des cavités orales par les souches de SARM chez les nouveau-nés (Uehara et al., 2001). De même, les personnes ayant reçu des vaccins anti-pneumococques ont un taux de portage nasal élevé de *S. aureus* (van Gils et al., 2011). Les individus porteurs des espèces *Corynebacterium* et *Propionibacterium* semblent être mieux protégés contre la colonisation par *S. aureus*, probablement à cause d'une compétition entre ces espèces bactériennes (Frank et al., 2010; Lina et al., 2003; Uehara et al., 2000). Cependant les mécanismes moléculaires impliqués dans cet antagonisme sont toujours inconnus et ne semblent pas être liés à la production de bactériocines (Uehara et al., 2000).

Les interactions entre la colonisation par *S. aureus* et le virome sont complètement inconnues jusqu'à présent. Cependant, des corrélations positives ont été décrites entre *S. aureus* et certaines infections virales respiratoires comme la grippe ou le rhume. Ces interactions entre *S. aureus* et les infections virales respiratoires sont détaillés dans le chapitre suivant. Les avancées technologiques importantes en matière de séquençage haut débit devraient faciliter l'étude du microbiome et mieux comprendre le rôle complexe des interactions entre *S. aureus* et les autres agents infectieux de la flore commensale résidente.

#### 5.2.4. Les facteurs environnementaux

Un déterminant primordial qui est nécessaire à la colonisation est l'exposition à *S. aureus* dans l'environnement afin de permettre son acquisition par l'hôte. Cette acquisition peut se faire suite à des contacts avec des supports contaminés par cette bactérie ou par le biais de contacts avec d'autres individus porteurs de *S. aureus*.

Les voies classiques de la transmission de *S. aureus* impliquent le manuportage ; soit directement de la main d'un porteur au nez d'un non porteur, soit indirectement à partir de la main d'un porteur qui contamine une surface (par exemple une poignée de porte) vers celle du receveur qui entre en contact avec cette surface puis à son nez (Wertheim et al., 2006). Les contacts physiques rapprochés ou le risque de blessures lors d'activités sportives ou de travaux manuels sont positivement corrélés avec la transmission et l'acquisition de *S. aureus* (Kazakova et al., 2005). Les transmissions entre les membres d'une famille ou de la mère à un nouveau-né sont également identifiées comme des facteurs de l'environnement qui favorisent le portage de *S. aureus* (Leshem et al., 2012; Mollema et al., 2010; Wagenvoort et al., 2005). Le contact avec le personnel de santé ou l'hospitalisation peuvent aussi jouer un rôle dans la transmission et l'acquisition de *S. aureus* (Olsen et al., 2013). En parallèle avec le développements socio-économique, la prévalence générale du portage nasal de *S. aureus* a diminué au cours du siècle dernier, suggérant un rôle important de l'hygiène et des conditions de vie dans l'acquisition de ce portage (Kluytmans and Wertheim, 2005; Kluytmans et al., 1997).

### 5.3. Le passage de la colonisation à l'infection

Bien que les déterminants liés à la colonisation par *S. aureus* soient plus ou moins bien identifiés, les facteurs permettant d'expliquer le passage d'un état commensal asymptomatique à un état pathogène avec des signes cliniques d'infection restent mal connus. Le portage nasal de *S. aureus* est identifié comme un facteur de risque majeur de développement d'infections endogènes par cet agent infectieux chez les patients hospitalisés (chirurgie, dialyse, pose de cathéter, soin intensifs...) (Levy et al., 2013). *S. aureus* est alors considéré comme un pathogène « opportuniste » qui profiterait des défaillances immunitaires ou physiologiques de son hôte pour induire une infection. Toutefois, l'hypothèse que *S. aureus* est capable de migrer du site du portage jusqu'au site d'infection n'est pas à exclure. Une étude *in vivo* sur un modèle murin a montré que *S. aureus* est capable d'atteindre les organes profonds à partir de la peau à travers une translocation directe sans passer par la voie circulatoire (Hahn and Sohnle, 2013). En l'absence de données chez l'Homme permettant d'expliquer comment *S. aureus* peut se déplacer de son réservoir muqueux jusqu'au site d'infection, il est toujours admis qu'une rupture de la barrière épithéliales (blessure ou acte médical) est nécessaire au développement d'une infection (Brown et al., 2014).

## B. Les interactions entre *Staphylococcus aureus* et les virus respiratoires

### 1. Les interactions entre *S. aureus* et le virus de la grippe

Le développement des infections des voies supérieures et inférieures est déterminé par les interactions entre les agents pathogènes viraux ou bactériens et la réponse immunitaire de l'hôte. Pendant les dernières décennies, l'intérêt pour l'investigation de la contribution de la colonisation bactérienne dans l'évolution des infections respiratoires virales n'a cessé d'augmenter. Plusieurs études cliniques ont rapporté des co-infections virales et bactériennes au niveau des voies respiratoires chez les enfants et les adultes (White et al., 1981; Johnson et al., 1996; Numazaki et al., 2004; Hui et al., 2008; van den Bergh et al., 2012; Suzuki et al., 2012; Jiang et al., 2016). Les bactéries le plus souvent isolées sont *S. aureus*, *S. pneumoniae* et *H. influenzae* qui compliquent principalement les infections par les virus influenza (IV), les virus parainfluenza (PIV), et les rhinovirus (RV). Les taux de co-infections virus-bactéries varient de 1 à 30% chez les enfants et de 8 à 10% chez les adultes (White et al., 1981; Hui et al., 2008; Suzuki et al., 2012; Jiang et al., 2016). *S. aureus* est isolé dans 10 à 57% des cas de co-infections, ce qui suggère que cette bactérie joue un rôle important dans la pathogénèse des infections respiratoires (Jiang et al., 2016; Suzuki et al., 2012).

#### 1.1. Épidémiologie des co-infections grippe/*S. aureus*

La première pandémie grippale des temps modernes eut lieu en 1918 et fût appelée « grippe espagnole ». Plus de 500 millions personnes autour du monde ont été infectées par le virus de la grippe A/H1N1 et 30 à 50 millions sont décédées (Taubenberger and Morens, 2006). Dans 85 à 90% des cas mortels, les patients avaient montré des signes de bronchopneumonie aiguë due à une surinfection bactérienne. Parmi les bactéries causales, *S. pneumoniae* et les streptocoques  $\beta$ -hémolytiques (probablement *S. pyogenes*) ont, respectivement, représenté 71 et 28% des cultures positives à partir d'échantillons de liquide pleural ou de sang prélevés au niveau des poumons par autopsie, tandis que *S. aureus* n'a représenté que 1% (Morens and Fauci,

2007; Chien et al., 2009). Lors des deux pandémies suivantes qui ont eu lieu en 1957 (« grippe asiatique », H2N2) et en 1968 (« grippe de Hong Kong », H3N2), les taux de mortalité ont été nettement plus faibles qu'en 1918, cependant la mortalité causée par des surinfections bactériennes a été prédominante (Trotter et al., 1959; Lindsay MI et al., 1970). *S. aureus* a constitué le principal agent pathogène responsable de surinfections bactériennes mortelles (47%) (Robertson et al., 1958). La dernière pandémie grippale en 2009 a été causée par un virus de type A/H1N1. Plus de 200 000 personnes sont décédées, les pneumonies bactériennes ont compliqué, respectivement, entre 17 et 30% des infections virales mortelles chez les enfants et les adultes. En plus de *S. pneumoniae* et de *S. aureus*, différentes autres espèces bactériennes ont été retrouvées dans les échantillons biologiques des patients gravement malades incluant *S. pyogenes*, *H. influenzae* et d'autres bactéries à Gram négatif (Bosch et al., 2013).

Au cours du siècle dernier, *S. aureus* a montré son caractère hautement pathogène quand il est associé à des infections grippales. Ce synergisme potentiellement fatal a été décrit autour du monde et peut survenir à la fois chez les enfants et les adultes immunocompétents, non seulement pendant les périodes de pandémies grippales, mais également pendant les périodes de grippe saisonnière (tableau 5). Pendant la saison grippale 2003-2004, les centres de prévention et de contrôle sanitaire américains ont enregistré de nombreuses complications bactériennes après des infections grippales, incluant des pneumonies à *S. aureus*, chez des enfants et des adultes sans antécédents. La plupart de ces infections ont été associées à des souches de SARM (88%) et environ un tiers des patients co-infectés sont morts. La majorité des souches de SARM étaient résistantes aux macrolides et appartenaient à la souche USA300. Les résultats des analyses de biologie moléculaire ont montré que 85% des souches de SARM et 100% des souches de SARM ayant causé la mort des patients atteints possédaient les gènes de LPV (Hageman et al., 2006).

Bien que la résistance aux antibiotiques et la sécrétion de LPV soient des déterminants très importants dans la « pneumopathogénicité » de *S. aureus* au cours des infections grippales, des souches de SARM et des souches LPV négatives peuvent être responsables de formes sévères, voire mortelles, lors d'infections grippales (Murray et al., 2010).

De 2004 à 2008, malgré les avancées thérapeutiques et l'amélioration des stratégies de vaccination, le nombre de formes mortelles associées à la grippe chez les enfants a doublé. Parallèlement, le taux de co-infections virus-bactéries a augmenté significativement à chaque saison grippale (6, 15, 34 et 51%, respectivement). Curieusement, le taux de mortalité lié à des co-infections à *S. aureus* a dépassé celui lié aux co-infections plus communément décrites à *S. pneumoniae*, et devient la bactérie le plus souvent isolée dans ces cas (Peebles et al., 2011). De plus, une étude a montré que les enfants co-infectés par IV et *S. aureus* ont été plus souvent admis dans les services de soins intensifs (71%) que les enfants infectés par IV (28%) ou *S. aureus* (36%) seuls et ont une mortalité significativement plus élevée (29% versus 0% pour IV et 5% pour *S. aureus*) (Reed et al., 2009). Le taux des co-infections *S. aureus*-grippe varie de 0,29% en Australie (Hayashi et al., 2012) à 18,18% aux États-Unis (Nguyen et al., 2012).

L'estimation réelle du taux de surinfection par *S. aureus* après infection grippale est difficile à obtenir du fait des différences importantes entre les études (taille et caractéristiques de la population étudiée, techniques d'échantillonnage et méthodes d'analyse). Cependant, malgré l'hétérogénéité des données, plusieurs études s'accordent à montrer qu'au cours des dernières années, *S. aureus* est devenu l'agent pathogène bactérien le plus commun au décours des infections grippales après *S. pneumoniae* et *H. influenzae* (Mancini et al., 2008; Reed et al., 2009; Koon et al., 2010; Peebles et al., 2011; Nguyen et al., 2012; Rice et al., 2012; Blyth et al., 2013; Dawood et al., 2014; Safaeyan et al., 2015). Le tableau 5 rassemble les études parues entre 2006 et 2015 portant sur l'épidémiologie des infections staphylococciques post-grippales.

Tableau 5. Épidémiologie des surinfections post-grippales par *S. aureus*

Année Pays Type d'étude Référence	Nombre de cas Sexe ratio Age (médiane) Sévérité/mortalité	Caractéristiques du virus influenza	Caractéristiques de <i>Staphylococcus aureus</i>
2002-2013 États-Unis Rétrospective (Denison et al., 2013)	66 - 7 mois à 98 ans (18 ans) 25 cas sévères 14 (21,2%) morts	44 (66,7%) Influenza A (dont 23 H1N1) 22 (33,3%) Influenza B	66 (100%) co-infections 47 (71,2 %) SARM 58 (87,9 %) LPV+ 43 (84 %) CC8
2003-2005 Brésil Rétrospective (Mancini et al., 2008)	37 - 12 à 30 ans -	25 (67,6%) Influenza A 12 (32,4%) Influenza B	6 (16,3%) co-infections 4 <i>S. aureus</i> et influenza A 2 <i>S. aureus</i> et influenza B

- Suite du tableau 5 -

<b>Année</b>	<b>Nombre de cas</b>	<b>Caractéristiques du virus influenza</b>	<b>Caractéristiques de <i>Staphylococcus aureus</i></b>
<b>Pays</b>	<b>Sexe ratio</b>		
<b>Type d'étude</b>	<b>Age (médiane)</b>		
<b>Référence</b>	<b>Sévérité/mortalité</b>		
2003-2010 États-Unis Rétrospective et prospective (Dawood et al., 2014)	6769 - <1 à 9 ans 1% mortalité	4439 (65,6%) Influenza saisonnier (A et B) 2330 (34,4%) Influenza pandémique (A/H1N1pdm09)	35 (0,5%) co-infections 32,7% des co-infections bactériennes 11 (31,4%) SARM
2003-2004 États-Unis Cas cliniques (Hageman et al., 2006)	17 8 (47%) mâles 3 mois à 62 ans (21 ans) 11 cas sévères 29,4% mortalité	Influenza A ou B	17 (100%) co-infections 15 (88,2%) SARM 11 (64,7%) USA300 (LPV+) 2 (11,8%) USA400 1 (5,8%) USA200 1 (5,8%) USA100
2006-2007 États-Unis Rétrospective (Reed et al., 2009)	65 - Enfants 29% mortalité	Influenza A ou B	7 (10,8%) co-infections 3 (42,8%) SARM
2007-2008 États-Unis Rétrospective (Peebles et al., 2011)	88 47 (53%) mâles <1 à 17 ans (5 ans) 100% mortalité	64% Influenza A 26% H1N1 74% H3N2 36% Influenza B	29 (33%) co-infection 12 (41,4%) MRSA (USA300 et USA600)
2009 États-Unis Cas cliniques (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2009)	77 39 (55,7 %) mâles 2 mois à 56 ans (31 ans) - 100% mortalité	Influenza A H1N1	7 (9,1%) co-infections 31,8% des co-infections bactériennes
2009 États-Unis Rétrospective (Koon et al., 2010)	3110 - - -	Influenza A H1N1	458 (14,7%) co-infections
2009 Australie Prospective (Murray et al., 2010)	252 - 34 à 79 ans 0,8% mortalité	Influenza A H1N1	5 (2%) co-infections
2009 États-Unis Rétrospective et prospective (Rice et al., 2012)	683 13 à 92 ans 47% mâles 31% mortalité (co-infection bactériennes)	Influenza A H1N1	23 (3,37%) co-infections 11,11 % des co-infections bactériennes
2009 Australie Prospective (Blyth et al., 2013)	198 44,4% femelles 24 à 55 ans (38 ans) -	194 (98%) Influenza A 90,2% H1N1 9,8% H3N2 4 non-typés	17 (8,6%) co-infections 47,2% des co-infections bactériennes 6 (35,3%) SARM

- Suite du tableau 5 -

Année Pays Type d'étude Référence	Nombre de cas Sexe ratio Age (médiane) Sévérité/mortalité	Caractéristiques du virus influenza	Caractéristiques de <i>Staphylococcus aureus</i>
2009 Australie Rétrospective et prospective (Hayashi et al., 2012)	4491 - Tout âge (40 ans) 9 cas sévères 0,1% mortalité	Influenza A H1N1	13 (0,3%) co-infections 26% des co-infections bactériennes 2 (15,4%) SARM
2009 États-Unis (Nguyen et al., 2012)	66 H1N1 patients 59% mâles Enfants (5,9 ans) 33% mortalité (co- infections avec <i>S. aureus</i> )	Influenza A H1N1	12 (18,18%) co-infections 35% des co-infections bactériennes 5 (41,7%) SARM
2009 Canada Prospective (Muscedere et al., 2013)	681 46,8% mâles Tout âge (47 ans) -	Influenza A H1N1	82 (12%) co-infections 15,24% des co-infections bactériennes
2009-2010 Malaisie Rétrospective (Dhanoa et al., 2011)	50 50% mâles 90% < 50 ans et 46% ≤ 15 ans 4% mortalité	Influenza A H1N1	3 (6%) co-infections 21,43% des co-infections bactériennes
2009-2010 États-Unis Rétrospective et prospective (Randolph et al., 2011)	838 58% mâles Enfants (6 ans) -	Influenza A H1N1	71 (8,5%) co-infections 25,9 % des co-infections bactériennes 34 (48%) SARM
2009-2011 Iran Rétrospective (Safaeyan et al., 2015)	83 30% mâles Adultes -	Influenza A H1N1	10 (12%) co-infection
2012 États-Unis Cas cliniques (CDC, 2012)	3 - >50 ans 100% mortalité	Influenza A H3N2	2 (66,7%) co-infections 3 (100%) USA300 (LPV+)

CC : complexe clonal ; SARM : *S. aureus* résistant à la méthicilline ; LPV : leucocidine de Pantone-Valentine

## 1.2. Mécanismes de synergie entre *S. aureus* et influenza

### 1.2.1. Pathogénicité des co-infections sur les modèles in vivo

Plusieurs études ont essayé de reproduire les co-infections grippe/*S. aureus* observées chez l'Homme sur des modèles animaux pour comparer les changements physiopathologiques observés chez les animaux infectés par chaque pathogène séparément ou par les deux simultanément. L'un des premiers modèles animaux a été développé en 1980 par Gardner et Kung (Gardner and Kung, 1980).



Les auteurs ont observé que la primo-infection virale augmentait significativement la persistance de *S. aureus* chez les souris co-infectées ainsi que l'ampleur et la durée de la réponse inflammatoire. Ces souris montraient une baisse de l'infiltration des cellules phagocytaires dans les poumons par rapport aux souris infectées par *S. aureus* seulement. Les auteurs ont suggéré une chute de la fonction des macrophages alvéolaires après l'infection grippale, ce qui faciliterait l'infection par *S. aureus* (Gardner and Kung, 1980). Un autre modèle murin de co-infection a montré que le virus grippal augmentait les effets létaux de l'entérotoxine staphylococcique superantigénique B (SEB) à travers une augmentation de réponse inflammatoire (Zhang et al., 1996). L'ajout de vitamine E dans l'alimentation des souris co-infectées aurait un effet protecteur en régulant la réponse inflammatoire primaire à l'infection virale (Gay et al., 2004). D'autres études ont montré que les souris co-infectées par IV et *S. aureus* avaient un taux de mortalité plus élevé, des lésions pulmonaires plus importantes, une bactériémie plus sévère et des titres viraux plus élevés par rapport aux souris infectées par *S. aureus* ou IV seuls (Lee et al., 2010; Iverson et al., 2011).

Sous l'angle pathogénique, les surinfections graves à *S. aureus* au cours de la grippe semblent être en relation avec l'expression de toxines virales ou bactériennes et avec une réponse immunitaire inefficace. L'expression simultanée de la cytotoxine virale PB1-F2 et de la toxine bactérienne LPV contribue à l'aggravation du tableau clinique (Iverson et al., 2011). Récemment, Niemann et ses collaborateurs ont présenté un modèle permettant d'expliquer comment IV et LPV coopèrent pour causer une pneumonie nécrosante (Niemann et al., 2012).

L'infection grippale, comme d'autres infection virales, s'est montré capable d'activer les cellules épithéliales et d'induire une réponse immunitaire innée qui augmente la migration des neutrophiles au site inflammatoire pour détruire les pathogènes envahissants à travers la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), des défensines et des enzymes protéolytiques qui sont également nocives pour l'hôte (Wang and Forsyth, 2000; Soehnlein and Lindbom, 2010). De plus, la surinfection par des souches de *S. aureus* qui expriment LPV détruit, grâce à cette toxine, les neutrophiles recrutés et provoque le relargage des protéases intracellulaires des neutrophiles, ce qui endommage l'épithélium respiratoire.

Cet état inflammatoire favorise à la fois la multiplication virale et bactérienne. Pour contrer cette stratégie microbienne, l'hôte génère des anticorps neutralisants anti-LPV et inhibe les protéases libérées grâce à des inhibiteurs protéiques présents dans le sérum (Niemann et al., 2012). Des résultats similaires ont été publiés par Liu et coll. en utilisant un modèle de souris B6 infectées avec un virus de type A/H1N1 adapté aux murins et des souches de SARM. Par rapport au groupe de souris infectées avec IV seulement, les analyses histopathologiques des poumons de souris co-infectées ont montré une infiltration plus importante des neutrophiles dont la majorité étaient dégénérés. De plus, les souris co-infectées sécrétaient significativement plus d'IL-1 $\beta$ , de TNF $\alpha$  et de mKC (homologue murin de l'IL-8 humain) (Liu et al., 2013). L'augmentation du niveau des cytokines pro-inflammatoires régule activement le recrutement des neutrophiles, comme le confirment les observations histologiques. (Niemann et al., 2012). Par ailleurs, les auteurs ont également comparé l'impact de trois antibiotiques communément utilisés pour le traitement des pneumonies post-grippales à SARM sur leur modèle murin. Par rapport au placebo, les souris co-infectées traitées avec le linézolide, la vancomycine ou la clindamycine avaient une réponse inflammatoire pulmonaire déficiente en IL-6, mKC et IFN $\gamma$ . Tous ces antibiotiques réduisaient de façon similaire la multiplication de SARM, sans aucun effet sur les titres viraux (Liu et al., 2013). Bien que les études précédentes aient montré que l'infection virale est favorisée par l'infection bactérienne, très peu de données sont disponibles pour décrire la transition de la colonisation à *S. aureus* à une maladie invasive. Une étude publiée en 2016 a présenté un nouveau modèle de co-infection de la muqueuse nasale, site principal de colonisation de *S. aureus* et d'entrée du virus grippal dans les voies respiratoires de l'hôte. Elle a montré que *S. aureus* peut coloniser l'épithélium nasal des souris puis migrer vers les poumons après infection virale provoquant une pneumonie staphylococcique secondaire (Reddinger et al., 2016). Cependant, le mécanisme de cette migration reste inexpliqué.

En plus des modèles murins, d'autres modèles animaux ont été développés. Par exemple, un modèle de furets a été utilisé pour étudier l'adhésion bactériennes aux voies respiratoires supérieures après infection par un virus grippal de type A (Sanford and Ramsay, 1986, 1989).

*S. aureus* était capable d'adhérer trois fois plus aux épithéliums respiratoires des furets infectés par IV qu'à ceux des furets contrôles (Sanford and Ramsay, 1987). En effet, le virus grippal augmente l'adhésion de *S. aureus* aux cellules épithéliales squameuses au niveau de la zone nasale antérieure des animaux (Sanford and Ramsay, 1989). Toutefois, les facteurs d'adhésion surexprimés lors de l'infection virale n'ont pas été caractérisés. Un autre modèle de rongeur a été développé en utilisant des rats de coton co-infectés avec un virus de type A/H3N2 et une souche clinique de SARM (Braun et al., 2007). La co-infection a augmenté significativement le taux de mortalité (34% chez le groupe co-infecté, 13% chez le groupe *S. aureus* et 0% chez le groupe avec le virus grippal). Les rats co-infectés avaient une hypothermie plus sévère, une perte de poids plus importante et une inflammation pulmonaire plus prolongée. De plus, les cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et IL-6 du groupe co-infecté avaient des taux supérieurs à la somme des cytokines de chaque groupe infecté séparément. La présence d'inflammation est suivie par une libération de cytokines anti-inflammatoires comme IL-10 qui est significativement augmentée chez les animaux co-infectés (Braun et al., 2007). Cela peut jouer un rôle critique dans la synergie en réduisant la réponse immunitaire innée (Steinhauser et al., 1999).

Plus récemment, un modèle de co-infection chez des primates non humains a été mis au point en utilisant des souches cliniques de virus A/H3N2 et de *S. aureus* USA300. Cependant, les macaques co-infectés n'ont montré qu'une pneumonie aigüe légère avec une augmentation faible du nombre des neutrophiles au niveau des poumons. Contrairement aux modèles de rongeurs, la complexité des modèles de primates non humains n'a pas permis de distinguer de différence significative entre le groupe co-infecté et les autres groupes (Kobayashi et al., 2013). Plusieurs explications sont possibles pour expliquer ce résultat négatif : utilisation d'un virus humain peu pathogène pour ce modèle, nombre limité d'animaux et inocula viraux ou bactériens insuffisants. En 2016, Chertwo et coll. ont réussi à développer le premier modèle de primates non humains sur des macaques rhésus (*Macaca mulatta*) présentant une pneumonie sévère après co-infection par un virus grippal de type A et *S. aureus* USA300. Le pic pathologique a été observé après 6 jours d'infection virale, avec des infiltrations pulmonaires bilatérales et une hypoxémie.

Les observations radiographiques et les manifestations physiologiques se rapproche bien de celles observés cliniquement chez les humains (Chertow et al., 2016). Dans un autre contexte, les virus aviaires ou porcins n'infectent pas ou peu les humains. Cependant des infections humaines sporadiques avec ces virus ont eu lieu. Un modèle de poule co-infectée par *S. aureus* et le virus aviaire A/H9N2 et un autre de porc co-infecté par MRSA et un virus porcin de type A/H3N2 ont été développés (Kishida et al., 2004; Smith et al., 2011). Les animaux co-infectés ont montré des signes cliniques de synergie entre l'infection virale et l'infection bactérienne.

### 1.2.2. Effet de *S. aureus* sur l'infection virale

Parmi les premiers mécanismes impliqués dans la synergie entre *S. aureus* et les virus grippaux, plusieurs études ont décrit une protéase secrétée par certaines souches de *S. aureus* qui faciliterait indirectement la réplication virale en activant l'hémagglutinine virale (HA) par clivage protéolytique (Scheiblaue et al., 1992; Tashiro et al., 1987a, 1987b). Cette staphylokinase, similaire aux protéases de *S. pneumoniae* et *Aerococcus viridans* mais pas de *Pseudomonas aeruginosa*, active HA qui est une glycoprotéine de surface impliquée dans la pénétration du virus dans les cellules (Gamblin and Skehel, 2010; Scheiblaue et al., 1992). De plus, la liaison entre staphylokinase et  $\alpha$ -défensines abolit les propriétés bactéricides de ces dernières, ce qui contribue à la résistance staphylococcique aux réponses immunitaires non spécifiques de l'hôte (Mancini et al., 2008). Les staphylokinases permettent aussi de produire une plasmine active à partir de plasminogène, ce qui facilite la pénétration de *S. aureus* dans les tissus environnants (Bokarewa et al., 2006). Récemment, il a été démontré que les différents virus grippaux A (H1N1 et H3N2) et B se répliquent plus efficacement en présence de *S. aureus* vivant mais pas en présence de *S. aureus* inactivé thermiquement ou chimiquement, ni en présence d'aucun des composants de surface (LTA, peptidoglycanes et SpA) ou des toxines testés ( $\alpha$ -hémolysine, TSST, SEA et SEB) (Warnking et al., 2015). L'augmentation de la réplication virale nécessite donc des bactéries métaboliquement actives. De plus, la présence de *S. aureus* viable bénéficie à la réplication des virus grippaux, seulement dans les cellules capables de sécréter IFN (Warnking et al., 2015).

La réponse IFN joue un rôle important dans la réponse immunitaire innée contre les virus (Ehrhardt et al., 2010) en limitant la réplication virale. En effet, la surinfection par *S. aureus* réduit la phosphorylation des activateurs et transducteurs du signal de transcription de type 1 (STAT1), provoquant ainsi une réduction de la dimérisation entre STAT1 et STAT2 (Warnking et al., 2015). La phosphorylation et l'activation de STAT1 et STAT2 sont des réactions subséquentes de la voie de signalisation de l'IFN de type 1 qui régulent l'expression d'IFN, des cytokines et des chémokines ainsi que l'apoptose et l'autophagie en tant que réponse immunitaire innée aux pathogènes. *S. aureus* neutralise cette première ligne de défense contre les virus grippaux et favorise indirectement la réplication virale. D'une façon générale, la surinfection par *S. aureus* favorise leur réplication et leur pathogénicité à travers au moins deux mécanismes distincts : (i) les bactéries extracellulaires secrètent une staphylokinase qui facilite l'attachement des virus grippaux aux cellules hôtes en activant spécifiquement HA et (ii) les bactéries intracellulaires inhibent la réponse IFN anti-grippe en empêchant la dimérisation STAT1-STAT2 (Warnking et al., 2015). Ce dernier mécanisme pourrait aussi être pertinent pour d'autres pathogènes viraux.

### **1.2.3. Influenza augmente la sensibilité aux infections secondaires par *S. aureus***

#### 1.2.3.1. Effets sur l'adhésion et l'internalisation de *S. aureus*

En considérant que l'attachement d'un pathogène aux surfaces de la muqueuse respiratoire est la première étape du développement d'une maladie respiratoire et que l'infection virale réduit les défenses de l'hôte, il est plausible que l'infection virale puisse rendre l'épithélium plus sensible à la colonisation bactérienne d'une façon générale (Scott et al., 2003). Cette hypothèse a été vérifiée pour des synergies spécifiques entre le virus grippal et *S. pneumoniae* (McCullers, 2006) ou *S. pyogenes* (Okamoto et al., 2003) ; dans ces infections, le virus grippal augmente l'adhésion et l'internalisation des bactéries dans les cellules épithéliales. Dans les années 1980, plusieurs études ont essayé de caractériser une telle coopération impliquant le virus grippal et *S. aureus* (Fainstein et al., 1980; Selinger et al., 1981; Davison and Sanford, 1981, 1982; Sanford et al., 1986; Sanford and Ramsay, 1986). Toutes ces études s'accordaient sur le fait que l'infection primaire par IV augmente l'adhésion de *S. aureus* aux cellules infectées.

Cependant, aucune d'entre elles n'a pu identifier clairement les composants viraux, bactériens ou cellulaires impliqués dans cette synergie.

Plus récemment, il a été montré que le traitement *in vitro* des cellules HEp-2 avec la neuraminidase virale mime l'effet observé lors d'une primo-infection par le virus grippal sur l'adhésion de *S. aureus*, ce qui suggère que la neuraminidase modifie d'une façon ou d'une autre les récepteurs cellulaires pour *S. aureus* (El Ahmer et al., 1999). Une interaction entre la protéine A de *S. aureus* et le récepteur de TNF 1 (TNFR1) a été décrite récemment sur un modèle *in vitro* de cellules humaines endothéliales pulmonaires : les auteurs suggèrent que l'infection grippale augmente l'expression de TNFR1 et par conséquent l'adhésion de *S. aureus* (Wang et al., 2015).

L'infection grippale augmente également l'internalisation de *S. aureus* *in vitro* (Passariello et al., 2011; Takayama et al., 2014). Une étude japonaise a investigué l'effet de l'infection des cellules rénales canines (MDCK) par la souche pandémique A/H1N1/pdm2009 sur l'internalisation des souches de SARM USA100 et USA300. Les auteurs ont documenté une augmentation significative de l'internalisation des deux souches de SARM dans les cellules infectées par le virus grippal par rapport aux cellules infectées seulement par *S. aureus* avec une internalisation plus importante pour la souche USA300 (Takayama et al., 2014). Néanmoins, les mécanismes moléculaires de cette coopération n'ont pas été étudiés et l'utilisation d'un modèle *in vitro* de cellules non humaines ne reflète pas nécessairement la situation réelle chez l'Homme. Une étude italienne a également rapporté que l'infection par IV augmente l'adhésion et l'internalisation de *S. aureus* dans des cellules humaines dérivées de pneumocytes alvéolaires de types 1 et 2 (NCL-H292 et A549, respectivement) de façon temps- et dose-dépendante (Passariello et al., 2011). Le traitement des cellules infectées avec des anticorps anti-HA réduisait significativement l'internalisation de *S. aureus*, suggérant que HA est impliquée dans ce mécanisme. Des tests immunoenzymatiques ont montré que l'hémagglutinine des virions grippaux libres se lie spécifiquement à *S. aureus* et *S. pyogenes* mais pas aux autres bactéries à Gram positif ou négatif qui ont été testées (Passariello et al., 2011).

De façon générale, le virus grippal semble promouvoir l'internalisation de *S. aureus* à travers deux mécanismes distincts : (i) l'attachement des bactéries à HA exprimée sur la membrane des cellules infectées par le virus grippal et (ii) l'attachement aux virions libres pour rentrer dans les cellules non infectées, probablement à travers les récepteurs cellulaires des virus grippaux contenant l'acide sialique. Néanmoins les détails moléculaires des adhésines bactériennes et des voies de signalisation cellulaires impliquées dans cette coopération restent inconnus jusqu'à présent. Il est supposé aussi que l'infection grippale induit une surexpression des protéines de matrice extracellulaire comme le fibrinogène et la fibronectine, ce qui serait profitable à la bactérie pour augmenter sa capacité de colonisation de l'épithélium infecté.

#### 1.2.3.2. Effets sur la réponse immunitaire

Un des mécanismes impliqués dans la synergie entre *S. pneumoniae* et les virus grippaux est la détérioration de l'efficacité de l'élimination de l'agent pathogène bactérien par les cellules tueuses NK (*natural killers*) et les macrophages alvéolaires (Didierlaurent et al., 2008; Sun and Metzger, 2008). Des effets similaires ont été observés sur les modèles murins de co-infection grippe/*S. aureus* (Hang et al., 2011; Liu et al., 2013; Nugent and Pesanti, 1982; Small et al., 2010; Sun and Metzger, 2014). Certaines études ont montré que l'infection grippale inhibe la phagocytose de *S. aureus* et la réponse de type Th17 en modifiant la production des IFN (Hang et al., 2011; Liu et al., 2013; Rynda-Apple et al., 2014). D'autres études ont montré que les souris surinfectées par des souches de SARM avaient une clairance bactérienne réduite qui n'était pas due à un recrutement défectueux des cellules phagocytaires, mais coïncidait plutôt avec des niveaux réduits des ROS dans les neutrophiles et les macrophages alvéolaires (Subramaniam et al., 2014; Sun and Metzger, 2014).

#### 1.2.3.3. Rôles des interférons

Les IFN sont une famille de cytokines médiatrices inductibles principalement impliquées dans les défenses innées suite aux infections virales. Les IFN de type I (IFN $\alpha$  et IFN $\beta$ ) sont induits par les ARN viraux et sont sécrétés par les cellules non professionnelles infectées par des virus, alors que l'IFN de type II (IFN $\gamma$ ) est principalement induit par une réponse immunitaire spécifique et est sécrété par les

cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes T et NK). Les IFN sont capables d'activer les macrophages et les lymphocytes B, de modifier la réponse Th (*T helper*), d'inhiber la croissance cellulaire, de promouvoir l'apoptose et d'induire un état antiviral dans les cellules non infectées (Le Page et al., 2000). Récemment, il a été montré que les voies de signalisation des IFN représentent un mécanisme important par lequel les virus grippaux réduisent les défenses de l'hôte face aux pathogènes extracellulaires, ce qui contribue à la survenue d'infections secondaires à pneumocoque (Li et al., 2012; Nakamura et al., 2011; Shahangian et al., 2009). Des études similaires ont été réalisées pour investiguer le rôle des IFN dans la surinfection par *S. aureus* après une primo-infection grippale. Toutes ces études s'accordent sur le fait que la co-infection induit une augmentation de la production des deux types I et II d'IFN et affaiblit la clairance bactérienne (Hang et al., 2011; Kudva et al., 2011; Lee et al., 2015; Liu et al., 2013; Rynda-Apple et al., 2014; Shepardson et al., 2016).

Il est intéressant de noter qu'en utilisant IL-17R, IL-22, IFN $\alpha$ R et des modèles de souris IFN $\gamma$  KO, Kudva et coll. ont démontré que la co-infection grippe/*S. aureus* résulte en une diminution de la production d'IL-17, IL-22 et IL-23. Cette diminution observée après infection par *S. aureus* est dépendante des IFN de type I mais pas de l'IFN de type II. De plus, l'augmentation de la production des IFN de type I due à l'infection virale inhibait l'immunité de type 17, ce qui augmenterait la sensibilité à l'infection secondaire par *S. aureus* (Kudva et al., 2011; Lee et al., 2015). L'augmentation de la production de l'IFN $\gamma$  a été observée de façon tardive entre 7 et 12 jours après l'infection virale. IFN $\gamma$  semble avoir un rôle inhibiteur sur la phagocytose de *S. aureus* (mais pas d'*E. coli*) par les macrophages alvéolaires humains et murins (Kudva et al., 2011). En revanche, une autre étude a montré que l'augmentation de la sensibilité à l'infection secondaire par *S. aureus* (infection des souris avec une souche de SARM 3 jours après l'infection par le virus grippal) était corrélée avec une sécrétion plus importante d'IFN $\gamma$  à partir de 24 h après co-infection (Hang et al., 2011).

Une étude plus récente a montré que la suppression de la production d'IFN $\gamma$  grâce à la surproduction d'IL-13 réduit la sensibilité à l'infection secondaire par *S. aureus* (USA300) en activant les macrophages alvéolaires (Rynda-Apple et al., 2014). Cependant, la diminution de la production d'IFN $\gamma$  exacerbe l'infection par le virus



grippal. La persistance du virus réduit la production des cytokines activatrices de la production d'IL-13 (IL-33 et IL-25) et augmente l'expression du récepteur « leurre » IL-13R $\alpha$ 2 (un récepteur d'IL-13 sans domaine intracellulaire), ce qui se traduit par une perte de la signalisation IL-13 et par conséquent, de la production d'IFN $\gamma$  (Rynda-Apple et al., 2014). La sensibilité à l'infection bactérienne est alors de nouveau augmentée tardivement. Des résultats similaires ont été observés par Shepardson et coll. qui ont également rapporté que la sensibilité à l'infection par *S. aureus* était réduite à J3 post-infection grippale en relation avec la production d'IFN $\beta$ , puis augmentée à J7 en relation avec la production d'IFN $\alpha$  (Shepardson et al., 2016).

Le rôle de l'IFN de type III (IFN $\lambda$ ) a également été souligné récemment. La signalisation IFN $\lambda$ , en réponse à l'infection par le virus grippal, peut altérer l'expression des peptides antimicrobiens (PAM) et des composants du cytosquelette, ce qui réduirait la fonction barrière des muqueuses et contribuerait à les rendre plus sensibles à la colonisation par *S. aureus* (Planet et al., 2016). En tenant compte de toutes ces observations, il semble que les IFN jouent un rôle critique dans la synergie entre le virus grippal et *S. aureus* soit en inhibant l'immunité Th17 (par diminution de la production des IFN de type I et probablement de type III), soit en inhibant la phagocytose par les macrophages alvéolaires (par augmentation de la production de l'IFN de type II).

#### 1.2.3.4. Effet sur l'immunité Th17 et rôle des PAM

L'immunité Th17 joue un rôle important dans la défense de l'hôte contre *S. aureus* (Bröker et al., 2016). Les cellules Th17 appartiennent à un sous-groupe récemment découvert de cellules Th, en plus des sous-groupes classiques Th1 et Th2. Ces cellules sont caractérisées par la production d'IL-17, IL-21 et IL-22 (Ouyang et al., 2008). Le rôle de l'immunité Th17 contre les infections secondaires à *S. aureus* après infection par IV a été démontré il y a seulement quelques années (Kudva et al., 2011; Lee et al., 2015; Robinson et al., 2013, 2014, 2015). L'infection grippale diminue la production d'IL-17 et d'IL-22 par les cellules Th17 et  $\gamma\delta$ T. De plus, cette primo-infection inhibe la production d'IL-23 induite par l'infection à *S. aureus*, qui est nécessaire pour la production des cytokines de l'immunité Th17 et la maintenance des cellules Th17 au niveau du site d'infection.

Une des principales sources d'IL-23 est constituée par les cellules dendritiques qui orchestrent la polarisation des cellules Th17. La production d'IL-23 par les cellules dendritiques est inhibée par les IFN de type I mais pas par les IFN de type II qui sont les deux types d'IFN fortement détectés dans les poumons des souris co-infectées (Kudva et al., 2011).

IL-1 $\beta$  participe également à la régulation de la réponse immunitaire et à la polarisation des cellules Th17. IL-1 $\beta$  est produite après activation de certains récepteurs cellulaires qui reconnaissent des motifs microbiens, ce qui initie l'expression du gène de l'IL-1 $\beta$  par induction de NF $\kappa$ B en synthétisant la protéine inactive pro-IL-1 $\beta$  (Poeck et al., 2010). Pro-IL-1 $\beta$  est transformée en IL-1 $\beta$  active par différents mécanismes, y compris l'activation de la caspase 1 par un complexe protéique appelé inflammasome (Martinon et al., 2002).

Les travaux de Robinson et coll. ont montré que les souris co-infectées par *S. aureus* et le virus grippal ont une production réduite d'IL-1 $\beta$  par rapport aux souris infectées par *S. aureus* seul. L'infection grippale ne diminue pas l'activation de l'inflammasome suite à l'infection bactérienne mais inhibe l'activation de NF $\kappa$ B, ce qui suggère que la diminution de la production d'IL-1 $\beta$  est due à la diminution de pro-IL-1 $\beta$  de façon NF $\kappa$ B-dépendante. De plus, l'injection aux souris co-infectées d'IL-1 $\beta$  exogène rétablit la production normale d'IL-17 et d'IL-22 et améliore la clairance bactérienne, mais elle n'a pas d'effets significatifs sur les modèles de souris IL-17RA KO co-infectées ou sur les modèles de souris sauvages dont l'activité IL-17 et IL-22 a été bloquée chimiquement (Robinson et al., 2013). L'ensemble de ces données suggère un nouveau mécanisme par lequel l'infection grippale inhibe l'immunité de type 17 en bloquant l'activation de NF $\kappa$ B, ce qui provoquerait un blocage de la production d'IL-1 $\beta$  et par conséquent l'atténuation de la polarisation des cellules Th17.

IL-27 est une cytokine hétérodimérique qui a la capacité de réprimer différentes voies de signalisation des cellules T, y compris les cellules Th17 en inhibant leur différenciation (Hunter and Jones, 2015; Khader et al., 2009).

En utilisant IL-27R et des modèles de souris IL-10 KO, l'équipe d'Alcorn a pu également démontrer que l'augmentation de la production d'IL-27 pendant l'infection virale (jusqu'à 6 jours post-infection) régule la sensibilité à l'infection secondaire par *S. aureus* en agissant à la fois sur l'induction de la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 et la suppression de la production d'IL-17 (Robinson et al., 2015). IL-27 contribue à la fois aux défenses immunitaires de l'hôte et aux dommages pulmonaires puisqu'elle atténue l'infection virale mais augmente la sensibilité aux infections bactériennes (Robinson et al., 2015).

La question qui se pose à ce stade de la démonstration est de savoir quels sont les mécanismes impliqués dans la clairance de *S. aureus* qui sont inhibés par la suppression de l'immunité Th17 après une infection grippale. L'équipe d'Alcorn a montré que les souris infectées uniquement par *S. aureus* ont une production plus importante de PAM, qui est corrélée avec IL-17 et IL-22 (Robinson et al., 2014). En revanche, chez les souris co-infectées, l'infection virale induit une suppression de la production de PAM. De plus, l'infection bactérienne chez les souris IL-17 KO n'induit pas de production de PAM.

De façon intéressante, l'injection de PAM exogène (lipocaline 2) améliore la clairance bactérienne au niveau des poumons et inhibe la croissance de *S. aureus* en réduisant le fer disponible dans le microenvironnement (Robinson et al., 2014). Des résultats similaires ont été retrouvés par une autre équipe : l'infection grippale induit la suppression de l'immunité Th17 et de la production de PAM par l'augmentation de la production des IFN de type I (Lee et al., 2015). Ce mécanisme augmente la sensibilité non seulement aux infections secondaires par *S. aureus* mais aussi à des bactéries à Gram négatif (*E. coli* et *P. aeruginosa*) (Lee et al., 2015).

Tous ces travaux montrent clairement l'importance de l'immunité Th17 dans la synergie entre le virus grippal et *S. aureus*. Cependant la plupart des études en faveur de cette hypothèse ont été réalisées par la même équipe sur des modèles murins en utilisant un nombre réduit de souche de *S. aureus*. D'autres études sont nécessaires pour investiguer en profondeur l'effet de l'infection grippale sur l'immunité Th17, son effet sur la production de PAM et la clairance bactérienne chez les souris avant de vouloir tenter de transposer les résultats à l'Homme.

#### 1.2.3.5. Effet sur les cellules NK et rôle du TNF $\alpha$

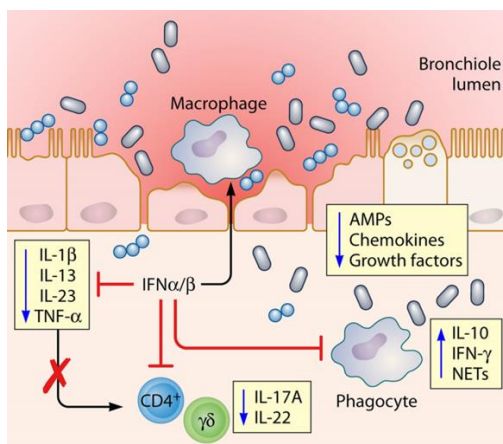
En plus de l'altération de la fonction phagocytaire des macrophages dans la réponse immunitaire anti-staphylococcique, l'infection grippale semble altérer également la fonction des cellules tueuses NK (Small et al., 2010). Les cellules NK jouent un rôle important dans les défenses de l'hôte contre les infections virales en tuant les cellules infectées et en participant à la production de cytokines (Brandstadter and Yang, 2011). Les cellules NK ont également la capacité d'interagir avec les macrophages pour réguler la clairance bactérienne (Scott et al., 2003). Par rapport aux souris infectées par *S. aureus*, l'influx des cellules NK est remarquablement réduit dans le tissu pulmonaire des souris co-infectées par le virus grippal et *S. aureus* (Small et al., 2010). Le nombre et la fréquence réduits des cellules NK productrices de TNF $\alpha$  et des macrophages producteurs d'IL-15 corrélient avec la capacité réduite de l'hôte à contrôler l'infection bactérienne. Ces résultats suggèrent que l'infection grippale réduit les défenses anti-staphylococciques de l'hôte en réduisant la production de TNF $\alpha$  par les cellules NK et en paralysant leur capacité à activer efficacement les macrophages (Small et al., 2010). En effet, une interférence entre plusieurs facteurs solubles, comme entre TNF $\alpha$  et IL-15, ainsi qu'un contact cellule-cellule sont nécessaires pour que les cellules NK et les macrophages s'activent mutuellement et assurent une réponse immunitaire innée efficace contre les infections virales et bactériennes (Michel et al., 2013). Cependant, une étude similaire n'a pas pu caractériser de changement significatif de production de TNF $\alpha$  dans les poumons des souris co-infectées malgré la réduction de la clairance bactérienne (Kudva et al., 2011). Il est possible que, dans ce dernier modèle d'infection subléthale, les niveaux de TNF- $\alpha$  soient impartis à des temps plus précoces après l'infection par *S. aureus* qui n'ont pas pu être mesuré. D'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre le rôle du TNF $\alpha$  dans l'altération de la fonction des cellules NK au cours des surinfections par *S. aureus*.

#### 1.2.3.6. Effet sur les macrophages et rôle du stress oxydatif

Le stress oxydatif est un processus selon lequel l'oxydase du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) produit des intermédiaires ROS nécessaires à l'élimination des bactéries par phagocytose.

Il est bien connu que l'activité de NADPH oxydase dans les macrophages et les neutrophiles est essentielle pour la clairance bactérienne au cours des infections respiratoires par *S. aureus*. Les souris KO pour NADPH oxydase ont montré une déficience importante dans l'élimination de SARM après infection grippale (Sun and Metzger, 2014). L'altération de la fonction du stress oxydatif chez des souris mosaïques Nox2<sup>+/-</sup> co-infectées accélère la nécrose cellulaire et les dommages pulmonaires (Sun et al., 2016). Ces observations ont été confirmées par une autre équipe qui a montré que la stimulation de la production des ROS permettait d'améliorer la clairance de *S. aureus* chez les souris infectées par le virus grippal et qu'inversement l'inactivation des ROS par des agents chimiques abrogeait la clairance bactérienne (Subramaniam et al., 2014). Cependant, une autre étude a montré que la déficience de la clairance de *S. aureus* après l'infection grippale n'est pas due à une altération de la fonction phagocytaire mais plutôt à une altération de la fonction Th17 (Robinson et al., 2014).

A la lumière de ces données, il apparaît que la réponse immunitaire à la co-infection grippe/*S. aureus* est complexe et multifactorielle. Les études sur les modèles animaux permettent de mieux comprendre la mécanistique de cette réponse et le rôle des différents composants du système immunitaire. Cependant les résultats obtenus restent plus ou moins contradictoires et ne reflètent pas forcément la réponse immunitaire déployée dans l'espèce humaine. Des études supplémentaires sont indispensables pour mieux comprendre cette relation très complexe entre virus grippal et *S. aureus*.



Suite à l'infection grippale, la réponse immunitaire innée IFN de type I ( $IFN\alpha/\beta$ ) inhibe la production des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-13, IL-23 et TNF $\alpha$ ), altère la réponse immunitaire de type 17 et réduit le recrutement des phagocytes, ce qui résulte en une production défective de peptides antimicrobiens (AMPs), de chémokines et de facteurs de croissance favorisant la surinfection bactérienne

**Figure 17. Rôle de la réponse immunitaire anti-influenza virus dans la sensibilité aux infections secondaires bactériennes.**

Figure de Rynda-Apple et al., 2015.

## 2. Les interactions entre *S. aureus* et les virus respiratoires non influenza

Les infections virales des voies respiratoires peuvent être compliquées par des surinfections bactériennes qui augmenteraient significativement la durée de la maladie et même, dans certains cas, engageraient le pronostic vital. Dans ce chapitre nous nous intéressons aux interactions entre *S. aureus* et les virus respiratoires non influenza. L'analyse des données de la littérature a montré que rhinovirus (RV) et le virus respiratoire syncytial (RSV) sont les principaux agents pathogènes respiratoires viraux, après influenza, qui interagissent avec *S. aureus*. Cette analyse a fait l'objet d'une revue publiée le 26 août 2018 dans le journal « *Virulence* » (Morgene et al., 2018a). Avant de présenter cette revue in extenso, nous proposons quelques rappels sur les RV, leur biologie et leur pathologie car ils sont au cœur des études de co-infections que nous avons conduites dans le contexte de notre travail expérimental de thèse.

### 2.1. Données générales sur les rhinovirus

#### 2.1.1. Pathologie des infections à rhinovirus

RV est connu pour être l'agent pathogène viral causal du rhume commun chez l'Homme qui peut se manifester sous différents symptômes comme la rhinorrhée, l'éternuement, la toux, le mal de gorge et un malaise général. L'infection par RV est généralement peu sévère. Elle est associée à une période d'incubation de deux jours suivie par une période symptomatique de 5 à 7 jours qui se termine par une guérison spontanée (Jacobs et al., 2013). Longtemps considéré comme un virus respiratoire banal, RV peut compliquer sérieusement d'autres pathologies respiratoires comme l'asthme, la bronchiolite, la pneumonie chronique obstructive et la fibrose kystique. Il est fréquemment isolé seul ou en association avec d'autres germes chez les patients atteints de pneumonies sévères (To et al., 2016). Jusqu'à présent, aucun traitement antiviral spécifique ou vaccin n'a démontré son efficacité. Les mesures de prévention reposent principalement sur l'hygiène et les traitements proposés sont exclusivement symptomatiques (Thibaut et al., 2016). Bien que la plupart des infections par RV soient bénignes, RV reste le premier agent étiologique des infections des voies respiratoires

supérieures et représente un énorme fardeau social et économique en termes d'absentéisme et de coûts liés aux soins (Jacobs et al., 2013).

### 2.1.2. Structure et classification des rhinovirus

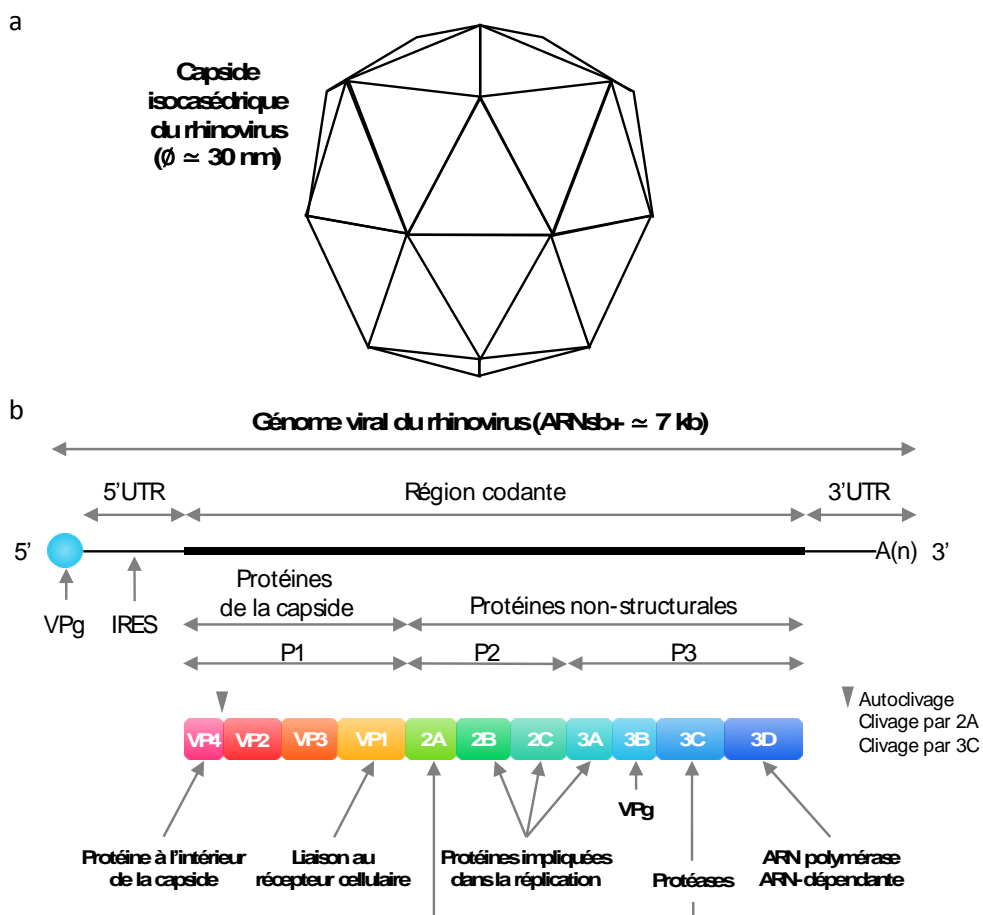
RV est un petit virus non enveloppé d'environ 30 nm de diamètre qui appartient à la famille des *Picornaviridae* et au genre *Enterovirus*. Sa capsidie icosaédrique est composée de quatre protéines virales (VP1, VP2, VP3 et VP4) et renferme un génome constitué d'un ARN monocaténaire de polarité positive (Figure 18). Le génome est composé d'une protéine virale génomique (VPg) attachée à l'extrémité 5', d'une région non-codante 5'UTR (*untranslated region*) qui contient, entre autres, la structure en feuille de trèfle IRES (*internal ribosomal entry site*), de la région codant les différentes protéines virales et enfin une région 3'UTR finissant par une queue poly(A) (Figure 18).

