



HAL
open science

Physiopathologie des infections ostéo-articulaires liées aux *Staphylococcus non-aureus*

Yousef Maali

► **To cite this version:**

Yousef Maali. Physiopathologie des infections ostéo-articulaires liées aux *Staphylococcus non-aureus*. Microbiologie et Parasitologie. Université de Lyon, 2019. Français. NNT: 2019LYSE1091 . tel-02292813

HAL Id: tel-02292813

<https://theses.hal.science/tel-02292813>

Submitted on 20 Sep 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 : 2019LYSE1091

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

Ecole Doctorale N° 341
Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation

Spécialité de doctorat : Science
Discipline : Microbiologie

Soutenue publiquement le 12/07/2019, par :

Yousef MAALI

Physiopathologie
des infections ostéo-articulaires
liées aux *Staphylococcus non-aureus*

Devant le jury composé de :

Lavigne, Jean-Philippe PU-PH Université de Montpellier - Rapporteur

Pestel-Caron, Martine PU-PH Université de Rouen Normandie - Rapporteur

Ferry, Tristan PU-PH Université Claude Bernard Lyon 1 - Examineur

Verhoeven, Paul MCU-PH Université Jean Monnet - Examineur

Haenni, Marisa Chargée de Recherches ANSES - Invitée

Laurent, Frédéric PU-PH Université Claude Bernard Lyon 1 - Directeur de thèse

Trouillet-Assant, Sophie Chargée de Recherche INSERM - Co-directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Au Professeure Martine PESTEL-CARON et au Professeur Jean-Philippe LAVIGNE, Rapporteurs :

Je vous remercie de l'honneur que vous m'avez fait en acceptant d'être rapporteur de ce travail et de participer à ce jury. Vos expériences respectives sur les pathologies infectieuses et notamment celles causées par les staphylocoques valorisent grandement le jugement de ce travail. Soyez assurés de ma sincère gratitude et de mon profond respect.

Au Docteur Paul VERHOEVEN, Examineur

J'ai été très honoré de bénéficier de votre expertise dans le domaine des interactions hôtes-pathogènes au cours de mes comités de pilotage ainsi qu'au cours des multiples échanges qui ont eu lieu au cours de ma thèse. Vous me faites encore honneur aujourd'hui d'accepter d'être examinateur de ce travail et de participer à mon jury. Je vous exprime mes plus vifs remerciements.

Au Professeur Tristan FERRY, Examineur

C'est un grand honneur pour moi de vous compter parmi les membres du jury de cette thèse. Votre expertise clinique dans le domaine des infections ostéo-articulaires valorise grandement ce projet. Merci aussi pour vos conseils et votre point de vue clinique que vous m'avez accordé tout au long de mon projet de thèse. Je souhaiterais aussi vous remercier pour votre travail d'organisation et de coordination réalisé au sein du CRIOAC Lyon. C'est en partie grâce à cette coordination que j'ai pu explorer d'autres champs d'études liés aux IOA et de prendre réellement conscience des conséquences cliniques pour le patient.

Au Docteur Marisa HAENNI, Invitée

Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de participer à ma soutenance de thèse et d'apporter votre enrichissant jugement à ce travail. Soyez assurée de ma sincère reconnaissance et de tout mon respect.

Au Professeur Frédéric LAURENT, Directeur de thèse

Frédéric, on y est, on voit la fin de cette aventure ! Merci de m'avoir donné la chance de travailler sous ta direction. J'ai été très heureux d'avoir réalisé mon M2 ainsi que ma thèse à tes côtés au sein de l'équipe, j'en garderai pleins de souvenirs en tête. Comme les fois où j'ai dû courir pour essayer de ne pas te perdre lorsque je marchais à tes côtés dans les couloirs du labo. A croire qu'on va louper un train! Et puis toutes ces formules mythiques « tu en es où » ou encore « quoi de neuf » qui peuvent tomber n'importe où n'importe quand ! Sans oublier celles qui seront le plus gravées pour moi « oublie pas les **témoins !** » et la meilleure de toutes « **Yousef, les MUTANTS !!!** ». Que des bons souvenirs ! Merci infiniment pour ton soutien, ton dynamisme, ton encadrement, tes points de vue, tes idées pertinentes et surtout pour ton humanité.

Au Docteur Sophie TROUILLET-ASSANT, Co-directrice de thèse

Sophie, je ne pourrais jamais assez te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi. Tu m'as accordé ta confiance dès le début de cette aventure. Je me souviens du jour de mon entretien pour mon stage de M2, je m'attendais à tout sauf à un test de calcul, quand j'y repense tu m'as mis la pression dès le début !!! Réaliser ce projet à tes côtés a été pour moi une aventure inoubliable, je me souviendrai de tes encouragements (« **Motivation, motivation !!!** »), de tes réactions spontanées (« **Non mais, c'est une blague !!!** »), du rapport biblio, j'ai failli y passer, de ton appel extraordinaire le jour des résultats du concours et pleins d'autres choses encore. Sophie, je te remercie sincèrement pour ta grande disponibilité, merci pour le soutien et l'encadrement que tu m'as accordé et cela même après ton départ de l'équipe. C'est une chance d'avoir travaillé sous ton encadrement, tu es sans aucun doute une chercheuse exceptionnelle.

Au Professeur François Vandenesch

Je vous remercie de m'avoir ouvert les portes de votre laboratoire. Merci pour votre aide et vos nombreux conseils accordés durant ma thèse et à l'occasion des nombreuses réunions BP2I.

A mes collègues

Je remercie chaleureusement chacun de mes chers collègues pour leurs aides, leurs conseils et leurs bonnes humeurs. J'ai eu la chance de réaliser ce projet à vos côtés, et ce, au sein d'une ambiance formidable. A **William**, mon voisin méticuleux, à quand le prochain « Doodle foot », courage pour ta thèse cher ami ! A **Jason**, pilier emblématique du labo, encore plus persistant que le biofilm ! A **Patricia**, merci pour ton écoute et tes conseils sur la vie de tous les jours. Merci de m'avoir initié à la bio-informatique (j'ai failli y perdre mes yeux sur le logiciel Chromas !!!). A la nouvelle maman **Virginie**, merci pour ton sourire et ta gentillesse. Je ne me fais pas de soucis pour la suite, tu as un mental d'acier. Courage pour ta nouvelle vie et surtout profitez un max du petit Estéban. A **Andrea**, bon courage pour ton EPHE et j'en suis sûr pour la thèse qui suivra, tu as l'âme d'une chercheuse. A **Marine Bergot**, merci pour les stats et pour toutes tes montées en puissance qu'on apprécie et qui nous font bien marrer !!! A **Allison**, merci pour ton dynamisme et ta motivation. A **Alan**, de la mafia toulousaine. Merci pour ton smile et pour le partage de ton expertise avisée en biologie moléculaire (Aller, on y croit, on croise les doigts encore une fois). A **Jérôme**, merci pour tes conseils et ton aide. Bonne continuation pour la suite. A **Lélia**, tu penseras à apporter du café !! A **Marine Butin**, merci pour tes conseils et ta gentillesse. Très bonne continuation sur le projet capitis, tu finiras bien par savoir où il se cache ce vilain !! (♪ *Ou t'es capitis'outai ? Ou t'es capitis'outai ?* ♪). A **Florent**, merci pour ton implication et ton aide, et ce, dès le début du projet. A **Cédric**, merci pour ta disponibilité et pour l'aide précieuse que tu m'as accordé. A **Elisabeth**, merci de m'avoir initié aux techniques de quantifications protéiques. A **Yvonne**, merci pour le partage de ton savoir-faire en biologie moléculaire. Merci également à tous les autres membres de l'équipe : Camille(s), Marie, Paul, Laura, Sylvère, Claude-Alexandre, Anaïs, Céline, Florence, Karen, Gérard, Jean-Philippe, Jessica, Christophe et ceux que j'oublie involontairement...

Ce travail n'aurait bien sûr pas pu être celui-là sans l'aide des stagiaires et techniciens qui m'ont aidé ces dernières années. A **Alice**, merci pour ton aide précieuse pour les biomat et aussi pour les autres projets. Un grand merci aussi à **Laëtitia**, à **Pierre-Antoine** et à **Roxane** qui m'ont aidé à réaliser ce travail. En dehors des manip n=40 souches, j'espère que vous garderez un bon

souvenir de votre passage...!!! Aux derniers arrivés, **Aubin, Clerc, Damien, Marie, Mathieu, Pauline**, et **Pierre** qui apportent du sourire et de la sympathie au quotidien dans le labo.

Aux techniciennes du CNR des staphylocoques, sans qui ce travail n'aurait pas été possible. Un merci particulier à **Michèle**, pour ces explications et son avis d'experte en phylogénie des staphylocoques.

A tous les membres du département pédagogique des sciences biomédicales de l'ISPB

Merci à **Anne, Florence, Nathalie, Emilie, Ghislaine, Samira** et **Veronica** de m'avoir si bien accueilli au sein de votre équipe pédagogique. C'est à vos côtés que j'ai pu découvrir avec passion les bases de l'enseignement au cours de mon ACE.

A mes collègues du département de biologie de l'ENS de Lyon

Je remercie également toute l'équipe pédagogique du département de biologie de l'ENS. Merci à Jean-Nicolas, à Nathalie Alazard-Dany, à Nathalie Davoust-Nataf, à Chloé, à Renaud et à Florence pour votre accueil chaleureux et pour la confiance que vous m'avez accordée tout au long de cette année ATER. Un grand merci également à mes collègues doctorants : Carole, Sébastien, Juliana et Amaury pour leur aide et leur sympathie apportée au cours de cette aventure.

A mes amis

Un grand merci à chacun d'entre vous pour le soutien, les encouragements et pour tous les moments de détente passés avec vous ! Désolé pour toutes les fois où je vous ai froissés les oreilles avec mes histoires de staphylocoques, d'infections et tout ça !!! **Amavet** (la parole sage vasy vasy), **Haik** (oublie pas la règle des 5), **Kamel** (milieu gauche de choc), **Medave** (sauterelle ou bâton de berger), **Nagoire** (reviens !!), **Lucas** (tu m'as perdu !), **Gigs** (ma valise !!), **Anes** (pas besoin mettre de mots, tu sais), **Hakan** (va falloir se mettre au sport), **Clém, Achraf, Mosbah, Bilel, Mathieu** et à tous les autres de la team **Beling**.

A ma famille

A mes parents, mille mercis à vous pour votre soutien et pour votre amour infini. Je n'ai jamais manqué de rien dans tous mes projets et vous m'avez toujours poussé vers le haut. Je ne pourrai jamais assez-vous remercier, je vous exprime, ici, toute ma reconnaissance et tout mon amour. Merci à **Lassaad** (tu es mon exemple frangin), **Yacine** (merci pour ta sagesse), **Wided** (je t'aime frangine), **Farouk** (merci professeur pour ta science) , **Besma** et **Samira** (le duo infernal), **Belkac** (merci pour les aventures hors du commun en VTT, j'en ai encore des cicatrices !!!), **Amina** (merci pour les révisions, je n'oublie pas) et à **Aicha** (ma petite sœur chérie, je serais toujours là pour toi, je t'aime !!!). Merci à mes neveux et nièces que j'aime énormément. Merci à ma grand-mère, à mes oncles et tantes et à tous les autres. Je vous aime tous !!!

A ma femme Delviana, c'est tellement agréable de se comprendre entre microbiologistes. Merci pour ton soutien et pour tout ton amour. Ca n'aurait pas été possible sans toi... Je t'aime !

A Emna, ma petite fille chérie. Tu es arrivé au meilleur moment, tu me donnes l'énergie qu'il me faut pour aller jusqu'au bout des choses. Je te porterais aussi haut que les cieux ma princesse.

RESUME

Les infections ostéo-articulaires (IOA) regroupent plusieurs entités cliniques hétérogènes ayant en commun l'invasion et la destruction progressive des tissus osseux et cartilagineux par un ou plusieurs micro-organismes. Le genre *Staphylococcus*, impliqué dans plus de 65% des IOA, représente la première étiologie dans ces infections particulièrement sévères et difficiles à traiter. Les *Staphylococcus non-aureus* (SNA) incluant des espèces tels que *Staphylococcus epidermidis* sont responsables de près de 40% de certaines formes cliniques notamment les IOA sur matériels. Contrairement à *S. aureus*, pour lequel les mécanismes physiopathologiques incluent : (i) la capacité d'internalisation dans les cellules de l'hôte et (ii) la formation de biofilm, peu de données sont disponibles concernant ceux impliqués dans les IOA dues aux SNA. Dans ce contexte, mon travail de doctorat s'est attaché à caractériser les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la genèse des IOA causées par différentes espèces de SNA.

A l'aide d'une approche *in silico* puis *in vitro* conduite dans un modèle d'invasion d'ostéoblastes humains, nos travaux ont mis en évidence une capacité d'internalisation et de persistance dans les cellules osseuses pour seulement deux espèces (*S. pseudintermedius* et *S. delphini*) sur les 17 testées. De façon similaire à *S. aureus*, le processus d'invasion cellulaire pour ces espèces fait intervenir une liaison tripartite entre les adhésines bactériennes liant la fibronectine (FnBPs), la fibronectine de la matrice extracellulaire et l'intégrine cellulaire $\alpha_5\beta_1$. Un autre point essentiel de ce travail est la mise en évidence du phénotype hautement cytotoxique de l'espèce *S. pseudintermedius* après internalisation dans les cellules hôtes. Nous démontrons ici que cette cytotoxicité est, au moins en partie, médiée par une action combinée de (i) la leucocidine Luk-I (toxine homologue de la leucocidine Pantone-Valentine de *S. aureus*) qui cible spécifiquement les cellules immunitaires exprimant le récepteur CXCR2 (récepteur 2 à l'interleukine 8) et (ii) les phénol-soluble modulins (PSMs) qui perturbent les membranes des cellules immunes et non immunes.

Sachant que les SNA sont les agents infectieux les plus incriminés dans les IOA sur matériel, une technique d'étude du biofilm sur biomatériaux orthopédiques (acier inoxydable, titane et polyéthylène) a été mise au point pour étudier le biofilm mature formé par les six espèces SNA les plus prévalentes dans les IOA (*S. epidermidis*, *S. lugdunensis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. caprae*, *S. capitis*). A l'exception de *S. epidermidis* qui forme plus de biofilm sur le polyéthylène, constituant placé à l'interface des pièces métalliques et/ou des os dans les prothèses orthopédiques, aucune différence significative n'a été observée entre les trois biomatériaux orthopédiques pour l'ensemble des espèces de SNA testées. Néanmoins, nos observations indiquent une forte hétérogénéité au sein des SNA en matière de capacité à former un biofilm mature. Les espèces telles que *S. capitis* et *S. lugdunensis* se distinguent significativement de *S. haemolyticus* et *S. warneri* par leurs aptitude à former plus de biofilm.

La grande diversité des phénotypes observés vis-à-vis des mécanismes physiopathologiques impliqués lors des IOA par les différentes espèces de SNA testées démontre qu'il ne faut pas considérer les SNA comme une entité clinique unique. L'amélioration des connaissances apportées au cours de ce travail devraient contribuer à l'optimisation de la prise en charge chirurgicale, médicale, et thérapeutique des patients.

Mots clés: *Staphylococcus*, internalisation, cytotoxicité, fibronectine, biofilm, biomatériaux.

SUMMARY

Bone and joint infections (BJI) include several heterogeneous clinical entities that share the invasion and the progressive destruction of bone and cartilage tissue by one or more microorganisms. The genus *Staphylococcus*, involved in over 65% of the BJI, represents the first etiology in these particularly severe and difficult-to-treat infections. *Staphylococcus non-aureus* (SNA), including species such as *Staphylococcus epidermidis*, are responsible for nearly 40% of some clinical forms, including device-associated BJI. In contrast to *S. aureus*, for which pathophysiological mechanisms include (i) internalization capacity in host cells and (ii) biofilm formation, few data are available regarding those involved in BJIs due to SNA. In this context, my PhD work focused on characterizing the pathophysiological mechanisms involved in the genesis of BJI caused by different SNA species.

Using an *in silico* together with an *in vitro* approach conducted in a human osteoblast invasion model, our work revealed an ability to internalize and persist in bone cells for only two species of SNA out of the 17 tested. Indeed, we have been able to demonstrate that only *S. pseudintermedius* and *S. delphini* have the ability to invade the cytoplasmic compartment of the host cells. Similar to *S. aureus*, the cellular invasion process for these species involves a tripartite association between bacterial adhesins fibronectin-binding proteins (FnBPs), fibronectin of the extracellular matrix, and $\alpha_5\beta_1$ cell integrin. Another key point of this work is the demonstration of the highly cytotoxic phenotype of the *S. pseudintermedius* species after internalization in the host cells. We demonstrate here that this cytotoxicity is, at least in part, mediated by a combined action of (i) the Leukocidin Luk-I (homologous to *S. aureus* Pantón-Valentine Leukocidin) that specifically targets immune cells expressing the CXC chemokine receptor 2 (CXCR2) with (ii) phenol-soluble modulins (PSMs) that disrupt the membranes of immune and non-immune cells.

Knowing that SNA are the most incriminated infectious agents in device-associated BJI, a technique for studying biofilm on orthopedic biomaterials (stainless steel, titanium and polyethylene) has been developed to study the mature biofilm formed by the six SNA species with the highest prevalence in BJI (*S. epidermidis*, *S. lugdunensis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. caprae*, *S. capitis*). With the exception of *S. epidermidis*, which forms more biofilm on polyethylene (constituting at the interface of metal parts and / or bone in orthopedic prostheses), no significant difference was observed between the three orthopedic biomaterials for all the SNA species tested.

The great diversity of phenotypes observed with respect to the pathophysiological mechanisms involved in BJI by the different SNA species tested demonstrates that SNA should not be considered as a single clinical entity. Improved knowledge provided during this work should contribute to the optimization of the surgical management, medical and therapeutic patient.

Key words: *Staphylococcus*, internalization, cytotoxicity, fibronectin, biofilm, biomaterial.

LABORATOIRE DE RATTACHEMENT

Cette thèse a été préparée au sein du Centre International de Recherche en Infectiologie - INSERM U1111 - CNRS UMR5308 - ENS Lyon – Université Lyon 1, équipe "Pathogénie des staphylocoques"

Adresse postale du laboratoire :

CIRI – INSERMU1111
Faculté de Médecine Lyon-Est
7, rue Guillaume Paradin
69372 LYON CEDEX 8 – France

SOMMAIRE

LISTE DES ABBREVIATIONS	15
INTRODUCTION GENERALE	18
TRAVAIL BIBLIOGRAPHIQUE	21
I. LES STAPHYLOCOQUES	22
A. Caractéristique générale	22
1. Un peu d'histoire...	22
2. Caractères bactériologiques	23
3. Habitat et transmission	24
B. Taxonomie et Classification	26
1. Nomenclature.....	26
2. Le genre <i>Staphylococcus</i>	27
C. Les infections liées aux différentes espèces de staphylocoques	31
1. Les toxi-infections.....	32
2. Les infections suppuratives	40
3. Potentiel épidémique des staphylocoques	43
II. LES INFECTIONS OSTEO-ARTICULAIRES	46
A. Généralités	46
B. Classification.....	47
1. Mécanismes de contamination	47
2. Localisations anatomiques	50
3. Classification selon le matériel orthopédique.....	54
4. Classification selon la durée d'évolution entre signes cliniques et prise en charge	55
C. Epidémiologie	57
1. Données démographiques	57
2. Mortalité - Morbidité	58
3. Données économiques	59
4. Etiologie bactérienne	60
III. INTERACTION HOTE-PATHOGENE AU SEIN DES IOA STAPHYLOCOCCIQUES	62
A. La colonisation.....	62