En plus des protéines de structure, le génome des RV code également des protéines non structurales appelées 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C et 3D. Ces protéines non structurales sont indispensables à la réplication des RV. Elles sont impliquées dans différentes fonctions bien identifiées (figure 19) (To et al., 2017) : (i) structuration de la capsidie en clivant la polyprotéine virale structurale grâce aux protéines 2A et 3C, (ii) participation à la structure du génome viral par la protéine 3B qui constitue VPg, (iii) réplication du génome viral grâce à l'activité ARN polymérase ARN-dépendante (RpRd) de la protéine 3D, (iv) ancrage du complexe de réplication aux membranes de la cellule hôte par les protéines 2B, 2C et 3A, (v) relargage des particules virales grâce à la protéine 2B et (vi) échappement au système immunitaire grâce à la protéine 3C qui peut cliver la protéine C3 du complément de l'hôte et certains récepteurs reconnaissant les pathogènes comme RIG-I.

### 2.1.1. Structure et classification des rhinovirus

D'après le dernier rapport du Comité International sur la Taxonomie des Virus (ICTV) en 2017, il existe plus de 150 sérotypes différents de RV répartis sur trois espèces A, B et C (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>). Les RV peuvent être classés également en fonction de leurs récepteurs d'entrée dans la cellule hôte (Figure 19).

La plupart des RV-A et tous les RV-B reconnaissent le récepteur ICAM-1 et constituent le groupe majeur des RV (Greve et al., 1989; Royston and Tapparel, 2016; Staunton et al., 1989). Les autres RV-A constituent le groupe mineur des RV et utilisent les récepteurs de la famille des LDLR (*low density lipoprotein receptors*) pour rentrer dans les cellules hôtes (Royston and Tapparel, 2016). Le récepteur CDHR3 (*human cadherin-related family member 3*) a été identifié comme le récepteur des RV-C (Bochkov et al., 2015).



**Figure 18. Principales caractéristiques structurales et organisationnelles des RV.**

(a) Schéma de la structure icosaédrique de la capside virale. (b) Schéma de l'organisation du génome virale et fonctions des protéines traduites. 3'UTR : région 3' non codante (*untranslated region*) ; 5'UTR : région 5' non codante ; ARNs<sup>b+</sup> : ARN simple brin de polarité positive ; IRES : site d'entrée interne des ribosomes (*internal ribosomal entry site*) ; VPg : protéine virale génomique. Figure de synthèse adaptée de Royston and Tapparel, 2016 et Thibaut et al., 2016



> 150  
sérotypes

### Figure 19. Classification des RV.

Diagramme de la répartition des sérotypes de RV en fonction de l'espèce (cercle intérieur) et des récepteurs cellulaires (cercle extérieur). CDHR3 : *human cadherin-related family member 3* ; ICAM-1 : *intercellular adhesion molecule 1* ; LDLR : *low density lipoprotein receptors* ; RV : rhinovirus.

Figure de synthèse adaptée de Royston and Tapparel, 2016 et Thibaut et al., 2016

### 2.1.2. Réplication des rhinovirus

La première étape de l'infection des cellules hôtes par RV consiste en l'attachement du virus à son récepteur cellulaire grâce à des interactions spécifiques avec VP1. L'attachement déclenche l'entrée du virus dans la cellule par endocytose dépendante ou non de la clarithrine ou par macropinocytose. Le pH acide des endosomes dégrade la capsid et libère le génome viral dans le cytosol. Aussitôt, le génome viral constitué d'ARN simple brin de polarité positive {ss(+)RNA} se comporte comme un ARN messenger (ARNm) et il est traduit en polyprotéine par les ribosomes qui reconnaissent la structure IRES. La réplication virale nécessite la formation de complexes de réplication composés de lipides, protéines et ARN viral. ss(+)RNA est d'abord transcrit en ARN simple brin de polarité négative {ss(-)RNA} par 3D en se servant de VPg (3B) comme amorce du côté 5'UTR. ss(-)RNA sert de matrice pour la synthèse de nouvelles copies de ss(+)RNA, également à l'aide de 3D et VPg. Les nouvelles copies de ss(+)RNA peuvent servir de matrice pour d'autres cycles de réplication ou d'ARNm pour la synthèse des protéines virales, ou peuvent aussi s'incorporer dans des capsides virales néosynthétisées. Le relargage des virions se fait par lyse des cellules infectées, ce qui provoque un effet cytopathique (ECP) sur les cultures de cellules permissives.

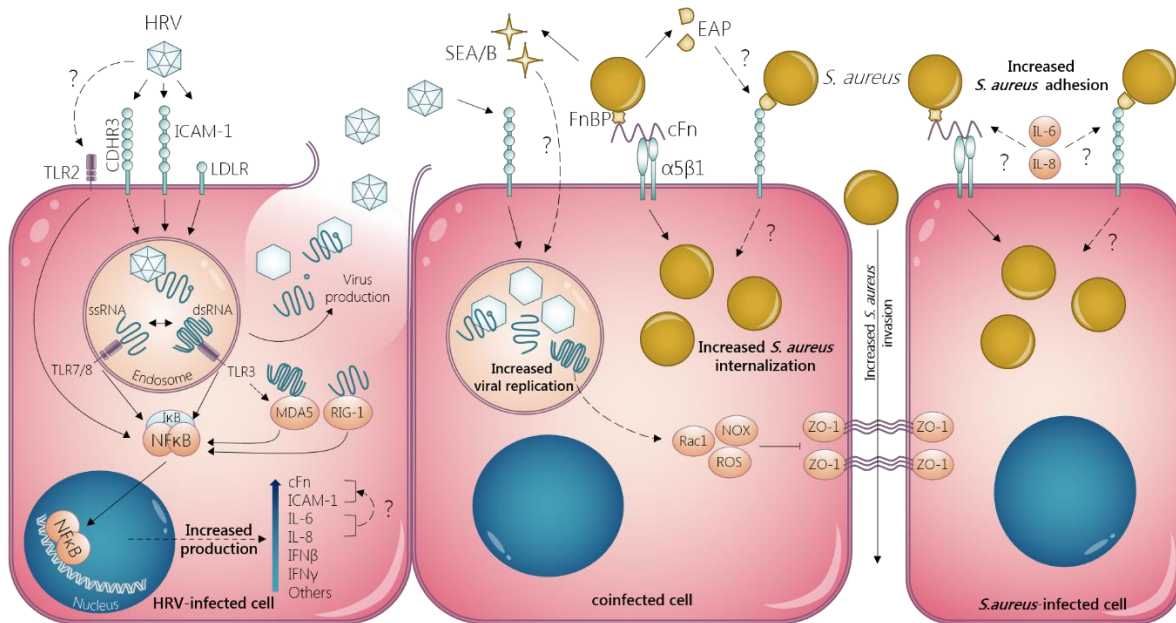
### 2.1.3. Culture in vitro des rhinovirus

Bien que l'isolement des RV en cultures cellulaires ait été abandonné par la majorité des laboratoires d'analyses médicales au profit des outils moléculaires plus rapides et plus sensibles, la culture virale in vitro reste indispensable pour l'étude des caractéristiques des RV, de leur pathogénèse et des cibles potentielles de traitement antiviral. Seulement quelques sérotypes de RV-A et RV-B sont cultivables in vitro. Les RV-C sont très difficiles à cultiver (Bochkov et al., 2015). RV possède un tropisme strictement humain rendant quasi-impossibles les études in vivo sur des modèles animaux. Seuls quelques primates non humains (chimpanzés et gibbons) sont sensibles aux RV. Des modèles de souris transgéniques ont été développés sans grand succès (Xatzipsalti and Papadopoulos, 2007). La culture in vitro des RV se fait classiquement sur les cellules fibroblastiques embryonnaires de poumons (HEL-299 ou MRC-5) ou sur certains clones de la lignée HeLa (HeLa-Ohio ou HeLa H1) (Jacobs et al., 2013). Quelques lignées de cellules épithéliales pulmonaires (A549, BEAS-2B et 16HB-E) ont été également utilisées pour l'infection par certains sérotypes de laboratoire de RV-A (Papi and Johnston, 1999; Passariello et al., 2006; Peng et al., 2006). Néanmoins, aucune de ces lignées n'est représentative de l'épithélium nasal. Quelques études ont eu recours à des cultures primaires de cellules épithéliales nasales ou à des explants nasaux humains (Bianco et al., 2000; Bochkov et al., 2015; Jang et al., 2005; Yu et al., 2011).

## 2.2. Revue : Interactions et mécanismes de synergie entre la colonisation à *S. aureus* et les virus respiratoires non influenza.

Les données cliniques ont montré que l'infection par RV augmente la charge de la colonisation nasale par *S. aureus* chez l'Homme et le risque de transmission en favorisant la dispersion de cette bactérie dans l'environnement (Bassetti et al., 2005; Bischoff et al., 2004, 2006, 2007; Hofstra et al., 2015; Merler et al., 2008; Sherertz et al., 1996). Les mécanismes impliqués dans cette synergie entre RV et *S. aureus* sont partiellement élucidés et représentés dans la figure 20. Les interactions semblent être bidirectionnelles : *S. aureus* favorise la réplication de RV selon un mécanisme inconnu impliquant les entérotoxines staphylococciques A et B ; d'autre part, RV favorise l'adhésion et l'internalisation de *S. aureus* in vitro en augmentant l'expression de la fibronectine cellulaire et du récepteur ICAM-1, ou l'invasion de l'épithélium en lésant les jonctions cellulaires serrées de type ZO-1 (*zona occludens 1*) (Passariello et al., 2006; Sajjan et al., 2008; Wang et al., 2007, 2009).

D'autre part, des études cliniques ont décrit une association entre les infections par RSV chez les enfants et la colonisation par *S. aureus* (Fukutani et al., 2015; Rosas-Salazar et al., 2016; Thorburn, 2006). L'infection par RSV semble favoriser l'adhésion de *S. aureus* aux cellules épithéliales in vitro et diminue sa clairance in vivo en altérant la réponse immunitaire de l'hôte (Blackwell et al., 1992; Paton and Goldwater, 1990; Saadi et al., 1993; Stark et al., 2006). Toutefois, contrairement à influenza, les interactions entre *S. aureus* et les autres virus respiratoires restent très peu étudiées. L'évaluation concrète de l'effet des infections virales sur la colonisation ou l'infection par *S. aureus* et des mécanismes potentiellement impliqués pourrait aider à proposer des stratégies préventives ou thérapeutiques adaptées.



**Figure 20. Mécanismes de synergie entre rhinovirus et *S. aureus* au niveau des cellules phagocytaires non professionnelles.**

*S. aureus* favorise la réplication de rhinovirus (HRV) à travers les entérotoxines SEA et SEB. HRV augmente l'adhésion et l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules grâce à l'augmentation de l'expression de la fibronectine cellulaire (cFn) et du récepteur majeur de rhinovirus ICAM-1 à travers l'activation du facteur nucléaire NFkB et l'augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires comme IL-6 et IL-8. HRV favorise également l'invasion de l'épithélium par *S. aureus* probablement à travers la production des espèces réactives à l'oxygène (ROS) et l'inhibition des jonctions cellulaires (ZO-1). Les points d'interrogation indiquent que les mécanismes d'interactions ou les voies de signalisation sont inconnus.

Figure de Morgene et al., 2018a.



Virulence



ISSN: 2150-5594 (Print) 2150-5608 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/kvir20>

## ***Staphylococcus aureus* colonization and non-influenza respiratory viruses: Interactions and synergism mechanisms**

M. Fedy Morgene, Elisabeth Botelho-Nevers, Florence Grattard, Sylvie Pillet, Philippe Berthelot, Bruno Pozzetto & Paul O. Verhoeven

To cite this article: M. Fedy Morgene, Elisabeth Botelho-Nevers, Florence Grattard, Sylvie Pillet, Philippe Berthelot, Bruno Pozzetto & Paul O. Verhoeven (2018) *Staphylococcus aureus* colonization and non-influenza respiratory viruses: Interactions and synergism mechanisms, *Virulence*, 9:1, 1354-1363, DOI: [10.1080/21505594.2018.1504561](https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1504561)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1504561>



© 2018 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.



Accepted author version posted online: 30 Jul 2018.  
Published online: 26 Aug 2018.



Submit your article to this journal [↗](#)




Article views: 64



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at  
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kvir20>

## ***Staphylococcus aureus* colonization and non-influenza respiratory viruses: Interactions and synergism mechanisms**

M. Fedy Morgene<sup>a</sup>, Elisabeth Botelho-Nevers<sup>a,b</sup>, Florence Grattard<sup>a,c</sup>, Sylvie Pillet<sup>a,c</sup>, Philippe Berthelot<sup>a,c</sup>, Bruno Pozzetto<sup>a,c</sup>, and Paul O. Verhoeven <sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>GIMAP EA 3064 (Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes), University of Lyon, Saint-Etienne, France; <sup>b</sup>Infectious Diseases Department, University Hospital of Saint-Etienne, Saint-Etienne, France; <sup>c</sup>Laboratory of Infectious Agents and Hygiene, University Hospital of Saint-Etienne, Saint-Etienne, France

### ABSTRACT

Viral infections of the respiratory tract can be complicated by bacterial superinfection, resulting in a significantly longer duration of illness and even a fatal outcome. In this review, we focused on interactions between *S. aureus* and non-influenza viruses. Clinical data evidenced that rhinovirus infection may increase the *S. aureus* carriage load in humans and its spread. In children, respiratory syncytial virus infection is associated with *S. aureus* carriage. The mechanisms by which some non-influenza respiratory viruses predispose host cells to *S. aureus* superinfection can be summarized in three categories: *i*) modifying expression levels of cellular patterns involved in *S. aureus* adhesion and/or internalization, *ii*) inducing *S. aureus* invasion of epithelial cells due to the disruption of tight junctions, and *iii*) decreasing *S. aureus* clearance by altering the immune response. The comprehension of pathways involved in *S. aureus*-respiratory virus interactions may help developing new strategies of preventive and curative therapy.

### ARTICLE HISTORY

Received 12 May 2018  
Accepted 23 July 2018

### KEYWORDS

*Staphylococcus aureus*; non-influenza respiratory viruses; human rhinovirus; respiratory syncytial virus; virus-bacterium interaction; nasal carriage

### Introduction

The development of upper and lower respiratory tract infections is determined by the interaction between one micro-organism and the host immune response. More recently, the interaction between the resident microbiota and incoming pathogens may also participate in the development of respiratory tract infections.

It has been postulated for a long time that viral infection of the respiratory tract indirectly predispose to bacterial superinfection by disruption of the respiratory mucosal epithelium [1], or passively through anatomical and mechanical changes like Eustachian tube dysfunction [2], ostiomeatal obstruction and reduced mucocilliary clearance [3]. Over the last decades, there was an increasing interest to investigate the contribution of bacterial colonization in the outcome of viral respiratory tract infections. The human respiratory tract is known to be the reservoir of diverse commensals and potential pathogens including mainly *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* that compose a significant part of the respiratory tract microbiota [4].


The role of interactions between viruses and bacteria in the pathogenesis of respiratory infections have been extensively studied in the literature and notably those between influenza viruses and *S. aureus* or *S.*

*pneumoniae* [5–10]. However, interactions between *S. aureus* and non-influenza respiratory viruses were not reviewed recently.

The aim of this report is to describe the current knowledge on possible interactions between *S. aureus* and non-influenza viral pathogens in the respiratory tract, with a focus on the mechanisms by which these interactions are potentially mediated.

### Impact of viral infections in the respiratory tract on *staphylococcus aureus* colonization

*S. aureus* is a commensal bacterium of the skin and mucosa, colonizing 15 to 36% of the whole population [11,12]. The main reservoir of *S. aureus* carriage in humans remains the nose [12], but other sites of carriage have been reported, such as the skin [11], pharynx [13,14], vagina [15], and rectum [16]. *S. aureus* is however a Janus-faced bacterium and beyond its commensal status, it is also a life-threatening pathogen. It is in fact considered to be one of the leading causes of nosocomial and community-acquired bacterial infections [17]. In addition to be the most common cause of bacteremia, with a 25% mortality rate despite appropriate treatment [18], it is also known as an etiological agent of other deep-seated

**CONTACT** Bruno Pozzetto  [bruno.pozzetto@univ-st-etienne.fr](mailto:bruno.pozzetto@univ-st-etienne.fr)

© 2018 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



infections including osteomyelitis, septic arthritis, endocarditis and device-related infections [17,19].

*S. aureus* is also an important pathogen in lung infection, mostly implicated in hospital-acquired pneumonia [17]. *S. aureus* expresses a wide repertoire of surface proteins that recognize cellular adhesive molecules and it is therefore able to adhere to and internalize into lung epithelial cells, which protects the bacteria from the host immune system and facilitate chronic infection [20]. *In vitro* experiments have demonstrated that the activation of NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) signaling pathway in infected pulmonary epithelial cells results in inflammation enhancement via IL-8 expression; furthermore, intracellular *S. aureus* can lead, after an initial lag period, to the apoptosis of these cells. [21,22] In necrotizing pneumonia, the key virulence factors of *S. aureus* associated with the apoptosis of lung cells were shown to be pore-forming toxins, namely Pantone-Valentine leukocidin (PVL) and alpha-hemolysin [23,24].

Besides, *S. aureus* is frequently involved in secondary bacterial pneumonia occurring during seasonal influenza outbreaks [8]. During the 2009 A/H1N1 influenza pandemic, bacterial co-infections complicated up to one-third of influenza cases in the United States in which *S. aureus* was the most common pathogen, accounting for 27% of the cases in both critically ill children and adults [25,26]. *S. aureus* co-infection was associated with significantly higher morbidity and mortality [26]. To date, the clinical association between the healthy carriage of *S. aureus* and the secondary staphylococcal pneumonia is still unclear. However, recent evidence from *in vitro* and *in vivo* tests showed that host physiologic changes induced by influenza virus can lead to the transition from asymptomatic colonization to invasive disease [27]. In addition to influenza viruses, *S. aureus* nasopharyngeal carriage has been found to be associated with some other respiratory viruses like rhinovirus and respiratory syncytial virus (RSV).

#### **Staphylococcus aureus and rhinovirus**

Rhinovirus is the second respiratory virus that has been most frequently reported to interact with *S. aureus*. Several studies showed that natural or experimental rhinovirus infection in *S. aureus* nasal carriers leads to increased *S. aureus* airborne dispersal, especially when sneezing is a part of the syndrome [28–33]. These studies emphasized that rhinovirus infection may facilitate the spreading of *S. aureus* from staphylococcal carriers to their environment and the transmission of the bacterium

between humans. A recent study showed that rhinovirus infection is associated with changes in the upper respiratory tract microbiota [34]. In this study, healthy adults who were experimentally infected by rhinovirus showed increase in the relative abundance of *H. parainfluenzae*, *Neisseria subflava* and *S. aureus*, and returned to their baseline level after the infection was cleared [34]. It has been also shown that experimental rhinovirus infection significantly increases *S. aureus* nasal load by 39% compared to baseline bacterial load [30]. These findings suggest that changes in the composition of respiratory microbiota following rhinovirus infection may play a role in the development of bacterial superinfection. However, the role of rhinovirus infection on the onset or increase of staphylococcal carriage in human remains poorly studied.

#### **Staphylococcus aureus and respiratory syncytial virus**

A prospective microbiological analysis showed that 40% of children with severe RSV bronchiolitis had a bacterial co-infection in their lower airways and were at increased risk for bacterial pneumonia [35]. Bacterial co-infection in children with RSV bronchiolitis seems to increase inflammatory markers, abnormal radiologic patterns and hospital stay [36,37]. In young infants with RSV bronchiolitis, *S. aureus*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis* and *S. pneumoniae* are the most common pathogens colonizing the nasopharynx and the lower airways [35,36].

A recent prospective study investigated the differences in the nasopharyngeal microbiome during acute respiratory tract infections due to human rhinovirus or RSV in 135 infants aged less than 6 months [38]. By contrast to previous studies, *S. aureus* was not found among the most abundant bacteria. However, the difference of *S. aureus* abundance was significantly higher in RSV than in rhinovirus-infected infants [38]. Another prospective study investigated the nasopharyngeal microbiota in young infants with RSV infections by 16S-RNA sequencing; the authors found that RSV infection was positively associated with *H. influenzae* and *S. pneumoniae*, but negatively associated with *S. aureus* nasopharyngeal colonization [39]. In another study concerning nasopharyngeal aspirates from children with RSV infection aged between 6 months and 2 years, *S. aureus* was shown to colonize 77% of RSV-infected patients with a positive association between RSV and *S. aureus* nasopharyngeal carriage [40]. The conflicting data from the two latter studies may be explained by differences in target populations, sampling procedures and/or microbiological methods.

To date, most of the studies dedicated to the impact of RSV infection on the bacterial colonization of the upper respiratory airways identified a synergistic interaction between RSV and *S. pneumoniae* [41,42]. Nevertheless, nasopharyngeal colonization with *S. aureus* is clearly more than a passive phenomenon during RSV infection and further studies are needed to elucidate the interactions between these 2 pathogens.

There is no doubt that the impact of infection with respiratory non-influenza viruses on *S. aureus* colonization is important and should not be neglected as this may worsen the disease outcome and even be fatal in some cases [43]. The recent technical breakthrough of molecular diagnostic will be of precious help to investigate the changes in nasopharyngeal microbiota composition and notably in staphylococcal carriage during non-influenza viral infections of the respiratory tract.

#### **Mechanisms involved in interactions between *staphylococcus aureus* and non-influenza respiratory viruses**

The high incidence of staphylococcal superinfection during pandemic and seasonal influenza and the important mortality risk associated to this condition promoted the in-depth investigation of the molecular and immunologic mechanisms that are involved in the bidirectional synergism between both pathogens. Influenza virus is known to promote staphylococcal superinfection by alteration of the host immune system via increased production of pro-inflammatory cytokines and interferons (IFNs), impairment of phagocytic cell functions and suppression of type 17 immunity [9,10]. In addition, influenza virus has been shown to promote *S. aureus* adhesion and internalization within non-professional phagocytic cells through at least two distinct mechanisms: binding of bacteria to the membrane-associated hemagglutinin of influenza-infected cells, and binding of bacteria to free virions, followed by internalization of virus-coated bacteria into non-infected cells [44]. Besides, *S. aureus* co-infection promotes influenza virus replication and pathogenicity; indeed, extracellular bacteria secrete staphylokinase that facilitates the binding of influenza virus to the host cells, whereas intracellular *S. aureus* inhibits influenza virus-induced type I IFN signaling through impaired signal transducers and activators of transcription (STAT1 and STAT2) dimerization [45,46]. While the mechanisms of interaction between *S. aureus* and influenza virus seem to be deeply understood, the interactions between *S. aureus* and other respiratory viruses were less investigated. Table 1 summarizes the main mechanisms and pathways potentially involved in the interactions between *S. aureus* and non-influenza respiratory viruses.

#### ***Staphylococcus aureus* and rhinovirus**

Rhinovirus, the most common cause of upper respiratory tract infections (URTI), primarily targets the nasal and nasopharyngeal epithelial cells [47]. The innate immune system recognizes rhinovirus by different Pattern Recognition Receptors (PRRs) including membrane and endosomal Toll-like Receptors (TLRs) and cytoplasmic inducible RNA helicases like retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I) or melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5) [48]. Rhinovirus infection promotes pro-inflammatory cytokines and IFN production mainly through the activation of NFκB [49,50].

Several potential mechanisms through which rhinovirus increases susceptibility to bacterial infection have been demonstrated *in vitro* in epithelial cells of the upper and lower airways. In 1981, Selinger, Reed and McLaren developed an *in vitro* model for studying bacterial adherence to virus-infected epithelial cells [51]. They reported that the adherence of *S. aureus* was significantly higher in rhinovirus-infected cells compared to uninfected cells. Only recently, various *in vitro* studies have shown that inflammation due to rhinovirus infection increased cellular patterns that facilitate the adhesion and internalization of *S. aureus* within host cells [52–56].

#### ***Rhinovirus promotes cellular fibronectin expression***

In primary human nasal epithelial cells, it has been demonstrated that rhinovirus infection up-regulates the expression of cellular fibronectin [54,56]. The up-regulation of fibronectin was observed at both transcriptional and translational levels and seems to be related to the rhinovirus-induced NFκB activation [56]. Fibronectin is known to mediate the adhesion and the internalization of *S. aureus* in the presence of epithelial cells [57]. The fibronectin-binding protein A or B (FnBPA/B) are *S. aureus* cell wall-anchored Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMMs) that bind type I motif of fibronectin through a tandem beta-zipper interaction [58]. The α5β1 integrin expressed on host cell membrane binds the RGD motif of fibronectin [59]. Fibronectin is thus acting as a bridge between *S. aureus* and the host cell, and the complex formed by FnBPA/B, fibronectin and α5β1 integrin leads to *S. aureus* internalization inside the epithelial cell [57]. Then the up-regulation of fibronectin expression in epithelial cells during rhinovirus infection could explain the increase of *S. aureus* epithelial cells adhesion [54,56].



**Table 1.** Virulence factors involved in molecular mechanisms of interactions between *Staphylococcus aureus* and non-influenza respiratory viruses.

Virulence factors	Cellular target	Effects	Synergism	References
<b>Staphylococcus aureus</b>				
SEA/SEB	Unknown	Increase of IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 secretion	Increase of ICAM-1 expression Enhancement of rhinovirus replication	[53,83–85]
LTA	Unknown	Increase of IL-6, IL-12/IL-23 and IFN- $\gamma$ secretion	Increase of susceptibility to coronavirus	[98]
<b>Human rhinovirus</b>				
Capsid	Membrane TLR2	NF $\kappa$ B activation	Increase of cFn and ICAM-1 expression	[48,51–56]
ssRNA	Endosomal TLR7/8	Increase of IL-6, IL-8, INF $\beta$ and IFN- $\gamma$ secretion	Increase of <i>S. aureus</i> adhesion and internalization to/in host cells	
dsRNA	Cytoplasmic RIG-I	Increase of IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , RANTES, IL-8, IP-10 and ENA78 secretion		
	Cytoplasmic MDA5	RIG-I and MDA5 upregulation		
	Endosomal TLR3	NF $\kappa$ B activation		
		Increase of IL-6, IL-8, INF- $\beta$ and IFN- $\gamma$ secretion		
	Unknown	Rac1 activation NOX1 production Stimulation of ROS generation	Loss of ZO-1 tight junctions Induce <i>S. aureus</i> invasion of the epithelium	[78,81]
<b>Respiratory Syncytial Virus</b>				
Viral envelope	Membrane TLR2	NF $\kappa$ B activation	Alteration of neutrophil recruitment	[87,90,93,94,99]
Viral F protein	Membrane TLR4	Increase of pro-inflammatory cytokine secretion	Inhibition of B cells response	
ssRNA	Endosomal TLR3	IRFs activation	Decrease of <i>S. aureus</i> clearance	
dsRNA	Cytoplasmic RIG-I			
	Cytoplasmic Nod2	Increase of type I IFNs secretion		
	Endosomal TLR7			
	Cytoplasmic MDA5			
Unknown	NKG2D	Increase of IFN- $\gamma$ secretion		
Unknown	Unknown	Increase of Lewis blood group antigen expression	Increase of toxin-producing <i>S. aureus</i> binding to epithelial cells	[88,89,91]

### Rhinovirus promotes ICAM-1 expression

The intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), which is the receptor of the major group of rhinoviruses [60], have been found to be overexpressed during rhinovirus infection [52,61]. Adhesion and internalization of *S. aureus* to epithelial cells is also mediated by ICAM-1 [52,54]. Both immortalized pneumocytes (A549 cell line) and primary human nasal epithelial cells have been found to release higher levels of IL-6 and IL-8 when infected by rhinovirus and subsequently overexpressed ICAM-1. The pro-inflammatory effect of IL-6 and IL-8 also induces an overexpression of ICAM-1 in the surrounding uninfected cells, which increases *S. aureus* uptake by the epithelial cells [52]. The up-regulation of ICAM-1 and pro-inflammatory cytokines in rhinovirus-infected epithelial cells seems to follow the NF $\kappa$ B pathway [61–63].

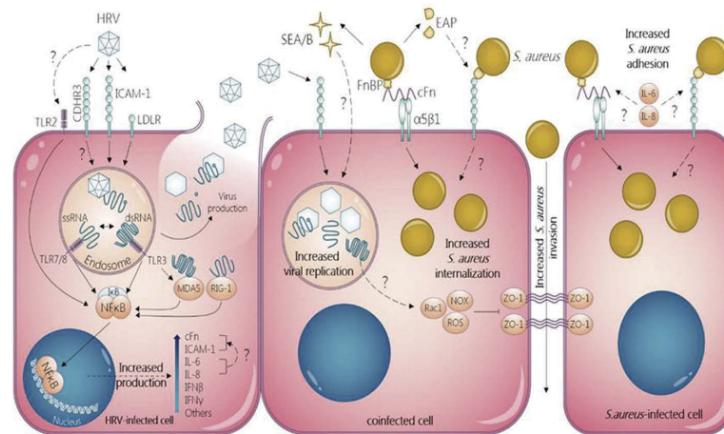
Interestingly, the extracellular adherence protein (EAP), an adhesin naturally secreted by *S. aureus*, was found to bind ICAM-1 [64]. EAP belongs to Secreted Expanded Repertoire Adhesive Molecules (SERAMs) and is involved in bacterial aggregation [65], adhesion and invasion of epithelial and fibroblastic cells [66–68], and in preventing neutrophil recruitment [64,69–72]. In addition to ICAM-1, EAP can also bind a large variety of extracellular matrix and plasma proteins including collagen, fibrinogen, fibronectin, vitronectin, laminin,

thrombospondin and prothrombin [64,65,73–75]. Taken together, it can be hypothesized that the ligation of *S. aureus* to ICAM-1, whose expression is enhanced by rhinovirus infection, is mediated by EAP.

### Rhinovirus disrupts tight junctions

The mucosal barrier of the nasal cavity is the first site of exposure to inhaled respiratory pathogens and plays an important role in host defenses in terms of innate immunity. Its integrity is regulated in large part by tight junctions of epithelial cells [76], which is a complex of several internal and membrane proteins including occludin and zona occludens (ZO) proteins [77]. Rhinovirus infection disrupts the barrier function of the airway epithelium through the dissociation of ZO-1 and occludin from the tight junction complex [78]. Rhinovirus infection has been shown to induce oxidative stress in respiratory epithelial cells by generating reactive oxygen species (ROS) [79]. ROS generation is induced by double-strands of viral RNA (dsRNA) that appear transiently during rhinovirus replication, and is produced by NADPH oxidase [78]. In non-phagocytic cells, ROS act as a molecular switch to stimulate pro-inflammatory responses [80]. Nevertheless, ROS generation disrupts the barrier function of rhinovirus-infected cells [78]. Thus, a perturbation of the tight junction barrier function increases paracellular permeability, facilitates translocation of pathogens and their soluble

1358 M. F. MORGÈNE ET AL.



**Figure 1. Mechanisms of bi-directional synergism between *Staphylococcus aureus* and human rhinovirus in non-professional phagocytic epithelial cells.** *S. aureus* increases HRV replication via SEA and SEB. HRV increases adhesion and internalization of *S. aureus* in both HRV-infected and uninfected cells through increased release of IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 and subsequent increase of ICAM-1 and cFn expression via NF $\kappa$ B activation. HRV inhibits ZO-1 tight junctions favoring *S. aureus* invasion of the epithelium.

products, and exposes basolateral receptors. It has been found that the infection of primary human airway epithelial cells with both major and minor groups of rhinovirus promoted the paracellular migration of *S. aureus* and its epithelium invasion [81]. The rhinovirus infection facilitates also the transmigration of other bacterial species like *H. influenzae* and *Pseudomonas aeruginosa* [81]. This provides insights into another mechanism by which rhinovirus can predispose the host to secondary bacterial infections.

#### **Staphylococcal enterotoxins a and b promote rhinovirus replication**

Interactions between rhinovirus and *S. aureus* have been shown to be bi-directional: whereas rhinovirus promotes *S. aureus* adhesion and internalization within host cells, *S. aureus* enhances the rhinovirus replication [53]. *S. aureus* secretes several toxins including pore-forming toxins, toxic shock syndrome toxin and enterotoxins [82]. *In vitro*, staphylococcal enterotoxins A and B (SEA and SEB) were shown to enhance the rhinovirus replication in A549 epithelial cells in a dose-dependent manner; however, they were found able to enhance neither ICAM-1 expression nor IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 secretion [53]. In contrast, studies using other cellular models (normal human keratinocytes, coculture of human peripheral blood mononuclear cells and A549 cells, or primary nasal epithelial cell cultures) showed that these enterotoxins induced ICAM-1 expression or the secretion of pro-inflammatory cytokines [83–85]. Therefore, the mechanisms involved in the

promotion of rhinovirus replication via staphylococcal enterotoxins need to be studied more in-depth.

All these experimental data provide evidence of bi-directional synergism between rhinovirus and *S. aureus*. The different mechanisms described above are summarized in Figure 1. Nevertheless, the molecular pathways of these mechanisms remain poorly understood and deserve further investigation.

#### **Staphylococcus aureus and respiratory syncytial virus**

RSV is a worldwide seasonal virus that affects mainly young children. RSV disease manifestations can vary from mild URTI to severe pneumonia or bronchiolitis, which can lead to hospitalization and serious complications like respiratory failure [86]. Despite the high incidence of bacterial and RSV co-infection in both children and adults, only few studies aimed to investigate the possible interactions between *S. aureus* and this virus [87–90]. RSV is supposed to exacerbate *S. aureus* co-infection via at least two mechanisms: enhancing the adhesion of *S. aureus* to the RSV-infected cells [88,89], and decreasing the bacterial clearance by altering the immune response to *S. aureus* [87,90].

#### **RSV infection enhances staphylococcus aureus adhesion**

*In vitro* studies had shown that RSV-infected epithelial cells bind more *S. aureus* than uninfected cells [88,89]. Study of

nasal washings in patients with respiratory virus diseases has shown that secretion of Lewis blood group antigens is associated with RSV infection [91]. In addition, epithelial cells (HEp2) expressing high concentrations of antigens of the Lewis blood group bound significantly more *S. aureus* than cells expressing low concentrations of these antigens [88,89]. While RSV infects about 50% of infants by the first year of life, Lewis antigen is expressed in secretions of nearly 90% of 3 month-aged infants [88,89]. This may explain the high susceptibility of RSV-infected infants to secondary staphylococcal infection, sometimes resulting in lethal issue [92]. Nevertheless, the molecular patterns involved in RSV-related increase of *S. aureus* adhesion to host cells remain unknown.

#### **RSV alters the immune response to staphylococcus aureus**

Pro-inflammatory cytokines and type I IFNs are known to be secreted by RSV-infected epithelial cells after viral sensing by different PRRs, mainly through NF $\kappa$ B and Interferon Regulation Factors (IRFs) pathways [93]. In addition, IFN- $\gamma$  (type II IFN) seems to play an important role in the immune response to RSV as it activates the T cell response [94]. It has been demonstrated that RSV infection of human adult or neonatal mononuclear leukocytes results in significant inhibition of the lymphoproliferative response to heat-killed *S. aureus* [87]. This inhibitory effect on the development of cell-mediated immune response could be due in part to the increased secretion of IFN- $\gamma$  [87]. IFN- $\gamma$  was shown to reduce RSV replication in epithelial cells and also to inhibit B cell responses, which may alter the humoral response to *S. aureus* infection and decrease the bacterial clearance [87,94].

Murine models had been used to demonstrate that, despite the increased number of inflammatory cells, RSV decreases the clearance of *S. aureus* and other pathogenic bacteria like *S. pneumoniae* and *P. aeruginosa* from the lungs of mice following secondary bacterial infection [90]. It was suggested that RSV alters neutrophil function via changes in inflammatory response and cytokine secretion in the lung. Further studies are needed to delineate the different immunological pathways that sustain the decrease of bacterial clearance and the increase of susceptibility to secondary infections by *S. aureus* following RSV infection.

#### **Staphylococcus aureus and other respiratory tract viruses**

*S. aureus* interactions with rhinovirus or RSV have been actively, yet insufficiently, investigated. However, bacterial interactions with other respiratory viruses are

poorly studied and only partial studies are available. For example, parainfluenza virus has been shown to enhance the ability of non-typeable *H. influenzae* and *S. pneumoniae* to adhere to human respiratory epithelial cells [95]. However, there is no information available about the interaction of these agents with *S. aureus* in humans. Only one *in vitro* study conducted on bovine embryonic lung cells investigated the effect of bovine parainfluenza virus infection on adherence of several bacterial agents, including *S. aureus*, and found no virus-specific effect on any of the tested bacteria [96]. Besides, normal human bronchial epithelial cells that were pre-incubated with *S. pneumoniae* resulted in an increased susceptibility to infection with human metapneumovirus. Nevertheless, this was not the case for cells pre-incubated with *H. influenzae*, *M. catarrhalis* or *S. aureus* [97]. On the contrary, synergistic effect between *S. aureus* and coronavirus has been demonstrated *in vivo* in a swine model. Lipoteichoic acid from *S. aureus* increased the susceptibility to coronavirus infection in pigs via increased secretion of pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-12, IL-23 and IFN- $\gamma$  [98]. To date, the lack of clinical and experimental data about the relationship between *S. aureus* colonization and other respiratory viruses complicates the understanding of potential interactions between these pathogens.

#### **Concluding remarks**

While clinical and mechanistic aspects of the synergism between *S. aureus* and influenza virus have been deeply studied, the interactions between this bacterium and other common respiratory viruses were only partially investigated [10]. Literature still lacks more data about the relations between *S. aureus* carriage and non-influenza respiratory virus infections, as well as deeper insights into mechanisms of interactions between these different pathogens. The evaluation of the concrete risk of switch from commensal *S. aureus* colonization to invasive disease during viral respiratory tract infections may help us to propose efficient strategies of decolonization when needed. Furthermore, the comprehension of the involved molecular pathways may help to develop new strategies of preventive and curative treatments.

CDHR3: Cadherin-Related Family Member 3; cFn: cellular Fibronectin; dsRNA: double-stranded RNA; ENA78: Epithelial Neutrophil Activating peptide-78; FnBP: Fibronectin Binding Protein; HRV: Human Rhinovirus; ICAM-1: InterCellular Adhesion Molecule 1; IFN: Interferon; IL: Interleukin; IRFs: Interferon Regulator Factors; I $\kappa$ B: NF $\kappa$ B Inhibitor; LDLR: Low-Density Lipoprotein Receptor; MDA5: Melanoma Differentiation Associated protein-5; NF $\kappa$ B: Nuclear



1360 M. F. MORGÈNE ET AL.

*Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*; *NKG2D*: Natural Killer Group 2D receptor; *Nod2*: Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2; *NOX*: membrane-bound NADPH OXidase; *Rac1*: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1; *RANTES*: Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted chemokine; *RIG-I*: Retinoic acid Inducible Gene-1; *ROS*: Reactive Oxygen Species; *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*; *SEA*: Staphylococcal Enterotoxin A; *SEB*: Staphylococcal Enterotoxin B; *ssRNA*: single-stranded RNA; *TLR*: Toll-Like receptor; *ZO-1*: Zona Occludens 1.


### Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

### Funding

M.F.M. was funded by a PhD scholarship from the European Erasmus Mundus–Al Idrisi program supported by the University of Granada, Spain.

### ORCID

Paul O. Verhoeven  <http://orcid.org/0000-0003-4352-1263>

### References

- Bakaletz LO. Viral potentiation of bacterial superinfection of the respiratory tract. *Trends Microbiol.* 1995;3:110–114.
- McBride TP, Doyle WJ, Hayden FG, et al. Alterations of the eustachian tube, middle ear, and nose in rhinovirus infection. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1989;115:1054–1059.
- Gwaltney JM. Acute community-acquired sinusitis. *Clin Infect Dis.* 1996;23:1209–1223.
- Robinson J. Colonization and infection of the respiratory tract: what do we know? *Paediatr Child Health.* 2004;9:21–24.
- McCullers JA. Insights into the interaction between influenza virus and *Pneumococcus*. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:571–582.
- DeLeo FR, Musser JM. Axis of coinfection evil. *J Infect Dis.* 2010;201:488–490.
- Metzger DW, Sun K. Immune dysfunction and bacterial coinfections following influenza. *J Immunol.* 2013;191:2047–2052.
- Papanicolaou GA. Severe influenza and *S.aureus* pneumonia. *Virulence.* 2013;4:666–668.
- Robinson KM, Kolls JK, Alcorn JF. The immunology of influenza virus-associated bacterial pneumonia. *Curr Opin Immunol.* 2015;34:59–67.
- Rynda-Apple A, Robinson KM, Alcorn JF. Influenza and bacterial superinfection: illuminating the immunologic mechanisms of disease. *Infect Immun.* 2015;83:3764–3770.
- Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis.* 2005;5:751–762.
- Verhoeven PO, Gagnaire J, Botelho-Nevers E, et al. Detection and clinical relevance of *Staphylococcus aureus* nasal carriage: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014;12:75–89.
- Mertz D, Frei R, Periat N, et al. Exclusive *Staphylococcus aureus* throat carriage: at-risk populations. *Arch Intern Med.* 2009;169:172–178.
- Verhoeven PO, Haddar CH, Grattard F, et al. Does pharyngeal sampling improve the detection of nasopharyngeal persistent carriers of *Staphylococcus aureus*? *J Infect.* 2015;70:549–552.
- Bourgeois-Nicolaos N, Lucet J-C, Daubié C, et al. Maternal vaginal colonisation by *Staphylococcus aureus* and newborn acquisition at delivery. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2010;24:488–491.
- Gagnaire J, Verhoeven PO, Grattard F, et al. Epidemiology and clinical relevance of *Staphylococcus aureus* intestinal carriage: a systematic review and meta-analysis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2017;15:767–785.
- Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, et al. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28:603–661.
- Melzer M, Welch C. Thirty-day mortality in UK patients with community-onset and hospital-acquired methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *J Hosp Infect.* 2013;84:143–150.
- Kern WV. Management of *Staphylococcus aureus* bacteremia and endocarditis: progresses and challenges. *Curr Opin Infect Dis.* 2010;23:346–358.
- Josse J, Laurent F, Diot A. Staphylococcal adhesion and host cell invasion: fibronectin-binding and other mechanisms. *Front Microbiol.* 2017;8:2433.
- Kahl BC, Goulian M, Van Wamel W, et al. *Staphylococcus aureus* RN6390 replicates and induces apoptosis in a pulmonary epithelial cell line. *Infect Immun.* 2000;68:5385–5392.
- Ratner AJ, Bryan R, Weber A, et al. Cystic fibrosis pathogens activate Ca<sup>2+</sup>-dependent mitogen-activated protein kinase signaling pathways in airway epithelial cells. *J Biol Chem.* 2001;276:19267–19275.
- Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, et al. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science.* 2007;315:1130–1133.
- Bubeck Wardenburg J, Bae T, Otto M, et al. Poring over pores: alpha-hemolysin and Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Nat Med.* 2007;13:1405–1406.
- Randolph AG, Vaughn F, Sullivan R, et al. Critically ill children during the 2009–2010 influenza pandemic in the United States. *Pediatrics.* 2011;128:e1450–8.
- Rice TW, Rubinson L, Uyeki TM, et al. Critical illness from 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus and bacterial coinfection in the United States. *Crit Care Med.* 2012;40:1487–1498.
- Reddinger RM, Luke-Marshall NR, Hakansson AP, et al. Host physiologic changes induced by influenza A virus lead to *Staphylococcus aureus* biofilm dispersion and transition from asymptomatic colonization to invasive disease. *mBio.* 2016;7:e01235–16.
- Sherertz RJ, Reagan DR, Hampton KD, et al. A cloud adult: the *Staphylococcus aureus*-virus interaction revisited. *Ann Intern Med.* 1996;124:539–547.

- Bischoff WE, Bassetti S, Bassetti-Wyss BA, et al. Airborne dispersal as a novel transmission route of coagulase-negative staphylococci: interaction between coagulase-negative staphylococci and rhinovirus infection. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2004;25:504–511.
- Bassetti S, Bischoff WE, Walter M, et al. Dispersal of *Staphylococcus aureus* into the air associated with a rhinovirus infection. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2005;26:196–203.
- Bischoff WE, Wallis ML, Tucker BK, et al. “Gesundheit!” sneezing, common colds, allergies, and *Staphylococcus aureus* dispersion. *J Infect Dis.* 2006;194:1119–1126.
- Bischoff WE, Tucker BK, Wallis ML, et al. Preventing the airborne spread of *Staphylococcus aureus* by persons with the common cold: effect of surgical scrubs, gowns, and masks. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007;28:1148–1154.
- Merler S, Poletti P, Ajelli M, et al. Coinfection can trigger multiple pandemic waves. *J Theor Biol.* 2008;254:499–507.
- Hofstra JJ, Matamoros S, Van De Pol MA, et al. Changes in microbiota during experimental human rhinovirus infection. *BMC Infect Dis.* 2015;15:336.
- Thorburn K. High incidence of pulmonary bacterial co-infection in children with severe respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis. *Thorax.* 2006;61:611–615.
- Suárez-Arrabal MC, Mella C, Lopez SM, et al. Nasopharyngeal bacterial burden and antibiotics: influence on inflammatory markers and disease severity in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect.* 2015;71:458–469.
- Jiang W, Wang T, Li L, et al. Impact of bacteria in nasal aspirates on disease severity of bronchiolitis. *Infect Dis.* 2016;48:82–86.
- Rosas-Salazar C, Shilts MH, Tovchigrechko A, et al. Differences in the nasopharyngeal microbiome during acute respiratory tract infection with human rhinovirus and respiratory syncytial virus in infancy. *J Infect Dis.* 2016;214:1924–1928.
- De Steenhuisen Piters WAA, Heinonen S, Hasrat R, et al. Nasopharyngeal microbiota, host transcriptome, and disease severity in children with respiratory syncytial virus infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;194:1104–1115.
- Fukutani KF, Nascimento-Carvalho CM, Van Der Gucht W, et al. Pathogen transcriptional profile in nasopharyngeal aspirates of children with acute respiratory tract infection. *J Clin Virol.* 2015;69:190–196.
- Stensballe LG, Hjulter T, Andersen A, et al. Hospitalization for respiratory syncytial virus infection and invasive pneumococcal disease in Danish children aged <2 years: a population-based cohort study. *Clin Infect Dis.* 2008;46:1165–1171.
- Weinberger DM, Klugman KP, Steiner CA, et al. Association between respiratory syncytial virus activity and pneumococcal disease in infants: a time series analysis of US hospitalization data. *PLoS Med.* 2015;12:e1001776.
- Metersky ML, Masterton RG, Lode H, et al. Epidemiology, microbiology, and treatment considerations for bacterial pneumonia complicating influenza. *Int J Infect Dis.* 2012;16:e321–31.
- Passariello C, Nencioni L, Sgarbanti R, et al. Viral hemagglutinin is involved in promoting the internalisation of *Staphylococcus aureus* into human pneumocytes during influenza A H1N1 virus infection. *Int J Med Microbiol.* 2011;301:97–104.
- Scheiblauer H, Reinacher M, Tashiro M, et al. Interactions between bacteria and influenza A virus in the development of influenza pneumonia. *J Infect Dis.* 1992;166:783–791.
- Warnking K, Klemm C, Löffler B, et al. Super-infection with *Staphylococcus aureus* inhibits influenza virus-induced type I IFN signalling through impaired STAT1-STAT2 dimerization. *Cell Microbiol.* 2015;17:303–317.
- Mäkelä MJ, Puhakka T, Ruuskanen O, et al. Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. *J Clin Microbiol.* 1998;36:539–542.
- Gavala ML, Bertics PJ, Gern JE. Rhinoviruses, allergic inflammation, and asthma: rhinovirus infections, allergy, and asthma. *Immunol Rev.* 2011;242:69–90.
- Triantafilou K, Vakakis E, Richer EA, et al. Human rhinovirus recognition in non-immune cells is mediated by Toll-like receptors and MDA-5, which trigger a synergistic pro-inflammatory immune response. *Virulence.* 2011;2:22–29.
- Slater L, Bartlett NW, Haas JJ, et al. Co-ordinated role of TLR3, RIG-I and MDA5 in the innate response to rhinovirus in bronchial epithelium. *PLoS Pathog.* 2010;6:e1001178.
- Selinger DS, Reed WP, McLaren LC. Model for studying bacterial adherence to epithelial cells infected with viruses. *Infect Immun.* 1981;32:941–944.
- Passariello C, Schippa S, Conti C, et al. Rhinoviruses promote internalisation of *Staphylococcus aureus* into non-fully permissive cultured pneumocytes. *Microbes Infect Inst Pasteur.* 2006;8:758–766.
- Wang JH, Kwon H-J, Lee B-J, et al. Staphylococcal enterotoxins A and B enhance rhinovirus replication in A549 cells. *Am J Rhinol.* 2007;21:670–674.
- Wang JH, Kwon HJ, Jang YJ. Rhinovirus enhances various bacterial adhesions to nasal epithelial cells simultaneously. *Laryngoscope.* 2009;119:1406–1411.
- Wang JH, Lee SH, Kwon HJ, et al. Clarithromycin inhibits rhinovirus-induced bacterial adhesions to nasal epithelial cells. *Laryngoscope.* 2010;120:193–199.
- Min J-Y, Shin S-H, Kwon HJ, et al. Levocetirizine inhibits rhinovirus-induced bacterial adhesion to nasal epithelial cells through down-regulation of cell adhesion molecules. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2012;108:44–48.
- Hauck CR, Ohlsen K. Sticky connections: extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9:5–11.
- Schwarz-Linek U, Werner JM, Pickford AR, et al. Pathogenic bacteria attach to human fibronectin through a tandem beta-zipper. *Nature.* 2003;423:177–181.
- Sinha B, François PP, Nüs Se O, et al. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin  $\alpha 5 \beta 1$ . *Cell Microbiol.* 1999;1:101–117.
- Van Kempen M, Bachert C, Van Cauwenberge P. An update on the pathophysiology of rhinovirus upper respiratory tract infections. *Rhinology.* 1999;37:97–103.
- Jang YJ, Wang JH, Kim JS, et al. Levocetirizine inhibits rhinovirus-induced ICAM-1 and cytokine expression and



- viral replication in airway epithelial cells. *Antiviral Res.* 2009;81:226–233.
- Papi A, Johnston SL. Rhinovirus infection induces expression of its own receptor intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) via increased NF- $\kappa$ B-mediated transcription. *J Biol Chem.* 1999;274:9707–9720.
- Kim J, Sanders SP, Siekierski ES, et al. Role of NF- $\kappa$ B in cytokine production induced from human airway epithelial cells by rhinovirus infection. *J Immunol.* 2000;165:3384–3392.
- Chavakis T, Hussain M, Kanse SM, et al. *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat Med.* 2002;8:687–693.
- Palma M, Haggar A, Flock JI. Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *J Bacteriol.* 1999;181:2840–2845.
- Hussain M, Haggar A, Heilmann C, et al. Insertional inactivation of Eap in *Staphylococcus aureus* strain Newman confers reduced staphylococcal binding to fibroblasts. *Infect Immun.* 2002;70:2933–2940.
- Haggar A, Hussain M, Lonnie H, et al. Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells. *Infect Immun.* 2003;71:2310–2317.
- Bur S, Preissner KT, Herrmann M, et al. The *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein promotes bacterial internalization by keratinocytes independent of fibronectin-binding proteins. *J Invest Dermatol.* 2013;133:2004–2012.
- Lee LY, Miyamoto YJ, McIntyre BW, et al. The *Staphylococcus aureus* Map protein is an immunomodulator that interferes with T cell-mediated responses. *J Clin Invest.* 2002;110:1461–1471.
- Harraghy N. The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional *Staphylococcus aureus* protein Eap. *Microbiology.* 2003;149:2701–2707.
- Chavakis T, Wiechmann K, Preissner KT, et al. *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial “secretable expanded repertoire adhesive molecules” (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb Haemost.* 2005;94:278–285.
- Athanasopoulos AN, Economopoulou M, Orlova VV, et al. The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* inhibits wound healing by interfering with host defense and repair mechanisms. *Blood.* 2006;107:2720–2727.
- Vercellotti GM, McCarthy JB, Lindholm P, et al. Extracellular matrix proteins (fibronectin, laminin, and type IV collagen) bind and aggregate bacteria. *Am J Pathol.* 1985;120:13–21.
- Bodén MK, Flock JI. Evidence for three different fibrinogen-binding proteins with unique properties from *Staphylococcus aureus* strain Newman. *Microb Pathog.* 1992;12:289–298.
- McGavin MH, Krajewska-Pietrasik D, Rydén C, et al. Identification of a *Staphylococcus aureus* extracellular matrix-binding protein with broad specificity. *Infect Immun.* 1993;61:2479–2485.
- Kojima T, Go M, Takano K, et al. Regulation of tight junctions in upper airway epithelium. *Biomed Res Int.* 2013;2013:947072.
- Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;286:C1213–28.
- Comstock AT, Ganesan S, Chatteraj A, et al. Rhinovirus-induced barrier dysfunction in polarized airway epithelial cells is mediated by NADPH oxidase 1. *J Virol.* 2011;85:6795–6808.
- Biagioli MC, Kaul P, Singh I, et al. The role of oxidative stress in rhinovirus induced elaboration of IL-8 by respiratory epithelial cells. *Free Radic Biol Med.* 1999;26:454–462.
- Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82:47–95.
- Sajjan U, Wang Q, Zhao Y, et al. Rhinovirus disrupts the barrier function of polarized airway epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;178:1271–1281.
- Otto M. *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr Opin Microbiol.* 2014;17:32–37.
- Morishita Y, Tada J, Sato A, et al. Possible influences of *Staphylococcus aureus* on atopic dermatitis— the colonizing features and the effects of staphylococcal enterotoxins. *Clin Exp Allergy J.* 1999;29:1110–1117.
- Krakauer T. Stimulant-dependent modulation of cytokines and chemokines by airway epithelial cells: cross talk between pulmonary epithelial and peripheral blood mononuclear cells. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9:126–131.
- Damm M, Quante G, Rosenbohm J, et al. Proinflammatory effects of *Staphylococcus aureus* exotoxin B on nasal epithelial cells. *Otolaryngol-Head Neck Surg.* 2006;134:245–249.
- Stein RT, Bont LJ, Zar H, et al. Respiratory syncytial virus hospitalization and mortality: systematic review and meta-analysis: incidence of RSV hospitalization and mortality. *Pediatr Pulmonol.* 2017;52:556–569.
- Paton AW, Goldwater PN. Respiratory syncytial virus modulation of adult and neonatal lymphocyte mitogenic responses and the role of interferon-gamma. *Microb Pathog.* 1990;9:235–241.
- Blackwell CC, Saadi AT, Raza MW, et al. Susceptibility to infection in relation to AIDS. *J Clin Pathol.* 1992;45:20–24.
- Saadi AT, Blackwell CC, Raza MW, et al. Factors enhancing adherence of toxigenic *Staphylococcus aureus* to epithelial cells and their possible role in sudden infant death syndrome. *Epidemiol Infect.* 1993;110:507–517.
- Stark JM, Stark MA, Colasurdo GN, et al. Decreased bacterial clearance from the lungs of mice following primary respiratory syncytial virus infection. *J Med Virol.* 2006;78:829–838.
- Raza MW, Blackwell CC, Molyneux P, et al. Association between secretor status and respiratory viral illness. *Br Med J.* 1991;303:815–818.
- Hight AR. An infectious aetiology of sudden infant death syndrome. *J Appl Microbiol.* 2008;105:625–635.
- Kim TH, Lee HK. Innate immune recognition of respiratory syncytial virus infection. *BMB Rep.* 2014;47:184–191.
- Lambert L, Sagfors AM, Openshaw PJM, et al. Immunity to RSV in early-life. *Front Immunol.* 2014;5:466.
- Avadhanula V, Rodriguez CA, DeVincenzo JP, et al. Respiratory viruses augment the adhesion of bacterial pathogens to