1. Un facteur de risque majeur	62
2. Résistances aux pressions physico-chimiques et immunologiques	65
3. Adhésion aux tissus de l'hôte	70
B. Internalisation et persistance.....	74
C. Les mécanismes toxiniques	79
D. Le biofilm chez les staphylocoques	85
1. Aspects généraux	85
2. Etapes de formation du biofilm.....	86
3. Impact du biofilm dans la genèse des IOA	91
TRAVAIL PERSONNEL.....	96
INTRODUCTION	97
PREMIERE PUBLICATION: Pathophysiological mechanisms of <i>Staphylococcus non-aureus</i> Bone and Joint Infection: interspecies homogeneity and specific behavior of <i>S. pseudintermedius</i>	100
DEUXIEME PUBLICATION: Understanding the virulence of <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> : a major role of Pore-Forming Toxins	111
TROISIEME PUBLICATION: Identification and characterization of <i>Staphylococcus delphini</i> internalization pathway in non-professional phagocytic cells	124
QUATRIEME PUBLICATION: Impact of biomaterial on coagulase-negative staphylococci (CoNS) biofilm.....	158
CINQUIEME PUBLICATION (Revue): Interaction between biofilm and bone: How the presence of biofilm promotes prosthesis loosening?	170
DISCUSSION – PERSPECTIVES	199
A. Interaction ostéoblastes - <i>Staphylococcus non-aureus</i>	200
B. Rôle majeur des « pore forming toxins » dans la cytotoxicité	202
C. Biofilm hétérogène au sein des SNA	204
D. Autres mécanismes physiopathologiques.....	206
ANNEXES.....	209
Annexe 1: Adhésion au collagène de type I des <i>Staphylococcus non-aureus</i>	210
Annexe 2: High intraspecific genetic diversity of <i>Nocardia brasiliensis</i> , a pathogen responsible for cutaneous nocardiosis found in France: phylogenetic relationships by using <i>sod</i> and <i>hsp65</i> Genes.	211
Annexe 3 : Liste des communications orales et affichées en congrès nationaux et internationaux	223
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	225

LISTE DES ABBREVIATIONS

Aae	Autolysin/adhesin E
Aas	Autolysin/adhesin S
ADN	Acide Désoxyribonucléique
<i>agr</i>	<i>accessory gene regulator</i>
ARNr	Acide Ribonucléique ribosomique
Atl	Autolysine
Bhp	Biofilm-associated homolog protein
CCE	Cage Cervicale Elastique
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CMEB	Concentration Minimale d'Eradication du Biofilm
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CRIOAc	Centre de Référence des Infections Ostéo-Articulaires complexes
CWA	Cell Wall Anchored
DnaJ	Protéine chaperone J
Embp	Extracellular matrix binding protein
ETA	Exfoliative Toxin A
ETB	Exfoliative Toxin B
Sdr	Serine–aspartate repeats protein
Fbl	Fibrinogen binding protein from <i>Staphylococcus lugdunensis</i>
Fn	Fibronectine
FPR2	N-formyl peptide receptor 2
GehD	Glycerol ester hydrolase D
<i>hld</i>	delta-hemolysin
<i>ica</i>	intercellular adhesion gene
IMOA	Infection sur Matériel Ostéo-Articulaire
IOA	Infection Ostéo-Articulaire
IOAc	IOA complexe

IPA	Infection de Prothèse Articulaires
LPV	Leucocidine de Panton-Valentine
Luk	Leucocidine
MSCRAMMs	Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules
FnBPs	Fibronectin binding proteins
PAMs	Peptides Antimicrobiens
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFTs	Pore Forming Toxins
PIA	Polysaccharide Intercellular Adhesin
PMN	Poly-Morphonuclear Neutrophils
PMSI	Programme Médicalisé des Systèmes d'Information
PSMs	Phenol-Soluble Modulins
PTG	Prothèse Totale de Genou
PTH	Prothèse Totale de Hanche
SSSS	Staphylococcal Scalded Skin Syndrome
Ti	Titane
TIA	Toxi-Infections Alimentaires
TSS	Toxic Shock Syndrome
TSST-1	Toxic Shock Syndrome Toxin 1
<i>tuf</i>	<i>elongation factor Tu</i>
UafB	Uroadherence factor B
UHMPE	Ultra-high-molecular-weight polyethylene
SE	Staphylococcal Enterotoxin
SNA	<i>Staphylococcus non-aureus</i>
Sps	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> surface proteins
SCoN	Staphylocoques à Coagulase-Négative
SCoP	Staphylocoques à Coagulase-Positive
SrtA	Sortase A
rpoB	<i>RNA polymerase beta-subunit gene</i>

INTRODUCTION GENERALE

Les infections ostéo-articulaires (IOA) regroupent un ensemble d'entités cliniques ayant en commun l'invasion et la destruction progressive des tissus osseux et cartilagineux par des agents microbiens, le plus souvent des bactéries (1-4). Atteignant plus de 70 patients pour 100 000 habitants par an en France, elles sont associées à un risque d'échec thérapeutique élevé, à un taux de mortalité de près de 5%, mais surtout à une morbidité importante responsable de séquelles fonctionnelles dans près de 30% des cas (5, 6). De plus, ces infections nécessitent une prise en charge médico-chirurgicale longue et coûteuse (50 000 à 150 000 € par épisode) (7, 8). Elles constituent ainsi un enjeu majeur de santé publique, aussi bien en termes médical, économique qu'individuel et sociétal, ce qui a motivé la création en 2008 de 9 centres interrégionaux de référence pour la prise en charge des IOA complexes (CRIOAc), incluant le CRIOAc de la Région Rhône-Alpes Auvergne coordonné par les Hospices Civils de Lyon (HCL). Ces structures permettent de répondre à la nécessité d'une meilleure prise en charge globale des patients mais aussi de faciliter la recherche clinique et fondamentale dans ce domaine, afin d'améliorer la qualité de prise en charge des personnes concernées.

Le genre *Staphylococcus*, impliqué dans plus de 65% des IOA, représente la première étiologie des IOA (8). Si parmi les staphylocoques, l'espèce *Staphylococcus aureus* est à elle seule responsable d'un nombre important d'IOA, les autres espèces du genre *Staphylococcus*, que l'on peut regrouper sous le terme générique de *Staphylococcus non-aureus* (SNA) sont les principaux agents pathogènes retrouvés dans les formes nosocomiales et plus spécifiquement dans les IOA chroniques sur matériel (8-10). Dans certaines séries cliniques, les SNA incluant notamment des espèces telle que *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis* ou *Staphylococcus capitis* sont responsables de près de 40% des IOA sur prothèses orthopédiques (11). Contrairement à *S. aureus*, peu de données sont disponibles concernant les mécanismes impliqués dans les IOA à SNA. Dans ce contexte, il est apparu capital de mieux comprendre la physiopathologie des IOA dues aux différentes espèces de SNA afin d'adapter au mieux la prise en charge des patients et de définir, à long terme, de nouvelles cibles thérapeutiques.

Au cours de l'introduction bibliographique de ce manuscrit, nous présenterons le genre *Staphylococcus*, nous mettrons l'accent sur la classification taxonomique des différentes

espèces avant de discuter des infections liées aux staphylocoques. Nous décrivons ensuite les IOA en portant notre attention sur le classement de ces pathologies hétérogènes et sur leurs caractéristiques épidémiologiques associées. Enfin, nous décrivons les différents mécanismes de virulence et/ou facteurs contribuant à la mise en place de ces infections. Ces facteurs sont représentés par : (i) la colonisation qui se présente comme un facteur de risque majeur dans la survenue des IOA, (ii) l'internalisation et la persistance des staphylocoques au sein des cellules non professionnelles phagocytaires, et notamment des ostéoblastes, (iii) la sécrétion de toxines responsables de la sévérité des IOA et (iv) la formation de biofilm permettant d'implanter, de promouvoir, de structurer et de réguler la survie bactérienne dans un environnement hostile.

Cette introduction bibliographique ne traite pas uniquement des SNA, nous avons porté notre description bibliographique sur l'ensemble du genre *Staphylococcus*, incluant l'espèce *S. aureus*. Cette approche comparative entre les SNA et *S. aureus* confère l'avantage de dresser les points communs et les différences entre ces deux entités mais permet surtout de mettre en lumière les questions sans réponse concernant les SNA, beaucoup moins étudiés que *S. aureus*.

Nous présenterons ensuite les résultats de nos travaux personnels qui ont portés sur l'étude de l'internalisation, de la persistance et de la cytotoxicité de certains SNA au sein des ostéoblastes et sur l'étude des mécanismes impliqués dans la sévérité des infections staphylococciques. Nous présenterons également les résultats ayant porté sur l'étude de la formation du biofilm des SNA sur divers biomatériaux utilisés en chirurgie orthopédique.

Nous concluons sur les implications et les perspectives de nos travaux dans la compréhension de la physiopathologie des IOA staphylococciques, ainsi que dans la prise en charge thérapeutique des patients.

TRAVAIL BIBLIOGRAPHIQUE

I. LES STAPHYLOCOQUES

A. Caractéristique générale

1. Un peu d'histoire...

Le Staphylocoque fut découvert par Louis Pasteur en 1880 : l'observation au microscope d'un pus de furoncle faisait apparaître des « amas de grains ». En 1881, un chirurgien écossais du nom d'Alexander Ogston isola de son côté la bactérie à partir d'un abcès post-opératoire et reproduisit l'infection chez l'animal (Figure 1). La forme de ces amas fut à l'origine du nom donné à ces bactéries en associant les mots grecs "*Staphyle*", qui signifie "grappe de raisin", et "*Kokkos*", qui signifie "graine" (12).



Figure 1. Dessin d'observation de cocci regroupés en amas à partir d'un abcès, réalisé par Alexander Ogston en 1881. D'après (12).

2. Caractères bactériologiques

Les staphylocoques sont des bactéries en cocci à coloration de Gram positive d'environ 1 μm de diamètre, asporulées, immobiles, aéro-anaérobie facultatives, et habituellement organisées en amas ou en paires à l'examen microscopique (Figure 2).

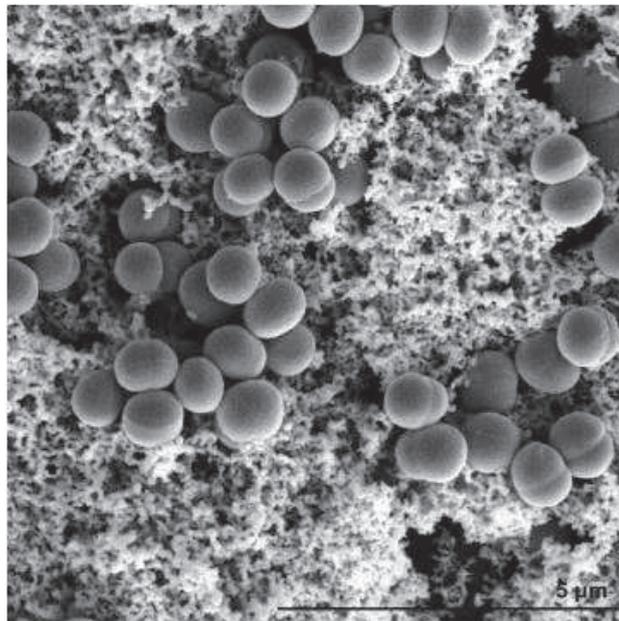


Figure 2. Photographie au microscope électronique à balayage (MEB) de *Staphylococcus epidermidis* cultivé sur un substrat de verre. (Echelle - 5 μm). D'après (13).

Ces bactéries peuvent croître dans une fourchette de température comprise entre 10-45°C avec une température optimale de croissance de 30 à 37°C. Les staphylocoques sont halotolérants et peuvent donc croître sur milieu contenant 1 à 15% de NaCl. Ils sont particulièrement osmotolérants, et peuvent se développer sur des environnements à faible activité de l'eau α_w (de l'ordre de 0.85), ce qui leur confère une forte résistance à la dessiccation. L'activité métabolique des staphylocoques est importante avec la production d'un large panel d'enzymes capables de métaboliser de nombreux substrats. Plusieurs études ont permis de dresser des profils métaboliques pour chacune des espèces, certaines caractéristiques biochimiques étant

communes : (i) la présence d'une catalase permettant de décomposer le peroxyde d'hydrogène, (ii) une absence d'oxydase (à l'exception de l'espèce *Staphylococcus sciuri*) et (iii) une capacité à fermenter de nombreux sucres, dont le glucose et le lactose.

3. Habitat et transmission

Le principal réservoir des staphylocoques est l'Homme et les animaux à sang chaud tels que les ovins, bovins, caprins et canidés. Adaptés à l'écosystème cutané, les staphylocoques jouent un rôle important dans l'équilibre physico-chimique de la peau et constitue une barrière contre les bactéries de la flore transitoire. Adaptées à l'hôte et même co-évoluées, les espèces staphylococciques diffèrent sensiblement chez l'Homme et chez l'Animal. Ainsi, l'Homme héberge majoritairement des espèces comme *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* (14-16), les chèvres hébergent plutôt *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus caprae* et *Staphylococcus simulans* alors que les chiens sont plutôt porteurs de *Staphylococcus pseudintermedius* (17, 18). Chez l'Homme, les analyses métagénomiques ont révélé que les staphylocoques sont les organismes les plus abondants dans les zones humides, ce qui vient confirmer les données obtenues en culture qui montrent également une préférence des staphylocoques dans les environnements à forte humidité (19, 20). Ces environnements humides incluent le nombril, la voûte axillaire, le pli inguinal, le pli fessier, la plante du pied, la fosse poplitée et la fosse antécubitale (Figure 3) (21, 22).

Les staphylocoques occupent une niche aérobie sur la peau et utilisent probablement l'urée présente dans la sueur comme source d'azote. Une étude ayant porté sur le portage nasal des staphylocoques des patients hospitalisés en service de chirurgie orthopédique et intensive (n= 635) a montré la distribution suivante : *S. epidermidis* (64.1%), suivi de *S. aureus* (13,4%), *S. haemolyticus* (10,1%) , *S. capitis* (3%) , *S. warneri* (3%), *S. hominis* (2.4%), *S. lugdunensis* (1.6%) (23). Toutefois, la distribution des différentes espèces sur le corps de l'Homme dépend fortement du microenvironnement du site échantillonné (22). Du fait de leur forte résistance à la dessiccation, la transmission inter-humaine des staphylocoques se fait par contact direct

(essentiellement par transmission manuportée) mais aussi plus rarement par l'intermédiaire des objets ou des aliments (24).

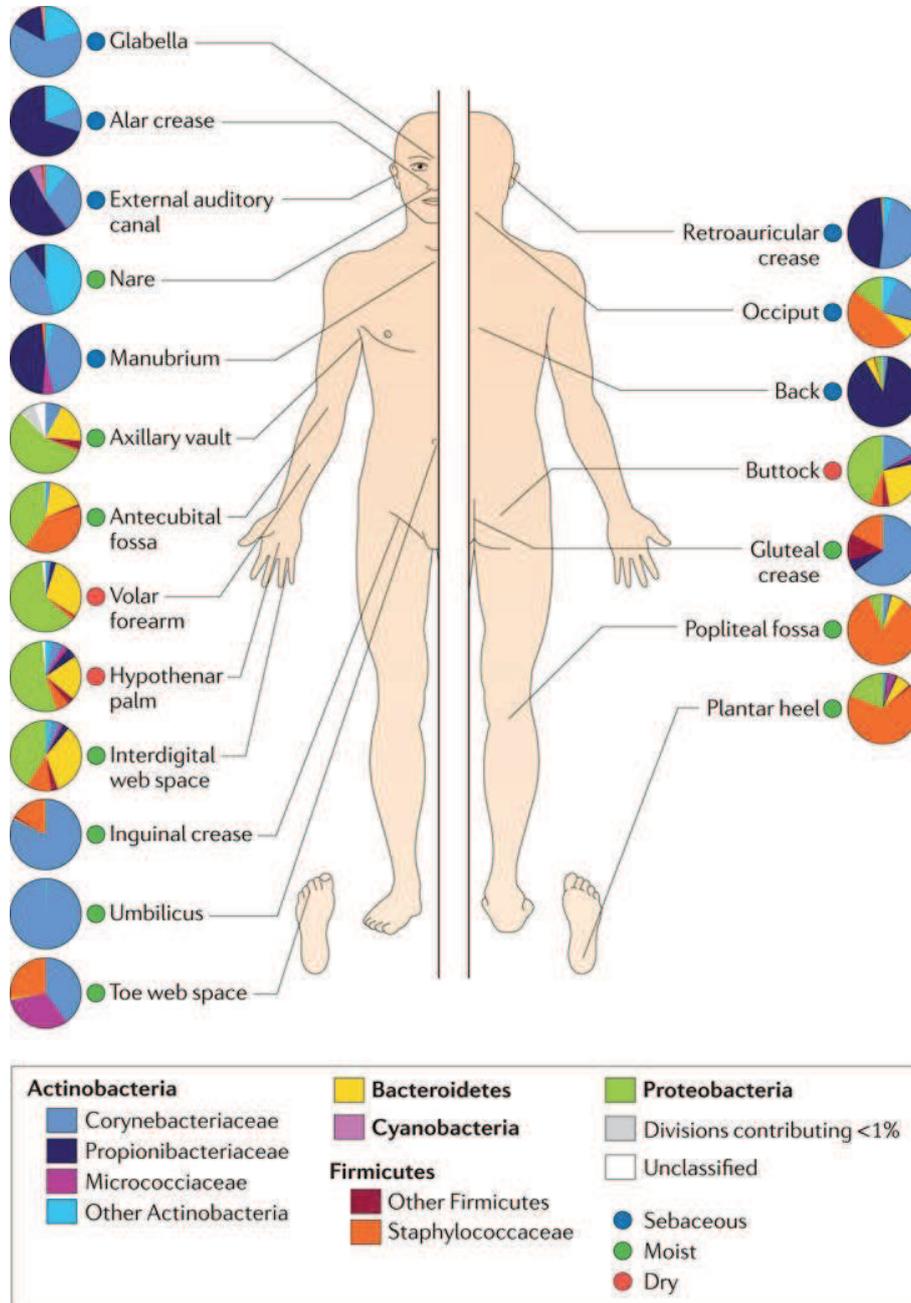


Figure 3. Représentation de la distribution topographique des bactéries sur les sites cutanés. Les sites sélectionnés sont les zones sébacées (cercles bleus), les zones humides (cercles verts) et les zones sèches (cercles rouges). D'après (21).

B. Taxonomie et Classification

1. Nomenclature

Au sein du genre *Staphylococcus*, *Staphylococcus aureus* est sans nul doute l'espèce la plus étudiée. Elle présente la caractéristique phénotypique de produire un pigment, la staphyloxanthine qui est à l'origine de la coloration jaune d'or des colonies sur milieu gélosé. Cette couleur est à l'origine de son nom d'espèce "*aureus*" (25). Les autres espèces du genre *Staphylococcus* sont regroupées sous le terme générique *Staphylococcus non-aureus* (SNA) aussi appelés familièrement staphylocoques blancs. Les SNA forment généralement des colonies non pigmentées de couleur blanche. Fréquemment, le nom donné à chacune des espèces a pour origine l'habitat privilégié de ces espèces ou la niche écologique ayant conduit à son premier isolement. Certains exemples l'illustrent particulièrement : *S. epidermidis* est retrouvé principalement sur l'épiderme, *S. capitis* qui fait partie de la flore du cuir chevelu humain, ou encore *S. auricularis* isolé pour la première fois à partir d'un prélèvement auriculaire. Les staphylocoques sont également classés sur des bases biochimiques : notamment sur la présence d'une enzyme, la coagulase libre (Staphylocoagulase), permettant de faire coaguler le plasma sanguin par transformation du fibrinogène soluble dans le plasma en fibrine solide. Ainsi, on distingue le groupe des staphylocoques à coagulase-positif (SCoP) regroupant les espèces comme *S. aureus* ou *S. pseudintermedius* du groupe des staphylocoques à coagulase-négatif (SCoN) incluant les espèces comme *S. epidermidis*, *S. capitis* ou *S. lugdunensis*. Il faut noter que bien souvent, par abus de langage, le terme SCoN est utilisé par erreur pour traiter de toutes les espèces en dehors de *S. aureus* bien que cette espèce ne soit pas la seule à présenter une activité coagulase libre.