- Bischoff WE, Bassetti S, Bassetti-Wyss BA, et al. Airborne dispersal as a novel transmission route of coagulase-negative staphylococci: interaction between coagulase-negative staphylococci and rhinovirus infection. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2004;25:504–511.
- Bassetti S, Bischoff WE, Walter M, et al. Dispersal of *Staphylococcus aureus* into the air associated with a rhinovirus infection. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2005;26:196–203.
- Bischoff WE, Wallis ML, Tucker BK, et al. “Gesundheit!” sneezing, common colds, allergies, and *Staphylococcus aureus* dispersion. *J Infect Dis.* 2006;194:1119–1126.
- Bischoff WE, Tucker BK, Wallis ML, et al. Preventing the airborne spread of *Staphylococcus aureus* by persons with the common cold: effect of surgical scrubs, gowns, and masks. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007;28:1148–1154.
- Merler S, Poletti P, Ajelli M, et al. Coinfection can trigger multiple pandemic waves. *J Theor Biol.* 2008;254:499–507.
- Hofstra JJ, Matamoros S, Van De Pol MA, et al. Changes in microbiota during experimental human rhinovirus infection. *BMC Infect Dis.* 2015;15:336.
- Thorburn K. High incidence of pulmonary bacterial co-infection in children with severe respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis. *Thorax.* 2006;61:611–615.
- Suárez-Arrabal MC, Mella C, Lopez SM, et al. Nasopharyngeal bacterial burden and antibiotics: influence on inflammatory markers and disease severity in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect.* 2015;71:458–469.
- Jiang W, Wang T, Li L, et al. Impact of bacteria in nasal aspirates on disease severity of bronchiolitis. *Infect Dis.* 2016;48:82–86.
- Rosas-Salazar C, Shilts MH, Tovchigrechko A, et al. Differences in the nasopharyngeal microbiome during acute respiratory tract infection with human rhinovirus and respiratory syncytial virus in infancy. *J Infect Dis.* 2016;214:1924–1928.
- De Steenhuisen Piters WAA, Heinonen S, Hasrat R, et al. Nasopharyngeal microbiota, host transcriptome, and disease severity in children with respiratory syncytial virus infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;194:1104–1115.
- Fukutani KF, Nascimento-Carvalho CM, Van Der Gucht W, et al. Pathogen transcriptional profile in nasopharyngeal aspirates of children with acute respiratory tract infection. *J Clin Virol.* 2015;69:190–196.
- Stensballe LG, Hjulter T, Andersen A, et al. Hospitalization for respiratory syncytial virus infection and invasive pneumococcal disease in Danish children aged <2 years: a population-based cohort study. *Clin Infect Dis.* 2008;46:1165–1171.
- Weinberger DM, Klugman KP, Steiner CA, et al. Association between respiratory syncytial virus activity and pneumococcal disease in infants: a time series analysis of US hospitalization data. *PLoS Med.* 2015;12:e1001776.
- Metersky ML, Masterton RG, Lode H, et al. Epidemiology, microbiology, and treatment considerations for bacterial pneumonia complicating influenza. *Int J Infect Dis.* 2012;16:e321–31.
- Passariello C, Nencioni L, Sgarbanti R, et al. Viral hemagglutinin is involved in promoting the internalisation of *Staphylococcus aureus* into human pneumocytes during influenza A H1N1 virus infection. *Int J Med Microbiol.* 2011;301:97–104.
- Scheiblauer H, Reinacher M, Tashiro M, et al. Interactions between bacteria and influenza A virus in the development of influenza pneumonia. *J Infect Dis.* 1992;166:783–791.
- Warnking K, Klemm C, Löffler B, et al. Super-infection with *Staphylococcus aureus* inhibits influenza virus-induced type I IFN signalling through impaired STAT1-STAT2 dimerization. *Cell Microbiol.* 2015;17:303–317.
- Mäkelä MJ, Puhakka T, Ruuskanen O, et al. Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. *J Clin Microbiol.* 1998;36:539–542.
- Gavala ML, Bertics PJ, Gern JE. Rhinoviruses, allergic inflammation, and asthma: rhinovirus infections, allergy, and asthma. *Immunol Rev.* 2011;242:69–90.
- Triantafylou K, Vakakis E, Richer EA, et al. Human rhinovirus recognition in non-immune cells is mediated by Toll-like receptors and MDA-5, which trigger a synergistic pro-inflammatory immune response. *Virulence.* 2011;2:22–29.
- Slater L, Bartlett NW, Haas JJ, et al. Co-ordinated role of TLR3, RIG-I and MDA5 in the innate response to rhinovirus in bronchial epithelium. *PLoS Pathog.* 2010;6:e1001178.
- Selinger DS, Reed WP, McLaren LC. Model for studying bacterial adherence to epithelial cells infected with viruses. *Infect Immun.* 1981;32:941–944.
- Passariello C, Schippa S, Conti C, et al. Rhinoviruses promote internalisation of *Staphylococcus aureus* into non-fully permissive cultured pneumocytes. *Microbes Infect Inst Pasteur.* 2006;8:758–766.
- Wang JH, Kwon H-J, Lee B-J, et al. Staphylococcal enterotoxins A and B enhance rhinovirus replication in A549 cells. *Am J Rhinol.* 2007;21:670–674.
- Wang JH, Kwon HJ, Jang YJ. Rhinovirus enhances various bacterial adhesions to nasal epithelial cells simultaneously. *Laryngoscope.* 2009;119:1406–1411.
- Wang JH, Lee SH, Kwon HJ, et al. Clarithromycin inhibits rhinovirus-induced bacterial adhesions to nasal epithelial cells. *Laryngoscope.* 2010;120:193–199.
- Min J-Y, Shin S-H, Kwon HJ, et al. Levocetirizine inhibits rhinovirus-induced bacterial adhesion to nasal epithelial cells through down-regulation of cell adhesion molecules. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2012;108:44–48.
- Hauck CR, Ohlsen K. Sticky connections: extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9:5–11.
- Schwarz-Linek U, Werner JM, Pickford AR, et al. Pathogenic bacteria attach to human fibronectin through a tandem beta-zipper. *Nature.* 2003;423:177–181.
- Sinha B, François PP, Nüs Se O, et al. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin  $\alpha 5 \beta 1$ . *Cell Microbiol.* 1999;1:101–117.
- Van Kempen M, Bachert C, Van Cauwenberge P. An update on the pathophysiology of rhinovirus upper respiratory tract infections. *Rhinology.* 1999;37:97–103.
- Jang YJ, Wang JH, Kim JS, et al. Levocetirizine inhibits rhinovirus-induced ICAM-1 and cytokine expression and

- respiratory epithelium in a viral species- and cell type-dependent manner. *J Virol.* 2006;80:1629–1636.
- Toth TE, Gates C. Lack of virus-specific bacterial adherence to bovine embryonic lung cells infected with bovine parainfluenza virus type 3. *J Clin Microbiol.* 1983;17:561–563.
- Verkaik NJ, Nguyen DT, De Vogel CP, et al. *Streptococcus pneumoniae* exposure is associated with human metapneumovirus seroconversion and increased susceptibility to in vitro HMPV infection. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:1840–1844.
- Atanasova K, Van Gucht S, Barbé F, et al. Lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* exacerbates respiratory disease in porcine respiratory coronavirus-infected pigs. *Vet J.* 2011;188:210–215.
- Li F, Zhu H, Sun R, et al. Natural killer cells are involved in acute lung immune injury caused by respiratory syncytial virus infection. *J Virol.* 2012;86:2251–2258.





# MATERIEL ET METHODES



## A. Modèle de colonisation par *S. aureus* des cellules HaCaT

### 1. Principe général

La modélisation in vitro de la colonisation par *S. aureus* repose principalement sur l'évaluation quantitative ou qualitative des capacités d'adhésion ou d'internalisation de cette bactérie sur une monocouche cellulaire. La colonisation de la muqueuse nasale est mimée in vitro par l'utilisation de cellules épithéliales primaires ou en lignée continue d'origine nasale ou cutanée. Il est admis que les cultures primaires représentent mieux les conditions réelles chez l'Homme car elles utilisent des cellules normales, non cancéreuses, issues d'embryons ou de volontaires sains. Cependant, ces cultures sont onéreuses, difficiles à standardiser, limitées à quelques passages et hétérogènes (variabilité entre les individus et les prélèvements, manque de reproductibilité, etc.).

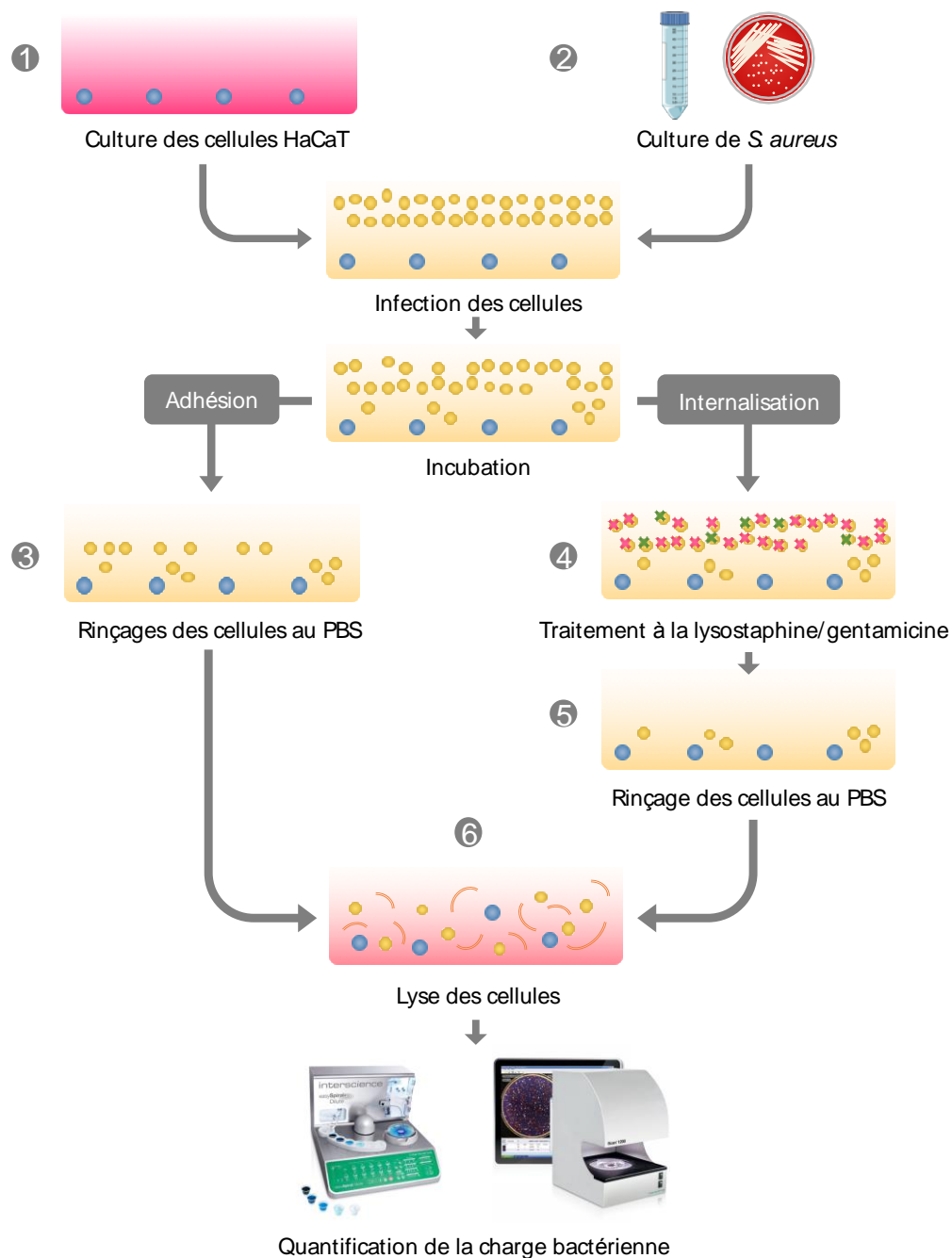
Les cellules HaCaT sont des kératinocytes humains spontanément immortalisés (pas de transformation par des virus oncogènes) qui ont l'avantage de se structurer et d'exprimer les marqueurs des kératinocytes comme les cytokératines et l'involucrine de façon normale (Boukamp et al., 1988). Ces cellules ont été utilisées au cours de ce travail pour représenter in vitro les cellules épithéliales (kératinocytes) que l'on retrouve au niveau du *vestibulum nasi*, principal site de colonisation par *S. aureus* chez l'Homme.

Le principe général du modèle in vitro pour étudier la colonisation à *S. aureus* (figure 21) consiste à mettre la monocouche cellulaire confluyente en contact avec une suspension bactérienne à une multiplicité d'infection (MOI) déterminée, pendant une durée de temps relativement courte (dans le cas d'un contact très prolongé ou à très forte concentration on parlerait plutôt d'une infection que d'une colonisation). Les cellules sont rincées pour se débarrasser des bactéries qui sont restées en suspension, lysées puisensemencées sur des géloses au sang afin de quantifier les bactéries qui ont adhéré aux cellules dans les conditions utilisées. On admet que la charge totale des bactéries adhérentes et internalisées correspond au pouvoir d'adhésion, vu que les bactéries internalisées ont dû d'abord adhérer aux cellules.

L'étude de l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules épithéliales repose principalement sur l'utilisation de la lysostaphine, une enzyme à activité bactériolytique spécifique de *S. aureus*, capable de tuer toutes les bactéries adhérentes ou en suspension qui sont dans le compartiment extracellulaire. En effet, la lysostaphine est une métalloendopeptidase produite naturellement par *Staphylococcus simulans* qui reconnaît et lyse spécifiquement la paroi de *S. aureus* (CMI90 entre 0,001 et 0,064 µg/ml) (Wu et al., 2003). Sa structure de grande taille (27 kDa) l'empêche de rentrer dans les cellules et d'avoir une activité intracellulaire (Schaffner et al., 1967; Schindler and Schuhardt, 1964). La gentamicine peut également être utilisée pour étudier l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules phagocytaires non professionnelles, seule ou en combinaison avec la lysostaphine.

## 2. Culture des cellules HaCaT

Les cellules HaCaT (Cell line Services 300493, Allemagne) ont été cultivées dans un milieu de croissance (M<sub>CDMEM/RPMI</sub>) composé d'un mélange (v/v) de DMEM « *high glucose* » (Sigma-Aldrich D6429) et de RPMI 1640 (Sigma-Aldrich R7388) enrichi de 10% SVF (Biowest S1810), 1mM L-glutamine (Sigma-Aldrich G7513), 1× acides aminés non essentiels (Sigma-Aldrich M7145) et 1× antibiotiques pour culture cellulaire (Sigma-Aldrich A5955). Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de culture stériles de 24 puits à une concentration comprise entre  $1 \times 10^5$  et  $1,5 \times 10^5$  cellules/puits puis incubées à 37 °C sous 5% de CO<sub>2</sub> jusqu'à confluence (3 jours). 24 heures avant l'infection, les cellules sont rincées en PBS stérile et mises en contact avec du milieu d'infection (M<sub>IRPMI</sub>) composé de RPMI 1640 sans rouge phénol (Sigma-Aldrich R8755), sans antibiotiques et enrichi avec 10% SVF, 5 mg/l de fer (FeSO<sub>4</sub>, Sigma-Aldrich F7002), 1 g/l de bicarbonate de soude (NaHCO<sub>3</sub>, Sigma-Aldrich S87611m), 1 mM de L-glutamine et des acides aminés non essentiels.



**Figure 21. Principe général du modèle de colonisation des cellules HaCaT par *S. aureus*.**

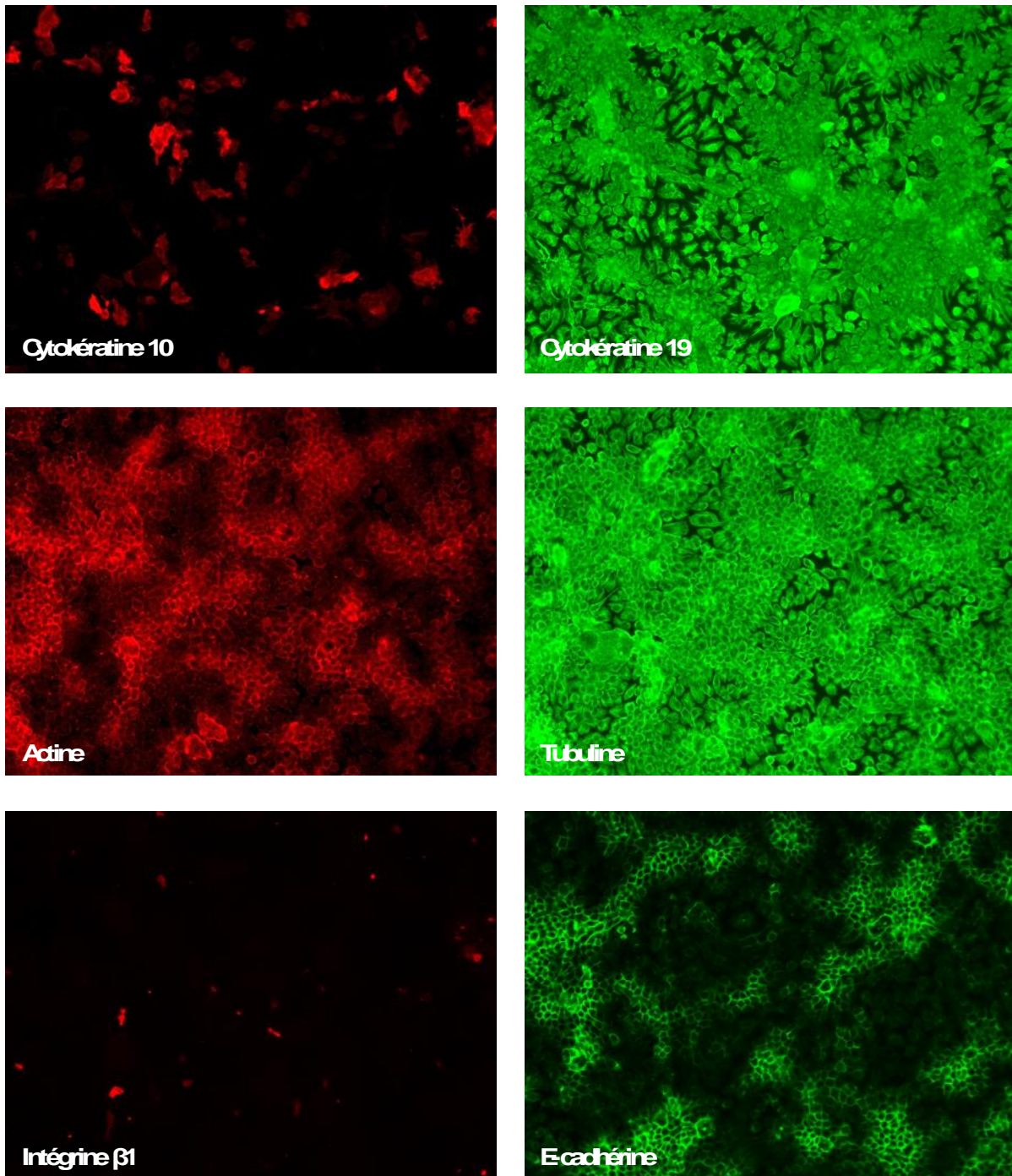
De nombreuses expériences préliminaires ont été nécessaires pour développer et optimiser notre modèle in vitro de colonisation à *S. aureus*. Les étapes critiques sont : (1) la culture des cellules HaCaT pour avoir une monocouche confluite de façon reproductible, (2) la préparation d'une suspension bactérienne pour avoir une MOI réelle la plus proche possible de la MOI théorique souhaitée, (3) le rinçage des cellules pour pouvoir quantifier la charge adhérente sans altérer l'intégrité de la monocouche cellulaire, (4) l'élimination des bactéries extracellulaires pour l'étude de l'internalisation, (5) l'élimination des résidus de molécules antibiotiques ou antimicrobiennes pour ne pas fausser la quantification de la charge des bactéries internalisées et (6) la lyse des cellules de façon efficace sans tuer les bactéries adhérentes et/ou internalisées.

Le milieu RPMI 1640 contient seulement 2 g/l de glucose et des concentrations minimales d'acides aminées, vitamines et minéraux. Ce milieu permet de mimer la composition du milieu de la muqueuse nasale qui est relativement pauvre en nutriments par rapport aux autres muqueuses. La composition du  $MI_{RPMI}$  a été optimisée pour permettre une croissance optimale des cellules HaCaT, notamment avec l'ajout du SVF et du bicarbonate de soude (effet tampon,  $pH_{final} = 7,4$ ). Le jour de l'infection (après 4 jours de culture), les cellules sont complètement confluentes à environ  $1 \times 10^6$  cellules/puits.

L'expression des marqueurs des kératinocytes comme les cytokératines 10 et 19 (CK10, CK19), des éléments du cytosquelette comme l'actine, la tubuline et l'E-cadhérine et de l'intégrine  $\beta 1$  (récepteur cellulaire majeur impliqué dans l'internalisation de *S. aureus* par les cellules phagocytaires non professionnelles) a été vérifiée par marquage immunofluorescent observé sous microscope à épifluorescence (Figure 22).

### 3. Culture bactérienne

Différentes souches de *S. aureus* provenant de laboratoires (sauvages ou mutées pour certains gènes) ou d'origine clinique, issues de volontaires sains, de patients atteints d'infections cutanées ou de bactériémie à *S. aureus* ou d'infection au niveau d'une prothèse et appartenant à différents fonds génétiques, ont été utilisées pour différentes expériences au cours de ce travail de thèse. La souche ATCC® 29213™ a été utilisée comme souche standard pour l'optimisation de certains paramètres ou comme souche de référence pour la comparaison avec d'autres souches. Cette souche appelée aussi « Wichita » a été isolée pour la première fois à partir d'une blessure chez un patient américain. Elle est utilisée comme souche standard représentative de son espèce par l'Institut des Standard Cliniques et des Laboratoires américain et par le Centre National de Référence des Staphylocoques français du CHU de Lyon, notamment pour des tests de sensibilité aux antibiotiques et pour des procédures de contrôle qualité. Pour l'étude des pouvoirs d'adhésion et d'internalisation, une colonie de *S. aureus* (mise en culture 24 h avant) est prélevée sur une gélose au sang puis ensemencée dans 10 ml de  $MI_{RPMI}$  et incubée à 37 °C sous agitation à 150 rpm pendant 18 h.



**Figure 22. Observation des cellules HaCaT sous microscopie à épifluorescence.**

Les cellules ont été fixées au méthanol froid. Les différentes molécules cellulaires cibles ont été détectées par des anticorps primaires puis révélées par des anticorps secondaires conjugués aux fluorochromes Alexa Fluor™ 555 (rouge) ou Alexa Fluor™ 488 (vert). Grossissement  $\times 100$ .



La composition du M<sub>IRPMI</sub> a été optimisée pour une croissance optimale de *S. aureus*, notamment grâce à l'ajout du fer. Le fer est un élément indispensable pour *S. aureus* (Haley and Skaar, 2012). En son absence, la bactérie surexprime à sa surface des protéines pour capter le fer environnant (les IsD), ce qui risque de perturber l'expression des autres facteurs d'adhésion et aussi de masquer les sites d'action de la lysostaphine au niveau de la paroi (Hammer and Skaar, 2011). Par ailleurs, des expériences préliminaires ont montré que le rouge phénol inhibe la croissance de *S. aureus*, d'où l'utilisation d'un milieu sans indicateur coloré. Le bicarbonate de soude permet de maintenir un pH neutre, ce qui empêche la formation de SCV (phénomène lié au stress à pH acide) et favorise aussi la fluorescence en cas d'utilisation de bactéries fluorescentes. Le bouillon bactérien obtenu servira comme inoculum pour préparer les dilutions adéquates pour l'infection des cellules.

#### 4. Adhésion et internalisation de *S. aureus*

Après culture des cellules HaCaT et préparation du bouillon de *S. aureus*, comme décrit ci-dessus, les cellules sont infectées avec des MOI variant de 0,1 à 100. Pour cela, la densité optique ( $DO_{600nm}$ ) du bouillon de 18 h est ajustée à 0,5 ce qui correspond à environ  $1 \times 10^8$  UFC/ml. Des dilutions décimales dans du M<sub>IRPMI</sub> ont été réalisées pour obtenir les MOI souhaitées. Les cellules sont ensuite infectées pendant 2 h à 37 °C sous 5% de CO<sub>2</sub> puis rincées 3 fois avec du PBS pour éliminer les bactéries non adhérentes. Pour l'étude de l'internalisation, les bactéries extracellulaires sont éliminées en rajoutant 10 µg/ml de lysostaphine (AMBI) en combinaison ou pas avec 100 µg/ml gentamycine (Panpharma) pendant 1 h à 37 °C et 5% CO<sub>2</sub>. Les cellules sont rincées encore 3 fois avec du PBS puis lysées en rajoutant une solution contenant de l'eau stérile, de la trypsine-EDTA (Sigma-Aldrich) et du Triton™ X-100 à 1% (2 : 1 : 1) pendant 10 minutes à 37 °C et 5% de CO<sub>2</sub> sous agitation à 120 rpm. Les lysats cellulaires contenant les bactéries sontensemencés à l'aide de l'ensemenceur easySpiral® Dilute (Intersciences) sur des géloses au sang (bioMérieux) puis incubés à 37°C pendant 24 heures. Le lendemain les boîtes sont analysées à l'aide du lecteur Scan® 1200 (Intersciences®) pour quantifier les bactéries adhérentes ou internalisées.

## B. Modèle d'infection des cellules HaCaT par rhinovirus

Aucune étude n'avait montré que les cellules HaCaT étaient sensibles ou permissives à l'infection par RV. L'objectif de cette deuxième partie était d'étudier la capacité des RV à infecter les cellules HaCaT afin de proposer un modèle d'infection adéquat qui permettrait par la suite de développer un modèle de co-infection RV/*S. aureus*. Les cellules fibroblastiques humaines pulmonaires embryonnaires HEL-299 étant connues pour être complètement permissives aux RV, elles ont été utilisées pour la propagation du virus, son titrage et la comparaison du cycle biologique avec celui des cellules HaCaT.

### 1. Infection virale

Les souches de RV utilisées sont RV-A13, RV-A16 et RV-A19. Ces trois souches appartiennent toutes au groupe majeur des RV et utilisent le récepteur ICAM-1 comme voie d'entrée dans la cellule. RV-A16 (ATCC® VR-283™) a été utilisée comme souche de référence. RV-A13 et RV-A19 sont deux souches cliniques isolées par le Centre National de Référence des Entérovirus (Lyon, France) qui nous les a généreusement fournies. Les cellules HaCaT et les cellules (HEL-299, CLS®) ont été cultivées dans le milieu MCDMEM/RPMI à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> comme décrit précédemment. Après 3 jours de culture, les cellules ont été infectées par RV avec une MOI variant de 0,01 à 1 selon les conditions. Après une étape d'adsorption d'une heure sous agitation douce à 33°C sous 5% de CO<sub>2</sub>, les cellules ont été rincées en PBS et du milieu frais a été ajouté. Les cellules ont été ensuite incubées à 33°C sous 5% de CO<sub>2</sub> entre 24 heures et 7 jours en fonction du plan expérimental.

### 2. Titrage viral

Pour déterminer le titre viral après infection des cellules, les surnageants ont été dilués en cascade décimale avec du MCDMEM/RPMI puis ajoutés sur des cellules HEL confluentes en plaque de 96 puits.

Après une incubation de 6 jours à 33°C et 5% CO<sub>2</sub>, les cellules ont été observées sous microscope à contraste de phase à la recherche d'ECP. Le titre viral a été calculé selon la formule de Reed et Muench (Reed and Muench, 1938).

### 3. Détection moléculaire

La présence de l'ARN viral dans les surnageants ou les lysats des cellules infectées par RV a été détectée par RT-qPCR (*reverse transcription quantitative polymerase reaction*). Les acides nucléiques ont été d'abord extraits en utilisant l'extracteur automatique easyMAG® (NucliSENS) selon les instructions du fournisseur, puis analysés en utilisant le kit EXPRESS One-Step SYBR™ GreenER™ kit (Invitrogen) (tableau 6) et le thermocycleur en temps réel Applied Biosystems® 7500 (tableau 7).

**Tableau 6. Mélange réactionnel pour la détection de l'ARN viral par RT-qPCR**

Désignation	Spécifications	Volume (µl)
SuperMix		10
ROX Dye	EXPRESS One-Step SYBR™ GreenER™ (Invitrogen®)	0,04
Mix One-Step		0,5
Amorce sens	WGC-CYG-CGT-GGC-KGC-C (10 µM) (Eurogentec®)	0,4
Amorce anti-sens	GAA-ACA-CGG-ACA-CCC-AAA-GTA-GT (10 µM) (Eurogentec®)	0,4
dH <sub>2</sub> O	Eau stérile distillée	3,66
Extrait nucléique	Extrait avec easyMAG® (NucliSENS®)	5
Volume final par réaction		20

**Tableau 7. Paramètres de la RT-qPCR**

Étape	Spécifications
Transcription réverse	50 °C pendant 5 minutes
Dénaturation	95 °C pendant 2 minutes
Appariement	95 °C pendant 15 secondes
Élongation	60 °C pendant 1 minute
Fusion	De 60 à 95 °C

40 cycles

### 4. Immunofluorescence

Afin de visualiser les particules virales au sein des cellules infectées et d'étudier l'effet de l'infection sur l'expression du récepteur ICAM-1, les cellules HaCaT et HEL cultivées dans des chambres de culture cellulaire sur lame en verre (Falcon™) ont été infectées par RV-A16 pendant 24 h comme décrit ci-dessus. La détection des particules virales a été réalisée à l'aide d'un anticorps primaire de souris anti-VP3 (protéine de la

capside virale) (Sigma-Aldrich) puis révélée par un anticorps secondaire de chèvre anti-souris conjugué avec Alexa Fluor™ 488 (Sigma-Aldrich). La visualisation d'ICAM-1 a été réalisée à l'aide d'un anticorps primaire de lapin anti-ICAM-1 (Sigma-Aldrich) puis révélée par un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin conjugué avec Alexa Fluor™ 488 (Sigma-Aldrich). Toutes les lames ont été observées à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Nikon® Eclipse Ti) et les images obtenues ont été analysées à l'aide du programme Fiji.

## C. Modèle de co-infection des cellules HaCaT par rhinovirus et *S. aureus*

Après la validation de l'utilisation des cellules HaCaT comme modèle d'étude de la colonisation par *S. aureus* et de l'infection par RV, un modèle de co-infection RV/*S. aureus* a été mis en place. Les cellules HaCaT ont été cultivées sur des plaques de 24 puits comme décrit précédemment pendant 3 jours à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> puis infectée par RV-A16 avec une MOI = 0,1 pendant 24 heures à 33°C sous 5% de CO<sub>2</sub> dans le M<sub>I</sub>RPMI. L'infection virale a été vérifiée en titrant le surnageant qui contenait environ 1×10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub>/ml. Par la suite, l'infection bactérienne a été réalisée comme décrit précédemment à 33°C sous 5% de CO<sub>2</sub>. Les souches de *S. aureus* utilisées pour cette partie sont listées dans le tableau 8. Afin de d'investiguer le rôle du récepteur ICAM-1 dans l'internalisation de *S. aureus*, ICAM-1 a été neutralisé avec 5 µg/ml d'anticorps monoclonaux anti-ICAM-1 (Santa Cruz Biotechnology® SC-107L, clone 15.2) pendant 1h à 33°C sous 5% CO<sub>2</sub> avant d'infecter les cellules avec *S. aureus*.

**Tableau 8. Liste des souches de *S. aureus* utilisées dans le modèle de co-infection**

Souche	Description	Référence
ATCC 29213	SASM, CC5, <i>spa</i> type t005, Oxa <sup>S</sup>	ATCC® 29213™
DU 5883	NCTC 8325-4 <i>fnbA/B</i> -, Chlo <sup>R</sup> , Eryt <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	(Greene et al., 1995)
NCTC 8325-4	Dérivée de NCTC 8325, Φ <sup>-</sup> , <i>rsbU</i> +	(Novick, 1967)
SA113	Dérivée de NCTC 8325, <i>rsbU</i> -, Ery <sup>S</sup>	(Iordanescu and Surdeanu, 1976)
SA113-Δ <i>eap</i>	SA113 <i>eap</i> -, Ery <sup>R</sup>	(Bur et al., 2013)
SA113-Δ <i>srtA</i>	SA113 <i>srtA</i> -, Ery <sup>R</sup>	(Weidenmaier et al., 2008)
SA6850	SASM, <i>spa</i> type t185, Ostéomyélite	(Fraunholz et al., 2013)
USA300	SARM, CC8, <i>spa</i> type t008, <i>agr</i> +, LPV+	(Diep et al., 2006)
USA400 (MW2)	SARM, CC1, <i>spa</i> type t128, <i>agr</i> +, LPV+	(King et al., 2016)

ATCC : American Type Culture Collection ; CC : complexe clonal ; Chlo<sup>R</sup> : résistance au chloramphénicol ; *eap*- : déficience du gène codant EAP (*extracellular adhesive protein*) ; Ery<sup>R/S</sup> : résistance/sensibilité à l'érythromycine ; *fnbA/B*- : déficience des gènes codant FnBPA/B (*fibronectin-binding protein A and B*) ; LPV : Leucocidine de Penton Valentine ; Oxa<sup>S</sup> : sensibilité à l'oxacilline ; *rsbU* : régulateur sigma B ; SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline ; SASM : *Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline ; *srtA*- : déficience du gène codant la sortase A ; Tet<sup>R</sup> : résistance à la tétracycline ; Φ<sup>-</sup> : phage déficient.

## D. Modèles in vitro de colonisation par *S. aureus* des cellules en état inflammatoire

Dans le but de généraliser l'effet d'une infection virale sur la colonisation par *S. aureus*, nous avons choisi de mimer l'état inflammatoire induit par les infections virales en traitant différentes lignées cellulaires avec le TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ). Les cellules utilisées dans cette partie sont décrites dans le tableau 10. La procédure utilisée dans ces modèles est quasiment identique à celle utilisé pour le modèle de co-infection des cellules HaCaT par RV/*S. aureus* hors quelques modifications : l'état inflammatoire a été induit en traitant les cellules avec 10 ng/ml de TNF $\alpha$  humain (Sigma-Aldrich) pendant 24 heures avant l'infection par *S. aureus* et toutes les incubations des cellules ont été réalisées à 37 °C sous 5% de CO $_2$ .

Tableau 9. Liste des lignées cellulaires utilisées

Lignée	Type	Spécifications	Source
HaCaT	Épithélial	Kératinocytes humains continus non transformés	CLS® 300493
HEL-299	Fibroblaste	Fibroblastes humains embryonnaires de poumon	CLS® 300193
A549	Épithélial	Cellules issues d'un cancer de poumon	ATCC® CCL-185™
SiHa	Épithélial	Cellules cervicales cancéreuses (papillomavirus)	ATCC® HTB-35™
CaCo2	Épithélial	Cellules issues d'un adénocarcinome colorectal	ATCC® HTB-37™
EaHy.926	Endothélial	Cellules de la veine ombilicale hybride	ATCC® CRL-2922™

Pour investiguer le mécanisme impliqué dans l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules HaCaT en état inflammatoire, nous avons eu recours à l'utilisation d'anticorps monoclonaux bloquants anti-ICAM-1 (comme décrit précédemment) et anti-ITGB1 (intégrine  $\beta$ 1) (BD Bioscience, 552828, clone Mab 13 (RUO)) ou à des inhibiteurs spécifiques de certaines enzymes impliquées dans la voie de signalisation cellulaire nécessaire à l'internalisation de *S. aureus*. Cpd22 (Merck, 407331), SHP099 (Chemietek) et Src inhibitor No.5 (Biaffin GmbH & Co KG) sont des inhibiteurs perméables et spécifiques de la kinase liée aux intégrines (ILK : *integrin linked kinase*), de la phosphatase liée à la signalisation intracellulaire d'ICAM-1 (SHP2 : *Src homology 2-containing phosphotyrosine phosphatase*) et de la tyrosine kinase Src impliquée dans la contraction des filaments d'actine, respectivement (Plé et al., 2004; Lee et al., 2011b; Chen et al., 2016).



# RESULTATS





## A. Validation du modèle de colonisation des cellules HaCaT par *Staphylococcus aureus*

Après de nombreuses expériences de mise au point et d'optimisation, le modèle in vitro de colonisation des cellules HaCaT a été validé à travers deux études différentes.

La première étude avait pour but de créer une collection de souches fluorescentes à partir de différentes souches cliniques de *S. aureus*. La création de cette collection représentait un défi technologique car les souches cliniques sauvages de *S. aureus* sont connues pour être difficilement transformables génétiquement à cause de leur système de restriction qui les protège des plasmides exogènes. Ce défi a été relevé grâce au travail de post-doctorat du Dr Sana Charaoui. Ma participation dans ce travail a permis à la fois de valider le modèle de colonisation des cellules HaCaT par *S. aureus* que j'ai optimisé au cours de la première année de thèse et de vérifier que les manipulations génétiques n'ont pas eu d'impact sur les capacités d'adhésion et d'internalisation des souches transformées. Une partie des résultats de cette étude a été présenté sous forme de poster lors de la journée de l'Académie de Médecine de l'IFRESIS le 10 mai 2016 à Saint-Etienne et a remporté le prix du meilleur poster en sciences fondamentales (voir annexes). Les résultats finaux de cette étude sont en cours de publication. Une version préliminaire de ce travail est présentée dans ce manuscrit de thèse (page 135).

La deuxième étude avait pour but d'évaluer l'activité de différents antibiotiques et antiseptiques sur le compartiment intracellulaire de *S. aureus* sur notre modèle de cellules HaCaT. Les résultats obtenus ont montré que la plupart de ces molécules sont inefficaces ou faiblement efficaces sur les bactéries intracellulaires, remettant en question les stratégies de décolonisation actuellement utilisées et le rôle des bactéries intracellulaires dans l'échec de la décolonisation chez certains patients. Les résultats de cette étude ont été publiés dans « *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* » (IF = 5.217) le 16 août 2018 (Rigail, **Morgene** et al., 2018).

# Adhésion et internalisation de souches cliniques de *Staphylococcus aureus* exprimant EGFP sur un modèle *in vitro* de kératinocytes.

Sana Charaoui<sup>1</sup>, **M. Fedy Morgene**<sup>1</sup>, Josselin Rigail<sup>1</sup>, Florence Grattard<sup>1,2</sup>, Elisabeth Botelho-Nevers<sup>1,3</sup>, Philippe Berthelot<sup>1,3</sup>, Bruno Pozzetto<sup>1,2</sup>, Paul Verhoeven<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire GIMAP (Groupe pour l'Immunologie des Muqueuse et Agents Pathogènes, EA3064), Université de Lyon, Saint-Etienne – France

<sup>2</sup> Laboratoire des Agents Pathogènes et Hygiène, CHU Nord de Saint-Etienne – France

<sup>3</sup> Service des Maladies Infectieuses, CHU Nord de Saint-Etienne – France

## Résumé

*S. aureus* est une bactérie commensale et pathogène de l'Homme qui peut être à l'origine de nombreuses maladies communautaires ou nosocomiales. La colonisation nasale par *S. aureus* est considérée comme un facteur de risque important de développer une infection par ce germe. En plus de sa capacité d'adhésion à la muqueuse nasale, *S. aureus* est capable de s'internaliser dans les cellules phagocytaires non professionnelles, ce qui pourrait expliquer la persistance de la colonisation et les échecs de décolonisation chez certains individus. Dans cette étude, nous avons transformé génétiquement 20 souches cliniques de *S. aureus* appartenant à différents fonds génétiques et isolées dans différents contextes cliniques pour exprimer la protéine fluorescente EGFP (*enhanced green fluorescent protein*). L'étude *in vitro* sur le modèle de kératinocytes HaCaT a montré que la transformation génétique n'a pas eu d'impact sur les capacités d'adhésion et d'internalisation de ces souches ; aucune différence significative n'a été détectée entre chaque couple de souches. En utilisant une MOI de 1, les niveaux moyens d'adhésion et d'internalisation étaient respectivement de  $6,47 \pm 0,05$  et  $4,03 \pm 0,07$  log UFC/10<sup>6</sup> cellules. L'étude par microscopie confocale a confirmé que les souches transformées étaient très bien visualisées à l'intérieur des cellules HaCaT. Cette collection de souches cliniques exprimant EGFP représente un outil précieux pour mieux étudier la localisation, la cinétique ou la dynamique de la colonisation ou de l'infection par *S. aureus*.

# Construction and validation of EGFP-expressing *Staphylococcus aureus* clinical strains for adhesion and internalization assays on epithelial cells

Sana Charaoui-Boukerzaza<sup>1#</sup>, M. Fedy Morgene<sup>1#</sup>, Josselin Rigail<sup>1,2</sup>, Estelle Audoux<sup>1</sup>, He Zhiguo<sup>3</sup>, Florence Grattard<sup>1,2</sup>, Bruno Pozzetto<sup>1,2</sup>, Philippe Berthelot<sup>1,2,4</sup>, Elisabeth Bothelo-Nevers<sup>1,4</sup> and Paul O. Verhoeven<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> GIMAP EA3064 (Group for Mucosal Immunity and Pathogens Agents), Faculty of Medicine of Saint-Etienne, University of Lyon, France.

<sup>2</sup> Laboratory of Infectious Agents and Hygiene, University Hospital of Saint-Etienne, Saint-Etienne, France.

<sup>3</sup> BiiGC EA2521 (Biology, Engineering and Imaging of Corneal Transplant), Faculty of Medicine of Saint-Etienne, University of Lyon, France.

<sup>4</sup> Infectious disease department, University Hospital of Saint-Etienne, France.

# These authors contributed equally for this work

**Running title:** EGFP-expressing *S. aureus* clinical strains

**Keys words:** GFP, *Staphylococcus aureus*, internalization, keratinocytes

**Corresponding author:** Paul Verhoeven (MD, PhD)

<http://orcid.org/0000-0003-4352-1263>

Laboratory of Infectious Agents and Hygiene, University Hospital of Saint-Etienne, 42055 Saint Etienne Cedex 02, France.

Phone number: +33 477 82 92 28.

Fax number: +33 477 82 84 60.

E-mail: [paul.verhoeven@univ-st-etienne.fr](mailto:paul.verhoeven@univ-st-etienne.fr)

**Abstract words count:** 269

**Text words count:** 2584

29

**ABSTRACT**

30

31

32

33

34

35

36

**Background:** *Staphylococcus aureus* is both a major pathogen and a commensal bacterium in humans. The anterior nares are the main reservoir of *S. aureus* in humans. *S. aureus* is able to adhere at the surface of epithelial cells and can trigger its internalization inside these non-professional phagocytic cells. In the aim to better understand the interactions of clinical isolates with keratinocytes in the anterior nares, we developed and validated a one-step protocol to express EGFP in *S. aureus* clinical strains adapted for adhesion and internalization assays in mammalian cells.

37

38

39

40

41

**Methods:** Twenty *S. aureus* clinical isolates belonging to clonal complexes 5, 8, 30, 45, 398 have been selected for one-step transformation protocol with the EGFP-encoding plasmid pBSU101. EGFP expression was analyzed by flow cytometry and confocal microscopy. Wild type and isogenic EGFP-expressing *S. aureus* clinical strains were compared for adhesion and internalization levels by using HaCaT cell model.

42

43

44

45

46

47

**Results:** Transformation of *S. aureus* clinical strains was achieved in all strains whatever the genetic background. The flow cytometry analysis showed that the mean proportion of EGFP-expressing bacteria was 97.2% ( $\pm 2.1$ ) after 4h of incubation in BHI. Adhesion and Internalization levels were similar in wild-type and isogenic EGFP-expressing *S. aureus* strains. Confocal laser scanning microscopy confirm that EGFP-expressing *S. aureus* could be easily identified inside HaCaT keratinocytes.

48

49

50

51

52

**Conclusion:** This study reported an efficient protocol for expressing EGFP in *S. aureus* clinical strains and demonstrated that these EGFP-expressing strains are suitable for adhesion and internalization assays on HaCaT cells. EGFP-expressing *S. aureus* clinical strains may be of a major interest to perform static or dynamic studies of *S. aureus* colonization in vitro.

## INTRODUCTION

53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83

*Staphylococcus aureus* acts as both a leading cause of infections and a commensal bacterium in humans (Gagnaire et al., 2017; Verhoeven et al., 2014). Approximately one third of the whole population is colonized by *S. aureus* and the anterior nares is considered as the main reservoir (Verhoeven et al., 2014). Previously considered as an exclusive extracellular bacterium, *S. aureus* has been shown to be able to invade many non-professional phagocytic cells (NPPCs) *in vitro* but also in both colonized and infected patients (Garzoni and Kelley, 2009; Hanssen et al., 2017; Rigai et al., 2018; Yang et al., 2018). The tripartite interaction between fibronectin, the  $\alpha 5\beta 1$  integrin exposed at the host cell plasma membrane and fibronectin-binding proteins expressed by *S. aureus* is widely acknowledged as the main internalization pathway of *S. aureus* in NPPCs (Josse et al., 2017). However, several others *S. aureus* virulence factors such as staphylococcal autolysin (Atl) and extracellular adherence protein (EAP) have been found to foster *S. aureus* internalization in NPPCs (Bur et al., 2013; Nguyen et al., 2018).

By contrast to the important knowledge generated from “laboratory” strains such as Newman or the 8325-4 derivatives strains, little is known about the mechanisms driving the internalization rate and the intracellular persistence of *S. aureus* clinical isolates at least because genetic manipulations in *Staphylococcus* species relied on labour intensive protocols and only a limited number of *S. aureus* laboratory strains have been successfully genetically modified (Chambers and Deleo, 2009). In fact, wild type *S. aureus* have an impenetrable restriction barrier preventing the uptake of “foreign” DNA. Monk and colleagues have demonstrated that DNA plasmid isolated from *E. coli* DH10B  $\Delta dcm$  (called DC10B) bypass the conserved type IV restriction system *SauSI* (which specifically recognizes cytosine methylated DNA) and enable transforming clinical strains of *S. aureus* (Monk et al., 2012). This major finding has extended the possibility of genetic manipulations in *S. aureus* especially regarding clinical strains that are protected from foreign DNA.

*In vitro* cell models associated with fluorescent labelling are valuable tools to study the molecular mechanisms involved in host bacteria interactions. However, after labelling of live bacteria with fluorescent reporter, the fluorescence intensity decreases during time according to the multiplication of live bacteria (*i.e.* the quantity of

84 fluorescent reporter is divided by two at each bacterial multiplication). The  
85 transformation of bacterial strains with gene coding for fluorescent reporters such as  
86 EGFP helps to overcome this limitation (Aymanns et al., 2011). Bacteria expressing  
87 fluorescent reporter could be tracked inside the cells for few hours (Neumann et al.,  
88 2016).

89 The aim of this work was to develop and validate a one-step transformation  
90 protocol for constructing EGFP-expressing *S. aureus* clinical strains belonging to  
91 different genetic backgrounds without interfering with their adhesion and  
92 internalization capacities on a keratinocyte model.

## 93 **Materials and methods**

### 94 **Microbiology procedures**

95 The bacterial strains used in this study are listed in **Table 1**. *E. coli* (NM522 and  
96 DC10B) bacteria were grown in Luria-Bertani broth (LB) (ThermoFisher Scientific). *S.*  
97 *aureus* strains were growth in brain heart infusion (BHI) (Becton Dickinson) or onto  
98 tryptic soy agar (TSA) (Becton Dickinson). Culture media were incubated at 37°C with  
99 shaking at 250 rpm in case of liquid medium. When required, antibiotics were added to  
100 culture media: spectinomycin (S4014, Sigma-Aldrich) was used at 120 mg/l for *S. aureus*  
101 and ampicillin was used at 100 mg/l for *E. coli*. Antimicrobial susceptibility testing of *S.*  
102 *aureus* clinical strains was done with the Vitek2 system (AST-P559, bioMérieux, France).  
103 The minimal inhibitory concentration (MIC) to spectinomycine was determined by using  
104 E-test (529240, bioMérieux). *S. aureus* strains were genotyped using spa-typing and  
105 DNA microarray (*S. aureus* genotyping kit v2.0, Alere, Jouy-en-Josas, France) as  
106 previously described (Verhoeven et al., 2015b).

### 107 **EGFP-encoding plasmid preparation**

108 The pBSU101 plasmid (gift from Barbara Spellerberg) was used to express  
109 enhanced green fluorescent protein (EGFP) in *S. aureus*. This shuttle plasmid harbors a  
110 copy of the *egfp* gene under the control of the promoter of the CAMP-factor gene (*cfb*) of  
111 *Streptococcus agalactiae* which enable a high-level EGFP expression in several Gram-  
112 positive bacteria including *S. aureus* (Aymanns et al., 2011). The pBSU101 was isolated  
113 from *E. coli* DH5 $\alpha$  NM522 (New England Biolabs) using mini spin columns (Nucleospin

114 740588, Macherey Nagel) according to the manufacturer's instructions and transformed  
115 into *E. coli* DC10B (gift from Ian Monk) by thermal shock (Monk et al., 2012).

### 116 **One step transformation protocol**

117 *S. aureus* clinical strains were inoculated in TSB for 24h. Overnight cultures of  
118 were diluted to an optical density (OD) at 600 nm of 0.1 in pre-warmed TSB media and  
119 incubated at 37 °C with shaking at 250 rpm until the OD at 600 nm reach 0.5. Cultures  
120 were transferred to centrifuge tubes and chilled on ice for 10 minutes. The cells were  
121 harvested by centrifuging at 4500×g at 4 °C for 20 minutes, washed twice in equal  
122 volume ice-cold sterile water and pelleted at 4 °C. The cells were then washed in 1/10,  
123 1/25 and 1/200 volume of ice-cold 10% sterile glycerol. Aliquots of 70 µl were stored at  
124 -80 °C. For electroporation, the cells were thawed at room temperature for 10 min,  
125 centrifuged at 5000×g for 3 min and re-suspended in 50 µl of sterile 10% glycerol with  
126 500 mM sucrose. Plasmid DNA (5 µg) of pBSU101 isolated from *E. coli* DC10B was added  
127 to the cells in a sterile 0.1 cm electroporation cuvette. The cells were pulsed once at 1.8  
128 kV and 2.5 ms time constant (MicroPulser, Biorad), outgrown in 1 ml of TSB containing  
129 500 mM sucrose for 90 min at 37°C, spread on TSA plates containing 120 µg/ml  
130 spectinomycin and incubated overnight at 37°C.

### 131 **FACS analysis of EGFP-expressing *S. aureus* clinical strains**

132 Fluorescence stability was checked by analyzing the fluorescence means and the  
133 total fluorescent populations for all the transformed *S. aureus* strains in the exponential  
134 phase of growth (4 hours) in BHI (Sigma-Aldrich) with spectinomycin. A 10 µl-volume  
135 of the bacterial suspension was diluted in 490 µl of sterile distilled water and assayed  
136 by flow analysis cell sorting (FACS) (FACSCantoII, Becton Dickinson). Relative  
137 fluorescence values were determined by analyzing 50 000 events for each sample by  
138 using FACSDiva software (V 6.1.2, Becton Dickinson).

### 139 **Adhesion and internalization assays**

140 HaCaT (Cell line service, Germany) cells were seeded into 24-well plates at  
141  $1.5 \times 10^5$  cells per well and were maintained with serum-free medium constituted of 50%  
142 RPMI-1640 (R7388, Sigma-Aldrich) and 50% DMEM (D6429, Sigma-Aldrich)  
143 supplemented with 2% Ultrosor G (Pall, Dreieich, Germany), 1 mM L-Glutamine (G7513,



144 Sigma-Aldrich), 1x MEM non-essential amino acids (M7145, Sigma-Aldrich) and 1x  
145 antibiotic antimycotic solution (A5955, Sigma-Aldrich) for three days at 37°C with 5%  
146 CO<sub>2</sub>. Cells were washed with PBS (806552, Sigma-Aldrich) and media was changed with  
147 fresh RPMI-1640 (R8755, Sigma-Aldrich) 24 hours prior *S. aureus* inoculation.  
148 Spectinomycin (240 µg/ml) was add to the wells designed to be infected with EGFP-  
149 expressing strains. Confluent cells (10<sup>6</sup> cells/well) were inoculated with *S. aureus* strains  
150 in the exponential phase of growth (multiplicity of infection of 1) and incubated for 2  
151 hours at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. To quantify both adhered and internalized  
152 bacteria, cells were washed 3 times with PBS to remove free bacteria. To quantify only  
153 intracellular bacteria, extracellular bacteria were killed by adding 10 µg/ml lysostaphine  
154 (Ambi Products LLC, NY, USA) for 1h at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. The efficiency of the  
155 lysostaphin treatment was systematically tested by plating the cells supernatant. The  
156 infected HaCaT cells were finally lysed by osmotic shock using sterile water, trypsin-  
157 EDTA (Sigma-Aldrich) and 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) (2:1:1). The determination  
158 of bacterial viable counts was carried out through plating serial dilutions of the lysates  
159 on blood agar (43041, bioMérieux, France) using an automatic seeder (EasySpiral Dilute,  
160 Interscience, Saint-Nom la Bretèche, France). The calculation of the bacterial loads was  
161 performed after incubation at 37 °C for 24 h, using a plate-reader (Scan1200,  
162 Interscience).

### 163 **Confocal laser scanning microscopy (CLSM)**

164 HaCaT cells were grown on a glass-bottom 4 chambers culture slides (C354104,  
165 Falcon). Internalization assay was conducted as described above. After treatment with  
166 lysostaphin, cells were washed three times with PBS, then fixed with 4%  
167 paraformaldehyde (Sigma-Aldrich). Cells were therefore permeabilized with 0.1%  
168 Triton X-100 then stained with TO-PRO-3 (Thermo Fisher Scientific) and rhodamine  
169 phalloidin (Molecular Probes). Image stacks were acquired by FluoView FV1200  
170 confocal laser scanning microscope (CLSM) equipped with UPlanSApo 60x/1.35 Oil  
171 [infinity]/0.17 FN26.5 objective and FV10-ASW4.1 software (Olympus, Tokyo, Japan).

### 172 **Statistical analysis**

173 For each strain, adhesion and internalization essays were performed at least  
174 three times in two independent experiences (n = 6). The unpaired t-test was used to

175 compare the levels of adhesion and internalization of WT and EGFP-expressing strains.  
176 *P* values under 0.05 were considered statically significant. Statistical tests were  
177 performed using GraphPad Prism (v7, La Jolla California, USA).

## 178 Results

### 179 One step transformation of *Staphylococcus aureus* clinical isolates

180 A collection of 20 *S. aureus* clinical strains isolated from bloodstream infections,  
181 prosthetic joint infection and nasal carriage and belonged to five different clonal  
182 complexes (CC5, CC8, CC30, CC45 and CC398) were randomly selected for evaluating the  
183 transformation protocol. All the strains were susceptible to spectinomycin with MIC  
184 ranging from 16 mg/l to 48 mg/l (**Table 1**). Regardless of the genetic background or the  
185 clinical origin, all the *S. aureus* clinical strains and the reference strain ATCC 29213 were  
186 successfully transformed by electroporation with pBSU101. A single colony of each  
187 EGFP-expressing *S. aureus* strain was phenotypically selected on selective agar under  
188 UV light. The expression of EGFP was confirmed by fluorescent microscopy (**Figure 1**).  
189 The constructs were all resistant to spectinomycin with a MIC > 128 mg/l (data not  
190 shown).

### 191 EGFP expression by laboratory and clinical strains of *S. aureus*

192 EGFP expression in *S. aureus* clinical strains was assessed by FACS using FITC  
193 channel. Figure 2a depicts the FACS diagrams of *S. aureus* ATCC 29213 transformed with  
194 pBSU101. The mean proportion of EGFP-expressing bacteria was 97.2% ( $\pm 2.1$ ) for the  
195 21 transformed strains (**Figure 2b**). Regarding the clonal complex, the mean  
196 proportions of EGFP-expressing bacteria ( $\pm$  SD) were 97.9% ( $\pm 0.7$ ), 97.9% ( $\pm 0.4$ ),  
197 96.8% ( $\pm 3.0$ ), 98.0% ( $\pm 1.2$ ) and 95.3% ( $\pm 3.0$ ) for CC5, CC8, CC30, CC45 and CC398,  
198 respectively. The mean fluorescence intensity (MFI) varied from one strain to another  
199 independently of the clonal complexes or the clinical origins (**Figure 2b**).

### 200 Adhesion and internalization of EGFP-expressing *S. aureus* strains

201 The adhesion and internalization levels of both EGFP-expressing and wild type  
202 strains were assessed using a cell model of HaCaT keratinocytes inoculated at a MOI of  
203 1. The mean adhesion level ( $\pm$  SEM) was  $6.50 \pm 0.06$  and  $6.44 \pm 0.05$  Log CFU/10<sup>6</sup> cells  
204 for EGFP-expressing *S. aureus* and parental strains, respectively ( $p > 0.5$ ) (**Figure 3a**).

205 The mean internalization level ( $\pm$  SEM) at 2h post-inoculation was  $4.04 \pm 0.08$  and  $4.03$   
206  $\pm 0.07$  Log CFU/ $10^6$  cells for EGFP-expressing *S. aureus* and parental strains, respectively  
207 ( $p > 0.5$ ) (**Figure 3b**). CLSM was used to visualize EGFP-expressing strains inside HaCaT  
208 keratinocytes 2h post-inoculation (**Figure 4**).

## 209 Discussion

210 This study reports a one-step transformation protocol based on the pBSU101  
211 plasmid that enable EGFP-expression in 20 *S. aureus* clinical isolates belonging to five  
212 different genetic backgrounds including CC5, 8, 30, 45 and 398. This one-step protocol  
213 based on the use of the *E. coli* DC10B accelerates the process of *S. aureus* transformation  
214 and allows to transform clinical isolates from different clonal complexes. In addition, we  
215 demonstrate that the expression of EGFP do not decrease neither adhesion nor  
216 internalization levels of transformed *S. aureus* in keratinocytes.

217 The plasmid pBSU101 that have been use in the study harbors a copy of the green  
218 fluorescent variant gene *egfp* under the control of the CAMP-factor gene (*cfb*) promoter  
219 of *Streptococcus agalactiae* (Aymanns et al., 2011). By using this plasmid, the fluorescent  
220 reporter is not present at the surface of the bacteria which avoid masking *S. aureus*  
221 surface proteins that could be involved in adhesion or internalization process. By  
222 contrast, fluorescent labeling using dye (e.g. Vancomycin bodipy FL) or antibodies that  
223 interact with the bacterial cell wall could modify interaction with cell host receptors  
224 (Hildebrandt et al., 2016). In this study, we showed that, EGFP expressed inside the  
225 bacteria did not modify adhesion and internalization capacities of *S. aureus*. Thus we  
226 could hypothetise that the expression of the fibronectin binding proteins, the major  
227 invasion factor in *S. aureus*, is not impacted by the expression of the EGFP.

228 The EGFP expression enables live imaging of *S. aureus* clinical isolates because  
229 the EGFP expression driven by pBSU101 do not alter the bacterial viability (Aymanns et  
230 al., 2011) whereas vancomycin based labeling have been found to have a bacteriostatic  
231 activity that limit its use of over the time (Hildebrandt et al., 2016). By contrast to  
232 peptidoglycan-binding or DNA-binding dyes staining, plasmid encoded fluorescent  
233 reporters are highly specific since they are expressed only in transformed strains.  
234 Recently, Kato et al. developed fluorescent protein tracing vectors for multicolor imaging  
235 of three clinically isolated *S. aureus* strains (N315, MW2 and TY34) (Kato et al., 2017).

236 Furthermore, imaging of EGFP-expressing *S. aureus* does not require traditional  
237 immunostaining steps of fixation, permeabilization and antibody labelling. Our results  
238 showed that intracellular EGFP-expressing *S. aureus* clinical isolates can be easily  
239 localized by CLSM and thus the rate of *S. aureus*-invaded cells can be measured. By  
240 contrast, invasion rates obtained from culture experiments are calculated as mean of  
241 viable bacteria divided by total number of cells and therefore does not give any  
242 information about the distribution of *S. aureus* in the cells monolayer,

243         The use of pBSU101 to transform clinical isolates of *S. aureus* has some limits. The  
244 EGFP fluorescence emission is known to be optimal at pH 7 but decreased almost to zero  
245 at pH 5 (Haupts et al., 1998). Since internalized *S. aureus* can be found inside  
246 phagolysosomes, the detection of these cocci can be therefore impaired. Other  
247 fluorescent proteins (*e.g.* red fluorescent protein) have been found to resist to pH  
248 reduction and could be useful to overcome this limitation. Besides, EGFP-encoding  
249 pBSU101 requires antibiotic selection to foster the transcription of both  
250 acetyltransferase and EGFP. Although the use of antibiotic is easy in cell models, it is not  
251 suitable in animal models. This limitation can be overpassed by chromosomic  
252 integration that ensures constitutive expression of the fluorescent reporter without the  
253 need for antibiotic pressure (Jong et al., 2017). However, the protocol is more labor  
254 intensive and it is probably difficult to apply to a number of clinical isolates. We also  
255 observed that fluorescence intensity varied from one strain to another. Automatic  
256 quantification of bacteria based on fluorescence intensity seems will required a  
257 calibration step for each strain. The ability of each strain to form clump could also have  
258 impact for automated quantification system based. Nevertheless, the use of EGFP-  
259 expressing *S. aureus* strains may be easier, more specific and more accurate than live  
260 labeling bacteria with fluorescents dyes or cell-permeable nuclear probes (Hildebrandt  
261 et al., 2016; Ko et al., 2013). Although, only EGFP was tested in this study, the pBSU101  
262 gives opportunity to replace the *egfp* gene with another gene coding for different  
263 fluorescent proteins such as yellow fluorescent protein or mCherry that have been found  
264 suitable to label different *S. aureus* laboratory strains (RN 4220, SH1000 and SH1001)  
265 (Malone et al., 2009; Rodriguez et al., 2017).

266 To the best of our knowledge, this is the first report describing a large collection  
267 of EGFP-expressing *S. aureus* clinical strains that could represent a useful tool to study  
268 adhesion and internalization within NPPCs such as keratinocytes. The one step protocol  
269 could be used to develop similar valuable tools optimized to study lifestyle of *S. aureus*  
270 during intracellular persistence or biofilm formation.

### 271 **Conflict of interest**

272 The authors declare having no conflict of interest related to this study.

### 273 **Acknowledgments**

274 *Escherichia coli* DH10B was kindly provided by Ian Monk (Moyne Institute of  
275 Preventive Medicine, Department of Microbiology, School of Genetics and Microbiology,  
276 Trinity College Dublin, Dublin, Ireland). The plasmid pBSU101 was a gift from Prof  
277 Barbara Spellerberg (Institute of Medical Microbiology and Hygiene, University of Ulm,  
278 Ulm, Germany).

### 279 **Funding**

280 This study was funded by the University Jean Monnet through a 12 months post-  
281 doctoral contract (SCB). MFM was funded by a PhD grant from the European Erasmus  
282 Mundus Al-Idrisi II program supported by the University of Granada, Spain (2013-  
283 2401/001-001-EMA2).

### 284 **Contributions**

285 POV, PB and BP designed the study. SCB performed experiments for transforming  
286 *S. aureus* strains. MFM and JR performed adhesion and internalization assays. SCB, MFM  
287 and JR performed cytometry assays. HZ, JR and EA performed microscopy imaging. POV,  
288 MFM and EBN analyzed the results. POV, MFM, SCB, EBN, FG and BP wrote the  
289 manuscript.

290

**Table 1. Bacterial strains used in this study**

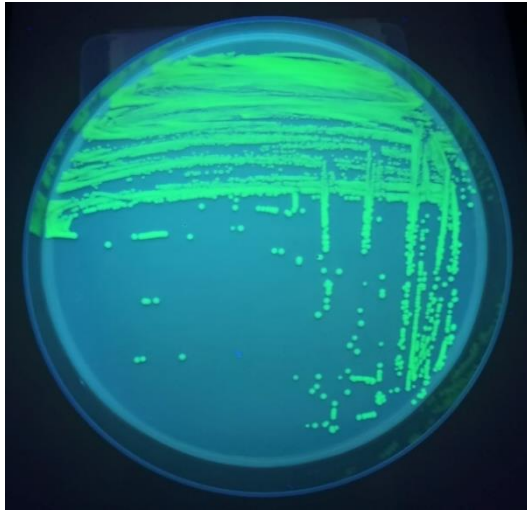
Strains	Description/genotype	Origin
<i>Escherichia coli</i>		
NM522	<i>F' proAB lac<sup>d</sup> Δ(lacZ)M15/Δ(lac-proAB) thi hsd-5</i>	(Gough and Murray, 1983)
DC10B	<i>dam<sup>+</sup> dcm<sup>-</sup> ΔhsdRMS endA1 recA1</i>	(Monk et al., 2012)
<i>Staphylococcus aureus</i>		
ATCC 29213	Reference strain	(Rudrik et al., 1985)
CC5-BJI	Bone and joint infection, CC5, t002, MIC <sub>spec</sub> = 16 mg/l	This study
CC5-BSI	Bacteremia, CC5, t13478, MIC <sub>spec</sub> = 16 mg/l	This study
CC5-COL1	Nasal colonization, CC5, t002, MIC <sub>spec</sub> = 16 mg/l	This study
CC5-COL2	Nasal colonization, CC5, t002, MIC <sub>spec</sub> = 16 mg/l	This study
CC8-BJI	Bone and joint infection, CC8, t008, MIC <sub>spec</sub> = 16 mg/l	This study
CC8-BSI	Bacteremia, CC8, t1905, MIC <sub>spec</sub> = 16 mg/l	This study
CC8-COL1	Nasal colonization, CC8, t008, MIC <sub>spec</sub> = 16 mg/l	This study
CC8-COL2	Nasal colonization, CC8, t008, MIC <sub>spec</sub> = 16 mg/l	This study
CC30-BJI	Bone and joint infection, CC30, t012, MIC <sub>spec</sub> = 16 mg/l	This study
CC30-BSI	Bacteremia, CC30, t019, MIC <sub>spec</sub> = 16 mg/l	This study
CC30-COL1	Nasal colonization, CC30, t012, MIC <sub>spec</sub> = 16 mg/l	This study
CC30-COL2	Nasal colonization, CC30, t2082, MIC <sub>spec</sub> = 32 mg/l	This study
CC45-BJI	Bone and joint infection, CC45, t015, MIC <sub>spec</sub> = 16 mg/l	This study
CC45-BSI	Bacteremia, CC45, t1575, MIC <sub>spec</sub> = 16 mg/l	This study
CC45-COL1	Nasal colonization, CC45, t230, MIC <sub>spec</sub> = 24 mg/l	This study
CC45-COL2	Nasal colonization, CC45, t2301, MIC <sub>spec</sub> = 24 mg/l	This study
CC398-BJI	Bone and joint infection, CC398, t571, MIC <sub>spec</sub> = 24 mg/l	This study
CC398-BSI	Bacteremia, CC398, t571, MIC <sub>spec</sub> = 24 mg/l	This study
CC398-COL1	Nasal colonization, CC398, t1149, MIC <sub>spec</sub> = 24 mg/l	This study
CC398-COL2	Nasal colonization, CC398, t571, MIC <sub>spec</sub> = 24 mg/l	This study

CC: clonal complex; MIC<sub>spec</sub>: minimal inhibitory concentration for spectinomycin

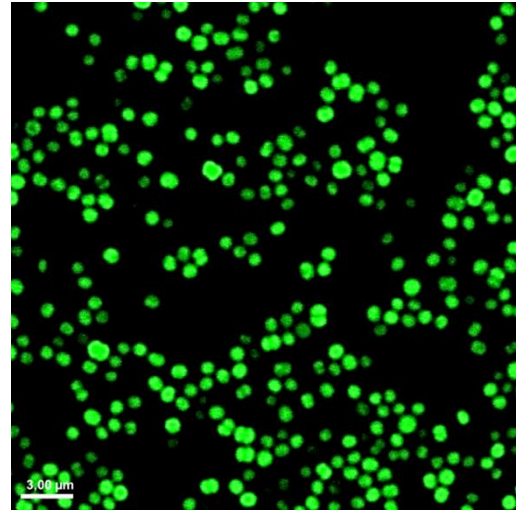
291

292

a



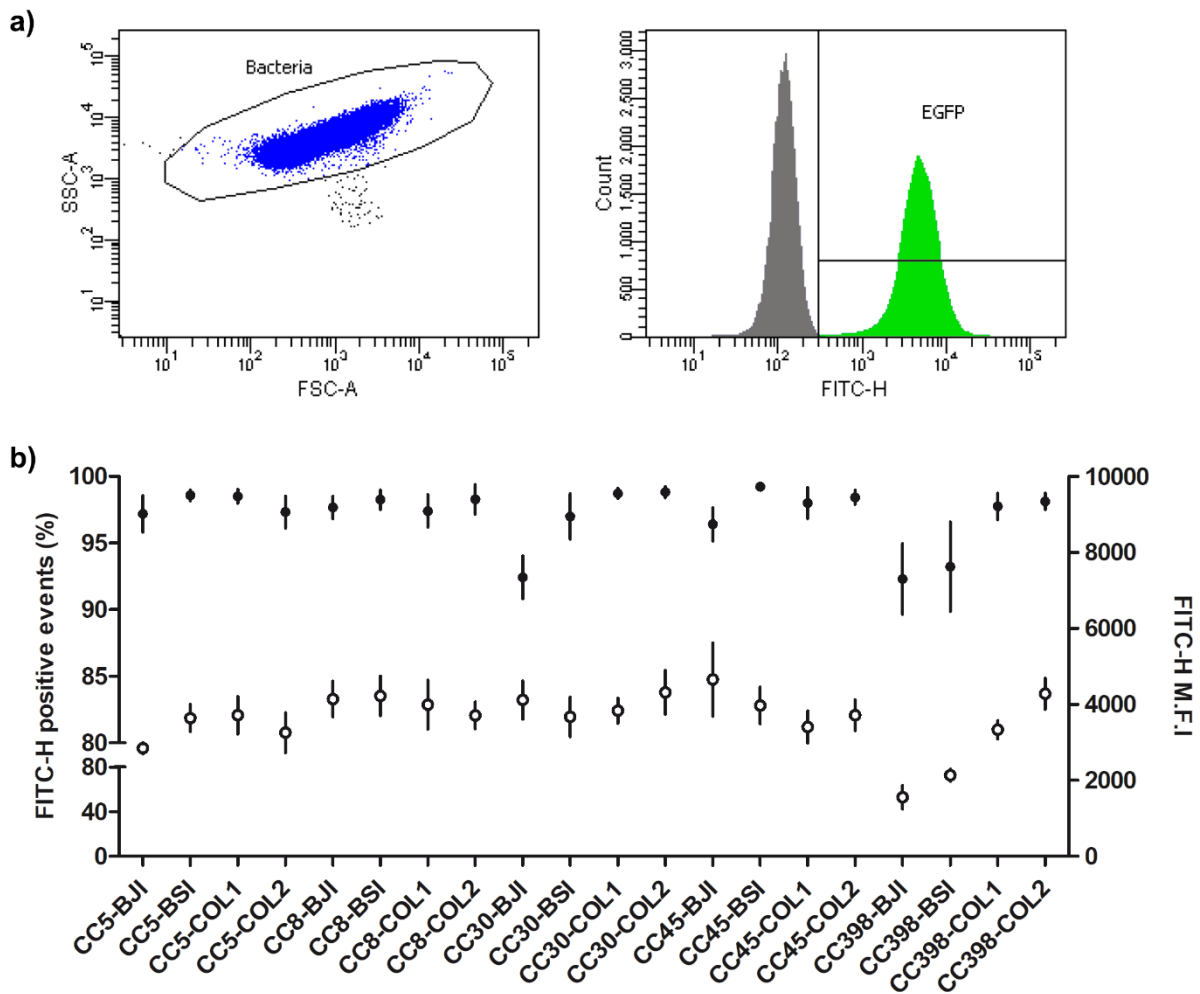
b



293

294

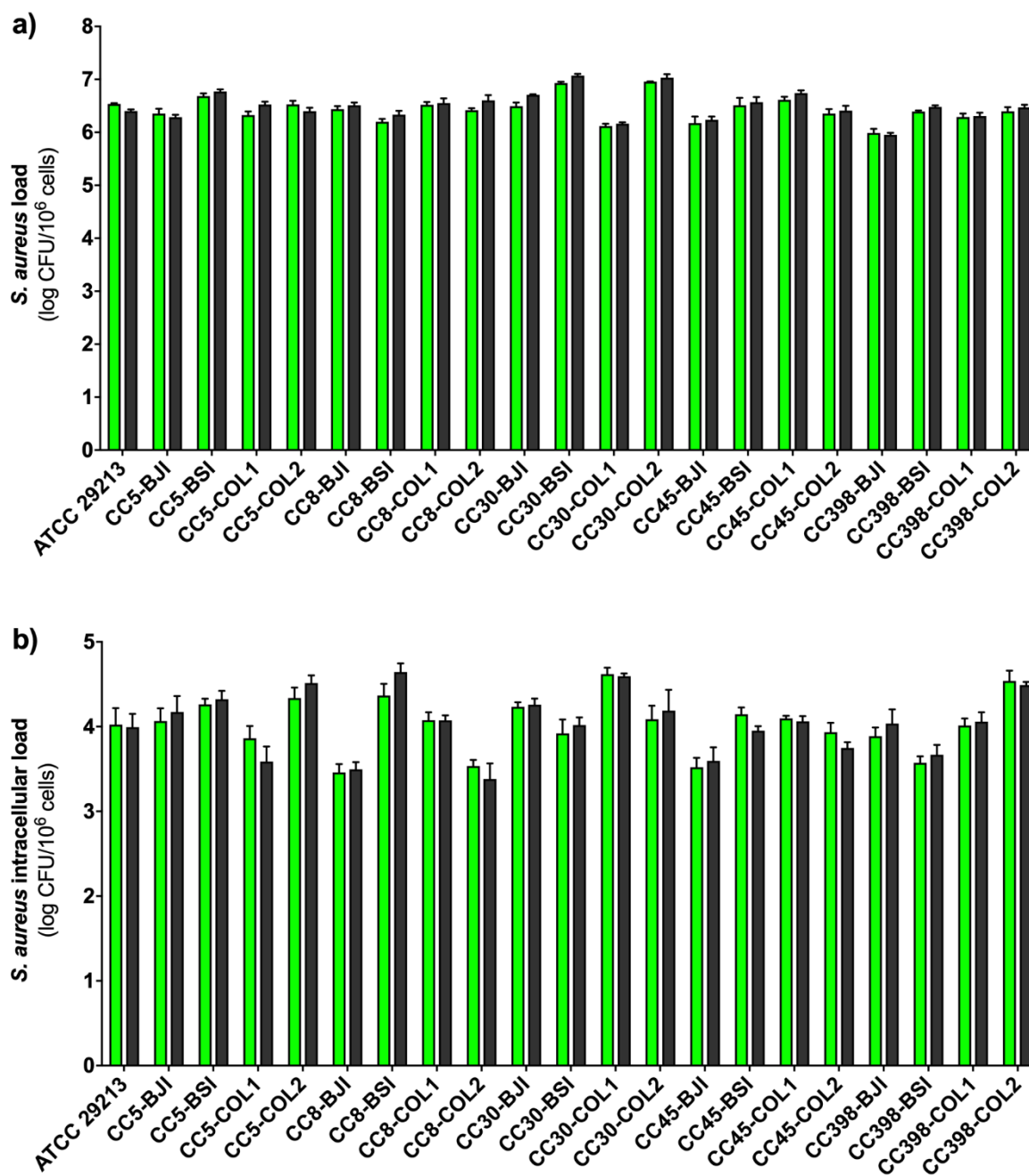
295 **Figure 1.** Transformed *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 with the plasmid  
296 **pBSU101** observed under UV light (a) and by epifluorescence microscope (b). Bar,  
297 3 μm.



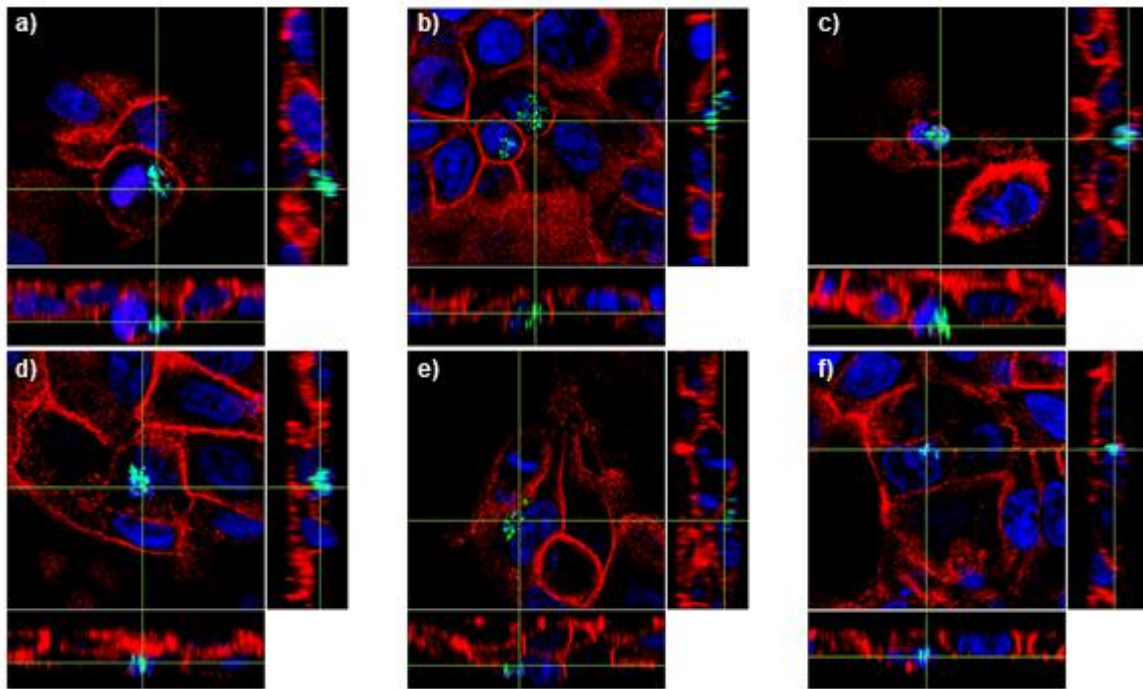
298

299 **Figure 2. FACS analysis of EGFP-expressing *Staphylococcus aureus* strains**  
 300 **transformed with pBSU101.** a) Dot plot and FITC-H histogram of *S. aureus* ATCC 29213  
 301 transformed with pBSU101. b) FITC-H values of the 20 *S. aureus* clinical strains transformed  
 302 with the pBSU101. The rate of fluorescent bacteria (closed circles) and the mean  
 303 fluorescence intensity (open circles) were calculated using EGFP-expressing *S. aureus*  
 304 strains grown for 4h in brain heart infusion with 120 mg/l spectinomycin. Data represents  
 305 the mean of 4 independent experiments for which 50 000 events were recording. Vertical  
 306 bars represent the SEM. CC: clonal complex. BJI: bone and joint infection. BSI: blood stream  
 307 infection. COL: nasal colonization.





308  
 309 **Figure 3. Adhesion (a) and internalization (b) levels of EGFP-expressing *S. aureus***  
 310 **clinical strains (green) and their parental strain (black) by using confluent**  
 311 **monolayer of HaCaT cells inoculated using MOI of 1. Data represent the mean of 2**  
 312 **independent experiments in triplicate (n = 6). Error bars correspond to the SEM. No**  
 313 **significant differences were observed between each couple of strains ( $p > 0.05$ ).**



314

315 **Figure 4. Confocal laser scanning microscopy of internalized EGFP-expressing *S.***316 ***aureus* clinical strains in HaCaT cells.** *S. aureus* strains CC45-COL2 (a), CC8-BJI (b),

317 CC30-BJI (c), CC45-COL1 (d), CC398-BSI (e) and ATCC 29213 (f) are depicted in green. F-

318 Actin and nuclei of HaCaT cells were stained by rhodamine phalloidin (red) and TO-PRO3

319 (blue), respectively. 1800-fold magnification.

# Activité intracellulaire des molécules antimicrobiennes utilisées pour la décolonisation nasale par *Staphylococcus aureus*

Josselin Rigai<sup>1,2</sup>, **M. Fedy Morgene**<sup>1</sup>, Marie Gavid<sup>3</sup>, Yann Lelonge<sup>3</sup>, Zhiguo He<sup>4</sup>,  
Anne Carricajo<sup>1,2</sup>, Florence Grattard<sup>1,2</sup>, Bruno Pozzetto<sup>1,2</sup>, Philippe Berthelot<sup>1,5</sup>,  
Elisabeth Botelho-Nevers<sup>1,5</sup>, Paul Verhoeven<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire GIMAP (Groupe pour l'Immunologie des Muqueuse et Agents Pathogènes, EA3064), Université de Lyon, Saint-Etienne – France

<sup>2</sup> Laboratoire des Agents Pathogènes et Hygiène, CHU Nord de Saint-Etienne – France

<sup>3</sup> Service de chirurgie ORL, CHU Nord Saint-Etienne – France

<sup>4</sup> Laboratoire BiigC (Biologie, ingénierie et imagerie de la Greffe de Cornée EA2521), Université de Lyon, Saint-Etienne – France

<sup>5</sup> Service des Maladies Infectieuses, CHU Nord de Saint-Etienne – France

## Résumé


*S. aureus* est capable de s'internaliser dans différents types de cellules phagocytaires non professionnelles et a été observé récemment à l'intérieur des cellules épithéliales de la muqueuse nasale de porteurs sains. Le but de cette étude était d'évaluer l'activité intracellulaires de 21 molécules différentes antibiotiques et antiseptiques utilisées dans le cadre de la décolonisation nasale par *S. aureus* dans notre modèle in vitro de cellules HaCaT qui mime l'épithélium nasal.

Les résultats ont montré que *S. aureus* est internalisé aussi bien par les cellules HaCaT que par les cellules épithéliales nasales normales (HNEC) issues de volontaires porteurs sains de façon focale. Sur les 31 porteurs nasaux, 5 (16%) ont montré la présence de *S. aureus* à l'intérieur de leurs HNEC. La plupart des molécules testées ont montré une activité intracellulaire antistaphylococcique faible. Parmi les molécules les plus actives au niveau intracellulaire, l'acide fusidique, la clindamycine, le linézolide, la minocycline, la ciprofloxacine, la moxifloxacine, la rifampicine et la lévofloxacine réduisent les taux des bactéries intracellulaires dans une fourchette comprise entre 0,43 et 1,33 log UFC/10<sup>6</sup> cellules par rapport au contrôle sans traitement (charge intracellulaire initiale de 4,03 ± 0,43 log UFC/10<sup>6</sup> cellules,  $p < 0,001$ ).


En revanche, la mupirocine et la chlorhexidine, les deux molécules antibactériennes les plus utilisées actuellement dans les stratégies de décolonisation en application locale nasale et pour la toilette générale, ont montré une activité intracellulaire très faible avec une réduction de la charge bactérienne intracellulaire de respectivement 0,19 et 0,23 log UFC/10<sup>6</sup> cellules.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats montrent que *S. aureus* peut se retrouver à l'intérieur des cellules épithéliales de la muqueuse nasale chez les porteurs sains. Ce réservoir intracellulaire est difficilement accessible pour la plupart des molécules antimicrobiennes actuellement utilisée pour la décolonisation nasale, y compris la mupirocine et la chlorhexidine. Il semble donc nécessaire de mieux comprendre le rôle de *S. aureus* intracellulaire dans la persistance de la colonisation nasale et dans l'échec de la décolonisation chez certains sujets, afin de proposer de nouvelles stratégies de décolonisation plus efficaces.

## Intracellular activity of antimicrobial compounds used for *Staphylococcus aureus* nasal decolonization

J. Rigail<sup>1,2</sup>, M. F. Morgene<sup>2</sup>, M. Gavid<sup>3</sup>, Y. Lelonge<sup>3</sup>, Z. He<sup>4</sup>, A. Carricajo<sup>1,2</sup>, F. Grattard<sup>1,2</sup>, B. Pozzetto<sup>1,2</sup>, P. Berthelot<sup>1,5</sup>, E. Botelho-Nevers<sup>1,5</sup> and P. O. Verhoeven <sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Group for Mucosal Immunity and Pathogen Agents (GIMAP), EA 3064, University of Lyon, 42023 St-Etienne, France; <sup>2</sup>Laboratory of Infectious Agents and Hygiene, University Hospital of St-Etienne, 42055 St-Etienne cedex 02, France; <sup>3</sup>Department of Ear Nose Throat Surgery, University Hospital of St-Etienne, 42055 St-Etienne cedex 02, France; <sup>4</sup>Corneal Graft Biology, Engineering and Imaging Laboratory (BiIGC), EA2521, University of Lyon, 42023 St-Etienne, France; <sup>5</sup>Department of Infectious Diseases, University Hospital of St-Etienne, 42055 St-Etienne cedex 02, France

\*Corresponding author. Laboratory of Infectious Agents and Hygiene, University Hospital of St-Etienne, 42055 St-Etienne cedex 02, France. Tel: +33-4-77-82-92-28; Fax: +33-4-77-82-84-60; E-mail: paul.verhoeven@univ-st-etienne.fr  [orcid.org/0000-0003-4352-1263](https://orcid.org/0000-0003-4352-1263)

Received 24 April 2018; returned 23 May 2018; revised 3 July 2018; accepted 11 July 2018

**Background:** *Staphylococcus aureus* is able to invade mammalian cells during infection and was recently observed inside nasal mucosa of healthy carriers.

**Objectives:** To determine the intracellular activity of antimicrobial compounds used for decolonization procedures using a cell model mimicking *S. aureus* nasal epithelium invasion.

**Patients and methods:** HaCaT cells and human nasal epithelial cells (HNECs) recovered from nasal swabs of *S. aureus* carriers were visualized by confocal laser scanning microscopy to detect intracellular *S. aureus* cells. An HaCaT cell model, mimicking *S. aureus* internalization observed *ex vivo* in HNECs, was used to assess the intracellular activity against *S. aureus* of 21 antimicrobial compounds used for nasal decolonization, including mupirocin and chlorhexidine.

**Results:** HaCaT cells and HNECs were found to internalize *S. aureus* with the same focal pattern. Most antimicrobial compounds tested on HaCaT cells were shown to have weak activity against intracellular *S. aureus*. Some systemic antimicrobials, including fusidic acid, clindamycin, linezolid, minocycline, ciprofloxacin, moxifloxacin, rifampicin and levofloxacin, reduced *S. aureus* intracellular loads by 0.43–1.66 log cfu/10<sup>6</sup> cells compared with the control ( $P < 0.001$ ). By contrast, mupirocin and chlorhexidine reduced the *S. aureus* intracellular load by 0.19 and 0.23 log cfu/10<sup>6</sup> cells, respectively.

**Conclusions:** These data indicate that most of the antimicrobial compounds used for nasal decolonization, including mupirocin and chlorhexidine, exhibit weak activity against intracellular *S. aureus* using the HaCaT cell model. This work emphasizes the need to better understand the role of the *S. aureus* intracellular reservoir during nasal colonization in order to improve decolonization procedures.

Article protégé par des droits d'auteurs. Doi : 10.1093/jac/dky318.

Article protégé par des droits d'auteurs. Doi : 10.1093/jac/dky318.

Article protégé par des droits d'auteurs. Doi : 10.1093/jac/dky318.



Article protégé par des droits d'auteurs. Doi : 10.1093/jac/dky318.

## B. Développement du modèle de d'infection des cellules HaCaT par rhinovirus

### Nouveau modèle d'infection par rhinovirus sur les cellules épithéliales HaCaT et impact de la clarithromycine sur la cinétique de l'infection

**M. Fedy Morgene**<sup>1</sup>, Corantin Morin<sup>1</sup>, Sylvie Pillet<sup>1,2</sup>, Philippe Berthelot<sup>1,3</sup>, Florence Morfin<sup>4</sup>, Bruno Pozzetto<sup>1,2</sup>, Elisabeth Botelho-Nevers<sup>1,3</sup>, Paul Verhoeven<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire GIMAP (Groupe pour l'Immunologie des Muqueuse et Agents Pathogènes, EA3064), Université de Lyon, Saint-Etienne – France

<sup>2</sup> Laboratoire des Agents Pathogènes et Hygiène, CHU Nord de Saint-Etienne – France

<sup>3</sup> Service de chirurgie ORL, CHU Nord Saint-Etienne – France

<sup>4</sup> Laboratoire de Virologie, Institut des Agents Infectieux, Hospices civiles de Lyon et Centre National de Référence des virus respiratoires, Lyon – France

#### Résumé

La modélisation *in vitro* de l'infection par RV est indispensable pour mieux comprendre la physiopathologie des infections par ce virus afin de proposer des traitements adéquats. Cependant, la propagation du RV est compliquée par le fait que seulement un nombre limité de lignées cellulaires humaines sont permissives à cet agent pathogène. Dans cette étude, nous démontrons que les kératinocytes humains HaCaT représentent un nouveau modèle pour l'étude de l'infection par les RV-A13, RV-A16 et RV-A19.

En utilisant une MOI de 0,1 les cellules HaCaT infectées par RV produisent des nouvelles particules infectieuses avec un titre viral d'environ  $3 \log_{10} \text{DICT}_{50}/\text{ml}$  sans effet cytopathique notable. L'infection par RV-A16 augmente l'expression de son propre récepteur d'entrée ICAM-1 sur les cellules HaCaT. Le traitement des cellules HaCaT avec une dose unique de clarithromycine (10  $\mu\text{M}$ ) avant l'infection par RV-A16 réduit le titre viral de 93 et 60% pendant les deux premiers jours d'infection ( $p < 0,01$ ).

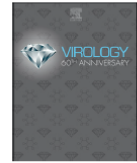
L'effet inhibiteur de la clarithromycine a été maintenu sur toute la période de l'infection en administrant des doses journalières (entre 94 et 77 % du premier au sixième jour d'infection,  $p < 0,01$ ). Cette inhibition de la réplication semble être due à la répression de l'expression d'ICAM-1. Ce modèle d'infection des cellules HaCaT constitue un outil intéressant pour l'étude des co-infections virus-bactérie au niveau cellulaire.

Virology 523 (2018) 27–34



Contents lists available at ScienceDirect

Virology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/virology](http://www.elsevier.com/locate/virology)

## HaCaT epithelial cells as an innovative novel model of rhinovirus infection and impact of clarithromycin treatment on infection kinetics



M. Fedy Morgene<sup>a</sup>, Corantin Maurin<sup>a</sup>, Sylvie Pillet<sup>a,b</sup>, Philippe Berthelot<sup>a,c</sup>, Florence Morfin<sup>d</sup>, Bruno Pozzetto<sup>a,b,\*</sup>, Elisabeth Botelho-Nevers<sup>a,c,1</sup>, Paul O. Verhoeven<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Group for Mucosal Immunity and Pathogen Agents (GIMAP EA3064), Faculty of Medicine of Saint-Etienne, University of Lyon, France

<sup>b</sup> Laboratory of Infectious Agents and Hygiene, University Hospital of Saint-Etienne, France

<sup>c</sup> Department of Infectious Diseases, University Hospital of Saint-Etienne, France

<sup>d</sup> Laboratory of Virology, Institute for Infectious Agents, Hospices Civils de Lyon and National Reference Centre for Respiratory Viruses, Lyon, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

HaCaT  
Epithelial cell line  
Keratinocyte  
Rhinovirus  
ICAM-1  
Clarithromycin

### ABSTRACT

The in vitro propagation of human rhinoviruses (RVs) is difficult because only few continuous human cell lines are permissive to these agents. We propose an innovative model of epithelial cell infection using a non-transformed continuous keratinocyte line from human origin (HaCaT cells). After infection with RV-A13, RV-A16 or RV-A19, HaCaT cells produced infectious particles without showing any observable cytopathic effect and overexpressed ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1), the major entry receptor of RVs. Furthermore, the treatment of HaCaT cells with 10  $\mu$ M clarithromycin reduced the viral titer by 93% and 60% during the first and second days following viral infection, respectively, probably by down-regulating ICAM-1 expression. This original model of epithelial cell infection by RV could be useful to study chronic viral infection and bacterium-virus interactions at the cell level. These results also suggest that clarithromycin may be evaluated for treating in vivo infections associating RV to a susceptible bacterium.

Article protégé par des droits d'auteurs. Doi : 10.1016/j.virol.2018.07.025.



Article protégé par des droits d'auteurs. Doi : 10.1016/j.virol.2018.07.025.

Article protégé par des droits d'auteurs. Doi : 10.1016/j.virol.2018.07.025.



Article protégé par des droits d'auteurs. Doi : 10.1016/j.virol.2018.07.025.

Article protégé par des droits d'auteurs. Doi : 10.1016/j.virol.2018.07.025.

Article protégé par des droits d'auteurs. Doi : [10.1016/j.virol.2018.07.025](https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.07.025).

## C. Etude in vitro de l'impact de l'infection par rhinovirus et de l'inflammation sur la colonisation à *S. aureus*

Après avoir validé le modèle de colonisation par *S. aureus* sur les cellules HaCaT et vérifié que ces cellules sont permissives à l'infection par RV et adaptées pour l'étude des interactions RV/bactéries, nous avons utilisé ce modèle pour étudier l'impact de l'infection par RV sur l'adhésion et l'internalisation de *S. aureus*. L'induction d'un état inflammatoire suite à un traitement des cellules par TNF $\alpha$  a permis de mimer l'infection virale, d'évaluer son effet sur la colonisation de différentes autres lignées cellulaires et d'investiguer la voie de signalisation mise en œuvre. L'analyse des données cliniques disponibles a montré que l'infection naturelle ou expérimentale par RV favorise l'augmentation de la charge nasale de *S. aureus* et sa dispersion dans l'environnement (Morgene et al., 2018a). De plus, quelques études in vitro ont montré que RV augmente l'adhésion et l'internalisation de *S. aureus* par augmentation de l'expression de la fibronectine cellulaire ou d'ICAM-1 (Morgene et al., 2018a). Cependant ni les motifs bactériens ni les voies cellulaires n'ont été déterminés et le mécanisme de cette synergie reste très mal compris. Nos résultats ont permis de montrer que l'infection par RV-A16 augmente l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules HaCaT à travers une nouvelle voie alternative mettant en œuvre la protéine bactérienne EAP et le récepteur cellulaire ICAM-1. Nous avons également montré que d'autres types cellulaires comme les pneumocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales peuvent internaliser *S. aureus* via cette voie alternative, notamment durant un état pro-inflammatoire. Nos résultats permettent aussi de suggérer que l'activation d'ICAM-1 par *S. aureus* à travers EAP entraîne une signalisation cellulaire qui active la tyrosine phosphatase SHP2 ; cette enzyme reconnaît le résidu Tyr<sup>518</sup> appartenant au motif intracellulaire d'ICAM-1 et active alors la tyrosine kinase Src qui déclenche à son tour une cascade d'évènements intracellulaires aboutissant au réarrangement du cytosquelette d'actine et à l'internalisation de *S. aureus*. Ces résultats pourraient expliquer l'augmentation de la charge de *S. aureus* durant le rhume et suggèrent que l'inflammation due à d'autres infections virales respiratoires ou à des interventions chirurgicales pourrait participer à la survenue des infections à *S. aureus*.

Les résultats de cette étude ont fait l'objet de plusieurs communications scientifiques en France et à l'étranger : (i) communication par poster à la retraite scientifique du Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI) tenue à Vogüé (France) du 4 au 6 avril 2018, (ii) communication orale au Congrès Européen de Microbiologie Clinique et Maladie Infectieuse (ECCMID) tenu à Madrid (Espagne) du 21 au 24 avril 2018, (iii) communication par poster au Symposium International sur les Staphylocoques et les Infections Staphylococciques (ISSSI) tenu à Copenhague (Danemark) du 23 au 26 août 2018 et (iv) communication orale au congrès national de la Société Française de Microbiologie (SFM) tenu à Paris (France) du premier au 3 octobre 2018. Une version préliminaire de cette étude est présentée dans ce manuscrit ; elle sera soumise prochainement pour publication dans le journal « Cell Host & Microbe».

1 **Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)**  
 2 **promotes *Staphylococcus aureus* internalization**  
 3 **via extracellular adherence protein (EAP)**  
 4 **in non-professional phagocytic cells**  
 5

6 **M. Fedy Morgene**<sup>1</sup>, Josselin Rigail<sup>1,2</sup>, Estelle Audoux<sup>1</sup>, Amélie Prier<sup>1</sup>, Florence  
 7 Grattard<sup>1,2</sup>, Bruno Pozzetto<sup>1,2</sup>, Philippe Berthelot<sup>1,3</sup>, Elisabeth Bothelo-Nevers<sup>1,3</sup>,  
 8 Frédéric Laurent<sup>4,5</sup> and Paul O. Verhoeven<sup>1,2</sup>  
 9

10 <sup>1</sup> GIMAP (Group for Mucosal Immunity and Pathogens Agents), EA3064, Faculty of Medicine of St-  
 11 Etienne, University of Lyon, France.

12 <sup>2</sup> Laboratory of Infectious Agents and Hygiene, University Hospital of Saint-Etienne, St-Etienne,  
 13 France.

14 <sup>3</sup> Infectious disease department, University Hospital of St-Etienne, France.

15 <sup>4</sup> CIRI (Centre International de Recherche en Infectiologie), INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS  
 16 Lyon, University of Lyon 1, Lyon, France.

17 <sup>5</sup> Institute for Infectious Agents, Hôpital de la Croix-Rousse, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.  
 18

19 **Running title:** EAP and ICAM-1 as a new alternative pathway of *Staphylococcus*  
 20 *aureus* internalization

21 **Keys words:** *Staphylococcus aureus*, internalization, keratinocytes, EAP, ICAM-1

22 **Corresponding author:** Paul Verhoeven (MD, PhD)

23 <http://orcid.org/0000-0003-4352-1263>

24 Laboratory of Infectious Agents and Hygiene, University Hospital of Saint-Etienne,  
 25 42055 Saint Etienne Cedex 02, France.

26 Phone number: +33 477 82 92 28.

27 Fax number: +33 477 82 84 60.

28 E-mail: paul.verhoeven@univ-st-etienne.fr

29 **Abstract words count:** 238

30 **Text words count:** 3598

31

**ABSTRACT**

32 *Staphylococcus aureus* is able to trigger its internalization by non-professional  
33 phagocytic cells (NPPCs) including human keratinocytes of the nasal vestibule. Although  
34 the main internalization pathway relies on the interaction between the  $\alpha 5\beta 1$  integrin,  
35 fibronectin, and staphylococcal fibronectin binding proteins, the mechanisms  
36 underlying *S. aureus* internalization in NPPCs remains not fully understood. The nasal  
37 vestibule is both the main reservoir of *S. aureus* in humans and an entry site for  
38 rhinoviruses. Using HaCaT keratinocytes that mimic the nasal vestibule, we found that  
39 RV-A16 infection increase *S. aureus* internalization. We screened *S. aureus* mutants for  
40 *fnbA/B*, *srtA* and *eap* and we found that both extracellular adherence protein (EAP) and  
41 intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) are required to promote internalization in  
42 RV-infected HaCaT cells. ICAM-1 expression induced by TNF $\alpha$  stimulation in both HaCaT  
43 keratinocytes and A549 alveolar epithelial cells was also found to increase  
44 internalization of *S. aureus* strains expressing EAP. In addition, blockage of ICAM-1  
45 reduced the *S. aureus* internalization level in EA.hy926 endothelial cells and HEL  
46 fibroblasts suggesting that this pathway is functional in different types of NPPCs. Finally,  
47 we showed that the inhibition of both SHP2 and c-Src (but not ILK) abolished the  
48 increase of *S. aureus* internalization induced by TNF $\alpha$  stimulation in HaCaT  
49 keratinocytes. Thus, in addition to the well described  $\alpha 5\beta 1$  integrin-based  
50 internalization pathway, EAP was found to trigger ICAM-1/SHP2 to promote *S. aureus*  
51 internalization in NPPCs and this mechanism could be fostered during pro-inflammatory  
52 stimulation.

53

**INTRODUCTION**

54 *Staphylococcus aureus* acts as both a leading cause of infections and a commensal  
55 bacterium in humans (Verhoeven et al., 2014; Wertheim et al., 2005). Approximately  
56 30% of the whole population is colonized by *S. aureus* and the *vestibulum nasi* (anterior  
57 nares) is considered as the main reservoir (Verhoeven et al., 2014). Numerous studies  
58 have shown that *S. aureus* is able to invade different types of non-professional  
59 phagocytic cells (NPPCs) *in vitro* but also in both colonized and infected patients  
60 (Garzoni and Kelley, 2009; Hanssen et al., 2017; Rigaille et al., 2018; Yang et al., 2018).

61 The major internalization pathway of *S. aureus* in NPPCs is initiated by tripartite  
62 interaction between fibronectin present in the extracellular matrix (ECM), the  $\alpha 5\beta 1$   
63 integrins exposed at the host cell plasma membrane and fibronectin-binding proteins A  
64 and B (FnBPA/B) expressed by *S. aureus* (Josse et al., 2017; Sinha et al., 1999). FnBPs are  
65 members of the family of microbial surface component recognizing adhesive matrix  
66 molecules (MSCRAMMs). MSCRAMMs includes more than twenty adhesins that are  
67 covalently linked to *S. aureus* wall by sortase A (SrtA) recognizing a conserved LPTXG  
68 motif at their C-terminal region (Heilmann, 2011).

69 Several other bacterial adhesins and cellular receptor have been reported to  
70 participate in *S. aureus* internalization in NPPCs (Alva-Murillo et al., 2014; Josse et al.,  
71 2017). Among these adhesins, extracellular adherence protein (EAP) have been  
72 described to foster *S. aureus* internalization in epithelial cells (Bur et al., 2013; Hagggar et  
73 al., 2004). *S. aureus* internalization via EAP seems to be FnBPs-independent; however,  
74 the cellular receptor and the intracellular signaling pathway involved in this mechanism  
75 are unknown (Bur et al., 2013; Josse et al., 2017). EAP is member of the secretable  
76 expanded repertoire adhesive molecules (SERAMs) (Heilmann, 2011). It seems that *S.*  
77 *aureus* is the only *Staphylococcus* specie able to produce EAP (Hussain et al., 2008a).  
78 Different forms of EAP ( $\approx 40 - 70$  kDa) have been described and consist of four to six  
79 tandem repeat domains (Geisbrecht et al., 2005; Hussain et al., 2008). Eap is expressed  
80 by the *eap* gene in a growthphase-dependent manner, under the control of both *agr*, *sae*  
81 and *sar* genes, with a maximal production during the late exponential phase of growth  
82 (Dunman et al., 2001; Harraghy et al., 2005). In in low-iron condition, EAP production  
83 requires the expression of *fur* gene in addition of *agr*, *sae* and *sar* (Johnson et al., 2008).  
84 EAP has the ability to bind various ECM and plasma proteins including fibrinogen,  
85 fibronectin, vitronectin, prothrombin and collagen (Eisenbeis et al., 2017; Harraghy et  
86 al., 2003) and even DNA indiscriminately of its origin (Eisenbeis et al., 2018). With such  
87 a high variety of ligands, EAP is considered as a multifunctional protein playing  
88 important roles in bacterial adhesion and invasion, biofilm formation, platelets  
89 activation and immune evasion (Bertling et al., 2012; Bur et al., 2013; Chavakis et al.,  
90 2002; Harraghy, 2003; Scriba et al., 2008). Thus, EAP has been shown to act as anti-  
91 inflammatory factor by binding intracellular adhesion receptor 1 (ICAM-1) on  
92 endothelial cells, which are essentials for neutrophil recruitment (Chavakis et al., 2002,



93 2005). Interestingly, ICAM-1 is also the main entry receptor of rhinoviruses (RVs) in  
94 humans (Greve et al., 1989). Experimental or natural infections with RVs promote *S.*  
95 *aureus* loads of nasal carriage and its dispersion in the environment (Morgene et al.,  
96 2018b). However, the mechanisms involved in the interactions between RV infection  
97 and *S. aureus* nasal colonization are not fully understood (Morgene et al., 2018b).

98 In this study, we aimed to study the impact of RV infection of *S. aureus*  
99 colonization in vitro by using a model of co-infection of HaCaT keratinocytes that mimics  
100 squamous epithelial cells of the *vestibulum nasi*. Furthermore, we investigated the role  
101 of EAP and ICAM-1 in *S. aureus* internalization in keratinocytes and various other cell  
102 types in both inflammatory and non-inflammatory states.

## 103 **Materials and methods**

### 104 **Cell culture**

105 Seven human cell lines were used in this study including HaCaT keratinocytes  
106 (Cell line service, Germany), A549 pneumocytes, CaCo2 enterocytes, SiHa cervical cells,  
107 EA.hy926 endothelial aortic cells and HEL-299 embryonic lung fibroblasts. All cells were  
108 seeded into 24-well plates at  $1.5 \times 10^5$  cells per well and were maintained with serum-  
109 free medium constituted of 50% RPMI-1640 (R7388, Sigma-Aldrich) and 50% DMEM  
110 (D6429, Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal calf serum (Biowest USA,  
111 Riverside, MO), 1 mM L-Glutamine (G7513, Sigma-Aldrich), 1x MEM non-essential amino  
112 acids (M7145, Sigma-Aldrich) and 1x antibiotic antimycotic solution (A5955, Sigma-  
113 Aldrich) for three days at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. Confluent cells ( $10^6$  cells per wall) were  
114 used to perform the experiments below.