2. Le genre *Staphylococcus*

Les staphylocoques appartiennent à la division des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Bacillales* dans la famille des *Staphylococcaceae*. Le genre *Staphylococcus* regroupent actuellement 51 espèces et 24 sous-espèces. La définition d'une espèce bactérienne n'a pas toujours fait l'unanimité au sein des différentes disciplines de la microbiologie (taxonomie, écologie et évolution) et est toujours en perpétuel remaniement. En taxonomie, les premières descriptions d'espèces bactériennes ont été faites uniquement sur la base de traits phénotypiques qui ont conduit à des classifications floues. Par la suite, la description des espèces a été basée principalement sur des traits génomiques tels que le pourcentage de génomes en bases GC et l'hybridation ADN-ADN. Un rapport de corrélation ADN-ADN supérieur ou égal à 70% et une stabilité thermique des hybrides (ΔT_m) inférieure ou égale à 5°C ont été considérés comme un «Gold standard» pour circonscrire les espèces (26). À l'heure actuelle, il est généralement admis que les descriptions d'espèces à des fins taxonomiques doivent être fondées sur un large éventail de paramètres garantissant la compréhension de leur unicité. Cette approche, appelée «approche polyphasique», vise à obtenir une classification consensuelle en intégrant différents types de données dans une classification de contradictions minimales (27). Pour une classification précise d'une espèce, deux grands principes doivent être remplis : (i) la cohérence phénotypique et (ii) la cohérence génomique (28).

Les critères phénotypiques, incluent la coloration de Gram, la morphologie des bactéries et celle des colonies, la mobilité et les résultats de tests conventionnels tel que la production de pigments, les exigences de croissance, l'activité fermentative et oxydante des sucres, la sensibilité à la novobiocine et diverses activités enzymatiques. Les critères génotypiques comprennent le contenu en GC de l'ADN (% GC), le pourcentage de similarité du core génome avec les espèces les plus proches et l'étude des relations de parenté entre les différentes espèces, c'est-à-dire la phylogénie, basée sur les gènes de ménage conservés (29, 30). Comme la plupart des espèces bactériennes, l'analyse des séquences du gène de l'ARNr 16S est la méthode la plus couramment utilisée pour étudier la phylogénie au sein des staphylocoques (31-33). Toutefois, l'efficacité de cette méthode basée sur le gène codant l'ARNr 16S reste

limitée en raison de l'impossibilité de discriminer les espèces très proches comme *Staphylococcus lentus* et *Staphylococcus sciuri* (34-36). D'autres méthodes d'étude de la phylogénie des staphylocoques ont été proposées afin de présenter un pouvoir discriminant plus important entre les différentes espèces. Celles-ci reposent sur le séquençage de gènes de ménage supplémentaires, notamment le gène *hsp60*, le gène *sodA*, le gène *rpoB* et le gène *tuf* (37-41). Ces méthodes phylogénétiques offrent une meilleure résolution taxonomique entre espèces étroitement apparentées, tout en limitant la fréquence des erreurs d'identification. Enfin, les analyses de locus multiples par concaténation des gènes permettent une estimation plus robuste des groupements des espèces de staphylocoques. Basée sur la concaténation de quatre loci, les gènes *dnaJ*, *rpoB*, *tuf* et l'ARNr 16S, Lamers *et al.* ont proposés en 2012 une classification affinée pour le genre *Staphylococcus*. Cette étude phylogénétique à loci multiples sépare les espèces du genre *Staphylococcus* en 15 clusters, regroupés sur la base de leur ressemblance moléculaire. Six groupes d'espèces ont également été définis sur la base des propriétés phénotypiques similaires (Figure 4) (31, 42).

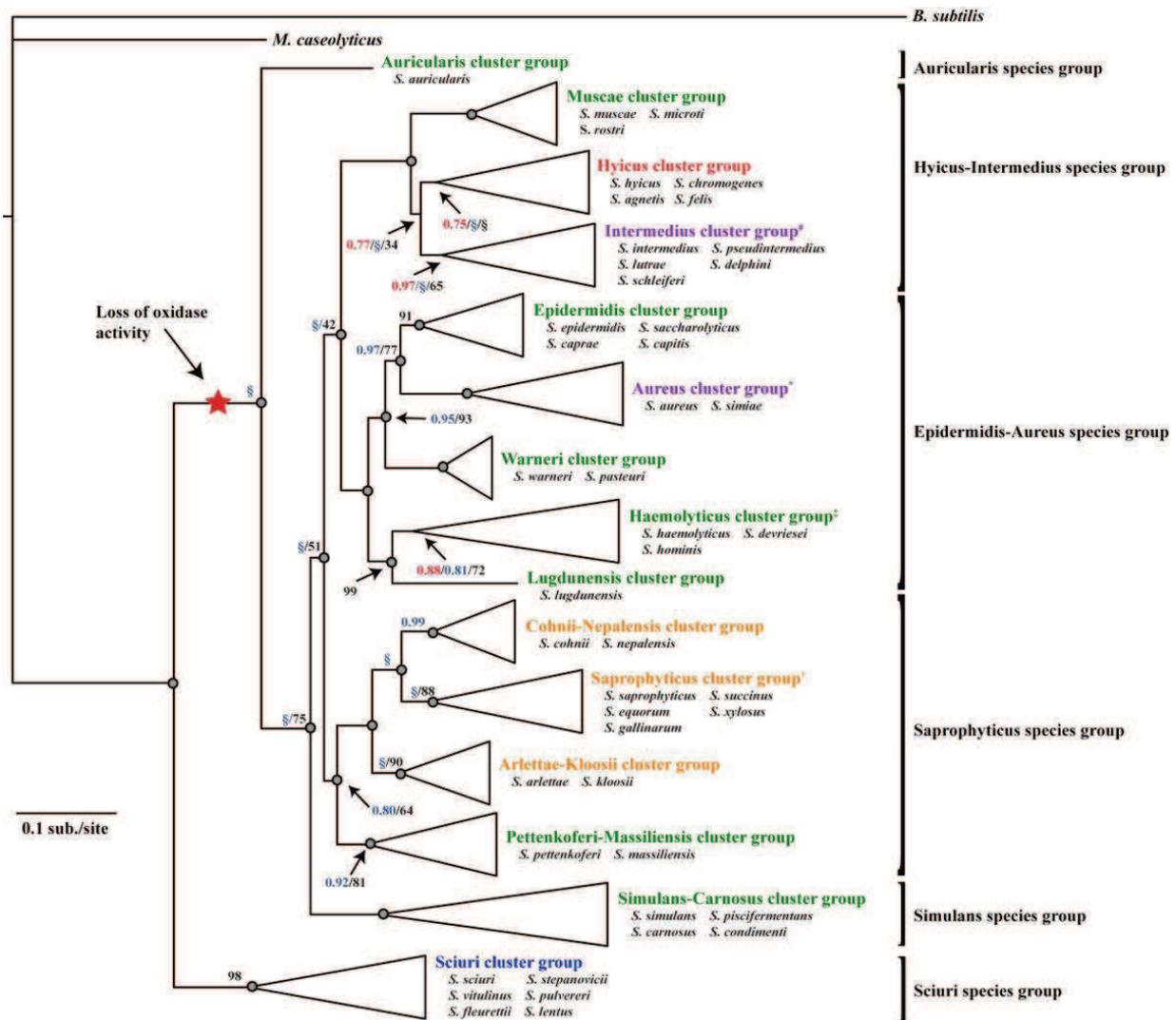


Figure 4. Phylogramme des 46 espèces staphylococciques, définies en 2012, regroupées en 6 groupes d'espèces et 15 clusters. Bleu : Espèces résistantes à la novobiocine, coagulase négative et oxydase positive; Vert : Espèces sensibles à la novobiocine, coagulase négative et oxydase négative; Orange : Espèces résistantes à la novobiocine, coagulase négative et oxydase négative, Violet : Espèces sensibles à la novobiocine, coagulase positive et oxydase positive; Rouge : Espèces sensibles à la novobiocine, coagulase variable et oxydase négative. D'après (42).

Depuis cette étude, 5 nouvelles espèces ont été identifiées et rapportées dans la bibliographie. L'emplacement phylogénétique de ces nouvelles espèces récemment décrites est représenté dans la Figure 5. L'espèce *Staphylococcus petrasii* isolée à partir de prélèvements humains en 2012, est relié au cluster « Haemolyticus group » ; les espèces *Staphylococcus argenteus* et

Staphylococcus schweitzeri ont été décrites en 2015, celles-ci sont très proches de *S. aureus*, elles forment avec elle le cluster « Aureus group » ; *Staphylococcus argensis* identifié comme nouvelle espèce également en 2015, isolé de l'Argen, une rivière allemande ; *Staphylococcus cornubiensis* isolé en Cornouailles à partir d'une plaie humaine, appartenant au cluster « Intermedius group ».

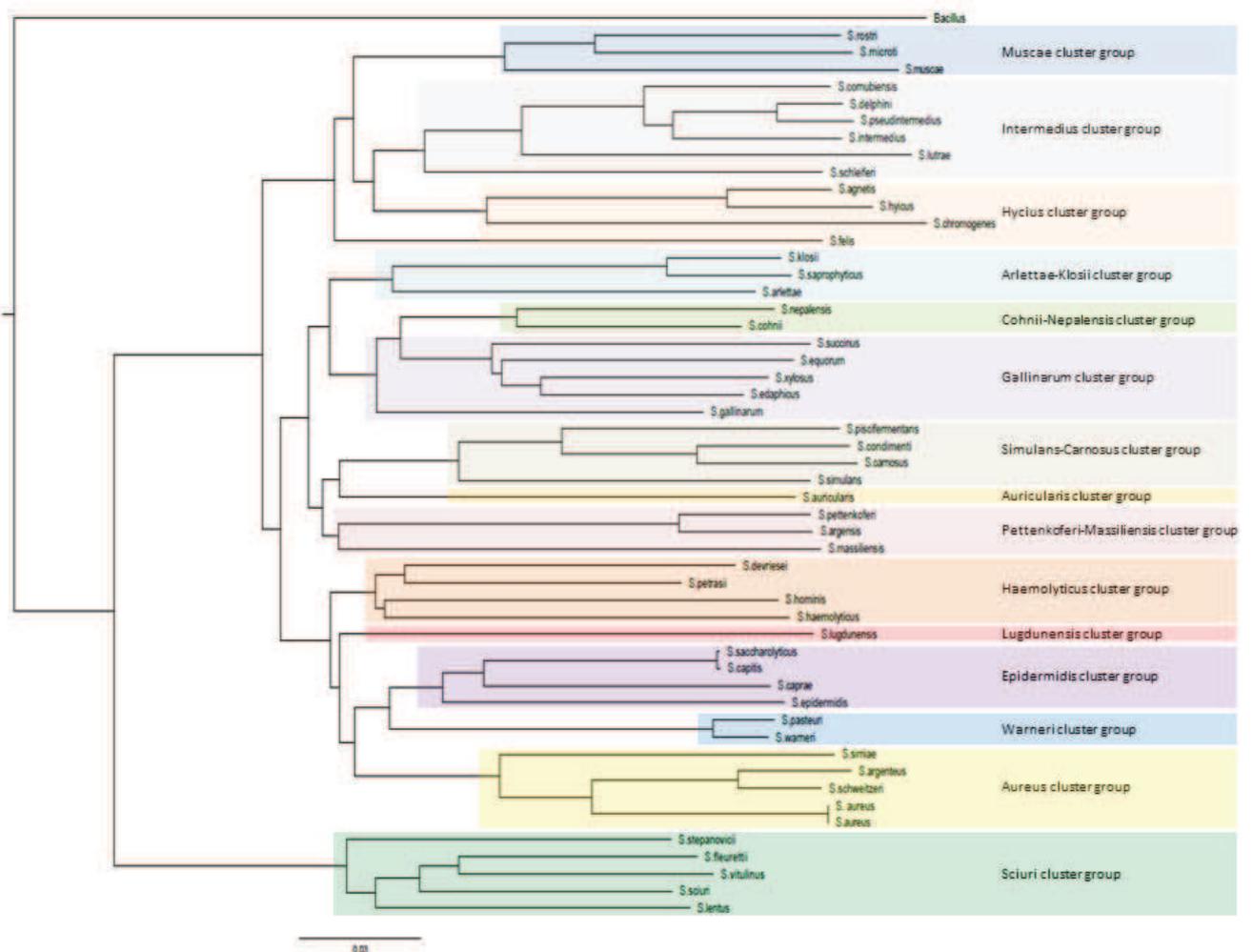


Figure 5. Phylogramme des 51 espèces staphylococciques, définies en 2018, basé sur les données concaténées des gènes *tuf*, *rpob* et *dnaJ*. La méthode de distance utilisée est le bioNJ avec un enracinement sur le groupe extérieur *Bacillus*. (Source interne au laboratoire).

C. Les infections liées aux différentes espèces de staphylocoques

Si tous les staphylocoques commensaux colonisent des surfaces d'hôtes ou des surfaces d'aliments naturels, la capacité de divers staphylocoques à causer une infection diffère. L'amélioration des techniques d'identification des espèces de staphylocoques, a conduit à une caractérisation progressive d'un certain nombre d'espèces opportunistes. Ce comportement opportuniste est permis par (i) une immunodéficience de l'hôte, (ii) la rupture de la barrière cutanéomuqueuse ou (iii) la présence de matériels étrangers dans l'organisme. Von Eiff *et al.* ont proposé de catégoriser les espèces selon leur impact clinique chez l'Homme. En plus de l'espèce *S. aureus* décrite comme « hautement pathogène », on peut distinguer les staphylocoques considérés comme « moyennement pathogènes », représentés par des espèces du cluster *S. epidermidis* group, *S. lugdunensis* et *S. saprophyticus* et enfin les staphylocoques classiquement « non pathogènes » comme *S. carnosus*, *S. condimentii*, et *S. piscifermentans* qui sont des saprophytes généralement utilisés dans la fermentation d'aliments tels que les saucisses, le fromage ou le poisson (43). Jusqu'à présent, ces espèces n'ont jamais été signalées comme colonisant l'Homme ou l'Animal sans jamais être décrites dans un contexte clinique infectieux. Ce classement présente toutefois une limite, on ne peut exclure que même un microorganisme peu virulent, tel que ceux appartenant à une espèce généralement considérée comme non pathogène, ne puisse pas provoquer une infection locale ou systémique chez un patient immunodéprimé.

Les staphylocoques sont à l'origine de deux principaux types de syndromes dont les bases physiopathologiques sont bien distinctes: les toxi-infections principalement décrites lors d'infections à *S. aureus* et les infections suppuratives.

1. Les toxi-infections

Les toxi-infections sont dues à la diffusion des toxines produites par les bactéries *in vivo* ou introduites préformées dans l'organisme via les aliments. La production de toxines est responsable à elle seule des symptômes cliniques observés. Parmi les infections toxiques, on distingue le choc toxique staphylococcique, le syndrome d'exfoliation généralisé, l'impétigo bulleux, la pneumonie nécrosante et les intoxications alimentaires.

Les chocs toxiques staphylococciques (TSS) sont liés à l'expression de superantigènes (SAg), incluant la TSST-1, les entérotoxines staphylococciques (SEs) (serotypes A, B, C, D, E, et G), et les SE-like (SE-I) superantigènes (serotypes H, I, et de J à X) (44). Les SAg contournent les mécanismes classiques régulant la phagocytose, l'apprêtement et la présentation de l'antigène, dans lesquels les fragments peptidiques de l'antigène sont présentés aux lymphocytes T par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type II situé sur la membrane des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Les SAg stimulent eux directement les cellules T en se liant sous forme de protéines intactes directement au récepteur des cellules T (TCR) et au CMH de type II. Ce mécanisme de pontage met en jeu la partie variable de la chaîne β du TCR et peut induire une expansion clonale des lymphocytes T possédant le motif V β du TCR correspondant (Figure 6). En conséquence, les SAg déclenchent une activation excessive et non conventionnelle des lymphocytes T avec une libération non coordonnée et exagérée de cytokines pro-inflammatoires (orages cytokiniques) responsables du tableau clinique observé chez les patients (45). Ce tableau clinique associe une fièvre supérieure à 39°C, une hypotension artérielle, des manifestations systémiques de défaillance viscérale (digestives, musculaires, rénales...) et une érythrodermie scarlatiniforme généralisée suivie après 7 à 14 jours d'une desquamation intense (44, 46-48).

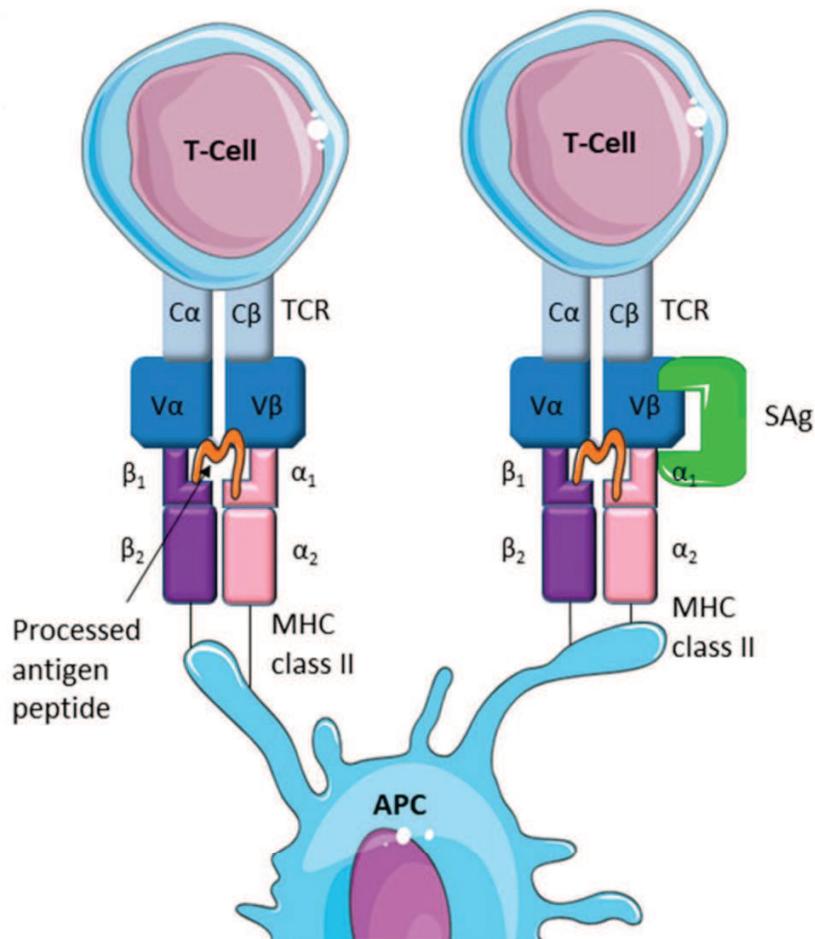


Figure 6. Les SAg sont des protéines à deux domaines qui activent la prolifération des cellules T en se liant sous une forme non traitée au CMH de classe II des cellules CPA et au TCR des lymphocyte T. D'après (49).