### 115 **Viral infection and TNF $\alpha$ treatment**

116 RV-A16 belongs to the major group of RVs and uses ICAM-1 as entry receptor in  
117 human cells (Morgene et al., 2018b). RV-A16 (VR-283, ATCC, Manassas, VA) was used to  
118 infect confluent HaCaT cells using a multiplicity of infection (MOI) of 0.1 for 24 hours at  
119 33 °C with 5% CO<sub>2</sub> in cells infection medium (IM<sub>RPMI</sub>) composed of antibiotics-free and  
120 red-phenol-free RPMI-1640 (R8755, Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal calf  
121 serum, 1 mM L-Glutamine, 1x MEM non-essential amino acids and 5 mg/l iron (FeSO<sub>4</sub>,  
122 Sigma-Aldrich). RV-A16-infected HaCaT cells yielded  $\approx 3 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml (50% tissue

123 culture infective dose) as determined by viral titration on HEL-299 cells described in  
124 Morgene et al., 2018b. RV infection of HaCaT cells do not induce any observable  
125 cytopathic effect (Morgene et al., 2018b). The integrity of the cellular monolayer was  
126 systematically checked by microscopic observation. In order to mimic viral infections  
127 and to study the impact of inflammation on *S. aureus* internalization and ICAM-1  
128 expression, confluent cells were treated with 10 ng/ml human TNF $\alpha$  (Sigma-Aldrich) in  
129 IM<sub>RPMI</sub> for 24 hours at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>.

### 130 ***S. aureus* strains**

131 Different *S. aureus* strains were used in this study and are summarized in table  
132 S1. All the strains were plated on blood agar (BioMerieux, France) for 24 hours at 37 °C.  
133 One colony was diluted in 10 ml of IM<sub>RPMI</sub> and incubated for 18 hours at 37°C under  
134 constant shaking at 150 rpm. Optical density at 600 nm was adjusted to 0.5 ( $\approx 10^8$   
135 CFU/ml) and therefore serially diluted in IM<sub>RPMI</sub> to obtain the desired MOI (0.1, 1, 10 or  
136 100).

### 137 **Adhesion and internalization assays**

138 RV-A16 infected HaCaT cells, TNF $\alpha$ -treated cells and control cells were  
139 inoculated with adequate *S. aureus* dilutions for 2 hours at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. When  
140 needed, cells were incubated with 5  $\mu$ g/ml neutralizing antibody anti-ICAM-1 (SC-107L,  
141 Santa Cruz Biotechnologies, USA) or with one the following chemical inhibitors: Cpd22  
142 (40  $\mu$ M) (407311, Merck, Germany), SHP099 (100  $\mu$ M) (ChemieTek, Indianapolis, USA)  
143 or Src N°5 (20  $\mu$ M) (Biaffin, Kassel, Germany) for 90 minutes at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> prior  
144 to bacterial inoculation. Total adhered and internalized bacteria were quantified after  
145 washing off the non-adherent bacteria 3 times with sterile PBS (Sigma-Aldrich).  
146 Extracellular bacteria were killed by replacing the supernatant with IM<sub>RPMI</sub> containing  
147 10  $\mu$ g/ml lysostaphine (AMBI) and 100  $\mu$ g/ml gentamycin (Panpharma, Luitré, France).  
148 The cells were then incubated for 1 hour at 37 °C with 5 % CO<sub>2</sub>. The efficiency of the  
149 lysostaphin/gentamycin protection assay was systematically tested by plating the cells  
150 supernatant. *S. aureus*-infected cells were finally lysed by osmotic shock using sterile  
151 water, trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich) and 1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich) (2:1:1). The  
152 determination of bacterial viable counts was carried out through plating serial dilutions  
153 of the lysates on blood agar using the automatic seeder easySpiral Dilute (Interscience).

154 The calculation of the bacterial loads was performed after incubation at 37 °C for 24 h,  
155 using the automatic plate-reader Scan1200 (Interscience).

### 156 **ICAM-1 visualization**

157 Cells were grown on a glass-bottom 4 chambers culture slides (C354104, Falcon).  
158 ICAM-1 expression in RV-A16-infected, TNF $\alpha$ -treated and control cells was determined  
159 by using anti-ICAM-1 rabbit IgG (Sigma-Aldrich) as described in Morgene et al., 2018b.  
160 Slides were examined by epifluorescence microscope (Nikon eclipse Ti). The obtained  
161 images were analyzed by Fiji software (ImageJ).

### 162 **LDH cytotoxicity assay**

163 In order to evaluate the cytotoxicity of TNF $\alpha$  treatment, cells were cultured and  
164 treated with TNF $\alpha$  as described above. After 24 hours, supernatants were analyzed by  
165 using Pierce™ LDH cytotoxicity assay kit (ThermoFisher Scientific) according to the  
166 manufacturer's protocol.

### 167 **Statistical analysis**

168 For each condition, assays were performed at least in triplicate in two  
169 independent experiences (n = 6). Data are represented as mean  $\pm$  SEM. Diagrams and  
170 statistical tests were performed using GraphPad Prism (v7, La Jolla California, USA). *P*  
171 values under 0.05 were considered statically significant.

## 172 **Results**

### 173 **RV-A16 promotes *S. aureus* adhesion and internalization in HaCaT** 174 **keratinocytes**

175 RV-A16 infection of HaCaT cells promoted the adhesion (Figure S1) and  
176 internalization of *S. aureus* ATCC 29213 regardless of the MOI ( $p < 0.05$ ) (Figure 1A). *S.*  
177 *aureus* lacking genes coding FnBPA/B (DU 5883:  $\Delta fnbA/B$ ) or SrtA (SA113  $\Delta SrtA$ )  
178 showed greater internalization levels in RV-A16-infected keratinocytes than in control  
179 cells ( $p < 0.05$ ) (Figure 1B and 1C). Interestingly, RV-A16 infection of HaCaT cells  
180 enhanced the internalization of *S. aureus* SA113 (bacterial MOI of 0.1) ( $3.36 \pm 0.02$  vs  
181  $4.37 \pm 0.04$  Log CFU/10<sup>6</sup> cells,  $p < 0.001$ ) but not of SA113  $\Delta eap$  ( $3.03 \pm 0.04$  vs  $3.06 \pm$   
182  $0.04$  Log CFU/10<sup>6</sup> cells,  $p > 0.05$ ) (Figure 1D). In addition, ICAM-1 neutralization prior

183 to *S. aureus* inoculation inhibited the RV-A16-induced SA113 internalization ( $3.37 \pm 0.03$   
184 vs  $4.36 \pm 0.04$  Log CFU/ $10^6$  cells,  $p < 0.001$ ) and had no effect on SA113 internalization  
185 in control cells ( $3.38 \pm 0.02$  vs  $3.36 \pm 0.02$  Log CFU/ $10^6$  cells,  $p > 0.05$ ). The  
186 internalization of SA113  $\Delta eap$  remained unchanged regardless of RV-A16 infection or  
187 ICAM-1 neutralization ( $p > 0.05$ ) (Figure 1D). Microscopic observation showed that RV-  
188 A16 infection of HaCaT induced ICAM-1 overexpression (23-fold,  $p < 0.001$ ) (Figure 1E).

### 189 ***S. aureus* internalization in TNF $\alpha$ -stimulated cells**

190 TNF $\alpha$  stimulation of HaCaT keratinocytes and A549 pneumocytes was found to  
191 enhance *S. aureus* SA113 internalization compared to control cells ( $3.75 \pm 0.08$  vs  $4.78 \pm$   
192  $0.10$  Log CFU/ $10^6$  cells and  $4.79 \pm 0.06$  vs  $4.91 \pm 0.04$  Log CFU/ $10^6$  cells, respectively,  $p$   
193  $< 0.05$ ). Internalization dropped to control levels in ICAM-1-neutralized TNF $\alpha$ -  
194 stimulated cells ( $p > 0.05$ ). No significant changes were observed for SA113  $\Delta eap$   
195 internalization in both TNF $\alpha$ -stimulated and ICAM-1-neutralized cells ( $p > 0.05$ ) (Figure  
196 2A and 2B). In CaCo2 and SiHa control cells, the internalization of SA113 and SA113  $\Delta eap$   
197 were  $3.57 \pm 0.02$  and  $3.55 \pm 0.08$  Log CFU/ $10^6$  cells ( $p > 0.05$ ) and  $4.46 \pm 0.04$  and  $4.53$   
198  $\pm 0.04$  Log CFU/ $10^6$  cells ( $p > 0.05$ ), respectively. In these cells neither TNF $\alpha$  stimulation  
199 nor ICAM-1 neutralization altered the internalization levels of both SA113 and SA113  
200  $\Delta eap$  ( $p > 0.05$ ) (Figure 2C and 2D). ICAM-1 neutralization was found to reduce SA113  
201 internalization in both control and TNF $\alpha$ -stimulated EA.hy926 endothelial cells and  
202 HEL-299 lung fibroblasts ( $4.96 \pm 0.03$  vs  $4.72 \pm 0.04$ ,  $4.97 \pm 0.01$  vs  $4.79 \pm 0.01$ ,  $3.80 \pm$   
203  $0.01$  vs  $3.66 \pm 0.01$ ,  $3.26 \pm 0.02$  vs  $3.08 \pm 0.03$  Log CFU/ $10^6$  cells, respectively,  $p < 0.05$ ).  
204 In these cells, the internalization of SA113  $\Delta eap$  was not altered by ICAM-1  
205 neutralization independently of TNF $\alpha$  stimulation ( $p > 0.05$ ) (Figure 2E and 2F). As  
206 detected by immunofluorescence staining, TNF $\alpha$  stimulation was found to promote the  
207 expression of ICAM-1 in HaCaT, A549 and EA.hy926 cells compared to control cells ( $1.53$   
208  $\pm 0.10$  vs  $50.43 \pm 9.64$ ,  $9.72 \pm 1.29$  vs  $27.75 \pm 4.98$  and  $22.16 \pm 3.32$  vs  $39.06 \pm 3.71$  mean  
209 of fluorescence intensity, respectively,  $p < 0.01$ ). ICAM-1 expression was not induced by  
210 TNF $\alpha$  stimulation in CaCo2, SiHa and HEL-299 ( $p > 0.05$ ) (Figure 2G). These results were  
211 confirmed by ELISA on fixed cells (membranous ICAM-1(mICAM-1) (Figure S2A). TNF $\alpha$   
212 was found to significantly promote the secretion of soluble ICAM-1 (sICAM-1) in all cell

213 lines (Figure S2B). ICAM-1-dependent *S. aureus* internalization was found to be strongly  
214 correlated with the expression level of ICAM-1 on the cells ( $R^2 = 0.87$ ) (Figure S3).  
215 Cytotoxicity of  $\text{TNF}\alpha$  stimulation was checked for all the used cell lines (Figure S4).  $\text{TNF}\alpha$   
216 stimulation was found to induce mortality in SiHa, EA.hy926 and HEL-299 cells (2.75,  
217 3.12 and 10.24%,  $p < 0.05$ ).

### 218 ***S. aureus* internalization via ICAM-1 requires full-length EAP**

219 The internalization of the *S. aureus* clinical strain USA300 in HaCaT keratinocytes  
220 was promoted by  $\text{TNF}\alpha$  stimulation compared to control cells ( $4.06 \pm 0.08$  vs  $4.64 \pm 0.08$   
221 Log CFU/ $10^6$  cells,  $p < 0.001$ ) (Figure 3A). This  $\text{TNF}\alpha$ -induced internalization was  
222 abolished by neutralizing ICAM-1 ( $p < 0.001$ ). For the *S. aureus* clinical strains MW2 and  
223 SA6850,  $\text{TNF}\alpha$  stimulation had no significant effect on their internalization in  
224 keratinocytes ( $p > 0.05$ ) (Figure 3B and 3C). By analyzing NCBI databases, USA300  
225 (TaxID: 367830) and NCTC 8325 (parental strain of NCTC 8325-4 and SA113) were  
226 found to express full-length EAP with 99% identity to EAP gene reference encoded by  
227 the strain Newman (GenBank: CAB94853.1). EAP gene was not found in the genome of  
228 the strain MW2 (TaxID: 1242971). EAP of SA6850 (TaxID: 1392476) displayed 44  
229 different amino acids (92% identity) compared to the reference sequence.

### 230 **ICAM-1 internalization requires SHP2 and Src activities**

231 In order to investigate the intracellular signaling pathway involved in *S. aureus*  
232 internalization in HaCaT cells through ICAM-1, we used specific chemical cell-permeable  
233 inhibitors of three major signaling enzymes (Figure 4). Cpd22 inhibits the integrin-  
234 linked kinase (ILK) which is involved with integrin  $\beta 1$ -mediated signal transduction in  
235 keratinocytes to internalize *S. aureus* (Lee et al., 2011b; Sayedyahosseini et al., 2015). The  
236 pre-treatment of HaCaT cells with Cpd22 reduced *S. aureus* SA113 internalization in  
237 control cells to 2.48% ( $\pm 0.13$ ) and 19.01% ( $\pm 1.37$ ) in  $\text{TNF}\alpha$ -treated cells ( $p < 0.001$ ).  
238 ICAM-1 crosslinking results in Tyr<sup>518</sup> phosphorylation of ICAM-1 and Tyr<sup>530</sup>  
239 dephosphorylation of Src (tyrosine-protein kinase) by SHP2 (tyrosine phosphatase  
240 containing Src Homology 2 domains) (Liu et al., 2012). Src activation is known to play a  
241 central role in *S. aureus* internalization in NPPCs with association with FAK (focal  
242 adhesion kinase) by dephosphorylation of cortactin which results in actin cytoskeleton  
243 reorganization and *S. aureus* uptake (Agerer et al., 2003, 2005; Fowler et al., 2003). In

244 this study, we used SHP099 and Src N°5 to inhibit respectively SHP2 and Src. Results  
245 showed that HaCaT pre-treatment with SHP2 and Src inhibitors abolished the increase  
246 of *S. aureus* SA113 internalization induced by TNF $\alpha$  stimulation. SHP099-pre-treatment  
247 of HaCaT cells reduced the internalization levels in control cells to 47.69% ( $\pm$  2.56) and  
248 to 47.75% ( $\pm$  1.73) in TNF $\alpha$ -treated cells and ( $p > 0.05$ ). The inhibition of Src almost  
249 completely abolished *S. aureus* internalization in both control and TNF $\alpha$ -treated cells ( $p$   
250  $> 0.05$ ) (respectively only 0.18% ( $\pm$  0.05) and 0.21% ( $\pm$  0.06) of internalized bacteria  
251 compared to non-pre-treated cells). No significant differences were observed between  
252 the internalization of SA113  $\Delta eap$  in control and TNF $\alpha$ -treated cells independently of  
253 the inhibitor used ( $p > 0.05$ ) (Figure 4B).

## 254 Discussion

255 In this study, we first showed that RV-A16 infection of HaCaT keratinocytes  
256 promotes *S. aureus* adhesion and internalization. This finding is in accordance with  
257 previous reports indicating that RV infection enhances adhesion and internalization of  
258 *S. aureus* in A549 pneumocytes and human normal nasal epithelial cells (HNECs) (Min  
259 et al., 2012; Passariello et al., 2006; Wang et al., 2007, 2009, 2010). RV-A16 infection was  
260 found to promote internalization of *S. aureus* wild type strains and their isogenic  
261 mutants lacking *fnbA/B* or *srtA* genes suggesting that this effect is independent of both  
262 the major *S. aureus* internalization pathway through FnBPs and other MSCRAMMs  
263 anchored by sortase A to the bacterial cell wall. Interestingly, the *S. aureus* strain lacking  
264 EAP (SA113  $\Delta eap$ ) was not able to benefit from the viral impact on HaCaT cells to foster  
265 its internalization indicating that EAP is essential for this synergism between RV and *S.*  
266 *aureus*. The expression of the RV major group receptor ICAM-1 was upregulated in RV-  
267 A16 infected keratinocytes. Several cell types including HaCaT keratinocytes, A549  
268 pneumocytes and HNECs were shown to overexpress ICAM-1 during RV infection due to  
269 NF $\kappa$ B activation and pro-inflammatory cytokines release (Jang et al., 2009; Morgene et  
270 al., 2018b; Papi and Johnston, 1999; Passariello et al., 2006). In humans, experimental  
271 RV infection also upregulated the expression of ICAM-1 in nasal epithelium and the  
272 levels of soluble ICAM-1 in nasal lavage fluids within 24 hours after inoculation (Winther  
273 et al., 2002). The neutralization of ICAM-1 abolished the RV-A16-induced internalization

274 of *S. aureus* SA113 and had no effect on the internalization of SA113  $\Delta eap$ . These findings  
275 suggest that *S. aureus* benefits from the RV infection to bind the overexpressed ICAM-1  
276 through EAP in order to foster its uptake by HaCaT cells. Passariello et al. showed that  
277 RV-A1b can also promote the internalization of *S. aureus* SA1448 in A549 pneumocytes  
278 through ICAM-1 overexpression (Passariello et al., 2006). EAP is a multifunctional  
279 protein that can bind a dozen of different ligands (Harraghy et al., 2003). It have been  
280 demonstrated that EAP has a strong affinity to bind ICAM-1 in vitro and interacts with  
281 ICAM-1 expressed by human aortic endothelial cells to inhibit neutrophil recruitment  
282 (Chavakis et al., 2002; Hagggar et al., 2004). In addition, EAP was found to participate in  
283 *S. aureus* internalization in keratinocytes independently of FnBPs (Bur et al., 2013;  
284 Hagggar et al., 2003). Our results confirm previous observations and highlights the role  
285 of EAP/ICAM-1 as an alternative pathway of *S. aureus* internalization in keratinocytes.

286         Considering the difficulty of RV infection in vitro, as only a limited number of  
287 human cell lines are known to be permissive to this virus, we aimed next to mimic RV  
288 infection and investigate the impact of inflammation on *S. aureus* internalization in  
289 different cell lines. As observed for RV-A16 infection, TNF $\alpha$  stimulation promoted the  
290 internalization of *S. aureus* in HaCaT and A549 cells due to ICAM-1 overexpression and  
291 in an EAP-dependent manner. TNF $\alpha$  stimulation was found to upregulate ICAM-1  
292 expression in HaCaT keratinocytes, A549 pneumocytes and EA.hy926 endothelial cells.  
293 Similar results of TNF $\alpha$ -induced ICAM-1 overexpression by these cells were observed in  
294 other studies (Bernot et al., 2005; Burke-Gaffney and Hellewell, 1996; Kim et al., 2008;  
295 Youn et al., 2013). In EA.hy926 endothelial cells and HEL-299 fibroblasts, the basal  
296 ICAM-1 expression appears to participate in the internalization of EAP-expressing *S.*  
297 *aureus* even without TNF $\alpha$  stimulation. By contrast to HaCaT keratinocytes and A549  
298 pneumocytes, TNF $\alpha$  stimulation was found to reduce *S. aureus* in HEL-299 fibroblasts.  
299 This may be due to the cytotoxicity observed in TNF $\alpha$ -treated HEL-299 cells. In fact,  
300 TNF $\alpha$  is known to induce mortality in fibroblasts through multiple pathways that  
301 activates the expression of pro-apoptotic genes (Alikhani et al., 2004; Zhang et al., 2011).  
302 ICAM-1 was not upregulated in TNF $\alpha$ -treated CaCo2 intestinal cells and SiHa cervical  
303 cells and it does not seem to participate in *S. aureus* internalization in these cell lines.  
304 This may be due to the cleavage of mICAM-1 into sICAM-1 (Dippold et al., 1993).

305 Nevertheless, ICAM-1 expression was positively correlated with the increase of *S. aureus*  
306 internalization in a logarithmic way regardless of the cell line used; this highlights that  
307 the alternative internalization pathway EAP/ICAM-1 depends on the ICAM-1 expression  
308 in different tissues that can be upregulated during inflammation state (*i.e.* viral infection,  
309 surgery, trauma, *etc.*), and therefore may increase the risk of staphylococcal infections.

310 Although EAP is expressed by the vast majority of *S. aureus* strains (Hussain et al.,  
311 2001), the expression of a full length EAP seems to be crucial to foster *S. aureus*  
312 internalization through ICAM-1. The clinical strain USA300 expresses a functional EAP  
313 identical to most of the other *S. aureus* strains and benefits of this alternative pathway.  
314 By contrast, some clinical strains do not express (e.g. MW2) or express a mutant EAP  
315 (e.g. SA6850) and therefore they are not able to bind ICAM-1. USA300 is one of the major  
316 community-associated methicillin-resistant *S. aureus* (CA-MRSA) epidemic in the United  
317 States and associated with severe infection (Planet, 2017). For example, USA300  
318 accounts for 91% of MRSA isolates from children with pneumonia of whom 26% were  
319 co-infected with respiratory viruses including RV, influenza virus and parainfluenza  
320 virus (Carrillo-Marquez et al., 2011). ICAM-1 may be overexpressed during such disease  
321 offering to USA300 the opportunity to internalize into pneumocytes by its EAP hiding  
322 from the immune system and escaping anti-bacterial therapy which may participate in  
323 the exacerbation of the disease.

324 Finally, we investigated the intracellular signaling pathway of *S. aureus*  
325 internalization through EAP/ICAM-1. The specific chemical inhibition of SHP2 and Src  
326 (but not ILK) abolished TNF $\alpha$ -induced internalization of SA113 in HaCaT keratinocytes.  
327 These results are in favor of a signal transduction due to EAP binding of ICAM-1 that  
328 activates SHP2 and Src independently of ILK to internalize *S. aureus* by actin  
329 cytoskeleton reorganization. The knowledge of the intracellular signaling pathway of *S.*  
330 *aureus* internalization may be useful to develop new drugs for *S. aureus* decolonization  
331 to inhibit specifically the actors of this cascade and therefore avoid bacterial  
332 internalization without use of antibiotics. However, the use of chemical inhibitors should  
333 not affect the numerous other cellular pathways in which most of these enzymes (*i.e.*  
334 ILK, SHP2, Src, *etc.*) are involved. Macrolides have been shown to inhibit ICAM-1  
335 overexpression due to RV infection or TNF $\alpha$  stimulation and may be used for the



336 prevention of secondary staphylococcal infection during respiratory viral infections in  
337 *S. aureus* carriers (Jang et al., 2006, 2009; Min et al., 2012; Morgene et al., 2018b; Wang  
338 et al., 2010). Nevertheless, new non-antibiotic macrolide derivatives have been developed  
339 and seem also to inhibit ICAM-1 expression (Lusamba Kalonji et al., 2015). The use of  
340 such molecules may be more appropriate to avoid antibiotic resistance.

## 341 **Conclusion**

342 The results reported in this study demonstrate that RV infection or general  
343 inflammation promote *S. aureus* internalization in different NPPCs including  
344 keratinocytes, pneumocytes, and endothelial cells. This effect seems to be induced by the  
345 overexpression of ICAM-1 on some cell types which acts as an alternative pathway for *S.*  
346 *aureus* internalization through interaction with EAP. ICAM-1 activation by EAP induces  
347 SHP2 and Src activation resulting in *S. aureus* uptake by host cells. This may explain the  
348 synergism observed clinically between *S. aureus* and respiratory viruses or the onset of  
349 staphylococcal infection during inflammatory states due to mechanical trauma or  
350 surgical interventions and offer new perspectives for *S. aureus* decolonization strategies.

## 351 **Conflicts of interest**

352 The authors declare having no conflict of interest related to this study.

## 353 **Acknowledgments**

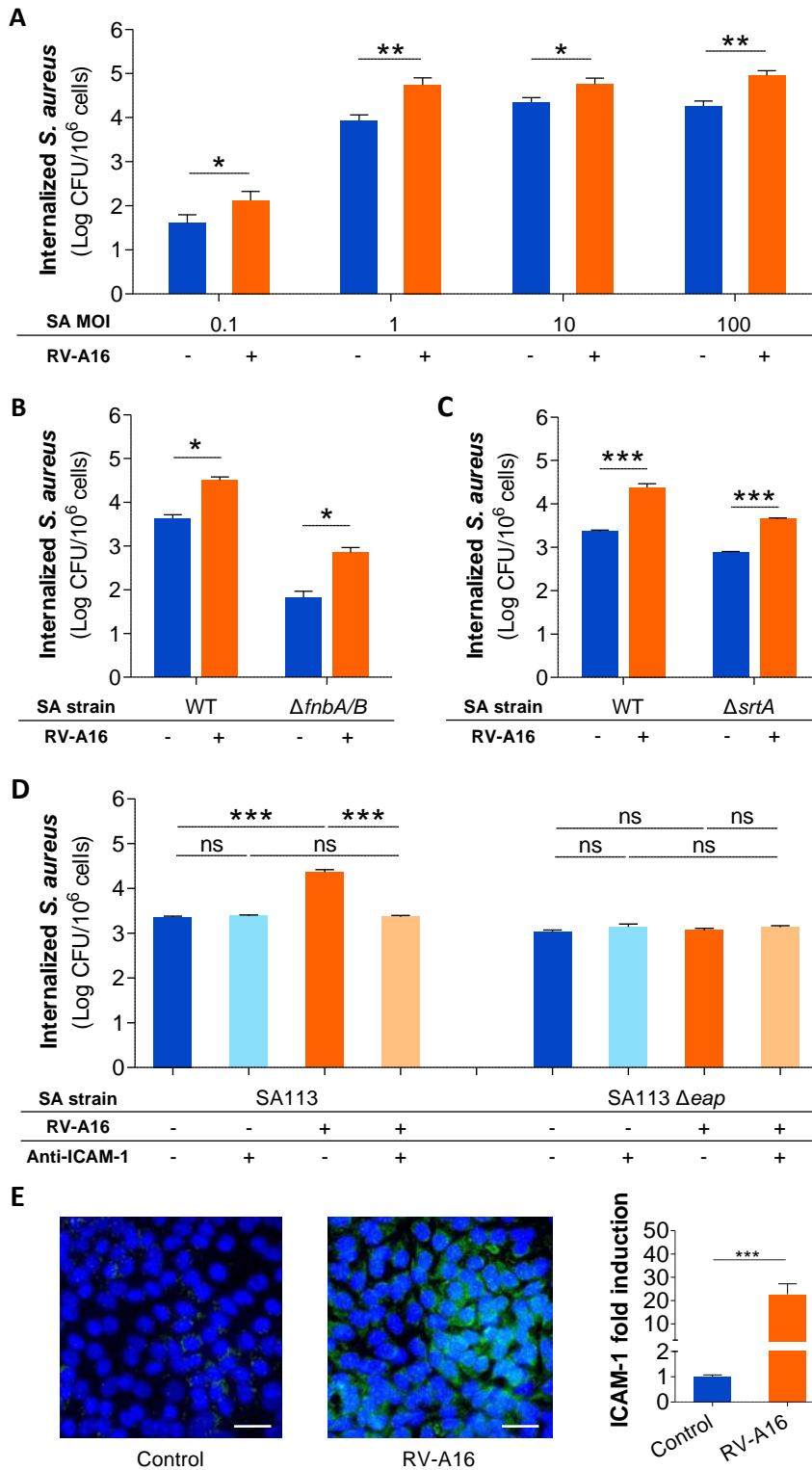
354 *S. aureus* SA113 strains were kindly provided by Prof. Markus Bischoff and Prof.  
355 Mathias Herrmann (Institute of Medical Microbiology and Hygiene, Saarland University,  
356 Homburg, Germany).

## 357 **Contributions**

358 POV, MFM, EBN and BP designed the study. MFM, JR, EA and AP performed the  
359 experiments. POV, MFM and EBN analyzed the results. POV, MFM, JR and BP wrote the  
360 manuscript. All the authors participated to the discussion of the results and agreed this  
361 manuscript.

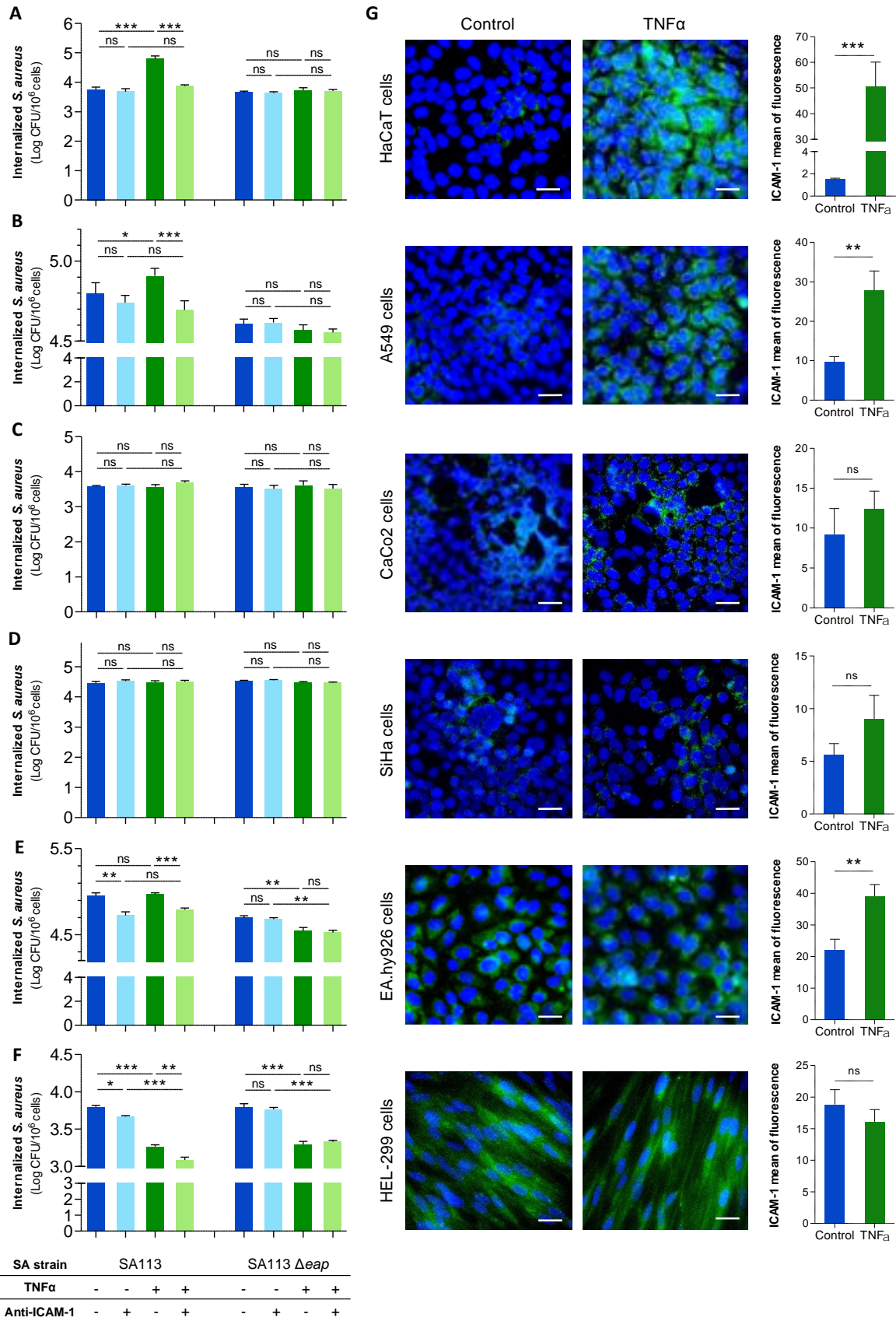
362

Figures

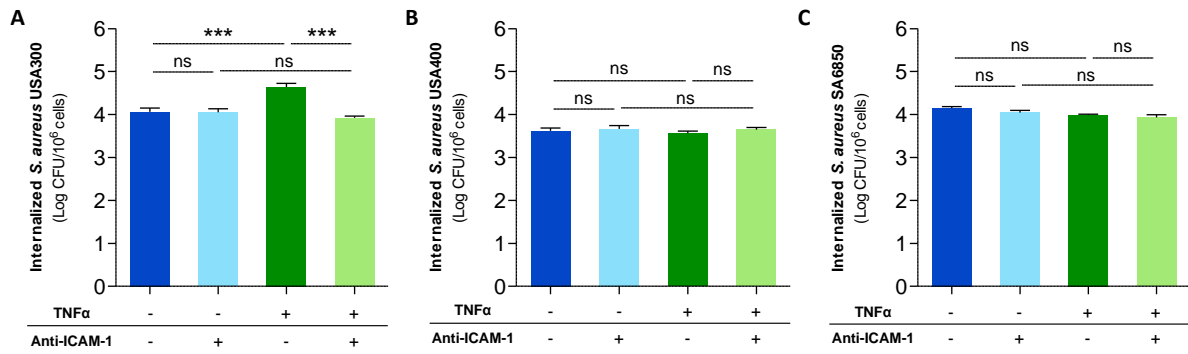


363

364 **Figure 1. Impact of RV-A16 on *S. aureus* internalization and ICAM-1**  
365 **expression in HaCaT keratinocytes. (A)** Internalization of *S. aureus* ATCC 29213 in  
366 control (blue) and RV-A16-infected (orange) HaCaT cells with different bacterial  
367 multiplicities of infection (SA MOI). **(B)** Internalization of *S. aureus* NCTC 8325-4 wild type  
368 (WT) and its isogenic mutant DU 5883 lacking genes coding fibronectin binding proteins  
369 A and B ( $\Delta fnbA/B$ ) in control (blue) and RV-A16-infected (orange) HaCaT cells. **(C)**  
370 Internalization of *S. aureus* SA113 wild type (WT) and its isogenic mutant lacking genes  
371 coding sortase A ( $\Delta srtA$ ) in control (blue) and RV-A16-infected (orange) HaCaT cells. **(D)**  
372 Internalization of *S. aureus* SA113 and its isogenic mutant lacking genes coding  
373 extracellular adherence protein ( $\Delta eap$ ) and impact of intracellular adhesion molecule 1  
374 (ICAM-1) neutralization in control (blue) and RV-A16-infected (orange) HaCaT cells. **(E)**  
375 ICAM-1 expression in control (blue) and RV-A16-infected (orange) HaCaT cells.  
376 Microscopic observations show nuclei in blue and ICAM-1 in green. 600-fold magnification  
377 (bar = 20  $\mu$ m). CFU: colony forming unit. Data are represented as mean  $\pm$  SEM. Differences  
378 are shown as <sup>ns</sup>non-significant; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ .



380 **Figure 2. Impact of TNF $\alpha$  treatment on *S. aureus* internalization and ICAM-1**  
381 **expression.** Internalization of *S. aureus* SA113 and its isogenic mutant lacking genes  
382 coding extracellular adherence protein (SA113  $\Delta eap$ ) in control (blue) and TNF $\alpha$ -treated  
383 (green) **(A)** HaCaT keratinocytes, **(B)** A549 pneumocytes, **(C)** CaCo2 intestinal cells, **(D)**  
384 SiHa cervical cells, **(E)** EA.hy926 endothelial cells and **(F)** HEL-299 lung fibroblasts with or  
385 without intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) neutralization. **(G)** Microscopic  
386 observations of ICAM-1 expression in in control and TNF $\alpha$ -treated cells. Nuclei are colored  
387 in blue and ICAM-1 in green. 600-fold magnification (bar = 20  $\mu$ m). ICAM-1 mean  
388 fluorescence intensity in control (blue) and TNF $\alpha$ -treated (green) cells are indicated for  
389 each cell line.. CFU: colony forming unit. Data are represented as mean  $\pm$  SEM. Differences  
390 are shown as <sup>ns</sup>non-significant; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ .



391

392

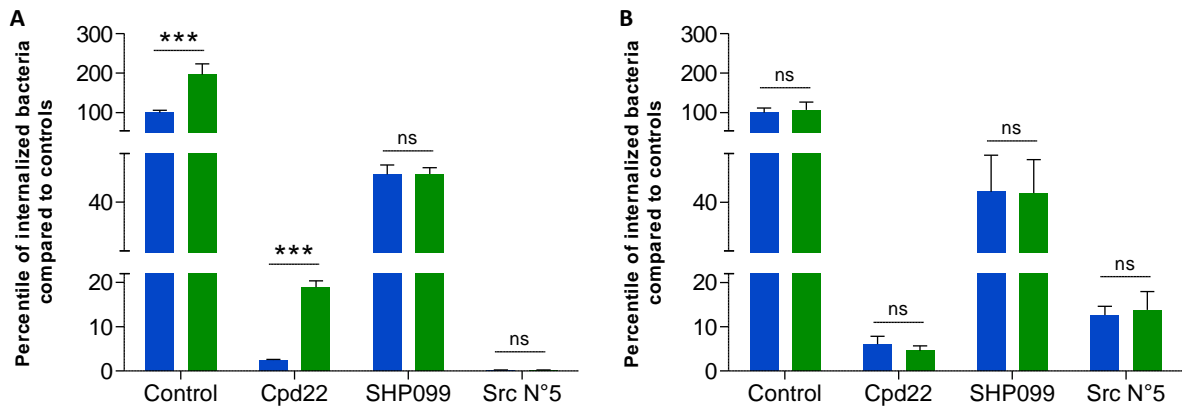
393

394

395

396

**Figure 3. Impact of TNF $\alpha$  treatment on the internalization of *S. aureus* clinical strains.** Internalization of *S. aureus* (A) USA300, (B) MW2 (USA400) and (C) SA6850 in control (blue) and TNF $\alpha$ -treated (green) HaCaT keratinocytes with or without intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) neutralization. CFU: colony forming unit. Data are represented as mean  $\pm$  SEM. Differences are shown as <sup>ns</sup>non-significant and \*\*\* $p < 0.001$ .



397

398 **Figure 4. Chemical inhibition of *S. aureus* internalization in HaCaT keratinocytes.**

399 Data show the percentile of internalized SA113 **(A)** and SA113  $\Delta eap$  **(B)** in control (blue)

400 and TNF $\alpha$ -stimulated (green) HaCaT keratinocytes pre-treated with Cpd22 (inhibitor of

401 ILK), SHP099 (inhibitor of SHP2) and Src N°5 (inhibitor of Src) compared to the

402 internalization in non-treated control cells. Data are represented as mean  $\pm$  SEM.

403 Differences are shown as <sup>ns</sup>non-significant and \*\*\* $p < 0.001$ .

404

## Supplementary data

405

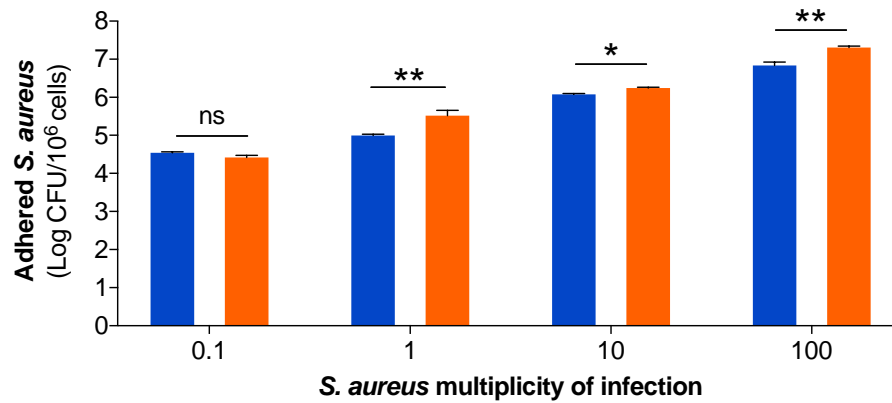
Table S1. Bacterial strains and plasmid used in this study

<i>S. aureus</i> strains	Description/genotype	Source
ATCC 29213	MSSA, CC5, <i>spa</i> type t005, Oxa <sup>S</sup>	ATCC® 29213™
DU 5883	NCTC 8325-4 <i>fnbA/B</i> <sup>-</sup> , Chlo <sup>R</sup> , Eryt <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	(Greene et al., 1995)
NCTC 8325-4	NCTC 8325, $\Phi$ <sup>-</sup> , <i>rsbU</i> <sup>+</sup>	(Novick, 1967)
SA113	NCTC 8325, <i>rsbU</i> <sup>-</sup> , Ery <sup>S</sup>	(Iordanescu and Surdeanu, 1976)
SA113- $\Delta eap$	SA113 <i>eap</i> <sup>-</sup> , Ery <sup>R</sup>	(Bur et al., 2013)
SA113- $\Delta srtA$	SA113 <i>srtA</i> <sup>-</sup> , Ery <sup>R</sup>	(Weidenmaier et al., 2008)
SA6850	MSSA, <i>spa</i> type t185	(Fraunholz et al., 2013)
USA300	MRSA, CC8, <i>spa</i> type t008, <i>agr</i> <sup>+</sup> , PVL <sup>+</sup>	(Diep et al., 2006)
USA400 (MW2)	MRSA, CC1, <i>spa</i> type t128, <i>agr</i> <sup>+</sup> , PVL <sup>+</sup>	(King et al., 2016)

*Agr*: accessory gene regulator; CC: clonal complex; Chlo<sup>R</sup>: chloramphenicol resistant; *eap*<sup>-</sup>: extracellular adhesive protein deficient; Ery<sup>R/S</sup>: erythromycin resistant/sensitive; *fnbA/B*<sup>-</sup>: fibronectin-binding protein A and B deficient; MRSA : methicillin resistant *Staphylococcus aureus*; MSSA: methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*; Oxa<sup>S</sup>: oxacillin sensitive; *rsbU*: sigma B regulation system; *srtA*<sup>-</sup>: sortase A deficient; Tet<sup>R</sup>: tetracycline resistant; PVL: Penton Valentine leucocidin;  $\Phi$ <sup>-</sup>: phage deficient.

406





407

408 **Figure S1. Impact of rhinovirus RV-A16 infection on *S. aureus* ATCC 29213 adhesion**

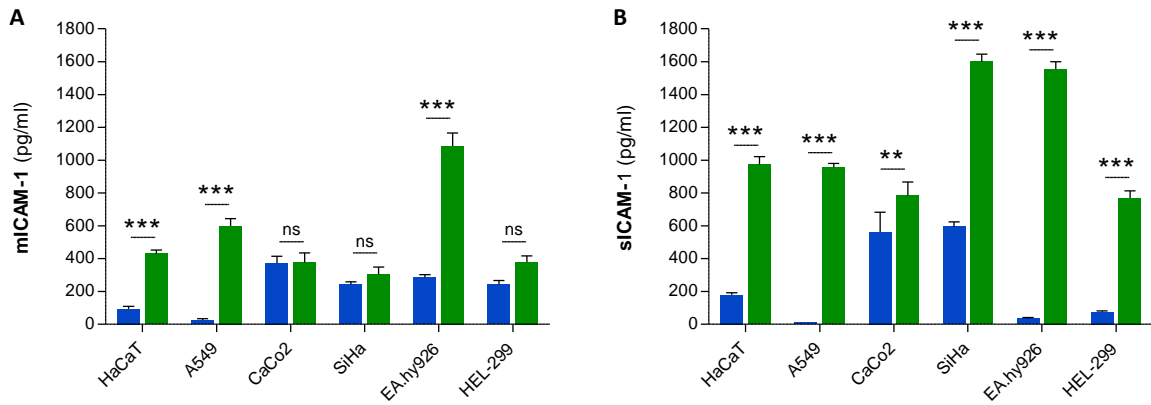
409 **to HaCaT keratinocytes.** Data show the adhered bacteria to control (blue) and RV-A16-

410 infected (green) HaCaT keratinocytes using different bacterial multiplicities of infection.

411 CFU: colony forming unit. Data are represented as mean  $\pm$  SEM. Differences are shown as

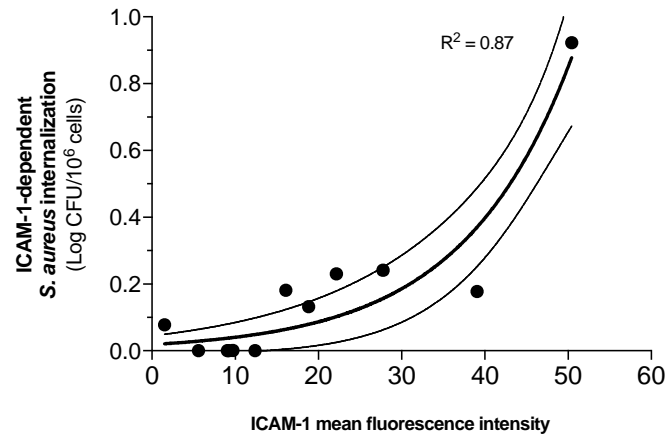
412 <sup>ns</sup>non-significant, \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ .

413



414

415 **Figure S2. Impact TNF $\alpha$  treatment on ICAM-1 expression.** Data show the Expression  
 416 of membranous ICAM-1 (mICAM-1) **(A)** and soluble ICAM-1 (sICAM-1) **(B)** in control  
 417 (blue) and TNF $\alpha$ -treated (green) cells as measured by ELISA. Data are represented as mean  
 418  $\pm$  SEM. Differences are shown as <sup>ns</sup>non-significant, \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ .



419

420 **Figure S3. Correlation between ICAM-1 expression and ICAM-1-dependent *S.***

421 ***aureus* internalization in the different cell lines used.** ICAM-1 expression for each cell

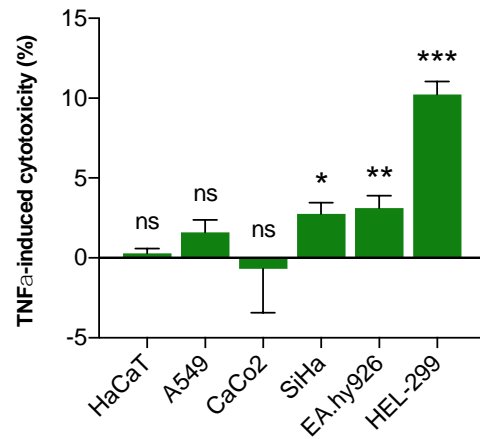
422 line was calculated according to the mean fluorescence intensity and plotted to the

423 corresponding ICAM-1-dependent internalization of *S. aureus* SA113 calculated as the

424 difference between the level of internalization of *S. aureus* in control cells and ICAM-1-

425 neutralized cells with and without TNF $\alpha$  stimulation. The correlation shows a

426 semilogarithmic line with  $R^2 = 0.87$ .



427

428 **Figure S4. Cytotoxicity of TNF $\alpha$  treatment.** Data show the percentile of mortality in  
429 TNF $\alpha$ -treated cells as calculated by the LDH cytotoxicity assay. Data are represented as  
430 mean  $\pm$  SEM. Differences are shown as <sup>ns</sup>non-significant, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p <$   
431 0.001.



# DISCUSSION GENERALE



Ce travail de thèse a permis de mettre en place un modèle *in vitro* mimant la colonisation nasale à *S. aureus* grâce à l'utilisation de keratinocytes HaCaT et d'acquérir une expertise dans l'utilisation de ce modèle pour mieux comprendre la pathogenicité de *S. aureus* et son interaction avec d'autres germes. Le défi était d'arriver à proposer un protocole expérimental fiable et reproductible qui prenne en compte les différentes étapes critiques du modèle de colonisation : (i) culture des cellules HaCaT présentant une monocouche confluente de façon reproductible, (ii) suspension bactérienne avec une MOI réelle la plus proche possible de la MOI théorique souhaitée, (iii) possibilité de rinçage des cellules pour pouvoir quantifier la charge adhérente sans altérer l'intégrité de la monocouche cellulaire, (iv) élimination des bactéries extracellulaires pour l'étude de l'internalisation grâce à la combinaison d'enzyme staphylolytique (lysostaphine) et d'antibiotique (gentamicine) sans activités intracellulaires, (v) élimination efficace des résidus de molécules antibactériennes précédentes et (vi) lyse des cellules de façon efficace sans tuer les bactéries qui ont adhéré ou se sont internalisées. Ce modèle tient également en compte de l'utilisation d'un milieu de culture adéquat pour une croissance optimale des cellules HaCaT avant inoculation bactérienne et d'un milieu d'infection dit « pauvre » qui mime la composition de l'environnement nasal tout en garantissant à la fois une croissance optimale de *S. aureus* (sans rouge phénol, avec du fer et du bicarbonate de soude) et une stabilité de la croissance cellulaire (par l'ajout de SVF et d'acides aminés). Grâce à ce modèle optimisé de colonisation des cellules HaCaT par *S. aureus*, nous avons pu : (i) étudier l'impact de la transformation génétique d'une collection de souches cliniques de *S. aureus* pour exprimer EGFP sur sa capacité d'adhésion et d'internalisation (article 1), (ii) évaluer l'activité intracellulaire anti-staphylococcique de différentes molécules antiseptiques et antibioques utilisées dans la décolonisation nasale de *S. aureus* (article 2) et (iii) investiguer le rôle de l'infection à RV et de l'inflammation sur la colonisation à *S. aureus* (article 4).

*S. aureus* est une espèce difficilement transformable à cause de son système de restriction qui la protège contre les gènes exogènes (Monk et al., 2012). La plupart des souches de *S. aureus* exprimant un rapporteur fluorescent sont des souches de laboratoire manipulées génétiquement pour accepter l'acquisition des gènes codant des protéines fluorescentes (Aymanns et al., 2011; Jong et al., 2017; Malone et al., 2009).



Cependant, ces souches peuvent se comporter d'une façon différente de celle des souches cliniques, d'où l'intérêt d'avoir des souches cliniques fluorescentes dont les capacités de colonisation n'ont pas été atteintes. Grâce à l'utilisation du plasmide pBSU101, nous avons pu générer une collection de 20 souches cliniques de *S. aureus* exprimant EGFP, appartenant à différents CC et isolées à partir de divers contextes cliniques. Les résultats obtenus dans notre modèle de colonisation des cellules HaCaT ont montré que les 20 souches cliniques de *S. aureus* exprimant EGFP étaient capables de coloniser les kératinocytes de la même façon que les souches parentales sauvages. Grâce à sa facilité de détection, cette collection représente un outil précieux pour l'étude statique, cinétique ou dynamique de la colonisation à *S. aureus* afin de mieux comprendre ses déterminants bactériens ou cellulaires grâce à des techniques de cytométrie en flux, de microscopie à épifluorescence, confocale ou vidéomicroscopie et probablement même sur des modèles *in vivo* de souris ou *ex vivo* sur des prélèvements humains.

D'autre part, l'utilisation du modèle *in vitro* de colonisation des cellules HaCaT a permis de montrer que la plupart des molécules antiseptiques et antibiotiques utilisées dans le cadre de la décolonisation nasale n'ont pas ou ont peu d'activité sur le réservoir intracellulaire de *S. aureus* (Rigai et al., 2018). Des résultats similaires ont été décrits au niveau des ostéoblastes humains et sur des modèles de kératinocytes et fibroblastes murins (Krut et al., 2004; Valour et al., 2015). Bien que la rifampicine et les quinolones induisent une forte diminution de la charge intracellulaire de *S. aureus*, leur utilisation pour la décolonisation nasale ne peut pas être recommandée en raison de l'émergence rapide de résistances bactériennes avec ces antibiotiques et doit être réservée aux cas d'infection. La mupirocine, la principale molécule utilisée à ce jour dans le cadre de la décolonisation nasale par *S. aureus*, fait également partie des molécules dont l'activité intracellulaire est insuffisante. Cela pourrait expliquer les échecs de décolonisation chez certains patients pour qui le réservoir intracellulaire pourrait être à l'origine de la persistance de la colonisation ou de la recolonisation. Des études prospectives permettraient d'investiguer cette hypothèse. A la lumière de ces observations, il apparaît nécessaire de développer de nouvelles stratégies plus efficaces de décolonisation.

Après avoir vérifié que les cellules HaCaT sont permissives à l'infection par RV et sont adaptées pour les études des interactions RV/bactéries (Article 3), nous avons développé un modèle de co-infection RV/*S. aureus* basé sur le modèle de colonisation des cellules HaCaT. Nos résultats ont montré que l'infection par RV-A16 favorise l'adhésion et l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules infectées. Cet effet est dû à une surexpression du récepteur cellulaire majeur des RV, ICAM-1, qui agit également comme récepteur de *S. aureus* via EAP. Ces résultats sont en concordance avec ceux de publications montrant que (i) l'infection par RV augmente l'adhésion et l'internalisation de *S. aureus* de façon indépendante de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  (Passariello et al., 2006), (ii) EAP inhibe le recrutement des neutrophiles en fixant ICAM-1 (Chavakis et al., 2002) et (iii) EAP participe à l'internalisation de *S. aureus* de façon indépendante de FnBPA/B (Bur et al., 2013). Afin de mimer l'infection par RV et vérifier si d'autres lignées cellulaires sont capables d'internaliser *S. aureus* via EAP/ICAM-1, nous avons adapté notre modèle de colonisation en remplaçant l'infection virale par une stimulation avec  $\text{TNF}\alpha$ . Les résultats ont montré que le traitement par  $\text{TNF}\alpha$  favorise la surexpression d'ICAM-1 sur les kératinocytes HaCaT, les pneumocytes A549 et les cellules endothéliales EA.hy926. Les cellules exprimant ICAM-1 en quantité suffisante, soit de façon inducible par l'inflammation (HaCaT et A549), soit de façon constitutive (EA.hy926 et HEL-299), se sont montrées capables d'internaliser les souches de *S. aureus* exprimant EAP. Nous apportons la preuve que cette internalisation implique une cascade de signalisation intracellulaire mettant en oeuvre SHP2 et Src. Nos résultats décrivent pour la première fois les détails de la voie d'internalisation de *S. aureus* via EAP dont le récepteur cellulaire était inconnu jusque là (Josse et al., 2017). Ils suggèrent par ailleurs que la surexpression d'ICAM-1 suite à une inflammation d'origine virale, allergique ou mécanique (blessure ou intervention chirurgicale) favorise l'internalisation des souches de *S. aureus* exprimant EAP. Cela pourrait expliquer la synergie observée cliniquement entre *S. aureus* et les virus respiratoires (Morgene et al., 2018a) et être à l'origine des surinfections staphylococciques post-virales ou post-traumatiques. De nouvelles stratégies préventives personnalisées pourraient être envisageables pour limiter l'expression d'ICAM-1 ou pour inhiber spécifiquement les acteurs intracellulaires de l'internalisation.