La production de SAg n'est pas universelle au sein des souches *S. aureus*, on constate la présence d'au moins un gène de SAg dans 50 à 80% des isolats de *S. aureus* (50). Cette non ubiquité s'explique par la localisation des gènes codant pour les SAg sur des éléments génétiques mobiles tels que les prophages, les plasmides et les îlots de pathogénicité (51). De rares études attestent de la production de SAg TSST-1 et/ou SE chez les SNA. Une étude américaine conduite sur 14 isolats de SNA isolés de patients atteints d'un syndrome TSS, a montré que 50% des souches étaient productrices de TSST-1 seul ou avec l'entérotoxine A (SEA)

(52). Toutefois, cette étude présente une limite majeure qui est que le seul argument témoignant que ces isolats soient responsables d'un syndrome TSS provoqué chez les patients est qu'ils ont été les seuls isolés en culture. D'autre part, aucune donnée n'est apportée concernant la présence génétique des gènes codant pour les SAg. Un an après la publication de cette étude, Parsonnet *et al.* ont évalué la production de TSST-1 sur 187 souches de SNA isolées de tampons de femmes menstruées, de tampons neufs et de patientes présentant un syndrome TSS. Aucune des 187 souches de SNA n'était porteuse du gène *tsst* ni ne produisait la toxine (53). De façon similaire, d'autres études ont montré qu'aucun des SAg connu n'était présent au niveau génétique ou protéique chez des isolats SNA (54, 55). Une étude française menée par Lina *et al.* conduite sur 2 souches *S. epidermidis* isolées de patients présentant des symptômes de TSS, a rapporté qu'aucune des souches ne produisait des SAg capables de stimuler la prolifération des leucocytes mononucléés humains ou des splénocytes de lapin. De plus, aucun ADN homologue aux gènes *seb* ou *sec* n'a été détecté par PCR, bien que ces souches aient été caractérisées comme porteuses des gènes liés aux entérotoxines B et C par southern blot. Toutefois, la stimulation des monocytes humains par des bactéries tuées par la chaleur induisait une production dose-dépendante de cytokines TNF alpha, IL-1 beta et IL-6 qui peut être responsable des symptômes cliniques observés chez les patients (56). La présence et l'implication pathologique des SAg chez les SNA fait donc encore débat (57-61).

Parmi les toxi-infections, les intoxications alimentaires ou toxi-infections alimentaires (TIA) surviennent après l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques (SEs) thermostables fabriquées par *S. aureus* qui se trouve déjà présent dans l'aliment contaminé. Les aliments les plus souvent contaminés sont les préparations à base de crème, le lait, la viande et le poisson conservés trop longtemps après décongélation ou au réfrigérateur (Figure 7). Malgré la contamination, les aliments présentent un goût et une odeur normale. Les SEs sont des toxines très stables et très résistantes à la chaleur et aux conditions environnementales ce qui leur permet de persister longtemps dans les aliments contaminés (62, 63). Ces toxines sont également résistantes aux enzymes protéolytiques telles que la pepsine ou la trypsine et aux pH acides, leur permettant de conserver leur activité dans le tractus gastro-intestinal après ingestion dans l'organisme (64).

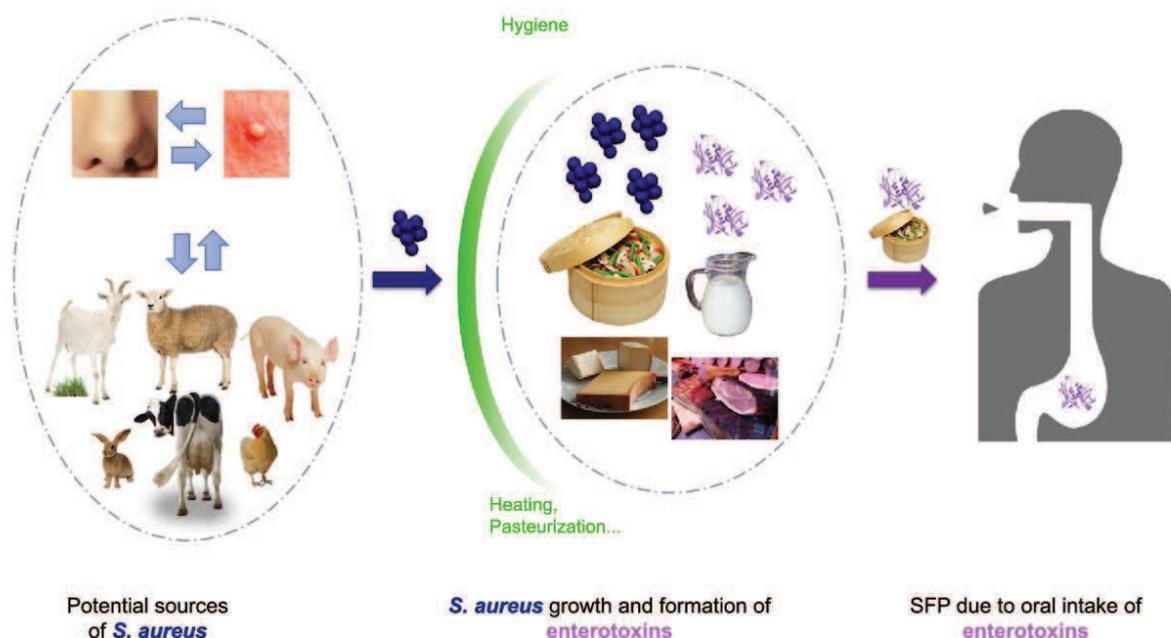


Figure 7. Vue d'ensemble de l'intoxication alimentaire staphylococcique. D'après (65).

Les mécanismes des toxines SEs, causant une intoxication alimentaire, ne sont pas clairement connus. On pense que la majorité des effets causés par les SEs sont déclenchés par l'initiation d'une réponse inflammatoire intestinale focalisée en raison de leur activité superantigénique ou par des lésions des mastocytes de l'intestin entraînant la dégranulation de ces derniers. Les SEs pourraient également agir directement sur l'épithélium intestinal et le nerf vague, provoquant une stimulation du centre émétique (66). Le risque d'épidémies, en l'occurrence de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC), est accru lorsque des techniciens alimentaires présentant des infections cutanées (panaris), contaminent des aliments insuffisamment cuits ou laissés à température ambiante. Les symptômes des TIA staphylococciques se manifestent généralement soudainement, 1 à 6 heures après ingestion. Cliniquement, ils se présentent sous la forme de nausées, de vomissements, de crampes abdominales, de diarrhées et d'une absence de fièvre. Les symptômes durent en général moins de 12 heures avec une évolution le plus souvent favorable sans traitement (64). Bien que *S. aureus* est aujourd'hui bien reconnue comme étant l'un des 5 agents les plus prévalents lors des TIA, on en sait beaucoup moins sur le potentiel entérotoxigène des SNA dans la survenue des TIA. De rare études ont rapporté des

souches SNA entérotoxigènes associées à des TIA (67, 68). Par ailleurs, des études récentes fournissent des preuves solides de la présence et de la localisation d'éléments codant pour des SEs dans les génomes de SNA et attestent de leur capacité à produire des SEs à des concentrations supérieures au seuil pouvant déclencher une infection (58, 69-72). Comme pour les TSSS, l'implication des SNA dans les TIA fait encore débat au sein de la communauté scientifique en raison de la très faible prévalence des cas rapportés de TIA à SNA. En effet, une enquête bibliographique a évalué le risque de survenue de TIA par les SNA à la suite d'ingestion de produits laitiers. Cette étude révèle qu'aucun SNA, isolé à partir de lait ou de produits laitiers, n'a jamais été impliqué dans un cas d'intoxication alimentaire ou de pathologie humaine à la suite de l'ingestion de produits laitiers (73).

Les toxi-infections incluent également les syndromes staphylococciques cutanés bulleux (SSCB). Ces pathologies sont caractérisées par l'expression des toxines exfoliantes ETA, ETB et ETD. Ces exfoliatines, également appelées épidermolysines, sont des toxines à activité protéolytique, et plus précisément à activité sérine protéase spécifique du glutamate. Elles agissent au niveau du stratum granulosum au sein de l'épiderme où elles hydrolysent une protéine, la desmoglécine-1. La desmoglécine-1 est la composante majeure des desmosomes du stratum granulosum, les desmosomes étant des jonctions inter-cellulaires permettant l'adhésion entre les kératinocytes. La destruction de la desmoglécine-1 par les exfoliatines entraîne donc la rupture de l'adhésion entre les kératinocytes du stratum granulosum, responsable d'un décollement intra-épidermique spécifique (Figure 8) (74).

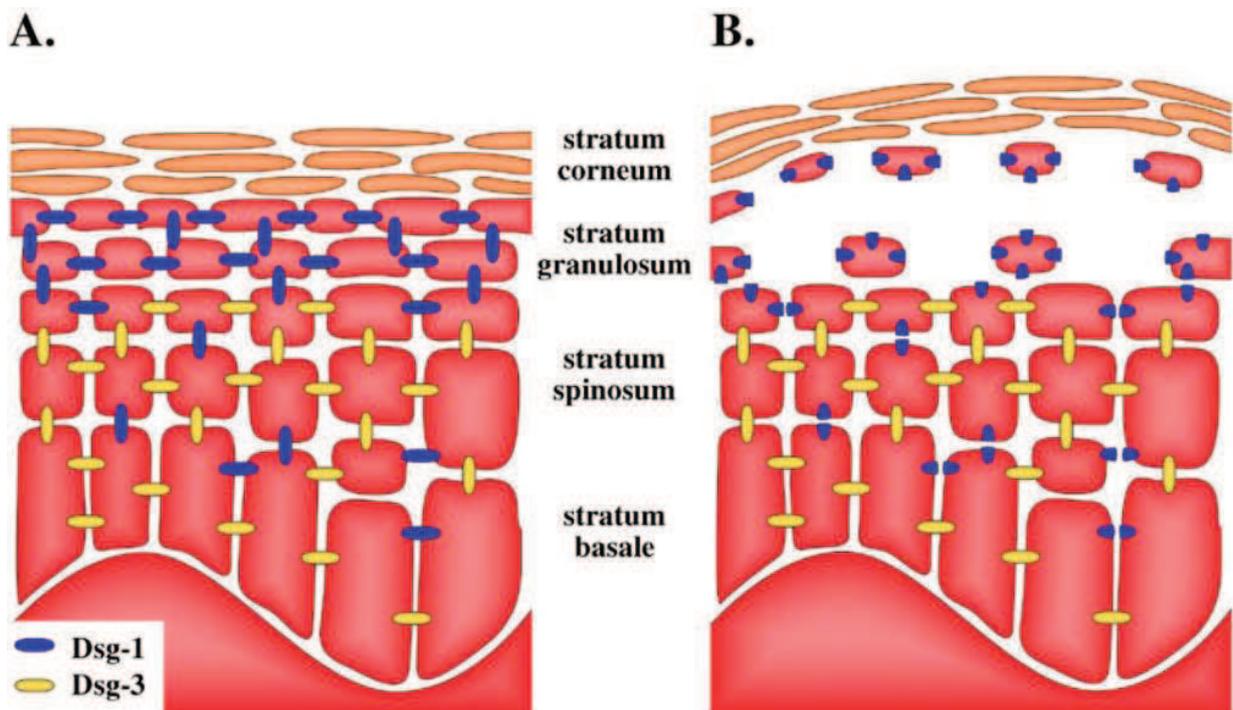


Figure 8. Mécanisme d'action des exfoliatines. Les exfoliatines clivent spécifiquement la desmogléine-1 au niveau du glutamate 381. Comme la desmogléine-1 est la seule présente dans les desmosomes du stratum granulosum, cela explique pourquoi le décollement cutané se produit à ce niveau dans les maladies exfoliatives dues aux exfoliatines. Dsg-1 : desmogléine-1 ; Dsg-3 : desmogléine-3. D'après (74).