# CONCLUSION ET PERSPECTIVES



*S. aureus* est une bactérie commensale et pathogène de l'Homme qui colonise environ 30% de la population générale. Il est également la cause majeure des infections post-chirurgicales et le deuxième agent pathogène responsable de maladies nosocomiales en France (Bothelo-Nevers et al., 2016). De plus, *S. aureus* est l'un des principaux germes responsables des surinfections bactériennes suite à une infection virale respiratoire (Rynda-Apple et al., 2015). Bien qu'il soit capable de coloniser la peau et différentes muqueuses, la cavité nasale est toujours considérée comme le réservoir principal du portage de *S. aureus* (Verhoeven et al., 2016). La colonisation nasale à *S. aureus* est un facteur de risque majeur d'infection par cette bactérie dans différentes situations cliniques. Dans la majorité des cas, les souches de colonisation et d'infection sont similaires, ce qui permet d'établir un lien de causalité entre la colonisation nasale et le risque d'infection (Levy et al., 2013). Il est admis que le développement d'une pathologie n'est pas simplement dû à la présence d'un pathogène dans l'organisme mais à des interactions complexes entre le pathogène, l'hôte, le système immunitaire, l'environnement, le microbiome et potentiellement la présence d'autres infections chroniques ou aiguës. Plusieurs études ont montré que certaines infections virales comme la grippe ou le rhume peuvent favoriser la colonisation à *S. aureus* et augmenter ainsi le risque d'infection par cette bactérie (Morgene et al., 2018a ; Rynda-Apple et al., 2015). Cependant, les mécanismes de ces interactions tripartites (hôte/*S. aureus*/virus) ne sont pas bien connus, notamment en ce qui concerne les interactions entre RV et *S. aureus* (Morgene et al., 2018a).

Plusieurs déterminants, aussi bien bactériens, humains qu'environnementaux, entrent en jeu dans l'établissement de la colonisation nasale à *S. aureus* (Sollid et al., 2014). L'un des déterminants majeurs est la capacité de *S. aureus* à adhérer à la surface de l'épithélium pour échapper à la clairance fluïdique ou mécanique, et de s'internaliser dans les cellules phagocytaires non professionnelles pour échapper au système immunitaire et aux traitements antimicrobiens, ce qui favorise sa persistance. Pour cela, *S. aureus* est doté de tout un arsenal d'adhésines qui lui permettent de s'accrocher ou de rentrer dans les cellules de l'hôte. Le mécanisme majeur, et le mieux étudié, d'internalisation de *S. aureus* dans les cellules phagocytaires non professionnelles implique l'interaction entre les adhésines bactériennes FnBPA/B et l'intégrine cellulaire

$\alpha 5\beta 1$  grâce à un pont de fibronectine. Cependant, la délétion des gènes codant ces adhésines n'abolit pas complètement la capacité d'internalisation de *S. aureus* ; de nombreuses études ont décrit plus ou moins précisément d'autres adhésines bactériennes et récepteurs cellulaires qui seraient impliqués dans ce phénomène (Alva-Murillo et al., 2014). Certaines de ces études ont montré que la protéine EAP sécrétée par *S. aureus* participe accessoirement à l'internalisation, de façon indépendante des FnBPA/B (Bur et al., 2013 ; Hagggar et al., 2003). Cependant, le récepteur cellulaire impliqué dans l'internalisation de *S. aureus* via EAP, ainsi que les détails de la voie de signalisation intracellulaire, n'étaient pas connus jusqu'à ce jour (Josse et al., 2017). Le présent travail de thèse a permis de lever le voile sur ce mécanisme à travers la mise en place d'un modèle de colonisation de kératinocytes HaCaT par *S. aureus* et l'étude de l'impact de l'infection par RV ou de l'induction d'un état inflammatoire sur l'internalisation de cette bactérie.

Au cours de cette thèse, différentes études ont été réalisées afin de : (i) valider notre modèle de colonisation des cellules HaCaT, (ii) étudier l'activité intracellulaire de différentes molécules antibactériennes utilisées dans la décolonisation à *S. aureus*, (iii) étudier la perméabilité des cellules HaCaT à l'infection par RV, (iv) investiguer l'impact de l'infection par RV ou de l'induction d'un état inflammatoire sur la colonisation des cellules HaCaT et d'autres cellules phagocytaires non professionnelles par *S. aureus* et (v) identifier le mécanisme impliqué dans l'internalisation de *S. aureus* via EAP.

Nos résultats ont montré que les cellules HaCaT représentent un bon modèle in vitro pour mimer la colonisation des cellules épithéliales nasales par *S. aureus* et pourraient donc être utilisées pour étudier différents aspects de la colonisation nasale à *S. aureus*. Ce modèle a permis de montrer que la plupart des antibiotiques et autres agents antimicrobiens utilisés dans la décolonisation à *S. aureus* n'ont pas ou ont peu d'effet sur le réservoir bactérien intracellulaire (Rigaill et al., 2018). D'autre part, nous avons montré pour la première fois que les cellules HaCaT sont sensibles et permissives à l'infection par RV et pourraient être utilisées pour mieux comprendre la pathogénicité de ces agents, tester de nouvelles molécules à visée antivirale ou étudier les interactions possibles entre RV et d'autres germes (Morgene et al., 2018b).

Grâce au modèle de co-infection RV/*S. aureus* des cellules HaCaT, nous avons montré que l'infection par RV-A16 induit la surexpression d'ICAM-1, le récepteur d'entrée dans la cellule, ce qui favorise l'internalisation de *S. aureus* à travers ce récepteur via EAP. L'internalisation de souches de *S. aureus* productrices d'EAP via ICAM-1 a été également montré sur d'autres types cellulaires, soit de façon constitutive comme c'est le cas pour les cellules endothéliales EA.Hy926 et les fibroblastes pulmonaires HEL-299, soit de façon inductible par TNF $\alpha$  comme observé sur les kératinocytes HaCaT et les pneumocytes A549. Nos résultats ont montré, pour la première fois, que la voie alternative de l'internalisation de *S. aureus* via EAP nécessite la présence du récepteur ICAM-1 exprimé de façon suffisante sur la membrane cellulaire et fait intervenir les enzymes intracellulaires SHP2 et Src pour assurer la voie de signalisation aboutissant à l'entrée de *S. aureus* dans la cellule hôte.

D'une façon générale, ce travail de thèse offre différentes perspectives d'ordre scientifique et médical. D'un point de vue scientifique, les modèles de colonisation des cellules HaCaT et d'autres lignées cellulaires par *S. aureus*, les souches cliniques fluorescentes de *S. aureus* et le modèle d'infection des cellules HaCaT par RV représentent des outils technologiques originaux ; ces derniers pourraient être adaptés pour l'étude de la colonisation à *S. aureus*, de la pathogénicité de *S. aureus* ou de RV, des interactions entre *S. aureus* et RV ou d'autres germes, ou de l'efficacité de molécules à visée antibactérienne ou antivirale. De plus, les résultats obtenus ont permis de mieux comprendre le mécanisme qui sous-tend l'augmentation de la colonisation à *S. aureus* lors de l'infection par RV ou suite à l'induction d'un état inflammatoire, et de décrire pour la première fois certains aspects de l'internalisation de *S. aureus* par la voie alternative EAP/ICAM-1. D'autres études sont nécessaires pour décrire plus en profondeur les aspects moléculaires de la liaison entre EAP et ICAM-1 et de la voie de signalisation ainsi activée. De plus, la plupart des autres voies alternatives de l'internalisation de *S. aureus* sont mal comprises et nécessitent aussi de plus amples investigations.

D'un point de vue médical, les résultats obtenus ont montré que la plupart des molécules antibactériennes utilisées dans le cadre de la décolonisation à *S. aureus* sont peu efficaces sur le réservoir intracellulaire, ce qui expliquerait la persistance de la



colonisation et les échecs de la décolonisation chez certains patients. Cela suggère que de nouvelles stratégies doivent être proposées. L'utilisation des antibiotiques qui ont montré une plus forte activité intracellulaire comme la rifampicine et les quinolones ne peut être sans risque sur l'émergence de nouvelles souches résistantes à ces antibiotiques. De plus, l'utilisation des antibiotiques a un impact certain sur l'écologie du microbiome, ce qui favoriserait le développement d'autres infections. L'utilisation des bactériophages pourrait être une alternative prometteuse aux molécules antimicrobiennes classiques. Ces virus sont naturellement présents dans l'environnement et ont une activité bactériolytique très spécifique, ce qui permettrait de viser spécifiquement *S. aureus* sans perturber les autres résidents de la flore commensale. D'autres stratégies sont également envisageables comme l'utilisation d'une flore antagoniste de *S. aureus* à des fins thérapeutiques ou prophylactiques. Dans le cas d'une inflammation faisant suite à une infection virale (rhume, grippe, etc.) ou à un traumatisme (blessure, intervention chirurgicale, etc.), l'expression d'ICAM-1 pourrait être augmentée significativement, ce qui pourrait représenter pour les souches de *S. aureus* exprimant EAP une nouvelle porte d'entrée dans les cellules de l'hôte. Les bactéries internalisées constitueraient un réservoir intracellulaire qui pourrait être à l'origine du développement d'infections à *S. aureus*. Des stratégies préventives peuvent être imaginées dans certains cas pour empêcher cette internalisation ; c'est le cas notamment des anti-inflammatoires et des molécules non antibiotiques qui inhibent la surexpression d'ICAM-1, et des inhibiteurs spécifiques des enzymes intracellulaires impliquées dans l'internalisation de *S. aureus* (notamment Src).

En conclusion, ce travail de thèse a permis le développement d'outils technologiques originaux et de nouveaux modèles *in vitro* mimant la colonisation nasale à *S. aureus* et ses interactions avec différents pathogènes. Il ouvre des perspectives pour évaluer l'efficacité des molécules antibactériennes pour la décolonisation des porteurs chroniques de *S. aureus*. Par ailleurs, il a permis d'identifier la molécule ICAM-1 comme le récepteur d'EAP, ce qui constitue un mécanisme alternatif d'internalisation de *S. aureus* qui pourrait notamment être mis en jeu en cas d'infection à RV ou d'inflammation. Ces observations constituent une illustration de la complexité des interactions entre les cellules épithéliales de la muqueuse, *S. aureus* et les pathogènes viraux.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



1. Abel, J., Goldmann, O., Ziegler, C., Höltje, C., Smeltzer, M.S., Cheung, A.L., Bruhn, D., Rohde, M., and Medina, E. (2011). *Staphylococcus aureus* evades the extracellular antimicrobial activity of mast cells by promoting its own uptake. *J. Innate Immun.* 3, 495–507.
2. Abou Shady, H.M., Bakr, A.E.A., Hashad, M.E., and Alzohairy, M.A. (2015). *Staphylococcus aureus* nasal carriage among outpatients attending primary health care centers: a comparative study of two cities in Saudi Arabia and Egypt. *Braz. J. Infect. Dis.* 19, 68–76.
3. Acton, D.S., Plat-Sinnige, M.J.T., Wamel, W. van, Groot, N. de, and Belkum, A. van (2009). Intestinal carriage of *Staphylococcus aureus*: how does its frequency compare with that of nasal carriage and what is its clinical impact? *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 28, 115.
4. Agerer, F., Michel, A., Ohlsen, K., and Hauck, C.R. (2003). Integrin-mediated invasion of *Staphylococcus aureus* into human cells requires Src family protein-tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 278, 42524–42531.
5. Agerer, F., Lux, S., Michel, A., Rohde, M., Ohlsen, K., and Hauck, C.R. (2005). Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* reveals a functional link between focal adhesion kinase and cortactin in integrin-mediated internalisation. *J. Cell Sci.* 118, 2189–2200.
6. Ahmed, S., Meghji, S., Williams, R.J., Henderson, B., Brock, J.H., and Nair, S.P. (2001). *Staphylococcus aureus* fibronectin binding proteins are essential for internalization by osteoblasts but do not account for differences in intracellular levels of bacteria. *Infect. Immun.* 69, 2872–2877.
7. van den Akker, E.L.T., Nouwen, J.L., Melles, D.C., van Rossum, E.F.C., Koper, J.W., Uitterlinden, A.G., Hofman, A., Verbrugh, H.A., Pols, H.A., Lamberts, S.W.J., et al. (2006). *Staphylococcus aureus* nasal carriage is associated with glucocorticoid receptor gene polymorphisms. *J. Infect. Dis.* 194, 814–818.
8. Alikhani, M., Alikhani, Z., Raptis, M., and Graves, D.T. (2004). TNF-alpha in vivo stimulates apoptosis in fibroblasts through caspase-8 activation and modulates the expression of pro-apoptotic genes. *J. Cell. Physiol.* 201, 341–348.
9. Al-Rawahi, G.N., Schreuder, A.G., Porter, S.D., Roscoe, D.L., Gustafson, R., and Bryce, E.A. (2008). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage among injection drug users: six years later. *J. Clin. Microbiol.* 46, 477–479.
10. Alva-Murillo, N., López-Meza, J.E., and Ochoa-Zarzosa, A. (2014). Nonprofessional phagocytic cell receptors involved in *Staphylococcus aureus* internalization. *BioMed Res. Int.* 2014, 1–9.

11. Aly, R., Shinefield, H.I., Strauss, W.G., and Maibach, H.I. (1977). Bacterial adherence to nasal mucosal cells. *Infect. Immun.* 17, 546–549.
12. Aly, R., Shinefield, H.R., Litz, C., and Maibach, H.I. (1980). Role of teichoic acid in the binding of *Staphylococcus aureus* to nasal epithelial cells. *J. Infect. Dis.* 141, 463–465.
13. Andrews, J.I., Fleener, D.K., Messer, S.A., Kroeger, J.S., and Diekema, D.J. (2009). Screening for *Staphylococcus aureus* carriage in pregnancy: usefulness of novel sampling and culture strategies. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 201, 396.e1–396.e5.
14. Anwar, M.S., Jaffery, G., Rehman Bhatti, K.-U.-, Tayyib, M., and Bokhari, S.R. (2004). *Staphylococcus aureus* and MRSA nasal carriage in general population. *J. Coll. Physicians Surg.--Pak. JCPSP* 14, 661–664.
15. Arciola, C.R., Campoccia, D., Gamberini, S., Baldassarri, L., and Montanaro, L. (2005). Prevalence of *cna*, *fnbA* and *fnbB* adhesin genes among *Staphylococcus aureus* isolates from orthopedic infections associated to different types of implant. *FEMS Microbiol. Lett.* 246, 81–86.
16. Asadollahi, P., Farahani, N.N., Mirzaii, M., Khoramrooz, S.S., van Belkum, A., Asadollahi, K., Dadashi, M., and Darban-Sarokhalil, D. (2018). Distribution of the most prevalent *spa* types among clinical isolates of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* around the world: a review. *Front. Microbiol.* 9, 163.
17. Askarian, F., Ajayi, C., Hanssen, A.-M., van Sorge, N.M., Pettersen, I., Diep, D.B., Sollid, J.U.E., and Johannessen, M. (2016). The interaction between *Staphylococcus aureus* SdrD and desmoglein 1 is important for adhesion to host cells. *Sci. Rep.* 6, 22134.
18. Ateba Ngoa, U., Schaumburg, F., Adegnika, A.A., Kösters, K., Möller, T., Fernandes, J.F., Alabi, A., Issifou, S., Becker, K., Grobusch, M.P., et al. (2012). Epidemiology and population structure of *Staphylococcus aureus* in various population groups from a rural and semi urban area in Gabon, Central Africa. *Acta Trop.* 124, 42–47.
19. Aymanns, S., Mauerer, S., van Zandbergen, G., Wolz, C., and Spellerberg, B. (2011). High-level fluorescence labeling of Gram-positive pathogens. *PLOS One* 6.
20. Barber, M. (1961). Methicillin-resistant staphylococci. *J. Clin. Pathol.* 14, 385–393.
21. Barbu, E.M., Ganesh, V.K., Gurusiddappa, S., Mackenzie, R.C., Foster, T.J., Sudhof, T.C., and Höök, M. (2010).  $\beta$ -neurexin is a ligand for the *Staphylococcus aureus* MSCRAMM SdrC. *PLOS Pathog.* 6.
22. Bassetti, S., Bischoff, W.E., Walter, M., Bassetti-Wyss, B.A., Mason, L., Reboussin, B.A., D'Agostino, R.B., Gwaltney, J.M., Pfaller, M.A., and Sherertz, R.J. (2005). Dispersal of

*Staphylococcus aureus* into the air associated with a rhinovirus infection. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 26, 196–203.

23. Baur, S., Rautenberg, M., Faulstich, M., Faulstich, M., Grau, T., Severin, Y., Unger, C., Hoffmann, W.H., Rudel, T., Autenrieth, I.B., et al. (2014). A nasal epithelial receptor for *Staphylococcus aureus* WTA governs adhesion to epithelial cells and modulates nasal colonization. *PLOS Pathog.* 10, e1004089.

24. van Belkum, A., Kluytmans, J., van Leeuwen, W., Bax, R., Quint, W., Peters, E., Fluit, A., Vandenbroucke-Grauls, C., van den Brule, A., and Koeleman, H. (1995). Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1537–1547.

25. van Belkum, A., van Leeuwen, W., Kaufmann, M.E., Cookson, B., Forey, F., Etienne, J., Goering, R., Tenover, F., Steward, C., O'Brien, F., et al. (1998). Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis of SmaI macrorestriction fragments: a multicenter study. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1653–1659.

26. van Belkum, A., Emonts, M., Wertheim, H., de Jongh, C., Nouwen, J., Bartels, H., Cole, A., Cole, A., Hermans, P., Boelens, H., et al. (2007). The role of human innate immune factors in nasal colonization by *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect.* 9, 1471–1477.

27. van Belkum, A., Verkaik, N.J., de Vogel, C.P., Boelens, H.A., Verveer, J., Nouwen, J.L., Verbrugh, H.A., and Wertheim, H.F.L. (2009). Reclassification of *Staphylococcus aureus* nasal carriage types. *J. Infect. Dis.* 199, 1820–1826.

28. Bera, A., Herbert, S., Jakob, A., Vollmer, W., and Götz, F. (2005). Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 55, 778–787.

29. van den Bergh, M.R., Biesbroek, G., Rossen, J.W.A., de Steenhuijsen Piters, W.A.A., Bosch, A.A.T.M., van Gils, E.J.M., Wang, X., Boonacker, C.W.B., Veenhoven, R.H., Bruin, J.P., et al. (2012). Associations between pathogens in the upper respiratory tract of young children: interplay between viruses and bacteria. *PLOS One* 7, e47711.

30. Bernot, D., Peiretti, F., Canault, M., Juhan-Vague, I., and Nalbone, G. (2005). Upregulation of TNF-alpha-induced ICAM-1 surface expression by adenylate cyclase-dependent pathway in human endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 202, 434–441.

31. Bertling, A., Niemann, S., Hussain, M., Holbrook, L., Stanley, R.G., Brodde, M.F., Pohl, S., Schifferdecker, T., Roth, J., Jurk, K., et al. (2012). Staphylococcal extracellular adherence

protein induces platelet activation by stimulation of thiol isomerases. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 1979–1990.

32. Best, N., Fraser, J.D., Rainey, P.B., Roberts, S.A., Thomas, M.G., and Ritchie, S.R. (2011). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in healthy Aucklanders. *N. Z. Med. J.* 124, 31–39.

33. Bianco, A., Whiteman, S.C., Sethi, S.K., Allen, J.T., Knight, R.A., and Spiteri, M.A. (2000). Expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in nasal epithelial cells of atopic subjects: a mechanism for increased rhinovirus infection? *Clin. Exp. Immunol.* 121, 339–345.

34. Bingham, R.J., Rudiño-Piñera, E., Meenan, N.A.G., Schwarz-Linek, U., Turkenburg, J.P., Höök, M., Garman, E.F., and Potts, J.R. (2008). Crystal structures of fibronectin-binding sites from *Staphylococcus aureus* FnBPA in complex with fibronectin domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 12254–12258.

35. Bischoff, W.E., Bassetti, S., Bassetti-Wyss, B.A., Wallis, M.L., Tucker, B.K., Reboussin, B.A., D'Agostino, R.B., Pfaller, M.A., Gwaltney, J.M., and Sherertz, R.J. (2004). Airborne dispersal as a novel transmission route of coagulase-negative staphylococci: interaction between coagulase-negative staphylococci and rhinovirus infection. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 25, 504–511.

36. Bischoff, W.E., Wallis, M.L., Tucker, B.K., Reboussin, B.A., Pfaller, M.A., Hayden, F.G., and Sherertz, R.J. (2006). "Gesundheit!" sneezing, common colds, allergies, and *Staphylococcus aureus* dispersion. *J. Infect. Dis.* 194, 1119–1126.

37. Bischoff, W.E., Tucker, B.K., Wallis, M.L., Reboussin, B.A., Pfaller, M.A., Hayden, F.G., and Sherertz, R.J. (2007). Preventing the airborne spread of *Staphylococcus aureus* by persons with the common cold: effect of surgical scrubs, gowns, and masks. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 28, 1148–1154.

38. Biswas, R., Voggu, L., Simon, U.K., Hentschel, P., Thumm, G., and Götz, F. (2006). Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. *FEMS Microbiol. Lett.* 259, 260–268.

39. Bläckberg, A., Trell, K., and Rasmussen, M. (2015). Erysipelas, a large retrospective study of aetiology and clinical presentation. *BMC Infect. Dis.* 15.

40. Blackwell, C.C., Saadi, A.T., Raza, M.W., Stewart, J., and Weir, D.M. (1992). Susceptibility to infection in relation to SIDS. *J. Clin. Pathol.* 45, 20–24.

41. Blair, J.E. (1958). Factors determining the pathogenicity of Staphylococci. *Annu. Rev. Microbiol.* 12, 491–506.

42. Blyth, C.C., Webb, S.A.R., Kok, J., Dwyer, D.E., van Hal, S.J., Foo, H., Ginn, A.N., Kesson, A.M., Seppelt, I., Iredell, J.R., et al. (2013). The impact of bacterial and viral co-infection in severe influenza. *Influenza Other Respir. Viruses* 7, 168–176.
43. Bochkov, Y.A., Watters, K., Ashraf, S., Griggs, T.F., Devries, M.K., Jackson, D.J., Palmenberg, A.C., and Gern, J.E. (2015). Cadherin-related family member 3, a childhood asthma susceptibility gene product, mediates rhinovirus C binding and replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 5485–5490.
44. Bogaert, D., van Belkum, A., Sluijter, M., Luijendijk, A., de Groot, R., Rümke, H., Verbrugh, H., and Hermans, P. (2004). Colonisation by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in healthy children. *Lancet* 363, 1871–1872.
45. Boisseau, D., Alfandari, S., Gauzit, R., Rabaud, C., and Stahl, J.-P. (2012). *Staphylococcus aureus* nasal carriage during the infectious diseases national congress in France. *Médecine Mal. Infect.* 42, 435–439.
46. Bokarewa, M., and Tarkowski, A. (2004). Human alpha -defensins neutralize fibrinolytic activity exerted by staphylokinase. *Thromb. Haemost.* 91, 991–999.
47. Bokarewa, M.I., Jin, T., and Tarkowski, A. (2006). *Staphylococcus aureus* Staphylokinase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 504–509.
48. Bosch, A.A.T.M., Biesbroek, G., Trzcinski, K., Sanders, E.A.M., and Bogaert, D. (2013). Viral and bacterial interactions in the upper respiratory tract. *PLOS Pathog.* 9, e1003057.
49. Bosi, E., Monk, J.M., Aziz, R.K., Fondi, M., Nizet, V., and Palsson, B.Ø. (2016). Comparative genome-scale modelling of *Staphylococcus aureus* strains identifies strain-specific metabolic capabilities linked to pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 3801–3809.
50. Botelho-Nevers, E., Gagnaire, J., Verhoeven, P.O., Cazorla, C., Grattard, F., Pozzetto, B., Berthelot, P., and Lucht, F. (2016). Decolonization of *Staphylococcus aureus* carriage in 2016. *Médecine Mal. Infect.*
51. Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N.E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 106, 761–771.
52. Bourgeois-Nicolaos, N., Lucet, J.-C., Daubié, C., Benchaba, F., Rajguru, M., Ruimy, R., Andremont, A., and Armand-Lefèvre, L. (2010). Maternal vaginal colonisation by *Staphylococcus aureus* and newborn acquisition at delivery. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* 24, 488–491.



53. Brandstadter, J.D., and Yang, Y. (2011). Natural killer cell responses to viral infection. *J. Innate Immun.* 3, 274–279.
54. Braun, L.E., Sutter, D.E., Eichelberger, M.C., Pletneva, L., Kokai-Kun, J.F., Blanco, J.C.G., Prince, G.A., and Ottolini, M.G. (2007). Co-infection of the cotton rat (*Sigmodon hispidus*) with *Staphylococcus aureus* and influenza A virus results in synergistic disease. *Microb. Pathog.* 43, 208–216.
55. ten Broeke-Smits, N.J.P., Kummer, J.A., Bleys, R.L.A.W., Fluit, A.C., and Boel, C.H.E. (2010). Hair follicles as a niche of *Staphylococcus aureus* in the nose; is a more effective decolonisation strategy needed? *J. Hosp. Infect.* 76, 211–214.
56. Bröker, B., Mrochen, D., and Péton, V. (2016). The T cell response to *Staphylococcus aureus*. *Pathogens* 5, 31.
57. Brown, A.F., Leech, J.M., Rogers, T.R., and McLoughlin, R.M. (2014). *Staphylococcus aureus* colonization: modulation of host immune response and impact on human vaccine design. *Front. Immunol.* 4, 507.
58. Bur, S., Preissner, K.T., Herrmann, M., and Bischoff, M. (2013). The *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein promotes bacterial internalization by keratinocytes independent of fibronectin-binding proteins. *J. Invest. Dermatol.* 133, 2004–2012.
59. Burian, M., Wolz, C., and Goerke, C. (2010a). Regulatory adaptation of *Staphylococcus aureus* during nasal colonization of humans. *PLOS One* 5.
60. Burian, M., Rautenberg, M., Kohler, T., Fritz, M., Krismer, B., Unger, C., Hoffman, W.H., Peschel, A., Wolz, C., and Goerke, C. (2010b). Temporal expression of adhesion factors and activity of global regulators during establishment of *Staphylococcus aureus* nasal colonization. *J. Infect. Dis.* 201, 1414–1421.
61. Burke-Gaffney, A., and Hellewell, P.G. (1996). Tumour necrosis factor- $\alpha$ -induced ICAM-1 expression in human vascular endothelial and lung epithelial cells: modulation by tyrosine kinase inhibitors. *Br. J. Pharmacol.* 119, 1149–1158.
62. Byren, I., Bejon, P., Atkins, B.L., Angus, B., Masters, S., McLardy-Smith, P., Gundle, R., and Berendt, A. (2009). One hundred and twelve infected arthroplasties treated with “DAIR” (debridement, antibiotics and implant retention): antibiotic duration and outcome. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 1264–1271.
63. Candi, E., Schmidt, R., and Melino, G. (2005). The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 328–340.
64. Cardona, A.F., and Wilson, S.E. (2015). Skin and soft-tissue infections: a critical review and the role of telavancin in their treatment. *Clin. Infect. Dis.* 61, S69–S78.

65. Carlet, J., Astagneau, P., Brun-Buisson, C., Coignard, B., Salomon, V., Tran, B., Desenclos, J.-C., Jarlier, V., Schlemmer, B., Parneix, P., et al. (2009). French national program for prevention of healthcare-associated infections and antimicrobial Resistance, 1992–2008: positive trends, but perseverance needed. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 30, 737–745.
66. Carrillo-Marquez, M.A., Hulten, K.G., Hammerman, W., Lamberth, L., Mason, E.O., and Kaplan, S.L. (2011). *Staphylococcus aureus* pneumonia in children in the era of community-acquired methicillin-resistance at Texas Children’s Hospital. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 30, 545–550.
67. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2009). Bacterial coinfections in lung tissue specimens from fatal cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1) - United States, May-August 2009. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 58, 1071–1074.
68. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2012). Severe coinfection with seasonal influenza A (H3N2) virus and *Staphylococcus aureus* - Maryland, February-March 2012. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 61, 289–291.
69. Chambers, H.F., and Deleo, F.R. (2009). Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 629–641.
70. Chapoutot, C., Pageaux, G.-P., Perrigault, P.-F., Joomaye, Z., Perney, P., Jean-Pierre, H., Jonquet, O., Blanc, P., and Larrey, D. (1999). *Staphylococcus aureus* nasal carriage in 104 cirrhotic and control patients. A prospective study. *J. Hepatol.* 30, 249–253.
71. Chauhan, S., Jain, S., Varma, S., and Chauhan, S.S. (2004). Tropical pyomyositis (myositis tropicans): current perspective. *Postgrad. Med. J.* 80, 267–270.
72. Chavakis, T., Hussain, M., Kanse, S.M., Peters, G., Bretzel, R.G., Flock, J.-I., Herrmann, M., and Preissner, K.T. (2002). *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat. Med.* 8, 687–693.
73. Chavakis, T., Wiechmann, K., Preissner, K.T., and Herrmann, M. (2005). *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial “secretable expanded repertoire adhesive molecules” (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb. Haemost.* 94, 278–285.
74. Chen, Y.-N.P., LaMarche, M.J., Chan, H.M., Fekkes, P., Garcia-Fortanet, J., Acker, M.G., Antonakos, B., Chen, C.H.-T., Chen, Z., Cooke, V.G., et al. (2016). Allosteric inhibition of SHP2 phosphatase inhibits cancers driven by receptor tyrosine kinases. *Nature* 535, 148–152.

75. Chertow, D.S., Kindrachuk, J., Sheng, Z.-M., Pujanauski, L.M., Cooper, K., Noguee, D., Claire, M.S., Solomon, J., Perry, D., Sayre, P., et al. (2016). Influenza A and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* co-infection in rhesus macaques - A model of severe pneumonia. *Antiviral Res.* 129, 120–129.
76. Chickering, H.T., and Park, J.H. (1919). *Staphylococcus aureus* pneumonia. *JAMA* 72, 617–626.
77. Chien, Y.-W., Klugman, K.P., and Morens, D.M. (2009). Bacterial pathogens and death during the 1918 influenza pandemic. *N. Engl. J. Med.* 361, 2582–2583.
78. Choi, C.S., Yin, C.S., Bakar, A.A., Sakewi, Z., Naing, N.N., Jamal, F., and Othman, N. (2006). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* among healthy adults. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 39, 458–464.
79. Clarke, S.R., and Foster, S.J. (2006). Surface adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Adv. Microb. Physiol.* 51, 187–224.
80. Clarke, S.R., and Foster, S.J. (2008). IsdA protects *Staphylococcus aureus* against the bactericidal protease activity of apolactoferrin. *Infect. Immun.* 76, 1518–1526.
81. Clarke, S.R., Wiltshire, M.D., and Foster, S.J. (2004). IsdA of *Staphylococcus aureus* is a broad spectrum, iron-regulated adhesin. *Mol. Microbiol.* 51, 1509–1519.
82. Clarke, S.R., Brummell, K.J., Horsburgh, M.J., McDowell, P.W., Mohamad, S.A.S., Stapleton, M.R., Acevedo, J., Read, R.C., Day, N.P.J., Peacock, S.J., et al. (2006). Identification of in vivo-expressed antigens of *Staphylococcus aureus* and their use in vaccinations for protection against nasal carriage. *J. Infect. Dis.* 193, 1098–1108.
83. Clarke, S.R., Mohamed, R., Bian, L., Routh, A.F., Kokai-Kun, J.F., Mond, J.J., Tarkowski, A., and Foster, S.J. (2007). The *Staphylococcus aureus* surface protein IsdA mediates resistance to innate defenses of human skin. *Cell Host Microbe* 1, 199–212.
84. Clarke, S.R., Andre, G., Walsh, E.J., Dufrêne, Y.F., Foster, T.J., and Foster, S.J. (2009). Iron-regulated surface determinant protein A mediates adhesion of *Staphylococcus aureus* to human corneocyte envelope proteins. *Infect. Immun.* 77, 2408–2416.
85. Clement, S., Vaudaux, P., Francois, P., Schrenzel, J., Huggler, E., Kampf, S., Chaponnier, C., Lew, D., and Lacroix, J.-S. (2005). Evidence of an intracellular reservoir in the nasal mucosa of patients with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis. *J. Infect. Dis.* 192, 1023–1028.
86. Cogen, A.L., Yamasaki, K., Sanchez, K.M., Dorschner, R.A., Lai, Y., MacLeod, D.T., Torpey, J.W., Otto, M., Nizet, V., Kim, J.E., et al. (2010a). Selective antimicrobial action is

provided by phenol-soluble modulins derived from *Staphylococcus epidermidis*, a normal resident of the skin. *J. Invest. Dermatol.* 130, 192–200.

87. Cogen, A.L., Yamasaki, K., Muto, J., Sanchez, K.M., Alexander, L.C., Tanios, J., Lai, Y., Kim, J.E., Nizet, V., and Gallo, R.L. (2010b). *Staphylococcus epidermidis* antimicrobial  $\delta$ -toxin (Phenol-Soluble Modulin- $\gamma$ ) cooperates with host antimicrobial peptides to kill group A *Streptococcus*. *PLOS One* 5, e8557.

88. Cole, A.L., Muthukrishnan, G., Chong, C., Beavis, A., Eade, C.R., Wood, M.P., Deichen, M.G., and Cole, A.M. (2016). Host innate inflammatory factors and staphylococcal protein A influence the duration of human *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Mucosal Immunol.* 9, 1537–1548.

89. Cole, A.M., Dewan, P., and Ganz, T. (1999). Innate antimicrobial activity of nasal secretions. *Infect. Immun.* 67, 3267–3275.

90. Cole, A.M., Tahk, S., Oren, A., Yoshioka, D., Kim, Y.-H., Park, A., and Ganz, T. (2001a). Determinants of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8, 1064–1069.

91. Cole, A.M., Ganz, T., Liese, A.M., Burdick, M.D., Liu, L., and Strieter, R.M. (2001b). Cutting edge: IFN-inducible ELR- CXC chemokines display defensin-like antimicrobial activity. *J. Immunol.* 167, 623–627.

92. Collins, L.V., Kristian, S.A., Weidenmaier, C., Faigle, M., Van Kessel, K.P.M., Van Strijp, J.A.G., Götz, F., Neumeister, B., and Peschel, A. (2002). *Staphylococcus aureus* strains lacking D-alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice. *J. Infect. Dis.* 186, 214–219.

93. Colque-Navarro, P., Jacobsson, G., Andersson, R., Flock, J.-I., and Möllby, R. (2010). Levels of antibody against 11 *Staphylococcus aureus* antigens in a healthy population. *Clin Vaccine Immunol* 17, 1117–1123.

94. Corrigan, R.M., Miajlovic, H., and Foster, T.J. (2009). Surface proteins that promote adherence of *Staphylococcus aureus* to human desquamated nasal epithelial cells. *BMC Microbiol.* 9, 22.

95. Dabul, A.N.G., and Camargo, I.L.B.C. (2014). Clonal complexes of *Staphylococcus aureus*: all mixed and together. *FEMS Microbiol. Lett.* 351, 7–8.

96. David, M.Z., and Daum, R.S. (2010). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 616–687.

97. Davison, V.E., and Sanford, B.A. (1981). Adherence of *Staphylococcus aureus* to influenza A virus-infected Madin-Darby canine kidney cell cultures. *Infect. Immun.* 32, 118–126.
98. Davison, V.E., and Sanford, B.A. (1982). Factors influencing adherence of *Staphylococcus aureus* to influenza A virus-infected cell cultures. *Infect. Immun.* 37, 946–955.
99. Dawood, F.S., Chaves, S.S., Pérez, A., Reingold, A., Meek, J., Farley, M.M., Ryan, P., Lynfield, R., Morin, C., Baumbach, J., et al. (2014). Complications and associated bacterial coinfections among children hospitalized with seasonal or pandemic influenza, United States, 2003–2010. *J. Infect. Dis.* 209, 686–694.
100. De la Calle, C., Morata, L., Cobos-Trigueros, N., Martinez, J.A., Cardozo, C., Mensa, J., and Soriano, A. (2016). *Staphylococcus aureus* bacteremic pneumonia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* 35, 497–502.
101. Demos, M., McLeod, M.P., and Nouri, K. (2012). Recurrent furunculosis: a review of the literature. *Br. J. Dermatol.* 167, 725–732.
102. Denison, A.M., DeLeon-Carnes, M., Blau, D.M., Shattuck, E.C., McDougal, L.K., Rasheed, J.K., Limbago, B.M., Zaki, S.R., and Paddock, C.D. (2013). Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* and influenza virus coinfections in patients with fatal pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 51, 4223–4225.
103. Deplano, A., Schuermans, A., Van Eldere, J., Witte, W., Meugnier, H., Etienne, J., Grundmann, H., Jonas, D., Noordhoek, G.T., Dijkstra, J., et al. (2000). Multicenter evaluation of epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by repetitive-element PCR analysis. The European Study Group on Epidemiological Markers of the ESCMID. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3527–3533.
104. Deurenberg, R.H., and Stobberingh, E.E. (2008). The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Genet. Evol.* 8, 747–763.
105. DeVries, A.S., Leshner, L., Schlievert, P.M., Rogers, T., Villaume, L.G., Danila, R., and Lynfield, R. (2011). Staphylococcal toxic shock syndrome 2000–2006: epidemiology, clinical features, and molecular characteristics. *PLOS One* 6, e22997.
106. Dhanoa, A., Fang, N.C., Hassan, S.S., Kaniappan, P., and Rajasekaram, G. (2011). Epidemiology and clinical characteristics of hospitalized patients with pandemic influenza A (H1N1) 2009 infections: the effects of bacterial coinfection. *Viol. J.* 8, 501.
107. Didierlaurent, A., Goulding, J., Patel, S., Snelgrove, R., Low, L., Bebien, M., Lawrence, T., van Rijt, L.S., Lambrecht, B.N., Sirard, J.-C., et al. (2008). Sustained

desensitization to bacterial Toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection. *J. Exp. Med.* 205, 323–329.

**108.** Diep, B.A., Gill, S.R., Chang, R.F., Phan, T.H., Chen, J.H., Davidson, M.G., Lin, F., Lin, J., Carleton, H.A., Mongodin, E.F., et al. (2006). Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 367, 731–739.

**109.** Dippold, W., Wittig, B., Schwaeble, W., Mayet, W., and Meyer zum Büschenfelde, K.H. (1993). Expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1, CD54) in colonic epithelial cells. *Gut* 34, 1593–1597.

**110.** Dunyach-Remy, C., Courtais-Coulon, C., DeMattei, C., Jourdan, N., Schuldiner, S., Sultan, A., Carrière, C., Alonso, S., Sotto, A., and Lavigne, J.-P. (2017). Link between nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and infected diabetic foot ulcers. *Diabetes Metab.* 43, 167–171.

**111.** Dziwanowska, K., Patti, J.M., Deobald, C.F., Bayles, K.W., Trumble, W.R., and Bohach, G.A. (1999). Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect. Immun.* 67, 4673–4678.

**112.** Dziwanowska, K., Carson, A.R., Patti, J.M., Deobald, C.F., Bayles, K.W., and Bohach, G.A. (2000). Staphylococcal fibronectin binding protein interacts with heat shock protein 60 and integrins: role in internalization by epithelial cells. *Infect. Immun.* 68, 6321–6328.

**113.** Edwards, A.M., Potts, J.R., Josefsson, E., and Massey, R.C. (2010). *Staphylococcus aureus* host cell invasion and virulence in sepsis is facilitated by the multiple repeats within FnBPA. *PLOS Pathog.* 6, e1000964.

**114.** Ehrhardt, C., Seyer, R., Hrinčius, E.R., Eierhoff, T., Wolff, T., and Ludwig, S. (2010). Interplay between influenza A virus and the innate immune signaling. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 12, 81–87.

**115.** El Ahmer, O.R., Raza, M.W., Ogilvie, M.M., Weir, D.M., and Blackwell, C.C. (1999). Binding of bacteria to HEp-2 cells infected with influenza A virus. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 23, 331–341.

**116.** Emonts, M., Uitterlinden, A.G., Nouwen, J.L., Kardys, I., Maat, M.P.M. de, Melles, D.C., Witteman, J., Jong, P.T.V.M. de, Verbrugh, H.A., Hofman, A., et al. (2008). Host polymorphisms in interleukin 4, complement factor H, and C-reactive protein associated with nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and occurrence of boils. *J. Infect. Dis.* 197, 1244–1253.

117. Enright, M.C., Day, N.P.J., Davies, C.E., Peacock, S.J., and Spratt, B.G. (2000). Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1008–1015.
118. Enright, M.C., Robinson, D.A., Randle, G., Feil, E.J., Grundmann, H., and Spratt, B.G. (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 7687–7692.
119. Fainstein, V., Musher, D.M., and Cate, T.R. (1980). Bacterial adherence to pharyngeal cells during viral infection. *J. Infect. Dis.* 141, 172–176.
120. Falugi, F., Kim, H.K., Missiakas, D.M., and Schneewind, O. (2013). Role of protein A in the evasion of host adaptive immune responses by *Staphylococcus aureus*. *MBio* 4, e00575-13.
121. Feil, E.J., Cooper, J.E., Grundmann, H., Robinson, D.A., Enright, M.C., Berendt, T., Peacock, S.J., Smith, J.M., Murphy, M., Spratt, B.G., et al. (2003). How clonal is *Staphylococcus aureus*? *J. Bacteriol.* 185, 3307–3316.
122. Feil, E.J., Li, B.C., Aanensen, D.M., Hanage, W.P., and Spratt, B.G. (2004). eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J. Bacteriol.* 186, 1518–1530.
123. Foreman, A., Jervis-Bardy, J., Boase, S.J., Tan, L., and Wormald, P.-J. (2013). Noninvasive *Staphylococcus aureus* biofilm determination in chronic rhinosinusitis by detecting the exopolysaccharide matrix component poly-N-acetylglucosamine. *Int. Forum Allergy Rhinol.* 3, 83–88.
124. Foster, T. (1996). *Staphylococcus*. In *Medical Microbiology*, S. Baron, ed. (Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston), p 187-197.
125. Foster, T.J. (2005). Immune evasion by staphylococci. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 948–958.
126. Foster, T.J. (2016). The remarkably multifunctional fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 35, 1923-1931.
127. Foster, T.J. (2017). Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 430–449.
128. Fowler, T., Wann, E.R., Joh, D., Johansson, S., Foster, T.J., and Höök, M. (2000). Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *Eur. J. Cell Biol.* 79, 672–679.

129. Fowler, T., Johansson, S., Wary, K.K., and Höök, M. (2003). Src kinase has a central role in in vitro cellular internalization of *Staphylococcus aureus*. *Cell. Microbiol.* 5, 417–426.
130. Frank, D.N., Feazel, L.M., Bessesen, M.T., Price, C.S., Janoff, E.N., and Pace, N.R. (2010). The human nasal microbiota and *Staphylococcus aureus* carriage. *PLOS One* 5, e10598.
131. Fraunholz, M., and Sinha, B. (2012). Intracellular *Staphylococcus aureus*: live-in and let die. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 43.
132. Fraunholz, M., Bernhardt, J., Schuldes, J., Daniel, R., Hecker, M., and Sinha, B. (2013). Complete genome sequence of *Staphylococcus aureus* 6850, a highly cytotoxic and clinically virulent methicillin-sensitive strain with distant relatedness to prototype strains. *Genome Announc.* 1. e00775-13
133. Frénay, H.M., Bunschoten, A.E., Schouls, L.M., van Leeuwen, W.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Verhoef, J., and Mooi, F.R. (1996). Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15, 60–64.
134. Fukutani, K.F., Nascimento-Carvalho, C.M., Van der Gucht, W., Wollants, E., Khouri, R., Dierckx, T., Van Ranst, M., Houspie, L., Bouzas, M.L., Oliveira, J.R., et al. (2015). Pathogen transcriptional profile in nasopharyngeal aspirates of children with acute respiratory tract infection. *J. Clin. Virol.* 69, 190–196.
135. Gagnaire, J., Verhoeven, P.O., Grattard, F., Rigai, J., Lucht, F., Pozzetto, B., Berthelot, P., and Botelho-Nevers, E. (2017). Epidemiology and clinical relevance of *Staphylococcus aureus* intestinal carriage: a systematic review and meta-analysis. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 15, 767–785.
136. Gamblin, S.J., and Skehel, J.J. (2010). Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 285, 28403–28409.
137. Ganesh, V.K., Barbu, E.M., Deivanayagam, C.C.S., Le, B., Anderson, A.S., Matsuka, Y.V., Lin, S.L., Foster, T.J., Narayana, S.V.L., and Höök, M. (2011). Structural and biochemical characterization of *Staphylococcus aureus* clumping factor B/ligand interactions. *J. Biol. Chem.* 286, 25963–25972.
138. Gardner, I.D., and Kung, T.M. (1980). Histopathological changes in the lungs of influenza-infected mice superinfected with *Staphylococcus aureus*. *Br. J. Exp. Pathol.* 61, 415–420.
139. Garzoni, C., and Kelley, W.L. (2009). *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. *Trends Microbiol.* 17, 59–65.



140. Gay, R., Han, S.N., Marko, M., Belisle, S., Bronson, R., and Meydani, S.N. (2004). The effect of vitamin E on secondary bacterial infection after influenza infection in young and old mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1031, 418–421.
141. Geisbrecht, B.V., Hamaoka, B.Y., Perman, B., Zemla, A., and Leahy, D.J. (2005). The crystal structures of EAP domains from *Staphylococcus aureus* reveal an unexpected homology to bacterial superantigens. *J. Biol. Chem.* 280, 17243–17250.
142. Gesualdo, F., Onori, M., Bongiorno, D., Campanile, F., Carloni, E., Mancinelli, L., Russo, C., Villani, A., Valentini, D., Raponi, M., et al. (2014). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal colonization in a department of pediatrics: a cross-sectional study. *Ital. J. Pediatr.* 40, 3.
143. Giai, C., Gonzalez, C., Ledo, C., Garofalo, A., Genaro, M.S.D., Sordelli, D.O., and Gomez, M.I. (2013). Shedding of tumor necrosis factor receptor 1 induced by protein A decreases tumor necrosis factor alpha availability and inflammation during systemic *Staphylococcus aureus* infection. *Infect. Immun.* 81, 4200–4207.
144. van Gils, E.J.M., Veenhoven, R.H., Rodenburg, G.D., Hak, E., and Sanders, E.A.M. (2011). Effect of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage with *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* in a randomized controlled trial. *Vaccine* 29, 7595–7598.
145. Goerke, C., Fluckiger, U., Steinhuber, A., Bisanzio, V., Ulrich, M., Bischoff, M., Patti, J.M., and Wolz, C. (2005). Role of *Staphylococcus aureus* global regulators sae and sigmaB in virulence gene expression during device-related infection. *Infect. Immun.* 73, 3415–3421.
146. Goldenberg, D.L. (1998). Septic arthritis. *Lancet.* 351, 197–202.
147. Goldmann, O., and Medina, E. (2018). *Staphylococcus aureus* strategies to evade the host acquired immune response. *Int. J. Med. Microbiol.* 308, 625–630.
148. Gomes, A.R., Vinga, S., Zavolan, M., and de Lencastre, H. (2005). Analysis of the genetic variability of virulence-related loci in epidemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 366–379.
149. Gómez, M.I., Lee, A., Reddy, B., Muir, A., Soong, G., Pitt, A., Cheung, A., and Prince, A. (2004). *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nat. Med.* 10, 842–848.
150. Gorwitz, R.J., Kruszon-Moran, D., McAllister, S.K., McQuillan, G., McDougal, L.K., Fosheim, G.E., Jensen, B.J., Killgore, G., Tenover, F.C., and Kuehnert, M.J. (2008). Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001–2004. *J. Infect. Dis.* 197, 1226–1234.

151. Goss, C.H., and Muhlebach, M.S. (2011). Review: *Staphylococcus aureus* and MRSA in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 10, 298–306.
152. Gough, J.A., and Murray, N.E. (1983). Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. *J. Mol. Biol.* 166, 1–19.
153. Graham, P.L., Lin, S.X., and Larson, E.L. (2006). A U.S. population-based survey of *Staphylococcus aureus* colonization. *Ann. Intern. Med.* 144, 318–325.
154. Greene, C., McDevitt, D., Francois, P., Vaudaux, P.E., Lew, D.P., and Poster, T.J. (1995). Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of *fnb* genes. *Mol. Microbiol.* 17, 1143–1152.
155. Greve, J.M., Davis, G., Meyer, A.M., Forte, C.P., Yost, S.C., Marlor, C.W., Kamarck, M.E., and McClelland, A. (1989). The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell* 56, 839–847.
156. Guinan, M.E., Dan, B.B., Guidotti, R.J., Reingold, A.L., Schmid, G.P., Bettoli, E.J., Lossick, J.G., Shands, K.N., Kramer, M.A., Hargrett, N.T., et al. (1982). Vaginal colonization with *Staphylococcus aureus* in healthy women: a review of four studies. *Ann. Intern. Med.* 96, 944–947.
157. Haas, P.-J., de Haas, C.J.C., Kleibeuker, W., Poppelier, M.J.J.G., van Kessel, K.P.M., Kruijtzter, J.A.W., Liskamp, R.M.J., and van Strijp, J.A.G. (2004). N-terminal residues of the chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are essential for blocking formylated peptide receptor but not C5a receptor. *J. Immunol.* 173, 5704–5711.
158. de Haas, C.J.C., Veldkamp, K.E., Peschel, A., Weerkamp, F., Van Wamel, W.J.B., Heezius, E.C.J.M., Poppelier, M.J.J.G., Van Kessel, K.P.M., and van Strijp, J.A.G. (2004). Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent. *J. Exp. Med.* 199, 687–695.
159. Hageman, J.C., Uyeki, T.M., Francis, J.S., Jernigan, D.B., Wheeler, J.G., Bridges, C.B., Barenkamp, S.J., Sievert, D.M., Srinivasan, A., Doherty, M.C., et al. (2006). Severe community-acquired pneumonia due to *Staphylococcus aureus*, 2003-04 influenza season. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 894–899.
160. Haggar, A., Hussain, M., Lonnie, H., Herrmann, M., Norrby-Teglund, A., and Flock, J.-I. (2003). Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 71, 2310–2317.
161. Haggar, A., Ehrnfelt, C., Holgersson, J., and Flock, J.-I. (2004). The extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* inhibits neutrophil binding to endothelial cells. *Infect. Immun.* 72, 6164–6167.

162. Hahn, B.L., and Sohnle, P.G. (2013). Direct translocation of staphylococci from the skin surface to deep organs. *Microb. Pathog.* 63, 24–29.
163. Haim, M., Trost, A., Maier, C.J., Achatz, G., Feichtner, S., Hintner, H., Bauer, J.W., and Onder, K. (2010). Cytokeratin 8 interacts with clumping factor B: a new possible virulence factor target. *Microbiology* 156, 3710–3721.
164. Haley, K.P., and Skaar, E.P. (2012). A battle for iron: host sequestration and *Staphylococcus aureus* acquisition. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 14, 217–227.
165. Hallin, M., Deplano, A., Denis, O., De Mendonça, R., De Ryck, R., and Struelens, M.J. (2007). Validation of pulsed-field gel electrophoresis and spa typing for long-term, nationwide epidemiological surveillance studies of *Staphylococcus aureus* infections. *J. Clin. Microbiol.* 45, 127–133.
166. Hamdan-Partida, A., Sainz-Espuñes, T., and Bustos-Martínez, J. (2010). Characterization and persistence of *Staphylococcus aureus* strains isolated from the anterior nares and throats of healthy carriers in a Mexican community. *J. Clin. Microbiol.* 48, 1701–1705.
167. Hammel, M., Němeček, D., Keightley, J.A., Thomas, G.J., and Geisbrecht, B.V. (2007). The *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein (Eap) adopts an elongated but structured conformation in solution. *Protein Sci.* 16, 2605–2617.
168. Hammer, N.D., and Skaar, E.P. (2011). Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* iron acquisition. *Annu. Rev. Microbiol.* 65, 129–147.
169. Hang, D.T.T., Choi, E.-J., Song, J.-Y., Kim, S.-E., Kwak, J., and Shin, Y.-K. (2011). Differential effect of prior influenza infection on alveolar macrophage phagocytosis of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*: involvement of interferon-gamma production. *Microbiol. Immunol.* 55, 751–759.
170. Hanssen, A.-M., Kindlund, B., Stenklev, N.C., Furberg, A.-S., Fismen, S., Olsen, R.S., Johannessen, M., and Sollid, J.U.E. (2017). Localization of *Staphylococcus aureus* in tissue from the nasal vestibule in healthy carriers. *BMC Microbiol.* 17, 89.
171. Harraghy, N., Hussain, M., Haggar, A., Chavakis, T., Sinha, B., Herrmann, M., and Flock, J.-I. (2003). The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional *Staphylococcus aureus* protein Eap. *Microbiology* 149, 2701–2707.
172. Hauck, C.R., and Ohlsen, K. (2006). Sticky connections: extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by *Staphylococcus aureus*. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 5–11.

173. Haupt, U., Maiti, S., Schwille, P., and Webb, W.W. (1998). Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 13573–13578.
174. Hayashi, Y., Vaska, V.L., Baba, H., Nimmo, G.R., Davis, L., and Paterson, D.L. (2012). Influenza-associated bacterial pathogens in patients with 2009 influenza A (H1N1) infection: impact of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Queensland, Australia. *Intern. Med. J.* 42, 755–760.
175. Heilmann, C. (2011). Adhesion mechanisms of staphylococci. *Adv. Exp. Med. Biol.* 715, 105–123.
176. Higgins, J., Loughman, A., van Kessel, K.P.M., van Strijp, J.A.G., and Foster, T.J. (2006). Clumping factor A of *Staphylococcus aureus* inhibits phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes. *FEMS Microbiol. Lett.* 258, 290–296.
177. Hildebrandt, P., Surmann, K., Salazar, M.G., Normann, N., Völker, U., and Schmidt, F. (2016). Alternative fluorescent labeling strategies for characterizing gram-positive pathogenic bacteria: Flow cytometry supported counting, sorting, and proteome analysis of *Staphylococcus aureus* retrieved from infected host cells. *Cytometry.* 89, 932–940.
178. Hirschhausen, N., Schlesier, T., Schmidt, M.A., Götz, F., Peters, G., and Heilmann, C. (2010). A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin Atl and heat shock cognate protein Hsc70 as host cell receptor: Atl-mediated staphylococcal internalization. *Cell. Microbiol.* 12, 1746–1764.
179. Hirschhausen, N., Schlesier, T., Peters, G., and Heilmann, C. (2012). Characterization of the modular design of the autolysin/adhesin Aaa from *Staphylococcus aureus*. *PLOS One.* 7, e40353.
180. Hoeksma, A., and Winkler, K.C. (1963). The normal flora of the nose in twins. *Acta Leiden.* 32, 123–133.
181. Hofstra, J.J., Matamoros, S., van de Pol, M.A., de Wever, B., Tanck, M.W., Wendt-Knol, H., Deijns, M., van der Hoek, L., Wolthers, K.C., Molenkamp, R., et al. (2015). Changes in microbiota during experimental human Rhinovirus infection. *BMC Infect. Dis.* 15, 336.
182. Holtfreter, S., Roschack, K., Eichler, P., Eske, K., Holtfreter, B., Kohler, C., Engemann, S., Hecker, M., Greinacher, A., and Bröker, B.M. (2006). *Staphylococcus aureus* carriers neutralize superantigens by antibodies specific for their colonizing strain: a potential explanation for their improved prognosis in severe sepsis. *J. Infect. Dis.* 193, 1275–1278.

183. Holtfreter, S., Nguyen, T.T.H., Wertheim, H., Steil, L., Kusch, H., Truong, Q.P., Engelmann, S., Hecker, M., Völker, U., Belkum, A. van, et al. (2009). Human immune proteome in experimental colonization with *Staphylococcus aureus*. *Clin Vaccine Immunol* 16, 1607–1614.
184. Horn, J., Stelzner, K., Rudel, T., and Fraunholz, M. (2017). Inside job: *Staphylococcus aureus* host-pathogen interactions. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM*.
185. von Hoven, G., Rivas, A.J., Neukirch, C., Klein, S., Hamm, C., Qin, Q., Meyenburg, M., Füser, S., Saftig, P., Hellmann, N., et al. (2016). Dissecting the role of ADAM10 as a mediator of *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin action. *Biochem. J.* 473, 1929–1940.
186. Howard-Jones, A.R., Isaacs, D., and Gibbons, P.J. (2013). Twelve-month outcome following septic arthritis in children. *J. Pediatr. Orthop.* 22, 486–490.
187. Huesca, M., Peralta, R., Sauder, D.N., Simor, A.E., and McGavin, M.J. (2002). Adhesion and virulence properties of epidemic Canadian methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain 1: identification of novel adhesion functions associated with plasmin-sensitive surface protein. *J. Infect. Dis.* 185, 1285–1296.
188. Hui, D.S., Woo, J., Hui, E., Foo, A., Ip, M., To, K.-W., Cheuk, E.S.C., Lam, W.-Y., Sham, A., and Chan, P.K.S. (2008). Influenza-like illness in residential care homes: a study of the incidence, aetiological agents, natural history and health resource utilisation. *Thorax* 63, 690–697.
189. Hui, Y., Wohlers, J., Podschun, R., Hedderich, J., Lamprecht, P., Ambrosch, P., and Laudien, M. (2011). Antimicrobial peptides in nasal secretion and mucosa with respect to *S. aureus* colonisation in Wegener’s granulomatosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 29, S49-56.
190. Hunter, C.A., and Jones, S.A. (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat. Immunol.* 16, 448–457.
191. Hussain, M., Becker, K., von Eiff, C., Peters, G., and Herrmann, M. (2001). Analogs of Eap protein are conserved and prevalent in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8, 1271–1276.
192. Hussain, M., Hagggar, A., Heilmann, C., Peters, G., Flock, J.-I., and Herrmann, M. (2002). Insertional inactivation of Eap in *Staphylococcus aureus* strain Newman confers reduced staphylococcal binding to fibroblasts. *Infect. Immun.* 70, 2933–2940.
193. Hussain, M., Hagggar, A., Peters, G., Chhatwal, G.S., Herrmann, M., Flock, J.-I., and Sinha, B. (2008). More than one tandem repeat domain of the extracellular

adherence protein of *Staphylococcus aureus* is required for aggregation, adherence, and host cell invasion but not for leukocyte activation. *Infect. Immun.* 76, 5615–5623.

194. Inghammar, M., Rasmussen, M., and Linder, A. (2014). Recurrent erysipelas -risk factors and clinical presentation. *BMC Infect. Dis.* 14, 270.
195. Iordanescu, S., and Surdeanu, M. (1976). Two restriction and modification systems in *Staphylococcus aureus* NCTC8325. *J. Gen. Microbiol.* 96, 277–281.
196. Iverson, A.R., Boyd, K.L., McAuley, J.L., Plano, L.R., Hart, M.E., and McCullers, J.A. (2011). Influenza virus primes mice for pneumonia from *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 203, 880–888.
197. Iwase, T., Uehara, Y., Shinji, H., Tajima, A., Seo, H., Takada, K., Agata, T., and Mizunoe, Y. (2010). *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature* 465, 346–349.
198. Jacobs, S.E., Lamson, D.M., St. George, K., and Walsh, T.J. (2013). Human rhinoviruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 135–162.
199. Jang, Y.J., Lee, S.H., Kwon, H.-J., Chung, Y.-S., and Lee, B.-J. (2005). Development of rhinovirus study model using organ culture of turbinate mucosa. *J. Virol. Methods* 125, 41–47.
200. Jang, Y.J., Kwon, H.-J., and Lee, B.-J. (2006). Effect of clarithromycin on rhinovirus-16 infection in A549 cells. *Eur. Respir. J.* 27, 12–19.
201. Jang, Y.J., Wang, J.H., Kim, J.S., Kwon, H.J., Yeo, N.-K., and Lee, B.-J. (2009). Levocetirizine inhibits rhinovirus-induced ICAM-1 and cytokine expression and viral replication in airway epithelial cells. *Antiviral Res.* 81, 226–233.
202. Jett, B.D., and Gilmore, M.S. (2002). Internalization of *Staphylococcus aureus* by human corneal epithelial cells: role of bacterial fibronectin-binding protein and host cell factors. *Infect. Immun.* 70, 4697–4700.
203. Jiang, W., Wang, T., Li, L., Ji, W., Wang, Y., and Yan, Y. (2016). Impact of bacteria in nasal aspirates on disease severity of bronchiolitis. *Infect. Dis.* 48, 82–86.
204. Johnson, A.W., Aderere, W.I., Osinusi, K., Gbadero, D.A., Fagbami, A.H., and Rotowa, N.A. (1996). Acute bronchiolitis in tropical Africa: a hospital-based perspective in Ibadan, Nigeria. *Pediatr. Pulmonol.* 22, 236–247.
205. Jong, N.W.M. de, Horst, T. van der, Strijp, J.A.G. van, and Nijland, R. (2017). Fluorescent reporters for markerless genomic integration in *Staphylococcus aureus*. *Sci. Rep.* 7, 43889.

206. Jönsson, K., Signäs, C., Müller, H.P., and Lindberg, M. (1991). Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*. The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. *Eur. J. Biochem.* 202, 1041–1048.
207. Josse, J., Laurent, F., and Diot, A. (2017). Staphylococcal adhesion and host cell invasion: fibronectin-binding and other mechanisms. *Front. Microbiol.* 8.
208. Junie, L.M., Jeican, I., Matros, L.A., and Pandrea, S.L. (2018). Molecular epidemiology of the community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones: a synthetic review. *Clujul Med.* 91, 7–11.
209. Kania, R.E., Lamers, G.E.M., Vonk, M.J., Dorpmans, E., Struik, J., Huy, P.T., Hiemstra, P., Bloemberg, G.V., and Grote, J.J. (2008). Characterization of mucosal biofilms on human adenoid tissues. *Laryngoscope* 118, 128–134.
210. Kato, F., Nakamura, M., and Sugai, M. (2017). The development of fluorescent protein tracing vectors for multicolor imaging of clinically isolated *Staphylococcus aureus*. *Sci. Rep.* 7, 2865.
211. Kazakova, S.V., Hageman, J.C., Matava, M., Srinivasan, A., Phelan, L., Garfinkel, B., Boo, T., McAllister, S., Anderson, J., Jensen, B., et al. (2005). A clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among professional football players. *N. Engl. J. Med.* 352, 468–475.
212. Keane, F.M., Loughman, A., Valtulina, V., Brennan, M., Speziale, P., and Foster, T.J. (2007). Fibrinogen and elastin bind to the same region within the A domain of fibronectin binding protein A, an MSCRAMM of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 63, 711–723.
213. Kerro-Dego, O., Prysliak, T., Perez-Casal, J., and Potter, A.A. (2012). Role of GapC in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. *Vet. Microbiol.* 156, 443–447.
214. Khader, S.A., Gaffen, S.L., and Kolls, J.K. (2009). Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosal Immunol.* 2, 403–411.
215. Kim, H., Hwang, J.S., Woo, C.H., Kim, E.Y., Kim, T.H., Cho, K.J., Seo, J.M., Lee, S.S., and Kim, J.H. (2008). TNF- $\alpha$ -induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 is regulated by a Rac-ROS-dependent cascade in human airway epithelial cells. *Exp. Mol. Med.* 40, 167–175.
216. King, J.M., Kulhankova, K., Stach, C.S., Vu, B.G., and Salgado-Pabón, W. (2016). Phenotypes and virulence among *Staphylococcus aureus* USA100, USA200, USA300, USA400, and USA600 clonal lineages. *MSphere* 1.

217. Kintarak, S., Whawell, S.A., Speight, P.M., Packer, S., and Nair, S.P. (2004). Internalization of *Staphylococcus aureus* by human keratinocytes. *Infect. Immun.* 72, 5668–5675.
218. Kishida, N., Sakoda, Y., Eto, M., Sunaga, Y., and Kida, H. (2004). Co-infection of *Staphylococcus aureus* or *Haemophilus paragallinarum* exacerbates H9N2 influenza A virus infection in chickens. *Arch. Virol.* 149, 2095–2104.
219. Kisich, K.O., Howell, M.D., Boguniewicz, M., Heizer, H.R., Watson, N.U., and Leung, D.Y.M. (2007). The constitutive capacity of human keratinocytes to kill *Staphylococcus aureus* is dependent on beta-defensin 3. *J. Invest. Dermatol.* 127, 2368–2380.
220. Kluytmans, J., and Wertheim, H. (2005). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. *Infection* 33, 3–8.
221. Kluytmans, J., van Belkum, A., and Verbrugh, H. (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 505–520.
222. Ko, Y.-P., Kuipers, A., Freitag, C.M., Jongerius, I., Medina, E., Rooijen, W.J. van, Spaan, A.N., Kessel, K.P.M. van, Höök, M., and Rooijackers, S.H.M. (2013). Phagocytosis escape by a *Staphylococcus aureus* protein that connects complement and coagulation proteins at the bacterial surface. *PLOS Pathog.* 9, e1003816.
223. Kobayashi, S.D., Olsen, R.J., LaCasse, R.A., Safronetz, D., Ashraf, M., Porter, A.R., Braughton, K.R., Feldmann, F., Clifton, D.R., Kash, J.C., et al. (2013). Seasonal H3N2 influenza A virus fails to enhance *Staphylococcus aureus* co-infection in a non-human primate respiratory tract infection model. *Virulence* 4, 707–715.
224. Köck, R., Becker, K., Cookson, B., Gemert-Pijnen, J.E. van, Harbarth, S., Kluytmans, J., Mielke, M., Peters, G., Skov, R.L., Struelens, M.J., et al. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Eurosurveillance* 15, 19688.
225. Kolata, J., Bode, L.G.M., Holtfreter, S., Steil, L., Kusch, H., Holtfreter, B., Albrecht, D., Hecker, M., Engelmann, S., van Belkum, A., et al. (2011). Distinctive patterns in the human antibody response to *Staphylococcus aureus* bacteremia in carriers and non-carriers. *Proteomics* 11, 3914–3927.
226. Koon, K., Sanders, C.M., Green, J., Malone, L., White, H., Zayas, D., Miller, R., Lu, S., and Han, J. (2010). Co-detection of pandemic (H1N1) 2009 virus and other respiratory pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1976–1978.



227. Koreen, L., Ramaswamy, S.V., Graviss, E.A., Naidich, S., Musser, J.M., and Kreiswirth, B.N. (2004). *spa* typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. *J. Clin. Microbiol.* 42, 792–799.
228. Koreen, L., Ramaswamy, S.V., Naidich, S., Koreen, I.V., Graff, G.R., Graviss, E.A., and Kreiswirth, B.N. (2005). Comparative sequencing of the serine-aspartate repeat-encoding region of the clumping factor B gene (*clfB*) for resolution within clonal groups of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 3985–3994.
229. Kraus, D., and Peschel, A. (2008). *Staphylococcus aureus* evasion of innate antimicrobial defense. *Future Microbiol.* 3, 437–451.
230. Krismer, B., and Peschel, A. (2011). Does *Staphylococcus aureus* nasal colonization involve biofilm formation? *Future Microbiol.* 6, 489–493.
231. Krismer, B., Weidenmaier, C., Zipperer, A., and Peschel, A. (2017). The commensal lifestyle of *Staphylococcus aureus* and its interactions with the nasal microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 675–687.
232. Kristian, S.A., Dürr, M., Van Strijp, J.A.G., Neumeister, B., and Peschel, A. (2003). MprF-mediated lysinylation of phospholipids in *Staphylococcus aureus* leads to protection against oxygen-independent neutrophil killing. *Infect. Immun.* 71, 546–549.
233. Krut, O., Sommer, H., and Krönke, M. (2004). Antibiotic-induced persistence of cytotoxic *Staphylococcus aureus* in non-phagocytic cells. *J. Antimicrob. Chemother.* 53, 167–173.
234. Kudva, A., Scheller, E.V., Robinson, K.M., Crowe, C.R., Choi, S.M., Slight, S.R., Khader, S.A., Dubin, P.J., Enelow, R.I., Kolls, J.K., et al. (2011). Influenza A inhibits Th17-mediated host defense against bacterial pneumonia in mice. *J. Immunol.* 186, 1666–1674.
235. Kuehnert, M.J., Kruszon-Moran, D., Hill, H.A., McQuillan, G., McAllister, S.K., Fosheim, G., McDougal, L.K., Chaitram, J., Jensen, B., Fridkin, S.K., et al. (2006). Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001–2002. *J. Infect. Dis.* 193, 172–179.
236. Kumar, C.C. (1998). Signaling by integrin receptors. *Oncogene* 17, 1365–1373.
237. Kurtz, S.M., Ong, K.L., Lau, E., Bozic, K.J., Berry, D., and Parvizi, J. (2010). Prosthetic joint infection risk after TKA in the Medicare population. *Clin. Orthop.* 468, 52–56.

238. Laarman, A.J., Ruyken, M., Malone, C.L., van Strijp, J.A.G., Horswill, A.R., and Rooijackers, S.H.M. (2011). *Staphylococcus aureus* metalloprotease aureolysin cleaves complement C3 to mediate immune evasion. *J. Immunol.* 186, 6445–6453.
239. Lai, Y., Cogen, A.L., Radek, K.A., Park, H.J., Macleod, D.T., Leichtle, A., Ryan, A.F., Di Nardo, A., and Gallo, R.L. (2010). Activation of TLR2 by a small molecule produced by *Staphylococcus epidermidis* increases antimicrobial defense against bacterial skin infections. *J. Invest. Dermatol.* 130, 2211–2221.
240. Larsen, J., Enright, M.C., Godoy, D., Spratt, B.G., Larsen, A.R., and Skov, R.L. (2012). Multilocus sequence typing scheme for *Staphylococcus aureus*: revision of the *gmk* locus. *J. Clin. Microbiol.* 50, 2538–2539.
241. Le Loir, Y., and Gantier, M. (2009). *Staphylococcus aureus*. Paris : Editions Lavoisier, 6 p.
242. Le Page, C., Génin, P., Baines, M.G., and Hiscott, J. (2000). Interferon activation and innate immunity. *Rev. Immunogenet.* 2, 374–386.
243. Lebon, A., Labout, J.A.M., Verbrugh, H.A., Jaddoe, V.W.V., Hofman, A., Wamel, W. van, Moll, H.A., and Belkum, A. van (2008). Dynamics and determinants of *Staphylococcus aureus* carriage in infancy: the generation R study. *J. Clin. Microbiol.* 46, 3517–3521.
244. Lebon, A., Moll, H.A., Tavakol, M., Wamel, W.J. van, Jaddoe, V.W.V., Hofman, A., Verbrugh, H.A., and Belkum, A. van (2010). Correlation of bacterial colonization status between mother and child: the generation R study. *J. Clin. Microbiol.* 48, 960–962.
245. Lee, A.S., de Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., and Harbarth, S. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Dis. Primers* 4, 18033.
246. Lee, B., Robinson, K.M., McHugh, K.J., Scheller, E.V., Mandalapu, S., Chen, C., Di, Y.P., Clay, M.E., Enelow, R.I., Dubin, P.J., et al. (2015). Influenza-induced type I interferon enhances susceptibility to gram-negative and gram-positive bacterial pneumonia in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 309, 158-167.
247. Lee, C.J., Sankaran, S., Mukherjee, D.V., Apa, Z.L., Hafer, C.A., Wright, L., Larson, E.L., and Lowy, F.D. (2011a). *Staphylococcus aureus* oropharyngeal carriage in a prison population. *Clin. Infect. Dis.* 52, 775–778.
248. Lee, L.Y., Miyamoto, Y.J., McIntyre, B.W., Höök, M., McCrea, K.W., McDevitt, D., and Brown, E.L. (2002). The *Staphylococcus aureus* Map protein is an immunomodulator that interferes with T cell-mediated responses. *J. Clin. Invest.* 110, 1461–1471.

249. Lee, L.Y.L., Liang, X., Höök, M., and Brown, E.L. (2004a). Identification and Characterization of the C3 binding domain of the *Staphylococcus aureus* extracellular fibrinogen-binding protein (Efb). *J. Biol. Chem.* 279, 50710–50716.
250. Lee, L.Y.L., Höök, M., Haviland, D., Wetsel, R.A., Yonter, E.O., Syribeys, P., Vernachio, J., and Brown, E.L. (2004b). Inhibition of complement activation by a secreted *Staphylococcus aureus* protein. *J. Infect. Dis.* 190, 571–579.
251. Lee, M., Arrecubieta, C., Martin, F.J., Prince, A., Borczuk, A.C., and Lowy, F.D. (2010). A postinfluenza model of *Staphylococcus aureus* pneumonia. *J. Infect. Dis.* 201, 508–515.
252. Lee, S.-L., Hsu, E.-C., Chou, C.-C., Chuang, H.-C., Bai, L.-Y., Kulp, S.K., and Chen, C.-S. (2011b). Identification and characterization of a novel integrin-linked kinase inhibitor. *J. Med. Chem.* 54, 6364–6374.
253. Lee, S.W., Foley, E.J., and Epstein, J.A. (1944). Mode of action of penicillin: bacterial growth and penicillin activity-*Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 48, 393–399.
254. Lee, Y.-T., Lin, J.-C., Wang, N.-C., Peng, M.-Y., and Chang, F.-Y. (2007). Necrotizing fasciitis in a medical center in northern Taiwan: emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 40, 335–341.
255. Leshem, E., Maayan-Metzger, A., Rahav, G., Dolitzki, M., Kuint, J., Roytman, Y., Goral, A., Novikov, I., Fluss, R., Keller, N., et al. (2012). Transmission of *Staphylococcus aureus* from mothers to newborns. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 31, 360–363.
256. Lestari, E.S., Severin, J.A., Filius, P.M.G., Kuntaman, K., Duerink, D.O., Hadi, U., Wahjono, H., Verbrugh, H.A., and Prevention (AMRIN) (2008). Antimicrobial resistance among commensal isolates of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in the Indonesian population inside and outside hospitals. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 45.
257. Levy, P.-Y., Ollivier, M., Drancourt, M., Raoult, D., and Argenson, J.-N. (2013). Relation between nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and surgical site infection in orthopedic surgery: The role of nasal contamination. A systematic literature review and meta-analysis. *Orthop. Traumatol. Surg. Res.* 99, 645–651.
258. Li, W., Moltedo, B., and Moran, T.M. (2012). Type I interferon induction during influenza virus infection increases susceptibility to secondary *Streptococcus pneumoniae* infection by negative regulation of  $\gamma\delta$  T cells. *J. Virol.* 86, 12304–12312.

259. Liang, X., Garcia, B.L., Visai, L., Prabhakaran, S., Meenan, N.A.G., Potts, J.R., Humphries, M.J., and Höök, M. (2016). Allosteric regulation of fibronectin/ $\alpha 5\beta 1$  interaction by fibronectin-binding MSCRAMMs. *PLOS One* 11, e0159118.
260. Licitra, G. (2013). Etymologia: *Staphylococcus*. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1553.
261. Lina, G., Boutite, F., Tristan, A., Bes, M., Etienne, J., and Vandenesch, F. (2003). Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of staphylococcal *agr* alleles. *Appl. Env. Microbiol.* 69, 18–23.
262. Lindsay MI, Jr., Herrmann EC, Jr., Morrow GW, Jr., Brown AL, and Jr. (1970). Hong Kong influenza: clinical, microbiologic, and pathologic features in 127 cases. *JAMA* 214, 1825–1832.
263. Liu, G., Place, A.T., Chen, Z., Brovkovich, V.M., Vogel, S.M., Muller, W.A., Skidgel, R.A., Malik, A.B., and Minshall, R.D. (2012). ICAM-1-activated Src and eNOS signaling increase endothelial cell surface PECAM-1 adhesivity and neutrophil transmigration. *Blood* 120, 1942–1952.
264. Liu, X., He, Y., Xiao, K., White, J.R., Fusco, D.N., and Papanicolaou, G.A. (2013). Effect of linezolid on clinical severity and pulmonary cytokines in a murine model of influenza A and *Staphylococcus aureus* coinfection. *PLOS One* 8, e57483.
265. Löffler, B., Niemann, S., Ehrhardt, C., Horn, D., Lanckohr, C., Lina, G., Ludwig, S., and Peters, G. (2013). Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* necrotizing pneumonia: the role of PVL and an influenza coinfection. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 11, 1041–1051.
266. Lominski, I., and Grossfeld, E. (1948). An improved direct coagulase test for the rapid detection of *Staphylococcus aureus*. *Br. Med. J.* 1, 343.
267. Lu, P.-L., Chin, L.-C., Peng, C.-F., Chiang, Y.-H., Chen, T.-P., Ma, L., and Siu, L.K. (2005). Risk factors and molecular analysis of community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage. *J. Clin. Microbiol.* 43, 132–139.
268. Lusamba Kalonji, N., Nomura, K., Kawase, T., Ota, C., Kubo, H., Sato, T., Yanagisawa, T., Sunazuka, T., Ōmura, S., and Yamaya, M. (2015). The non-antibiotic macrolide EM900 inhibits rhinovirus infection and cytokine production in human airway epithelial cells. *Physiol. Rep.* 3, e12557.
269. Luzar, M.A., Coles, G.A., Faller, B., Slingeneyer, A., Dah, G.D., Briat, C., Wone, C., Knefati, Y., Kessler, M., and Peluso, F. (1990). *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *N. Engl. J. Med.* 322, 505–509.

270. Ma, X.X., Sun, D.D., Wang, S., Wang, M.L., Li, M., Shang, H., Wang, E.H., and Luo, E.J. (2011). Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among preclinical medical students: epidemiologic and molecular characteristics of methicillin-resistant *S. aureus* clones. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 70, 22–30.
271. Malone, C.L., Boles, B.R., Lauderdale, K.J., Thoendel, M., Kavanaugh, J.S., and Horswill, A.R. (2009). Fluorescent reporters for *Staphylococcus aureus*. *J. Microbiol. Methods* 77, 251–260.
272. Mancini, D.A.P., Alves, R.C.B., Mendonça, R.M.Z., Bellei, N.J., Carraro, E., Machado, A.M.O., Pinto, J.R., and Mancini Filho, J. (2008). Influenza virus and proteolytic bacteria co-infection in respiratory tract from individuals presenting respiratory manifestations. *Rev. Inst. Med. Trop.* 50, 41–46.
273. Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- $\beta$ . *Mol. Cell* 10, 417–426.
274. Massey, R.C., Kantzanou, M.N., Fowler, T., Day, N.P., Schofield, K., Wann, E.R., Berendt, A.R., Höök, M., and Peacock, S.J. (2001). Fibronectin-binding protein A of *Staphylococcus aureus* has multiple, substituting, binding regions that mediate adherence to fibronectin and invasion of endothelial cells. *Cell. Microbiol.* 3, 839–851.
275. McCullers, J.A. (2006). Insights into the interaction between influenza virus and *Pneumococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 571–582.
276. McDevitt, D., Nanavaty, T., House-Pompeo, K., Bell, E., Turner, N., McIntire, L., Foster, T., and Höök, M. (1997). Characterization of the interaction between the *Staphylococcus aureus* clumping factor (ClfA) and fibrinogen. *Eur. J. Biochem.* 247, 416–424.
277. McDonald, J.R. (2009). Acute infective endocarditis. *Infect. Dis. Clin.* 23, 643–664.
278. McDougal, L.K., Steward, C.D., Killgore, G.E., Chaitram, J.M., McAllister, S.K., and Tenover, F.C. (2003). Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5113–5120.
279. Mehraj, J., Akmatov, M.K., Strömpl, J., Gatzemeier, A., Layer, F., Werner, G., Pieper, D.H., Medina, E., Witte, W., Pessler, F., et al. (2014). Methicillin-sensitive and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in a random sample of non-hospitalized adult population in northern Germany. *PLOS One* 9.

280. Mempel, M., Schnopp, C., Hojka, M., Fesq, H., Weidinger, S., Schaller, M., Korting, H.C., Ring, J., and Abeck, D. (2002). Invasion of human keratinocytes by *Staphylococcus aureus* and intracellular bacterial persistence represent haemolysin-independent virulence mechanisms that are followed by features of necrotic and apoptotic keratinocyte cell death. *Br. J. Dermatol.* 146, 943–951.
281. Merler, S., Poletti, P., Ajelli, M., Caprile, B., and Manfredi, P. (2008). Coinfection can trigger multiple pandemic waves. *J. Theor. Biol.* 254, 499–507.
282. Mermel, L.A., Cartony, J.M., Covington, P., Maxey, G., and Morse, D. (2011). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization at different body sites: a prospective, quantitative analysis. *J. Clin. Microbiol.* 49, 1119–1121.
283. Mertz, D., Frei, R., Jaussi, B., Tietz, A., Stebler, C., Flückiger, U., and Widmer, A.F. (2007). Throat swabs are necessary to reliably detect carriers of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* 45, 475–477.
284. Mertz, D., Frei, R., Periat, N., Zimmerli, M., Battegay, M., Flückiger, U., and Widmer, A.F. (2009). Exclusive *Staphylococcus aureus* throat carriage: at-risk populations. *Arch. Intern. Med.* 169, 172–178.
285. Messaritakis, I., Samonis, G., Dimopoulou, D., Maraki, S., Papadakis, J.A., Daraki, V., Fragaki, M., Choulaki, C., Andrianaki, A.M., and Kofteridis, D.P. (2014). *Staphylococcus aureus* nasal carriage might be associated with vitamin D receptor polymorphisms in type 2 diabetes. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 920–925.
286. Michel, T., Hentges, F., and Zimmer, J. (2013). Consequences of the crosstalk between monocytes/macrophages and natural killer cells. *Front. Immunol.* 3, 403.
287. Miller, R.R., Walker, A.S., Godwin, H., Fung, R., Votintseva, A., Bowden, R., Mant, D., Peto, T.E.A., Crook, D.W., and Knox, K. (2014). Dynamics of acquisition and loss of carriage of *Staphylococcus aureus* strains in the community: the effect of clonal complex. *J. Infect.* 68, 426–439.
288. Min, J.-Y., Shin, S.-H., Kwon, H.J., and Jang, Y.J. (2012). Levocetirizine inhibits rhinovirus-induced bacterial adhesion to nasal epithelial cells through down-regulation of cell adhesion molecules. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 108, 44–48.
289. Mishra, A.K., Yadav, P., and Mishra, A. (2016). A systemic review on staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS): a rare and critical disease of neonates. *Open Microbiol. J.* 10, 150–159.
290. Mollema, F.P.N., Richardus, J.H., Behrendt, M., Vaessen, N., Lodder, W., Hendriks, W., Verbrugh, H.A., and Vos, M.C. (2010). Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to household contacts. *J. Clin. Microbiol.* 48, 202–207.

291. Monecke, S., Coombs, G., Shore, A.C., Coleman, D.C., Akpaka, P., Borg, M., Chow, H., Ip, M., Jatzwauk, L., Jonas, D., et al. (2011). A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. PLOS One 6, e17936.
292. Monk, I.R., Shah, I.M., Xu, M., Tan, M.-W., and Foster, T.J. (2012). Transforming the untransformable: application of direct transformation to manipulate genetically *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. MBio 3, e00277.
293. Moon, B.Y., Park, J.Y., Robinson, D.A., Thomas, J.C., Park, Y.H., Thornton, J.A., and Seo, K.S. (2016). Mobilization of genomic islands of *Staphylococcus aureus* by temperate bacteriophage. PLOS One 11, e0151409.
294. Morens, D.M., and Fauci, A.S. (2007). The 1918 influenza pandemic: insights for the 21st century. J. Infect. Dis. 195, 1018–1028.
295. Morgene, M.F., Botelho-Nevers, E., Grattard, F., Pillet, S., Berthelot, P., Pozzetto, B., and Verhoeven, P.O. (2018a). *Staphylococcus aureus* colonization and non-influenza respiratory viruses: Interactions and synergism mechanisms. Virulence 9, 1354–1363.
296. Morgene, M.F., Maurin, C., Pillet, S., Berthelot, P., Morfin, F., Pozzetto, B., Botelho-Nevers, E., and Verhoeven, P.O. (2018b). HaCaT epithelial cells as an innovative novel model of rhinovirus infection and impact of clarithromycin treatment on infection kinetics. Virology 523, 27–34.
297. Mulcahy, M.E., Geoghegan, J.A., Monk, I.R., O’Keeffe, K.M., Walsh, E.J., Foster, T.J., and McLoughlin, R.M. (2012). Nasal colonisation by *Staphylococcus aureus* depends upon clumping factor B binding to the squamous epithelial cell envelope protein loricrin. PLOS Pathog. 8, e1003092.
298. Mulvey, M.R., Chui, L., Ismail, J., Louie, L., Murphy, C., Chang, N., Alfa, M., and Canadian Committee for the Standardization of Molecular Methods (2001). Development of a Canadian standardized protocol for subtyping methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 39, 3481–3485.
299. Munckhof, W.J., Nimmo, G.R., Schooneveldt, J.M., Schlebusch, S., Stephens, A.J., Williams, G., Huygens, F., and Giffard, P. (2009). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*, including community-associated methicillin-resistant strains, in Queensland adults. Clin. Microbiol. Infect. 15, 149–155.
300. Murchan, S., Kaufmann, M.E., Deplano, A., Ryck, R. de, Struelens, M., Zinn, C.E., Fussing, V., Salmenlinna, S., Vuopio-Varkila, J., Solh, N.E., et al. (2003). Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1574–1585.

301. Murdoch, C., and Finn, A. (2000). Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 95, 3032–3043.
302. Murray, R.J., Robinson, J.O., White, J.N., Hughes, F., Coombs, G.W., Pearson, J.C., Tan, H.-L., Chidlow, G., Williams, S., Christiansen, K.J., et al. (2010). Community-acquired pneumonia due to pandemic A(H1N1)2009 influenza virus and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* co-infection. *PLOS One* 5, e8705.
303. Muscedere, J., Ofner, M., Kumar, A., Long, J., Lamontagne, F., Cook, D., McGeer, A., Chant, C., Marshall, J., Jouvett, P., et al. (2013). The occurrence and impact of bacterial organisms complicating critical care illness associated with 2009 influenza A(H1N1) infection. *Chest* 144, 39–47.
304. Muthukrishnan, G., Quinn, G.A., Lamers, R.P., Diaz, C., Cole, A.L., Chen, S., and Cole, A.M. (2011). Exoproteome of *Staphylococcus aureus* reveals putative determinants of nasal carriage. *J. Proteome Res.* 10, 2064–2078.
305. Muto, A., and Osawa, S. (1987). The guanine and cytosine content of genomic DNA and bacterial evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 166–169.
306. Naber, C.K. (2009). *Staphylococcus aureus* bacteremia: epidemiology, pathophysiology, and management strategies. *Clin. Infect. Dis.* 48, 231–237.
307. Nakamura, S., Davis, K.M., and Weiser, J.N. (2011). Synergistic stimulation of type I interferons during influenza virus coinfection promotes *Streptococcus pneumoniae* colonization in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 3657–3665.
308. Nashev, D., Toshkova, K., Salasia, S.I.O., Hassan, A.A., Lämmle, C., and Zschöck, M. (2004). Distribution of virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers. *FEMS Microbiol. Lett.* 233, 45–52.
309. Neumann, Y., Bruns, S.A., Rohde, M., Prajsnar, T.K., Foster, S.J., and Schmitz, I. (2016). Intracellular *Staphylococcus aureus* eludes selective autophagy by activating a host cell kinase. *Autophagy* 12, 2069–2084.
310. Newsom, S.W.B. (2008). Ogston's coccus. *J. Hosp. Infect.* 70, 369–372.
311. Nguyen, M.T., Peisl, L., Solari, F.B., Luqman, A., and Götz, F. (2018). Toll-like receptor 2 and lipoprotein-like lipoproteins enhance *Staphylococcus aureus* invasion in epithelial cells. *Infect. Immun.* 8, e00343.



312. Nguyen, T., Kyle, U.G., Jaimon, N., Tchamntchi, M.H., Coss-Bu, J.A., Lam, F., Teruya, J., and Loftis, L. (2012). Coinfection with *Staphylococcus aureus* increases risk of severe coagulopathy in critically ill children with influenza A (H1N1) virus infection: Crit. Care Med. 40, 3246–3250.
313. Ní Eidhin, D., Perkins, S., Francois, P., Vaudaux, P., Höök, M., and Foster, T.J. (1998). Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol. 30, 245–257.
314. Niemann, S., Ehrhardt, C., Medina, E., Warnking, K., Tuchscher, L., Heitmann, V., Ludwig, S., Peters, G., and Löffler, B. (2012). Combined action of influenza virus and *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin provokes severe lung epithelium damage. J. Infect. Dis. 206, 1138–1148.
315. Nilsson, P., and Ripa, T. (2006). *Staphylococcus aureus* throat colonization is more frequent than colonization in the anterior nares. J. Clin. Microbiol. 44, 3334–3339.
316. Nilsson, I.M., Lee, J.C., Bremell, T., Rydén, C., and Tarkowski, A. (1997). The role of staphylococcal polysaccharide microcapsule expression in septicemia and septic arthritis. Infect. Immun. 65, 4216–4221.
317. Noble, W.C., Valkenburg, H.A., and Wolters, C.H.L. (1967). Carriage of *Staphylococcus aureus* in random samples of a normal population. Epidemiol. Infect. 65, 567–573.
318. Nouwen, J., Boelens, H., van Belkum, A., and Verbrugh, H. (2004). Human factor in *Staphylococcus aureus* nasal carriage. Infect. Immun. 72, 6685–6688.
319. Novick, R. (1967). Properties of a cryptic high-frequency transducing phage in *Staphylococcus aureus*. Virology 33, 155–166.
320. Nübel, U., Roumagnac, P., Feldkamp, M., Song, J.-H., Ko, K.S., Huang, Y.-C., Coombs, G., Ip, M., Westh, H., Skov, R., et al. (2008). Frequent emergence and limited geographic dispersal of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 14130–14135.
321. Nugent, K.M., and Pesanti, E.L. (1982). Staphylococcal clearance and pulmonary macrophage function during influenza infection. Infect. Immun. 38, 1256–1262.
322. Numazaki, K., Chiba, S., Umetsu, M., Tanaka, T., Yoshimura, H., Kuniya, Y., Miura, J., Adachi, N., Ukae, S., Mori, T., et al. (2004). Etiological agents of lower respiratory tract infections in Japanese children. In Vivo 18, 67–72.

323. Nurjadi, D., Herrmann, E., Hinderberger, I., and Zanger, P. (2013). Impaired  $\beta$ -defensin expression in human skin links DEFB1 promoter polymorphisms with persistent *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *J. Infect. Dis.* 207, 666–674.
324. O'Brien, L., Kerrigan, S.W., Kaw, G., Hogan, M., Penadés, J., Litt, D., Fitzgerald, D.J., Foster, T.J., and Cox, D. (2002a). Multiple mechanisms for the activation of human platelet aggregation by *Staphylococcus aureus*: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartate repeat protein SdrE and protein A. *Mol. Microbiol.* 44, 1033–1044.
325. O'Brien, L.M., Walsh, E.J., Massey, R.C., Peacock, S.J., and Foster, T.J. (2002b). *Staphylococcus aureus* clumping factor B (ClfB) promotes adherence to human type I cytokeratin 10: implications for nasal colonization. *Cell. Microbiol.* 4, 759–770.
326. O'Hara, F.P., Amrine-Madsen, H., Mera, R.M., Brown, M.L., Close, N.M., Suaya, J.A., and Acosta, C.J. (2012). Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* in the United States 2004–2008 reveals the rapid expansion of USA300 among inpatients and outpatients. *Microb. Drug Resist.* 18, 555–561.
327. O'Hara, F.P., Suaya, J.A., Ray, G.T., Baxter, R., Brown, M.L., Mera, R.M., Close, N.M., Thomas, E., and Amrine-Madsen, H. (2016). spa typing and multilocus sequence typing show comparable performance in a macroepidemiologic study of *Staphylococcus aureus* in the United States. *Microb. Drug Resist.* 22, 88–96.
328. Okamoto, S., Kawabata, S., Nakagawa, I., Okuno, Y., Goto, T., Sano, K., and Hamada, S. (2003). Influenza A virus-infected hosts boost an invasive type of *Streptococcus pyogenes* infection in mice. *J. Virol.* 77, 4104–4112.
329. Olsen, K., Falch, B.M., Danielsen, K., Johannessen, M., Sollid, J.U.E., Thune, I., Grimnes, G., Jorde, R., Simonsen, G.S., and Furberg, A.-S. (2012). *Staphylococcus aureus* nasal carriage is associated with serum 25-hydroxyvitamin D levels, gender and smoking status. The Tromsø Staph and Skin Study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31, 465–473.
330. Olsen, K., Sangvik, M., Simonsen, G.S., Sollid, J.U.E., Sundsfjord, A., Thune, I., and Furberg, A.-S. (2013). Prevalence and population structure of *Staphylococcus aureus* nasal carriage in healthcare workers in a general population. The Tromsø Staph and Skin Study. *Epidemiol. Infect.* 141, 143–152.
331. Omuse, G., Kariuki, S., and Revathi, G. (2012). Unexpected absence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage by healthcare workers in a tertiary hospital in Kenya. *J. Hosp. Infect.* 80, 71–73.

332. Ong, K.L., Kurtz, S.M., Lau, E., Bozic, K.J., Berry, D.J., and Parvizi, J. (2009). Prosthetic joint infection risk after total hip arthroplasty in the Medicare population. *J. Arthroplasty* 24, 105–109.
333. Osterholm, M.T., and Forfang, J.C. (1982). Toxic-shock syndrome in Minnesota: results of an active-passive surveillance system. *J. Infect. Dis.* 145, 458–464.
334. Otter, J.A., and French, G.L. (2010). Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Lancet Infect. Dis.* 10, 227–239.
335. Otto, M., Echner, H., Voelter, W., and Götz, F. (2001). Pheromone cross-inhibition between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* 69, 1957–1960.
336. Ouedraogo, A.-S., Dunyach-Remy, C., Kissou, A., Sanou, S., Poda, A., Kyelem, C.G., Solassol, J., Bañuls, A.-L., Van De Perre, P., Ouédraogo, R., et al. (2016). High nasal carriage rate of *Staphylococcus aureus* containing Panton-Valentine leukocidin- and EDIN-encoding genes in community and hospital settings in Burkina Faso. *Front. Microbiol.* 7, e1406.
337. Ouidri, M.A. (2018). Screening of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* during admission of patients to Frantz Fanon Hospital, Blida, Algeria. *New Microbes New Infect.* 23, 52–60.
338. Ouyang, W., Kolls, J.K., and Zheng, Y. (2008). The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 28, 454–467.
339. Palma, M., Haggar, A., and Flock, J.I. (1999). Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *J. Bacteriol.* 181, 2840–2845.
340. Papi, A., and Johnston, S.L. (1999). Rhinovirus infection induces expression of its own receptor intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) via increased NF- $\kappa$ B-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* 274, 9707–9720.
341. Passariello, C., Schippa, S., Conti, C., Russo, P., Poggiali, F., Garaci, E., and Palamara, A.T. (2006). Rhinoviruses promote internalisation of *Staphylococcus aureus* into non-fully permissive cultured pneumocytes. *Microbes Infect.* 8, 758–766.
342. Passariello, C., Nencioni, L., Sgarbanti, R., Ranieri, D., Torrisi, M.R., Ripa, S., Garaci, E., and Palamara, A.T. (2011). Viral hemagglutinin is involved in promoting the internalisation of *Staphylococcus aureus* into human pneumocytes during influenza A H1N1 virus infection. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 97–104.

343. Paton, A.W., and Goldwater, P.N. (1990). Respiratory syncytial virus modulation of adult and neonatal lymphocyte mitogenic responses and the role of interferon-gamma. *Microb. Pathog.* 9, 235–241.
344. Payne, S.C., and Benninger, M.S. (2007). *Staphylococcus aureus* is a major pathogen in acute bacterial rhinosinusitis: a meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* 45, e121.
345. Peacock, S.J., Day, N.P., Thomas, M.G., Berendt, A.R., and Foster, T.J. (2000). Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibit diversity in *fnb* genes and adhesion to human fibronectin. *J. Infect.* 41, 23–31.
346. Peacock, S.J., Justice, A., Griffiths, D., Silva, G.D.I. de, Kantzanou, M.N., Crook, D., Sleeman, K., and Day, N.P.J. (2003). Determinants of acquisition and carriage of *Staphylococcus aureus* in infancy. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5718–5725.
347. Peebles, P.J., Dhara, R., Brammer, L., Fry, A.M., and Finelli, L. (2011). Influenza-associated mortality among children - United States: 2007–2008. *Influenza Other Respir. Viruses* 5, 25–31.
348. Peng, T., Kotla, S., Bumgarner, R.E., and Gustin, K.E. (2006). Human rhinovirus attenuates the type I interferon response by disrupting activation of interferon regulatory factor 3. *J. Virol.* 80, 5021–5031.
349. Peschel, A., Otto, M., Jack, R.W., Kalbacher, H., Jung, G., and Götz, F. (1999). Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J. Biol. Chem.* 274, 8405–8410.
350. Peschel, A., Jack, R.W., Otto, M., Collins, L.V., Staubitz, P., Nicholson, G., Kalbacher, H., Nieuwenhuizen, W.F., Jung, G., Tarkowski, A., et al. (2001). *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine. *J. Exp. Med.* 193, 1067–1076.
351. Pförtner, H., Burian, M.S., Michalik, S., Depke, M., Hildebrandt, P., Dhople, V.M., Pané-Farré, J., Hecker, M., Schmidt, F., and Völker, U. (2014). Activation of the alternative sigma factor SigB of *Staphylococcus aureus* following internalization by epithelial cells - an in vivo proteomics perspective. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 304, 177–187.
352. Pietrocola, G., Nobile, G., Gianotti, V., Zapotoczna, M., Foster, T.J., Geoghegan, J.A., and Speziale, P. (2016). Molecular interactions of human plasminogen with fibronectin-binding protein B (FnBPB), a fibrinogen/fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 291, 18148–18162.

353. Pires, F.V., da Cunha, M. de L.R. de S., Abraão, L.M., Martins, P.Y.F., Camargo, C.H., and Fortaleza, C.M.C.B. (2014). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in Botucatu, Brazil: a population-based survey. *PLOS One* 9, e92537.
354. Planet, P.J. (2017). Life After USA300: the rise and fall of a superbug. *J. Infect. Dis.* 215, 71–77.
355. Planet, P.J., Parker, D., Cohen, T.S., Smith, H., Leon, J.D., Ryan, C., Hammer, T.J., Fierer, N., Chen, E.I., and Prince, A.S. (2016). Lambda interferon restructures the nasal microbiome and increases susceptibility to *Staphylococcus aureus* superinfection. *MBio* 7, e01939.
356. Plé, P.A., Green, T.P., Hennequin, L.F., Curwen, J., Fennell, M., Allen, J., Lambert-Van Der Brempt, C., and Costello, G. (2004). Discovery of a new class of anilinoquinazoline inhibitors with high affinity and specificity for the tyrosine kinase domain of c-Src. *J. Med. Chem.* 47, 871–887.
357. Plough, H.H. (1945). Penicillin resistance of *Staphylococcus aureus* and its clinical implications. *Am. J. Clin. Pathol.* 15, 446–451.
358. Plouin-Gaudon, I., Clement, S., Huggler, E., Chaponnier, C., François, P., Lew, D., Schrenzel, J., Vaudaux, P., and Lacroix, J.S. (2006). Intracellular residency is frequently associated with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis. *Rhinology* 44, 249–254.
359. Poeck, H., Bscheider, M., Gross, O., Finger, K., Roth, S., Rebsamen, M., Hanneschläger, N., Schlee, M., Rothenfusser, S., Barchet, W., et al. (2010). Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 beta production. *Nat. Immunol.* 11, 63–69.
360. Priest, N.K., Rudkin, J.K., Feil, E.J., van den Elsen, J.M.H., Cheung, A., Peacock, S.J., Laabei, M., Lucks, D.A., Recker, M., and Massey, R.C. (2012). From genotype to phenotype: can systems biology be used to predict *Staphylococcus aureus* virulence? *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 791–797.
361. Prystopiuk, V., Feuillie, C., Herman-Bausier, P., Viela, F., Alsteens, D., Pietrocola, G., Speziale, P., and Dufrêne, Y.F. (2018). Mechanical forces guiding *Staphylococcus aureus* cellular invasion. *ACS Nano* 12, 3609–3622.
362. Psaltis, A.J., Ha, K.R., Beule, A.G., Tan, L.W., and Wormald, P.-J. (2007). Confocal scanning laser microscopy evidence of biofilms in patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 117, 1302–1306.
363. Quinn, G.A., Tarwater, P.M., and Cole, A.M. (2009). Subversion of interleukin-1-mediated host defence by a nasal carrier strain of *Staphylococcus aureus*. *Immunology* 128, e222–229.

364. Randolph, A.G., Vaughn, F., Sullivan, R., Rubinson, L., Thompson, B.T., Yoon, G., Smoot, E., Rice, T.W., Loftis, L.L., Helfaer, M., et al. (2011). Critically ill children during the 2009-2010 influenza pandemic in the United States. *Pediatrics* 128, e1450-1458.
365. Reddinger, R.M., Luke-Marshall, N.R., Hakansson, A.P., and Campagnari, A.A. (2016). Host physiologic changes induced by influenza A virus lead to *Staphylococcus aureus* biofilm dispersion and transition from asymptomatic colonization to invasive disease. *MBio* 7, e01235.
366. Reed, L.J., and Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* 27, 493–497.
367. Reed, C., Kallen, A.J., Patton, M., Arnold, K.E., Farley, M.M., Hageman, J., and Finelli, L. (2009). Infection with community-onset *Staphylococcus aureus* and influenza virus in hospitalized children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 28, 572–576.
368. Reyes, J., Rincón, S., Díaz, L., Panesso, D., Contreras, G.A., Zurita, J., Carrillo, C., Rizzi, A., Guzmán, M., Adachi, J., et al. (2009). Dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 sequence type 8 lineage in Latin America. *Clin. Infect. Dis.* 49, 1861–1867.
369. Rice, T.W., Rubinson, L., Uyeki, T.M., Vaughn, F.L., John, B.B., Miller, R.R., Higgs, E., Randolph, A.G., Smoot, B.E., and Thompson, B.T. (2012). Critical illness from 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus and bacterial co-infection in the United States. *Crit. Care Med.* 40, 1487–1498.
370. Rigail, J., Morgene, M.F., Gavid, M., Lelonge, Y., He, Z., Carricajo, A., Grattard, F., Pozzetto, B., Berthelot, P., Botelho-Nevers, E., et al. (2018a). Intracellular activity of antimicrobial compounds used for *Staphylococcus aureus* nasal decolonization. *J. Antimicrob. Chemother.*
371. Robertson, L., Caley, J.P., and Moore, J. (1958). Importance of *Staphylococcus aureus* in pneumonia in the 1957 epidemic of Influenza A. *Lancet* 272, 233–236.
372. Robinson, K.M., Choi, S.M., McHugh, K.J., Mandalapu, S., Enelow, R.I., Kolls, J.K., and Alcorn, J.F. (2013). Influenza A exacerbates *Staphylococcus aureus* pneumonia by attenuating IL-1 $\beta$  production in mice. *J. Immunol.* 191, 5153–5159.
373. Robinson, K.M., McHugh, K.J., Mandalapu, S., Clay, M.E., Lee, B., Scheller, E.V., Enelow, R.I., Chan, Y.R., Kolls, J.K., and Alcorn, J.F. (2014). Influenza A virus exacerbates *Staphylococcus aureus* pneumonia in mice by attenuating antimicrobial peptide production. *J. Infect. Dis.* 209, 865–875.

374. Robinson, K.M., Lee, B., Scheller, E.V., Mandalapu, S., Enelow, R.I., Kolls, J.K., and Alcorn, J.F. (2015). The role of IL-27 in susceptibility to post-influenza *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Respir. Res.* 16, 10.
375. Roche, F.M., Meehan, M., and Foster, T.J. (2003). The *Staphylococcus aureus* surface protein SasG and its homologues promote bacterial adherence to human desquamated nasal epithelial cells. *Microbiol. Read. Engl.* 149, 2759–2767.
376. Rodriguez, M.D., Paul, Z., Wood, C.E., Rice, K.C., and Triplett, E.W. (2017). Construction of stable fluorescent reporter plasmids for use in *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.* 8, e2491.
377. Rooijackers, S.H.M., Ruyken, M., Roos, A., Daha, M.R., Presanis, J.S., Sim, R.B., van Wamel, W.J.B., van Kessel, K.P.M., and van Strijp, J.A.G. (2005a). Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nat. Immunol.* 6, 920–927.
378. Rooijackers, S.H.M., van Wamel, W.J.B., Ruyken, M., van Kessel, K.P.M., and van Strijp, J. a. G. (2005b). Anti-opsonic properties of staphylokinase. *Microbes Infect.* 7, 476–484.
379. Rosas-Salazar, C., Shilts, M.H., Tovchigrechko, A., Schobel, S., Chappell, J.D., Larkin, E.K., Shankar, J., Yooseph, S., Nelson, K.E., Halpin, R.A., et al. (2016). Differences in the nasopharyngeal microbiome during acute respiratory tract infection with human rhinovirus and respiratory syncytial virus in infancy. *J. Infect. Dis.* 214, 1924–1928.
380. Ross, T.L., Merz, W.G., Farkosh, M., and Carroll, K.C. (2005). Comparison of an automated repetitive sequence-based PCR microbial typing system to pulsed-field gel electrophoresis for analysis of outbreaks of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5642–5647.
381. Royston, L., and Tapparel, C. (2016). Rhinoviruses and respiratory enteroviruses: not as simple as ABC. *Viruses* 8, e16.
382. Rudrik, J.T., Cavalieri, S.J., and Britt, E.M. (1985). Proposed quality control and interpretive criteria for disk diffusion susceptibility testing with enoxacin. *J. Clin. Microbiol.* 21, 332–334.
383. Ruimy, R., Angebault, C., Djossou, F., Dupont, C., Epelboin, L., Jarraud, S., Armand Lefevre, L., Bes, M., Elena Lixandru, B., Bertine, M., et al. (2010). Are host genetics the predominant determinant of persistent nasal *Staphylococcus aureus* carriage in humans? *J. Infect. Dis.* 202, 924–934.
384. Rynda-Apple, A., Harmsen, A., Erickson, A.S., Larson, K., Morton, R.V., Richert, L.E., and Harmsen, A.G. (2014). Regulation of IFN- $\gamma$  by IL-13 dictates susceptibility

to secondary postinfluenza MRSA pneumonia: Immunity to infection. *Eur. J. Immunol.* 44, 3263–3272.

**385.** Rynda-Apple, A., Robinson, K.M., and Alcorn, J.F. (2015). Influenza and bacterial superinfection: illuminating the immunologic mechanisms of disease. *Infect. Immun.* 83, 3764–3770.

**386.** Saadi, A.T., Blackwell, C.C., Raza, M.W., James, V.S., Stewart, J., Elton, R.A., and Weir, D.M. (1993). Factors enhancing adherence of toxigenic *Staphylococcus aureus* to epithelial cells and their possible role in sudden infant death syndrome. *Epidemiol. Infect.* 110, 507–517.

**387.** Sabat, A., Melles, D.C., Martirosian, G., Grundmann, H., van Belkum, A., and Hryniewicz, W. (2006). Distribution of the serine-aspartate repeat protein-encoding *sdr* genes among nasal-carriage and invasive *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1135–1138.

**388.** Safaeyan, F., Nahaei, M.R., Seifi, S.J., Kafil, H.S., and Sadeghi, J. (2015). Quantitative detection of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in patients with new influenza A (H1N1)/2009 and influenza A/2010 virus infection. *GMS Hyg. Infect. Control* 10, Doc06.

**389.** Sajjan, U., Wang, Q., Zhao, Y., Gruenert, D.C., and Hershenson, M.B. (2008). Rhinovirus disrupts the barrier function of polarized airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178, 1271–1281.

**390.** Sanclement, J.A., Webster, P., Thomas, J., and Ramadan, H.H. (2005). Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 115, 578–582.

**391.** Sanderson, A.R., Leid, J.G., and Hunsaker, D. (2006). Bacterial biofilms on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 116, 1121–1126.

**392.** Sanford, B.A., and Ramsay, M.A. (1986). Detection of staphylococcal membrane receptors on virus-infected cells by direct adhesin overlay. *Infect. Immun.* 52, 671–675.

**393.** Sanford, B.A., and Ramsay, M.A. (1987). Bacterial adherence to the upper respiratory tract of ferrets infected with influenza A virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 185, 120–128.

**394.** Sanford, B.A., and Ramsay, M.A. (1989). In vivo localization of *Staphylococcus aureus* in nasal tissues of healthy and influenza A virus-infected ferrets. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 191, 163–169.



395. Sanford, B.A., Davison, V.E., and Ramsay, M.A. (1986). *Staphylococcus aureus* adherence to influenza A virus-infected and control cell cultures: evidence for multiple adhesins. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 181, 104–111.
396. Sangvik, M., Olsen, R.S., Olsen, K., Simonsen, G.S., Furberg, A.-S., and Sollid, J.U.E. (2011). Age- and gender-associated *Staphylococcus aureus spa* types found among nasal carriers in a general population: the Tromsø Staph and Skin Study. *J. Clin. Microbiol.* 49, 4213–4218.
397. Saxena, S., Singh, K., and Talwar, V. (2003). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prevalence in community in the east Delhi area. *Jpn. J. Infect. Dis.* 56, 54–56.
398. Sayedyahosseini, S., Xu, S.X., Rudkouskaya, A., McGavin, M.J., McCormick, J.K., and Dagnino, L. (2015). *Staphylococcus aureus* keratinocyte invasion is mediated by integrin-linked kinase and Rac1. *FASEB J.* 29, 711–723.
399. Schaffer, A.C., Solinga, R.M., Cocchiari, J., Portoles, M., Kiser, K.B., Risley, A., Randall, S.M., Valtulina, V., Speziale, P., Walsh, E., et al. (2006a). Immunization with *Staphylococcus aureus* clumping factor B, a major determinant in nasal carriage, reduces nasal colonization in a murine model. *Infect. Immun.* 74, 2145–2153.
400. Schaffner, W., Melly, M.A., Hash, J.H., and Koenig, M.G. (1967). Lysostaphin: an enzymatic approach to staphylococcal disease. *J. Biol. Med.* 39, 215–229.
401. Scheiblaue, H., Reinacher, M., Tashiro, M., and Rott, R. (1992). Interactions between bacteria and influenza A virus in the development of influenza pneumonia. *J. Infect. Dis.* 166, 783–791.
402. Schindler, C.A., and Schuhardt, V.T. (1964). Lysostaphin: a new bacteriolytic agent for the *Staphylococcus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 51, 414–421.
403. Schneewind, O., Mihaylova-Petkov, D., and Model, P. (1993). Cell wall sorting signals in surface proteins of gram-positive bacteria. *EMBO J.* 12, 4803–4811.
404. Schwarz-Linek, U., Werner, J.M., Pickford, A.R., Gurusiddappa, S., Kim, J.H., Pilka, E.S., Briggs, J.A.G., Gough, T.S., Höök, M., Campbell, I.D., et al. (2003). Pathogenic bacteria attach to human fibronectin through a tandem beta-zipper. *Nature* 423, 177–181.
405. Scott, M.J., Hoth, J.J., Gardner, S.A., Peyton, J.C., and Cheadle, W.G. (2003). Natural killer cell activation primes macrophages to clear bacterial infection. *Am. Surg.* 69, 679–687.

406. Scriba, T.J., Sierro, S., Brown, E.L., Phillips, R.E., Sewell, A.K., and Massey, R.C. (2008). The *Staphylococcus aureus* Eap protein activates expression of proinflammatory cytokines. *Infect Immun* 76, 2164–2168.
407. Selinger, D.S., Reed, W.P., and McLaren, L.C. (1981). Model for studying bacterial adherence to epithelial cells infected with viruses. *Infect. Immun.* 32, 941–944.
408. Selva, L., Viana, D., Regev-Yochay, G., Trzcinski, K., Corpa, J.M., Lasa, Í., Novick, R.P., and Penadés, J.R. (2009). Killing niche competitors by remote-control bacteriophage induction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 1234–1238.
409. Senna, J.P.M., Pinto, C.A., Carvalho, L.P.S., and Santos, D.S. (2002). Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and PCR analysis of polymorphisms on the mec hypervariable region for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2254–2256.
410. Shahangian, A., Chow, E.K., Tian, X., Kang, J.R., Ghaffari, A., Liu, S.Y., Belperio, J.A., Cheng, G., and Deng, J.C. (2009). Type I IFNs mediate development of postinfluenza bacterial pneumonia in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 1910–1920.
411. Shepardson, K.M., Larson, K., Morton, R.V., Prigge, J.R., Schmidt, E.E., Huber, V.C., and Rynda-Apple, A. (2016). Differential type I interferon signaling is a master regulator of susceptibility to postinfluenza bacterial superinfection. *MBio* 7, e00506.
412. Sherertz, R.J., Reagan, D.R., Hampton, K.D., Robertson, K.L., Streed, S.A., Hoen, H.M., Thomas, R., and Gwaltney, J.M. (1996). A cloud adult: The *Staphylococcus aureus*-virus interaction revisited. *Ann. Intern. Med.* 124, 539–547.
413. Shopsin, B., Gomez, M., Montgomery, S.O., Smith, D.H., Waddington, M., Dodge, D.E., Bost, D.A., Riehman, M., Naidich, S., and Kreiswirth, B.N. (1999). Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3556–3563.
414. Sieprawska-Lupa, M., Mydel, P., Krawczyk, K., Wójcik, K., Puklo, M., Lupa, B., Suder, P., Silberring, J., Reed, M., Pohl, J., et al. (2004). Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 4673–4679.
415. Sievert, D.M., Rudrik, J.T., Patel, J.B., McDonald, L.C., Wilkins, M.J., and Hageman, J.C. (2008). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002–2006. *Clin. Infect. Dis.* 46, 668–674.
416. Sinha, B., François, P.P., Nüsse, O., Foti, M., Hartford, O.M., Vaudaux, P., Foster, T.J., Lew, D.P., Herrmann, M., and Krause, K.-H. (1999). Fibronectin-binding protein

acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin  $\alpha 5\beta 1$ . *Cell. Microbiol.* 1, 101–117.

417. Sissolak, D., Geusau, A., Heinze, G., Witte, W., and Rotter, M. (2002). Risk Factors for nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in infectious disease patients, including patients infected with HIV, and molecular typing of colonizing strains. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21, 88–96.

418. Skråmm, I., Moen, A.E.F., and Bukholm, G. (2011). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: frequency and molecular diversity in a randomly sampled Norwegian community population. *APMIS* 119, 522–528.

419. Slama, K.B., Gharsa, H., Klibi, N., Jouini, A., Lozano, C., Gómez-Sanz, E., Zarazaga, M., Boudabous, A., and Torres, C. (2011). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in healthy humans with different levels of contact with animals in Tunisia: genetic lineages, methicillin resistance, and virulence factors. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30, 499–508.

420. Small, C.-L., Shaler, C.R., McCormick, S., Jeyanathan, M., Damjanovic, D., Brown, E.G., Arck, P., Jordana, M., Kaushic, C., Ashkar, A.A., et al. (2010). Influenza infection leads to increased susceptibility to subsequent bacterial superinfection by impairing NK cell responses in the lung. *J. Immunol.* 184, 2048–2056.

421. Smith, E.A., Kumar, S.R.P., Deventhiran, J., Cecere, T.E., Leroith, T., McGilliard, M., Elankumaran, S., and Mullarky, I.K. (2011). A time course for susceptibility to *Staphylococcus aureus* respiratory infection during influenza in a swine model. *Influenza Res. Treat.* 2011, e846910.

422. Soehnlein, O., and Lindbom, L. (2010). Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 427–439.

423. Sollid, J.U.E., Furberg, A.S., Hanssen, A.M., and Johannessen, M. (2014). *Staphylococcus aureus* determinants of human carriage. *Infect. Genet. Evol.* 21, 531–541.

424. Sonesson, A., Przybyszewska, K., Eriksson, S., Mörgelin, M., Kjellström, S., Davies, J., Potempa, J., and Schmidtchen, A. (2017). Identification of bacterial biofilm and the *Staphylococcus aureus* derived protease, staphopain, on the skin surface of patients with atopic dermatitis. *Sci. Rep.* 7, e8689.

425. Speziale, P., Pietrocola, G., Rindi, S., Provenzano, M., Provenza, G., Di Poto, A., Visai, L., and Arciola, C.R. (2009). Structural and functional role of *Staphylococcus aureus* surface components recognizing adhesive matrix molecules of the host. *Future Microbiol.* 4, 1337–1352.

426. Stark, J.M., Stark, M.A., Colasurdo, G.N., and LeVine, A.M. (2006). Decreased bacterial clearance from the lungs of mice following primary respiratory syncytial virus infection. *J. Med. Virol.* 78, 829–838.
427. Stark, L., Olofsson, M., Löfgren, S., Mölsted, S., Lindgren, P.E., and Matussek, A. (2014). Prevalence and molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in Swedish nursing homes – as revealed in the SHADES study. *Epidemiol. Infect.* 142, 1310–1316.
428. Staubitz, P., Neumann, H., Schneider, T., Wiedemann, I., and Peschel, A. (2004). MprF-mediated biosynthesis of lysylphosphatidylglycerol, an important determinant in staphylococcal defensin resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* 231, 67–71.
429. Staunton, D.E., Merluzzi, V.J., Rothlein, R., Barton, R., Marlin, S.D., and Springer, T.A. (1989). A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for rhinoviruses. *Cell* 56, 849–853.
430. Stegger, M., Wirth, T., Andersen, P.S., Skov, R.L., De Grassi, A., Simões, P.M., Tristan, A., Petersen, A., Aziz, M., Kiil, K., et al. (2014). Origin and evolution of European community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *MBio* 5, e01044.
431. Steinhauser, M.L., Hogaboam, C.M., Kunkel, S.L., Lukacs, N.W., Strieter, R.M., and Standiford, T.J. (1999). IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense. *J. Immunol.* 162, 392–399.
432. Strommenger, B., Bräulke, C., Heuck, D., Schmidt, C., Pasemann, B., Nübel, U., and Witte, W. (2008). spa Typing of *Staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing. *J. Clin. Microbiol.* 46, 574–581.
433. Styers, D., Sheehan, D.J., Hogan, P., and Sahm, D.F. (2006). Laboratory-based surveillance of current antimicrobial resistance patterns and trends among *Staphylococcus aureus*. 2005 status in the United States. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 5, 2.
434. Subramaniam, R., Barnes, P.F., Fletcher, K., Boggaram, V., Hillberry, Z., Neuenschwander, P., and Shams, H. (2014). Protecting against post-influenza bacterial pneumonia by increasing phagocyte recruitment and ROS production. *J. Infect. Dis.* 209, 1827–1836.
435. Sun, K., and Metzger, D.W. (2008). Inhibition of pulmonary antibacterial defense by interferon-gamma during recovery from influenza infection. *Nat. Med.* 14, 558–564.
436. Sun, K., and Metzger, D.W. (2014). Influenza infection suppresses NADPH oxidase-dependent phagocytic bacterial clearance and enhances susceptibility to

secondary methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *J. Immunol.* 192, 3301–3307.

437. Sun, K., Yajjala, V.K., Bauer, C., Talmon, G.A., Fischer, K.J., Kielian, T., and Metzger, D.W. (2016). Nox2-derived oxidative stress results in inefficacy of antibiotics against post-influenza *S. aureus* pneumonia. *J. Exp. Med.* 213, 1851–1864.

438. Suzuki, A., Lupisan, S., Furuse, Y., Fuji, N., Saito, M., Tamaki, R., Galang, H., Sombrero, L., Mondoy, M., Aniceto, R., et al. (2012). Respiratory viruses from hospitalized children with severe pneumonia in the Philippines. *BMC Infect. Dis.* 12, 267.

439. Swidsinski, A., Göktas, O., Bessler, C., Loening-Baucke, V., Hale, L.P., Andree, H., Weizenegger, M., Hölzl, M., Scherer, H., and Lochs, H. (2007). Spatial organisation of microbiota in quiescent adenoiditis and tonsillitis. *J. Clin. Pathol.* 60, 253–260.

440. Swierstra, J., Debets, S., Vogel, C. de, Toom, N.L., Verkaik, N., Ramdani-Bouguessa, N., Jonkman, M.F., Dijk, J.M. van, Fahal, A., Belkum, A. van, et al. (2015). IgG4 Subclass-specific responses to *Staphylococcus aureus* antigens shed new light on host-pathogen interaction. *Infect. Immun.* 83, 492–501.

441. Switalski, L.M., Patti, J.M., Butcher, W., Gristina, A.G., Speziale, P., and Höök, M. (1993). A collagen receptor on *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with septic arthritis mediates adhesion to cartilage. *Mol. Microbiol.* 7, 99–107.

442. Takada, Y., Ye, X., and Simon, S. (2007). The integrins. *Genome Biol.* 8, 215.

443. Takayama, Y., Yano, H., Nojima, Y., Nakano, R., Okamoto, R., Hirakata, Y., Sunakawa, K., Akahoshi, T., and Kaku, M. (2014). Influence of prior pandemic A(H1N1)2009 virus infection on invasion of MDCK cells by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Chemother.* 20, 71–73.

444. Tamer, A., Karabay, O., and Ekerbicer, H. (2006). *Staphylococcus aureus* nasal carriage and associated factors in type 2 diabetic patients. *Jpn. J. Infect. Dis.* 59, 10–14.

445. Tashiro, M., Ciborowski, P., Klenk, H.D., Pulverer, G., and Rott, R. (1987a). Role of *Staphylococcus* protease in the development of influenza pneumonia. *Nature* 325, 536–537.

446. Tashiro, M., Ciborowski, P., Reinacher, M., Pulverer, G., Klenk, H.D., and Rott, R. (1987b). Synergistic role of staphylococcal proteases in the induction of influenza virus pathogenicity. *Virology* 157, 421–430.

447. Taubenberger, J.K., and Morens, D.M. (2006). 1918 influenza: The mother of all pandemics. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 15–22.

448. Thammavongsa, V., Kim, H.K., Missiakas, D., and Schneewind, O. (2015). Staphylococcal manipulation of host immune responses. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 529–543.
449. Thibaut, H.J., Lacroix, C., De Palma, A.M., Franco, D., Decramer, M., and Neyts, J. (2016). Toward antiviral therapy/prophylaxis for rhinovirus-induced exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: challenges, opportunities, and strategies. *Rev. Med. Virol.* 26, 21–33.
450. Thorburn, K. (2006). High incidence of pulmonary bacterial co-infection in children with severe respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis. *Thorax* 61, 611–615.
451. Tleyjeh, I.M., Abdel-Latif, A., Rahbi, H., Scott, C.G., Bailey, K.R., Steckelberg, J.M., Wilson, W.R., and Baddour, L.M. (2007). A systematic review of population-based studies of infective endocarditis. *Chest* 132, 1025–1035.
452. To, K.K.W., Lau, S.K.P., Chan, K.-H., Mok, K.-Y., Luk, H.K.H., Yip, C.C.Y., Ma, Y.-K., Sinn, L.H.Y., Lam, S.H.Y., Ngai, C.-W., et al. (2016). Pulmonary and extrapulmonary complications of human rhinovirus infection in critically ill patients. *J. Clin. Virol.* 77, 85–91.
453. To, K.K.W., Yip, C.C.Y., and Yuen, K.-Y. (2017). Rhinovirus – From bench to bedside. *J. Formos. Med. Assoc.* 116, 496–504.
454. Todd, J., Fishaut, M., Kapral, F., and Welch, T. (1978). Toxic-shock syndrome associated with phage-group-I Staphylococci. *Lancet* 2, 1116–1118.
455. Tong, S.Y.C., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., and Fowler, V.G. (2015). *Staphylococcus aureus* infections : Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 603–661.
456. Trotter, Y., Dunn, F.L., Drachman, R.H., Henderson, D.A., Pizzi, M., and Langmuir, A.D. (1959). Asian influenza in the United States, 1957–1958. *Am. J. Epidemiol.* 70, 34–50.
457. Truong-Bolduc, Q.C., Bolduc, G.R., Medeiros, H., Vyas, J.M., Wang, Y., and Hooper, D.C. (2015). Role of the Tet38 efflux pump in *Staphylococcus aureus* internalization and survival in epithelial cells. *Infect. Immun.* 83, 4362–4372.
458. Truong-Bolduc, Q.C., Khan, N.S., Vyas, J.M., and Hooper, D.C. (2017). Tet38 efflux pump affects *Staphylococcus aureus* internalization by epithelial cells through interaction with CD36 and contributes to bacterial escape from acidic and nonacidic phagolysosomes. *Infect. Immun.* 85.
459. Tsan, M.-F., and Gao, B. (2009). Heat shock proteins and immune system. *J. Leukoc. Biol.* 85, 905–910.

460. Tuchscher, L., Bischoff, M., Lattar, S.M., Noto Llana, M., Pfortner, H., Niemann, S., Geraci, J., Van de Vyver, H., Fraunholz, M.J., Cheung, A.L., et al. (2015). Sigma factor SigB is crucial to mediate *Staphylococcus aureus* adaptation during chronic infections. *PLOS Pathog.* 11, e1004870.
461. Tung, H. s, Guss, B., Hellman, U., Persson, L., Rubin, K., and Rydén, C. (2000). A bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: A member of the staphylococcal Sdr family. *Biochem. J.* 345, 611–619.
462. Uehara, Y., Nakama, H., Agematsu, K., Uchida, M., Kawakami, Y., Abdul Fattah, A.S.M., and Maruchi, N. (2000). Bacterial interference among nasal inhabitants: eradication of *Staphylococcus aureus* from nasal cavities by artificial implantation of *Corynebacterium* sp. *J. Hosp. Infect.* 44, 127–133.
463. Uehara, Y., Kikuchi, K., Nakamura, T., Nakama, H., Agematsu, K., Kawakami, Y., Maruchi, N., and Totsuka, K. (2001). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced by viridans group streptococci may contribute to inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization of oral cavities in newborns. *Clin. Infect. Dis.* 32, 1408–1413.
464. Uemura, E., Kakinohana, S., Higa, N., Toma, C., and Nakasone, N. (2004). Comparative characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from throats and noses of healthy volunteers. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57, 21–24.
465. Valour, F., Trouillet-Assant, S., Riffard, N., Tasse, J., Flammier, S., Rasigade, J.-P., Chidiac, C., Vandenesch, F., Ferry, T., and Laurent, F. (2015). Antimicrobial activity against intraosteoblastic *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 2029–2036.
466. Verhoeven, P.O., Grattard, F., Carricajo, A., Lucht, F., Cazorla, C., Garraud, O., Pozzetto, B., and Berthelot, P. (2012). Quantification by real-time PCR assay of *Staphylococcus aureus* load: a useful tool for rapidly identifying persistent nasal carriers. *J. Clin. Microbiol.* 50, 2063–2065.
467. Verhoeven, P.O., Gagnaire, J., Botelho-Nevers, E., Grattard, F., Carricajo, A., Lucht, F., Pozzetto, B., and Berthelot, P. (2014). Detection and clinical relevance of *Staphylococcus aureus* nasal carriage: an update. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 12, 75–89.
468. Verhoeven, P.O., Gautret, P., Haddar, C., Benkouiten, S., Gagnaire, J., Belhouchat, K., Grattard, F., Charrel, R., Pozzetto, B., Drali, T., et al. (2015a). Molecular dynamics of *Staphylococcus aureus* nasal carriage in Hajj pilgrims. *Clin. Microbiol. Infect.* 21, 650.

469. Verhoeven, P.O., Haddar, C.H., Grattard, F., Carricajo, A., Botelho-Nevers, E., Pozzetto, B., and Berthelot, P. (2015b). Does pharyngeal sampling improve the detection of nasopharyngeal persistent carriers of *Staphylococcus aureus*? *J. Infect.* 70, 549–552.
470. Verkaik, N.J., Nguyen, D.T., de Vogel, C.P., Moll, H.A., Verbrugh, H.A., Jaddoe, V.W.V., Hofman, A., van Wamel, W.J.B., van den Hoogen, B.G., Buijs-Offerman, R.M.G.B., et al. (2011). *Streptococcus pneumoniae* exposure is associated with human metapneumovirus seroconversion and increased susceptibility to in vitro HMPV infection. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 1840–1844.
471. Vuononvirta, J., Toivonen, L., Gröndahl-Yli-Hannuksela, K., Barkoff, A.-M., Lindholm, L., Mertsola, J., Peltola, V., and He, Q. (2011). Nasopharyngeal bacterial colonization and gene polymorphisms of mannose-binding lectin and toll-like receptors 2 and 4 in infants. *PLOS One* 6, e26198.
472. Wagenvoort, J.H.T., De Brauwier, E.I.G.B., Sijstermans, M.L.H., and Toenbreker, H.M.J. (2005). Risk of re-introduction of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* into the hospital by intrafamilial spread from and to healthcare workers. *J. Hosp. Infect.* 59, 67–68.
473. Wang, S.Z., and Forsyth, K.D. (2000). The interaction of neutrophils with respiratory epithelial cells in viral infection. *Respirol.* 5, 1–10.
474. Wang, C., Armstrong, S.M., Sugiyama, M.G., Tabuchi, A., Krauszman, A., Kuebler, W.M., Mullen, B., Advani, S., Advani, A., and Lee, W.L. (2015). Influenza-induced priming and leak of human lung microvascular endothelium upon exposure to *Staphylococcus aureus*. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 53, 459–470.
475. Wang, J.H., Kwon, H.-J., Lee, B.-J., and Jang, Y.J. (2007). Staphylococcal enterotoxins A and B enhance rhinovirus replication in A549 cells. *Am. J. Rhinol.* 21, 670–674.
476. Wang, J.H., Kwon, H.J., and Jang, Y.J. (2009). Rhinovirus enhances various bacterial adhesions to nasal epithelial cells simultaneously. *Laryngoscope* 119, 1406–1411.
477. Wang, J.H., Lee, S.H., Kwon, H.J., and Jang, Y.J. (2010). Clarithromycin inhibits rhinovirus-induced bacterial adhesions to nasal epithelial cells. *Laryngoscope* 120, 193–199.
478. Wang, J.-H., Zhang, K., Wang, N., Qiu, X.-M., Wang, Y.-B., and He, P. (2013). Involvement of phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt signaling pathway in  $\beta$ 1 integrin-mediated internalization of *Staphylococcus aureus* by alveolar epithelial cells. *J. Microbiol.* 51, 644–650.



479. Wann, E.R., Gurusiddappa, S., and Hook, M. (2000). The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen. *J. Biol. Chem.* 275, 13863–13871.
480. Warnking, K., Klemm, C., Löffler, B., Niemann, S., van Krüchten, A., Peters, G., Ludwig, S., and Ehrhardt, C. (2015). Super-infection with *Staphylococcus aureus* inhibits influenza virus-induced type I IFN signalling through impaired STAT1-STAT2 dimerization. *Cell. Microbiol.* 17, 303–317.
481. Weidenmaier, C., Kokai-Kun, J.F., Kristian, S.A., Chanturiya, T., Kalbacher, H., Gross, M., Nicholson, G., Neumeister, B., Mond, J.J., and Peschel, A. (2004). Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. *Nat. Med.* 10, 243–245.
482. Weidenmaier, C., Peschel, A., Xiong, Y.-Q., Kristian, S.A., Dietz, K., Yeaman, M.R., and Bayer, A.S. (2005). Lack of wall teichoic acids in *Staphylococcus aureus* leads to reduced interactions with endothelial cells and to attenuated virulence in a rabbit model of endocarditis. *J. Infect. Dis.* 191, 1771–1777.
483. Weidenmaier, C., Kokai-Kun, J.F., Kulauzovic, E., Kohler, T., Thumm, G., Stoll, H., Götz, F., and Peschel, A. (2008). Differential roles of sortase-anchored surface proteins and wall teichoic acid in *Staphylococcus aureus* nasal colonization. *Int. J. Med. Microbiol.* 298, 505–513.
484. Wertheim, H.F., Vos, M.C., Ott, A., van Belkum, A., Voss, A., Kluytmans, J.A., van Keulen, P.H., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Meester, M.H., and Verbrugh, H.A. (2004). Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. *Lancet* 364, 703–705.
485. Wertheim, H.F., Melles, D.C., Vos, M.C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H.A., and Nouwen, J.L. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect. Dis.* 5, 751–762.
486. Wertheim, H.F., Walsh, E., Choudhury, R., Melles, D.C., Boelens, H.A., Miajlovic, H., Verbrugh, H.A., Foster, T., and van Belkum, A. (2008). Key role for clumping factor B in *Staphylococcus aureus* nasal colonization of humans. *PLoS Med.* 5, e17.
487. Wertheim, H.F., van Kleef, M., Vos, M.C., Ott, A., Verbrugh, H.A., and Fokkens, W. (2006). Nose picking and nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 27, 863–867.
488. White, R.J., Blainey, A.D., Harrison, K.J., and Clarke, S.K. (1981). Causes of pneumonia presenting to a district general hospital. *Thorax* 36, 566–570.

489. Williams, J.V., Vowels, B.R., Honig, P.J., and Leyden, J.J. (1998). *S. aureus* isolation from the lesions, the hands, and the anterior nares of patients with atopic dermatitis. *Pediatr. Dermatol.* 15, 194–198.
490. Winther, B., Arruda, E., Witek, T.J., Marlin, S.D., Tsianco, M.M., Innes, D.J., and Hayden, F.G. (2002). Expression of ICAM-1 in nasal epithelium and levels of soluble ICAM-1 in nasal lavage fluid during human experimental rhinovirus infection. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 128, 131–136.
491. Wright, J.A., and Nair, S.P. (2010). Interaction of staphylococci with bone. *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 193–204.
492. Wright, J.S., Jin, R., and Novick, R.P. (2005). Transient interference with staphylococcal quorum sensing blocks abscess formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 1691–1696.
493. Wu, J.A., Kusuma, C., Mond, J.J., and Kokai-Kun, J.F. (2003). Lysostaphin disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms on artificial surfaces. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3407–3414.
494. Wunderink, R.G., and Waterer, G. (2017). Advances in the causes and management of community acquired pneumonia in adults. *BMJ* 358, 2471.
495. Xatzipsalti, M., and Papadopoulos, N. (2007). Cellular and animals models for rhinovirus infection in asthma. In *models of exacerbations in asthma and COPD*, (Karger Publishers), p. 33–41.
496. Xie, C., Alcaide, P., Geisbrecht, B.V., Schneider, D., Herrmann, M., Preissner, K.T., Lusinskas, F.W., and Chavakis, T. (2006). Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus*. *J. Exp. Med.* 203, 985–994.
497. Xie, Y., He, Y., Gehring, A., Hu, Y., Li, Q., Tu, S.-I., and Shi, X. (2011). Genotypes and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* clinical isolates from China. *PLOS One* 6, e28276.
498. Yang, D., Wijenayaka, A.R., Solomon, L.B., Pederson, S.M., Findlay, D.M., Kidd, S.P., and Atkins, G.J. (2018). Novel insights into *Staphylococcus aureus* deep bone infections: The involvement of osteocytes. *MBio* 9, e00415.
499. Youn, G.S., Kwon, D.-J., Ju, S.M., Choi, S.Y., and Park, J. (2013). Curcumin ameliorates TNF- $\alpha$ -induced ICAM-1 expression and subsequent THP-1 adhesiveness via the induction of heme oxygenase-1 in the HaCaT cells. *BMB Rep.* 46, 410–415.

500. Yu, M.S., Park, H.W., Kwon, H.J., and Jang, Y.J. (2011). The effect of a low concentration of hypochlorous acid on rhinovirus infection of nasal epithelial cells. *Am. J. Rhinol. Allergy* 25, 40–44.
501. Yu, V.L., Goetz, A., Wagener, M., Smith, P.B., Rihs, J.D., Hanchett, J., and Zuravleff, J.J. (1986). *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection in patients on hemodialysis. *N. Engl. J. Med.* 315, 91–96.
502. Zanelli, G., Sansoni, A., Zanchi, A., Cresti, S., Pollini, S., Rossolini, G.M., and Cellesi, C. (2002). *Staphylococcus aureus* nasal carriage in the community: a survey from central Italy. *Epidemiol. Infect.* 129, 417–420.
503. Zanger, P., Holzer, J., Schleucher, R., Steffen, H., Schitteck, B., and Gabrysch, S. (2009). Constitutive expression of the antimicrobial peptide RNase 7 is associated with *Staphylococcus aureus* infection of the skin. *J. Infect. Dis.* 200, 1907–1915.
504. Zanger, P., Nurjadi, D., Gaile, M., Gabrysch, S., and Kremsner, P.G. (2012). Hormonal contraceptive use and persistent *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Clin. Infect. Dis.* 55, 1625–1632.
505. Zapotoczna, M., Jevnikar, Z., Miajlovic, H., Kos, J., and Foster, T.J. (2013). Iron-regulated surface determinant B (IsdB) promotes *Staphylococcus aureus* adherence to and internalization by non-phagocytic human cells: Interactions of *S. aureus* IsdB with host cells. *Cell. Microbiol.* 15, 1026–1041.
506. Zautner, A.E., Krause, M., Stropahl, G., Holtfreter, S., Frickmann, H., Maletzki, C., Kreikemeyer, B., Pau, H.W., and Podbielski, A. (2010). Intracellular persisting *Staphylococcus aureus* is the major pathogen in recurrent tonsillitis. *PLOS One* 5, e9452.
507. Zhang, D.-W., Zheng, M., Zhao, J., Li, Y.-Y., Huang, Z., Li, Z., and Han, J. (2011). Multiple death pathways in TNF-treated fibroblasts: RIP3- and RIP1-dependent and independent routes. *Cell Res.* 21, 368–371.
508. Zhang, W.J., Sarawar, S., Nguyen, P., Daly, K., Rehg, J.E., Doherty, P.C., Woodland, D.L., and Blackman, M.A. (1996). Lethal synergism between influenza infection and staphylococcal enterotoxin B in mice. *J. Immunol.* 157, 5049–5060.
509. Zong, Y., Xu, Y., Liang, X., Keene, D.R., Höök, A., Gurusiddappa, S., Höök, M., and Narayana, S.V.L. (2005). A “collagen Hug” model for *Staphylococcus aureus* CNA binding to collagen. *EMBO J.* 24, 4224–4236.

# ANNEXES



## Développement et validation d'un modèle cellulaire de colonisation nasale par des souches cliniques de *Staphylococcus aureus* exprimant la « Green Fluorescent Protein »

Mohamed Fedy MORGENE<sup>1</sup>, Sana CHARAOUI-BOUKERZAZA<sup>1</sup>, Elisabeth BÔTELHO-NEVERS<sup>1,3</sup>, Florence GRATARD<sup>1,2</sup>, Bruno POZZETTO<sup>1,2</sup>, Thomas BOURLET<sup>1,3</sup> et Paul VERHOEVEN<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>Laboratoire GIMAP EA3064, Faculté de Médecine de Saint-Etienne,  
<sup>2</sup>Laboratoire des Agents Pathogènes et Hygiène, Hôpital Nord de Saint-Etienne,  
<sup>3</sup>Service d'infectiologie et des maladies tropicales, Hôpital Nord de Saint-Etienne



### INTRODUCTION

*Staphylococcus aureus* est devenu l'une des causes les plus importantes d'infections nosocomiales, en particulier après intervention chirurgicale. Le développement de nouvelles stratégies contre ces infections nécessite une meilleure compréhension de la complexité des interactions possibles entre *S. aureus* et l'organisme humain, notamment au niveau de la muqueuse nasale.

Le but de cette étude était d'évaluer la pathogénicité de 18 souches cliniques fluorescentes exprimant la GFP (voir poster S. Charaoui-Boukerzaza) par rapport à leur pouvoir d'adhésion et d'internalisation dans des cellules épithéliales HaCaT pour s'assurer que la transformation génétique de ces souches n'a pas eu d'impact sur leur infectiosité.

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les infections *in vitro* ont été réalisées sur des plaques de 24 puits contenant des cellules HaCaT confluentes qui ont été infectées avec une multiplicité d'infection (MOI) de 1 pendant 2 h puis traitées à la lysostaphine (Sigma®) qui permet d'éliminer les bactéries présentes à l'extérieur des cellules (Figure 1).

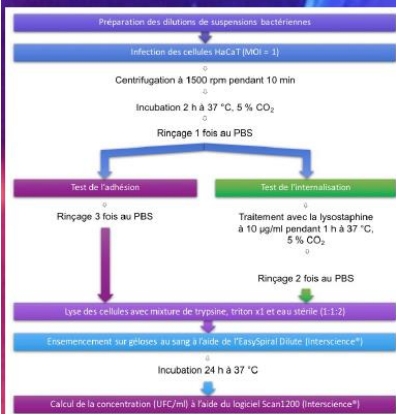


Figure 1. Schéma du protocole d'infection des cellules HaCaT par les différentes souches de *S. aureus* avec mesure de l'internalisation après traitement par lysostaphine.

### RÉSULTATS

- Adhésion similaire aux cellules HaCaT des souches non marquées (WT) et des souches transformées par le plasmide (*gfp+*) (Figure 2).
- Niveaux d'internalisation similaires entre les souches *gfp+* et les souches WT (Figure 3) → la transformation génétique n'a pas altéré le pouvoir infectieux.
- Observation en microscopie confocale (Olympus®) de la souche ATCC-29213-*gfp+* → bactéries fluorescentes en vert facilement détectables (Figure 4a) et internalisées à l'intérieur des cellules HaCaT (Figure 4 b).

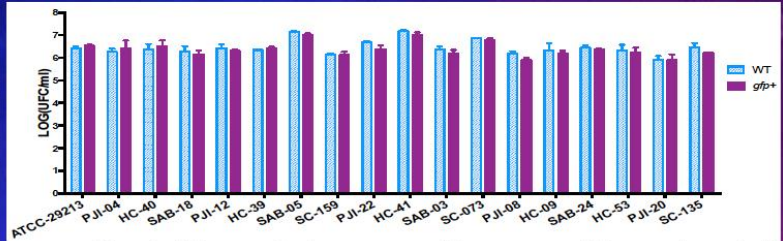


Figure 2. Adhésion des différentes souches de *S. aureus* aux cellules HaCaT. Aucune différence significative n'a été observée entre les souches WT et *gfp+* ( $p > 0,05$ ). Les résultats sont représentés en terme de moyenne  $\pm$  écart-type ( $n = 3$  essais)

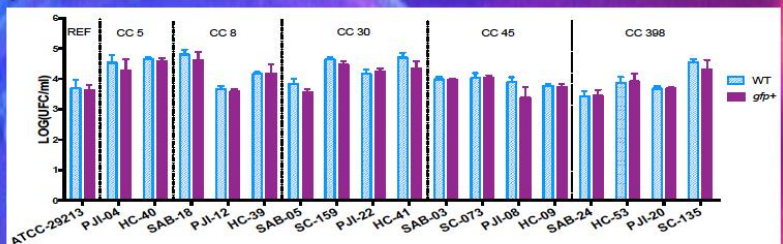


Figure 3. Internalisation des différentes souches de *S. aureus* dans les cellules HaCaT. Avec une MOI de 5 et une infection pendant 2 h, aucune différence significative n'a été observée entre les souches WT et *gfp+* ( $p > 0,05$ ). L'internalisation de la souche de référence ATCC-29213 dans les cellules HaCaT était de 3,69 LOG(UFC/ml). L'internalisation la plus importante a été observée avec la souche SAB-18, et la plus faible avec la souche PJI-12 (respectivement 4,80 et 3,58 LOG(UFC/ml)). Les résultats sont représentés en terme de moyenne  $\pm$  écart-type ( $n = 3$  essais).

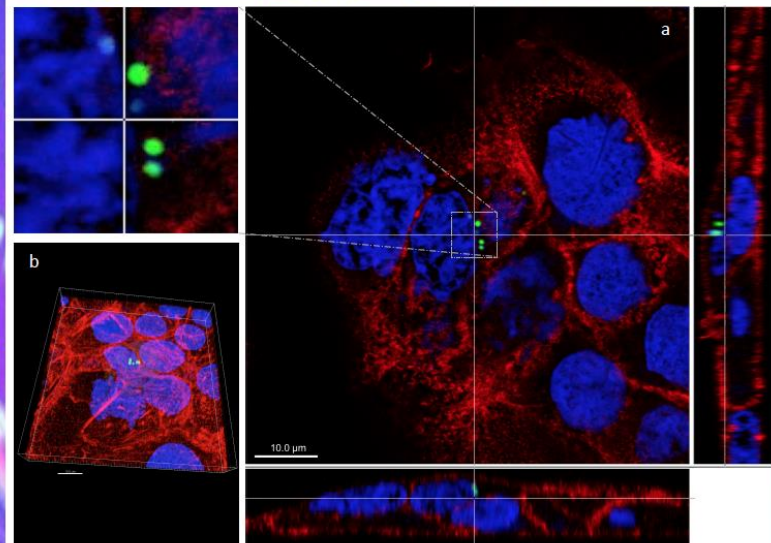


Figure 4. (a) Observation sous microscope confocal (Olympus® IX81) de l'internalisation de la souche ATCC-29213-*gfp+* dans les cellules HaCaT. (b) Modélisation 3D de l'internalisation. Vert: ATCC-29213-*gfp+*; Bleu: noyaux colorés au bromure d'éthidium; Rouge: cytosquelette d'actine marquée à la phalloïdine; Objectif x180–grossissement x1800.

### CONCLUSION

Nous avons développé un modèle *in vitro* de colonisation nasale par *S. aureus* en utilisant des cellules épithéliales de la lignée HaCaT. Ce modèle a permis de valider les capacités d'adhésion et d'internalisation de souches cliniques de *S. aureus* marquées par la *gfp* par rapport aux souches sauvages.

Nous disposons ainsi d'une collection de 18 souches fluorescentes de *S. aureus* présentant les mêmes capacités d'adhérer aux cellules et de s'y internaliser que les souches isogéniques d'origine. Ces bactéries constituent un outil original pour l'étude cinétique des infections à *S. aureus* grâce à l'expression permanente de la GFP rendant ces bactéries fluorescentes et donc faciles à suivre dans le temps par différentes techniques comme la cytométrie en flux, la microscopie confocale ou la vidéo-microscopie.

**MERCIEMENTS** Nous tenons à remercier le Dr Zhiguu HE, ingénieur au laboratoire BiiG, pour son aimable contribution lors de l'acquisition des observations en microscopie confocale.



**Rhinovirus A16 promotes *Staphylococcus aureus* internalisation in keratinocytes via upregulation of its own entry receptor**

Mohamed Fedy Morgene<sup>1</sup>\*, Elisabeth Botelho-Nevers<sup>1,2</sup>, Florence Grattard<sup>1,3</sup>, Sylvie Pillet<sup>1,3</sup>, Frédéric Laurent<sup>4,5</sup>, Bruno Pozzetto<sup>1,3</sup>, Paul-O. Verhoeven<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> GIMAP EA 3064 (Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes), University of Lyon, 42023 Saint-Etienne, France  
<sup>2</sup> Infectious Diseases Department, University Hospital of Saint-Etienne, 42055 Saint-Etienne, France  
<sup>3</sup> Laboratory of Infectious Agents and Hygiene, University Hospital of Saint-Etienne, 42055 Saint-Etienne, France  
<sup>4</sup> International Centre for Infectology Research (CIRI), INSERM, Lyon, France  
<sup>5</sup> Laboratory of Bacteriology, French National Reference Centre for Staphylococci, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

© fedymorgene@outlook.com

GIMAP EA 3064  
Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes  
SAINT-ETIENNE

### Background

In *Staphylococcus aureus* nasal carriers, rhinovirus (RV) infection increases the *S. aureus* nasal load and its spread into the environment.

Mechanisms of interaction between RV and *S. aureus* are not fully understood.

This study aimed to investigate the role of RV infection and its entry receptor, the intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), on *S. aureus* internalisation in a model of keratinocytes that mimic the squamous epithelium of the *vestibulum nasi*.

### Methods

To assess the role of RV infection, *S. aureus* strains were inoculated onto confluent HaCaT cells infected or not by RV-A16 (ATCC VR-283) with or without ICAM-1 neutralising antibody.

*S. aureus* strains tested in this model are:

- ATCC 29213
- NCTC 8325-4
- DU 5883 (NCTC 8325-4  $\Delta$ FnBPA/B)

Internalisation levels of *S. aureus* were measured by culture using the lysostaphin protection assay (Figure 1).

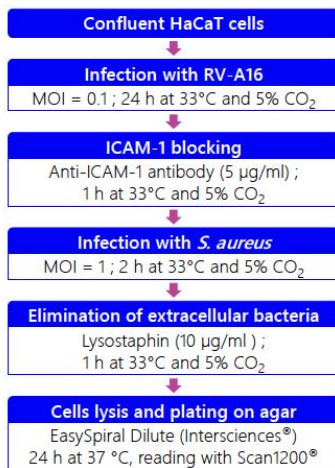


Figure 1. Flow diagram of the lysostaphin protection assay

### Results

- RV-A16 infection induced a 34-fold increase of ICAM-1 expression in HaCaT cells ( $p < 0.0001$ ) as showed by immunostaining (Figure 2).

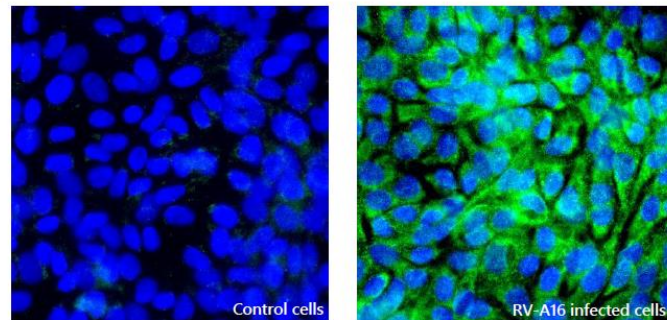


Figure 2. Epifluorescence microscopic observation of ICAM-1 expression on control and rhinovirus-infected HaCaT cells (MOI = 0.1) 24 hours post-infection. Blue: nuclei; green: ICAM-1. 600-fold magnification.

- RV-A16 infection significantly increased the internalisation of *S. aureus*.
- The incubation of RV-A16 infected HaCaT cells with anti-ICAM-1 neutralising antibody reduced significantly this effect. (Figure 3)

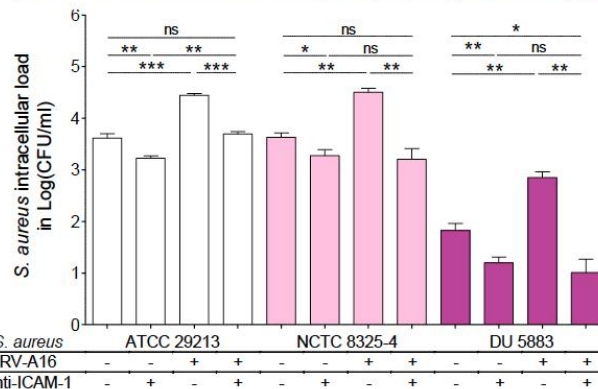


Figure 3. Internalisation of *S. aureus* strains in HaCaT cells in different RV-A16 infection and anti-ICAM-1 blocking conditions. Data are represented as mean  $\pm$  SEM (n = 6). ns: non significant; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

### Conclusion

This study demonstrates that upregulation of ICAM-1 receptor induced by RV-A16 infection increases the internalisation of *S. aureus* in a model of nasal colonisation. We also showed an increase of internalisation of *S. aureus* DU 5883 lacking fibronectin binding proteins A and B (FnBPA/B) suggesting that ICAM-1 might be an alternative pathway for *S. aureus* internalisation in keratinocytes independently of FnBPs.

Further studies are needed to evaluate the impact of RV infection on endogenous infection by *S. aureus* in *S. aureus* nasal carriers.



# Role of *Staphylococcus aureus* Extracellular Adhesive Protein and Intracellular Adhesion molecule in *S. aureus* internalization into non-professional phagocytic cells

M. Fedy Morgene<sup>1</sup>, Josselin Rigaille<sup>1,2</sup>, Florence Grattard<sup>1,3</sup>, Frédéric Laurent<sup>4,5</sup>, Philippe Berthelot<sup>1,2</sup>, Bruno Pozzetto<sup>1,3</sup>, Elisabeth Botelho-Nevers<sup>1,3</sup> and Paul O. Verhoeven<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Group on Mucosal Immunity and Pathogen Agents (GIMAP EA 3064), University Jean Monnet, Saint-Etienne, France. <sup>2</sup> Laboratory of Infectious Agents and Hygiene, University Hospital of Saint-Etienne, Saint-Etienne, France. <sup>3</sup> Infectious Diseases Department, University Hospital of Saint-Etienne, Saint-Etienne, France. <sup>4</sup> Staphylococcal Pathogenesis Team, International Centre for Infectiology Research (CIRI), INSERM U1111, Lyon, France. <sup>5</sup> Institute for Infectious Agents, French National Reference Centre for Staphylococci, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France. \* Corresponding author : paul.verhoeven@univ-st-etienne.fr

## Introduction

Extracellular Adhesive Protein (EAP) is a staphylococcal secretable molecule that was found able to increase *S. aureus* internalization inside keratinocytes (1). However, the cell receptor and the signaling pathway remain unknown. The aim of this study was to assess the role of the human cellular receptor Intracellular Adhesion molecule (ICAM)-1 and EAP in *S. aureus* internalization into non-professional phagocytic cells.

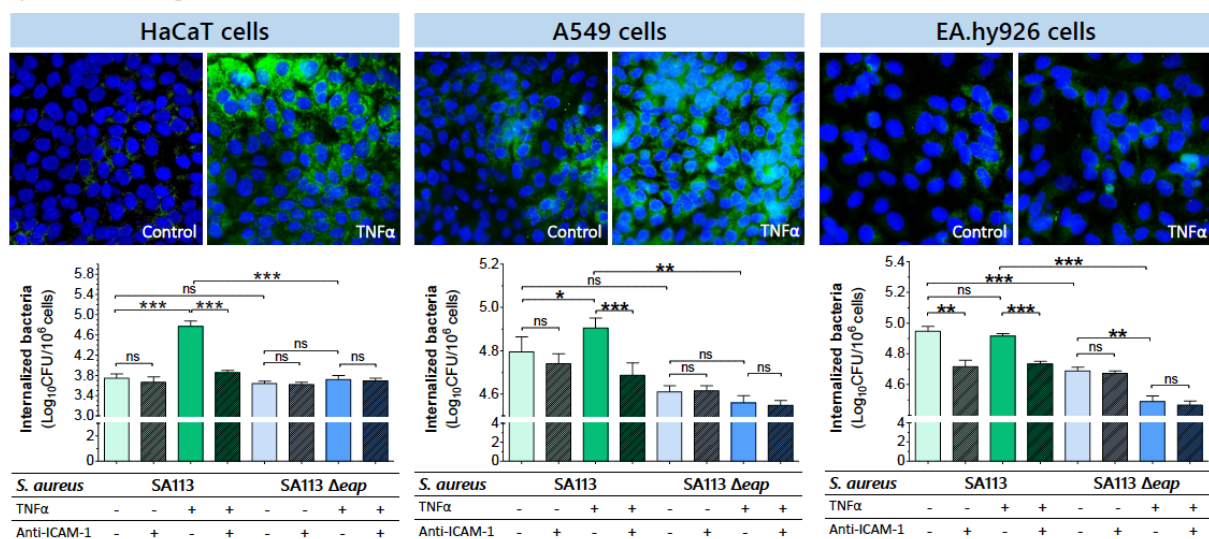
## Material and methods

Five human cell lines were used : **HaCaT** (keratinocytes), **A549** (pneumocytes), **CaCo-2** (intestinal cells), **SiHa** (cervical cells) and **EA.hy926** (endothelial cells).

Cells were treated or not with 10 ng/ml tumor necrosis factor (TNF $\alpha$ ) during 24h prior inoculation with *S. aureus* SA113 or SA113  $\Delta$ eap. Internalization levels were measured using the lysostaphin protection assay after 2 hours of incubation.

## Results

TNF $\alpha$  stimulation was found able to induce ICAM-1 overexpression in HaCaT, A549, CaCo-2 and SiHa cells ( $p < 0.01$ ) but not in EA.hy926 cells. In all cell lines, TNF $\alpha$  treatment and ICAM-1 neutralization had no effect on SA113  $\Delta$ eap internalization. TNF $\alpha$  increased SA113 internalization by 1.02 and 0.11 log(CFU/ml) in keratinocytes and pneumocytes, respectively ( $p < 0.05$ ). ICAM-1 neutralization with a blocking antibody inhibited the TNF $\alpha$ -induced *S. aureus* internalization. In endothelial cells, ICAM-1 neutralization reduced SA113 internalization by 0.23 log(CFU/ml) ( $p < 0.001$ ). No significant effects were observed in intestinal and cervical cells.



## Conclusion

EAP was found to interact with ICAM-1 to trigger *S. aureus* internalization into different human cells lines. ICAM-1 overexpression in response to TNF $\alpha$  stimulation promotes *S. aureus* internalization in keratinocytes and pneumocytes. The signaling pathways involved in this alternative mechanism of *S. aureus* internalization need to be further studied.



18<sup>th</sup> International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections 23-26 August, 2018 Copenhagen, Denmark






References: (1) Bur S et al. J Invest Dermatol. 2013;133(8):2004-12. Acknowledgements: *S. aureus* strains SA113 and SA113 $\Delta$ eap were kindly provided by Markus Bischoff



## M. Fedy MORGENE

- 29 ans
- Permis de conduire
- E-mail : fedymorgene@outlook.com

### Langues

- Français 
- Anglais 
- Arabe 
- Italien 
- Japonais 

### Informatique

- Systèmes d'exploitations Windows® et Mac®
- Internet et messagerie électronique
- Microsoft Office™
- GRAPHPAD Prism®
- ImageJ/ Fiji
- ZOTERO®

### Compétences techniques

- Cultures cellulaire, virale et bactérienne
- Biologie moléculaire
- Cytométrie en flux
- Microscopie optique, épifluorescence et confocale
- Expérimentation animale

### Compétences Personnelles

- Travailler dans / gérer une équipe
- Capacité d'apprentissage et d'adaptation
- Organisé et méthodique

## Expérience professionnelle

- 2014 – 2018 **Doctorant**, Modélisation in vitro de la colonisation nasale à *Staphylococcus aureus* ; interactions avec l'infection à rhinovirus. Groupe sur l'Immunologie des Muqueuses et Agents Pathogènes (GIMAP EA3064), *Saint-Etienne, France*
- 2017 – 2018 **Ingénieur de recherche**, Laboratoire des Agents Pathogènes et Hygiène, CHU Nord, *Saint-Etienne, France* (18 mois)
- 2017 – 2018 **Moniteur et formateur**, Bibliothèque Universitaire Santé, Faculté de Médecine Jacques Lisfranc, *Saint-Etienne, France* (9 mois)
- 2012 – 2014 **Etudiant chercheur**, Etude in vitro et in vivo de l'infection à Coxsackievirus. Laboratoire des Maladies transmissibles, Faculté de Pharmacie, *Monastir, Tunisie* (18 mois)
- 2012 **Projet de Master professionnel**, Etude de projet pour la création d'un laboratoire d'analyses agroalimentaires et des eaux (HACCP et ISO-17025), *Monastir, Tunisie* (6 mois)
- 2010 **Technicien de laboratoire**, Laboratoire de Toxicologie, CHU Fattouma Bourguiba, *Monastir, Tunisie* (6 mois)
- 2008 **Technicien de laboratoire**, Laboratoire d'Hématologie et de Biochimie, CHU Farhat Hached, *Sousse - Tunisie* (2 mois)

## Cursus universitaire

- 2014 – 2018 **Doctorat**, Biologie cellulaire et moléculaire, Ecole Doctorale Sciences Ingénierie Santé (EDSIS488), *Université de Lyon – France*
- 2011 - 2014 **Master de Recherche**, Biotechnologie et Immunologie appliquées aux maladies transmissibles, Faculté de Pharmacie, *Université de Monastir - Tunisie*
- 2010 - 2012 **Master professionnel**, Contrôle qualité et Hygiène, Institut Supérieur de Biotechnologie, *Université de Monastir - Tunisie*
- 2007 - 2010 **Licence appliquée**, Biotechnologie médicale, *Institut Supérieur de Biotechnologie, Université de Monastir - Tunisie*

## Formations et séminaires

- 2018 **Congrès National de la Société Française de Microbiologie (SFM)**, présentation orale, *Paris – France*
- 2018 **Congrès Européen de Microbiologie Clinique et Maladies Infectieuses (ECCMID)**, présentation orale, *Madrid - Espagne*
- 2018 **Retraite du Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)**, présentation poster, *Vogüé -France*
- 2017 **Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI)**, présentation orale, *Paris - France*
- 2017 **Congrès Européen de Microbiologie Clinique et Maladies Infectieuses (ECCMID)**, *Vienne- Autriche*
- 2017 **Formation en Management d'équipe**, Université Jean Monnet, *Saint-Etienne - France*
- 2017 **Analyse génomique par Partek®**, *Saint-Etienne-France*
- 2016 **Conduite et exploitation d'un autoclave**, Electronique services maintenance médicale, *Saint-Etienne – France*
- 2015 **Prévention et Secours Civiques de niveau 1**, Fédération Nationale Sapeurs-Pompiers de France, *Saint-Etienne – France*
- 2012 **Création et gestion d'entreprise**, Ministère de l'emploi et de la formation professionnelle, *Monastir – Tunisie*