Parmi les SSCB, le syndrome d'exfoliation généralisée est provoqué par l'action des exfoliatines A et B libérées par *S. aureus* à distance du foyer de colonisation par diffusion. Seulement 5% des isolats humains de *S. aureus* sont producteurs des toxines ETA et ETB. Le syndrome d'exfoliation généralisée se rencontre dans la grande majorité des cas chez les enfants où il est appelé le syndrome de la peau ébouillantée chez les jeunes enfants (Staphylococcal Scalded Skin Syndrome, SSSS) ou encore le syndrome de Ritter chez les nouveau-nés. Toutefois, il peut aussi se rencontrer chez l'adulte immunodéprimé et les patients atteints d'insuffisance rénale. Les symptômes débutent par un rash scarlatiniforme douloureux (surtout au visage, plis et régions péri-orificielles), suivi en quelques heures d'un décollement spontané ou provoqué (signe de Nikolski) et par l'apparition de bulles claires et stériles (75). On distingue également parmi les SSCB, l'impétigo bulleux, qui est induit par des souches productrices d'exfoliatines au sein

même des lésions cutanées. Il est constitué d'un nombre variable de bulles prédominantes aux extrémités à contenu trouble contenant le staphylocoque et la toxine (exfoliatine). Les bulles évoluent vers l'ouverture et la formation d'ulcérations puis de croûtes (76). Les SSCB sont exclusivement causées par *S. aureus*. Aucun cas clinique de syndrome d'exfoliation généralisée ou d'impétigo bulleux confirmé à SNA n'a été rapporté à ce jour. On peut noter qu'une seule étude a rapporté la production d'ETA, par analyse en western blot, chez des isolats de SNA appartenant aux espèces *S. equorum* et *S. carnosus* (61).

Enfin, les pneumonies nécrosantes sont associées à des souches de *S. aureus* sécrétrices d'une toxine à tropisme membranaire synergo-hyménotrope, la leucocidine de Pantone-Valentine (LPV). Initialement décrite chez les enfants et les jeunes adultes, cette pathologie est également répandue à l'âge adulte. Dans la moitié des cas, la pneumonie est précédée d'un syndrome grippal, avec pour certaines observations l'isolement d'un virus de type *Influenza*. L'hypothèse avancée est que l'infection virale, par la destruction des cellules ciliées et des cellules à mucus qu'elle provoque, favorise l'attachement de *S. aureus* aux cellules basales de l'épithélium respiratoire. Cette pathologie se caractérise par la survenue de fièvre, d'hémoptyxies, d'infiltrats alvéolaires multilobaires et d'une leucopénie, qui est rattachée à l'effet cytolytique de la LPV sur les polynucléaires neutrophiles. L'évolution est très défavorable avec la survenue d'un état de choc associé ou non à un syndrome de détresse respiratoire aiguë. Les pneumonies staphylococciques nécrosantes sont particulièrement sévères comme en témoigne le taux de mortalité de 75% qui leur est associé (77-80). D'un point de vue physiopathologique, les pneumonies nécrosantes staphylococciques sont liées exclusivement à la présence de la LPV. Cette toxine est composée de 2 sous-unités : LukS-PV et LukF-PV codées à partir de 2 gènes portés sur le génome d'un bactériophage. La LPV affecte la membrane des cellules, particulièrement les polynucléaires neutrophiles, les monocytes et les macrophages, par la formation de pores conduisant à l'apoptose. En réalisant des tests de cytotoxicité conduits avec de la LPV recombinante et différentes lignées cellulaires transfectées, Spaan *et al.* ont identifiés les récepteurs du complément humain C5aR et C5L2 en tant que cibles hôtes de la sous-unité LukS-PV et comme médiateurs de la cytotoxicité induite par la LPV (81). Très récemment, une étude révèle un rôle insoupçonné de la composante LukF-PV dans la sensibilité des phagocytes

humains à la LPV. Leurs travaux ont permis d'identifier le récepteur CD45 en tant que récepteur de LukF-PV (Figure 9) (82). Concernant l'implication des SNA dans les pneumonies nécrosantes, quelques études révèlent la présence de ces espèces, sans détection de *S. aureus*, sur des cultures de sangs positifs isolées de patients souffrant de pneumonies nécrosantes. L'implication de ces isolats est toutefois contestée, ces souches ne seraient que des contaminants (83, 84).

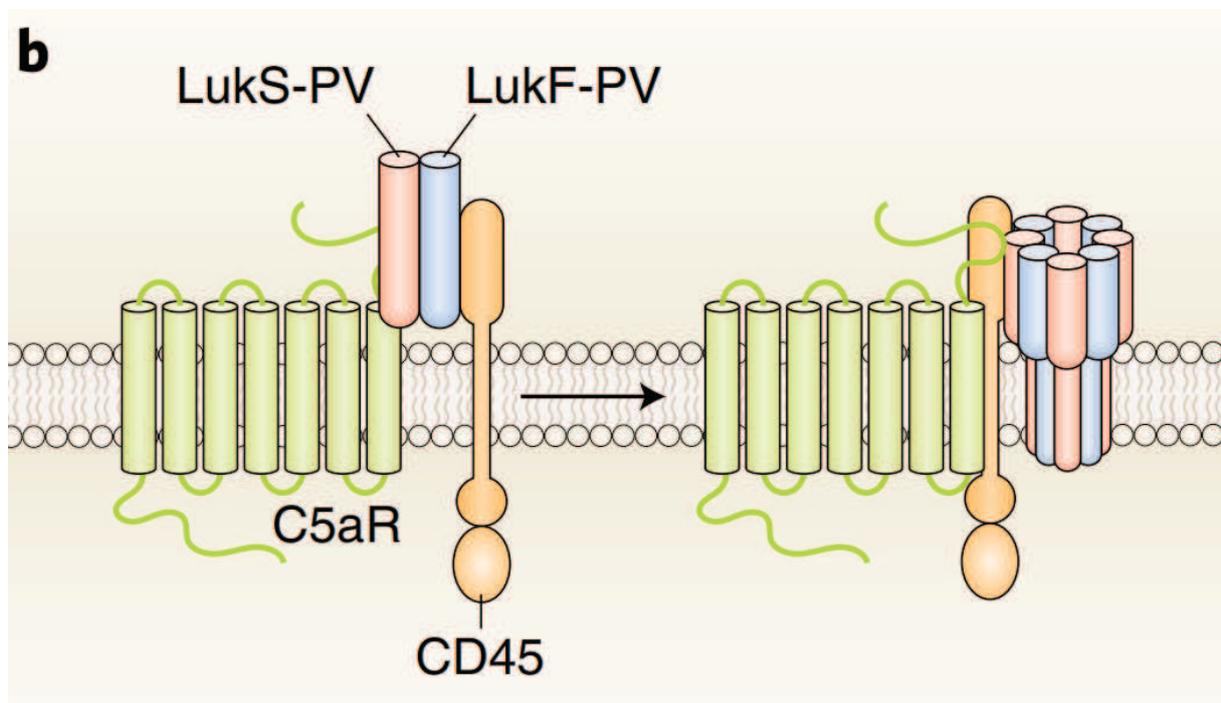


Figure 9. Modèle de formation de pores à deux composantes à l'aide de récepteurs spécifiques de la LPV. La liaison du C5aR humain à la sous-unité LukS-PV, est insuffisante pour la formation de pores. Le récepteur CD45 humain, agissant en tant que récepteur de la sous-unité LukF-PV, est également requis pour la formation de pores. D'après (82, 85).

2. Les infections suppuratives

A l'inverse des toxi-infections liées exclusivement à la production de toxines, les infections suppuratives impliquent la prolifération bactérienne, l'expression de multiples facteurs de virulence responsable de l'invasion, de la destruction des tissus de l'hôte et d'une réponse inflammatoire locale et systémique.

S. aureus est l'agent le plus fréquemment retrouvé dans les infections de la peau et des tissus mous plus ou moins profondes et complexes chez l'Homme (86). Il peut atteindre : (i) les follicules pilo-sébacés se traduisant par l'apparition de furoncles, de folliculites ou d'antrax, (ii) le tissu cutané se manifestant sous forme d'impétigo, d'onxyxis et de périonyxis, (iii) le tissu sous-cutané sous forme de panaris, de phlegmon et de cellulite et (iv) les muqueuses se traduisant par la présence de sinusite, d'otite et de conjonctivite. *S. aureus* peut également être à l'origine d'infections cutanées s'étendant aux tissus mous sous-jacents pouvant se présenter sous forme de fasciite nécrosante ou encore de pyomyosite (Figure 10) (87). Autrefois considéré comme des contaminants plutôt que comme des organismes responsables de l'infection, les SNA peuvent également être à l'origine d'infections de la peau et des tissus mous et ne doivent donc pas toujours être considérés comme des contaminants (88, 89). Les SNA tel que *S. auricularis*, *S. capitis*, *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* ou encore *S. simulans* sont à l'origine de diverses infections de la peau et des tissus mous qui se présentent principalement sous forme d'abcès et de panaris (90). Les personnes âgées et/ou immunodéprimées représentent des personnes à risque pour la survenue d'infections liées aux SNA. En plus de ces facteurs de risque, les personnes porteuses d'implants chirurgicaux ou d'appareils médicaux sont également prédisposées à la survenue d'infections suppuratives même chez les hôtes immunocompétents (43).

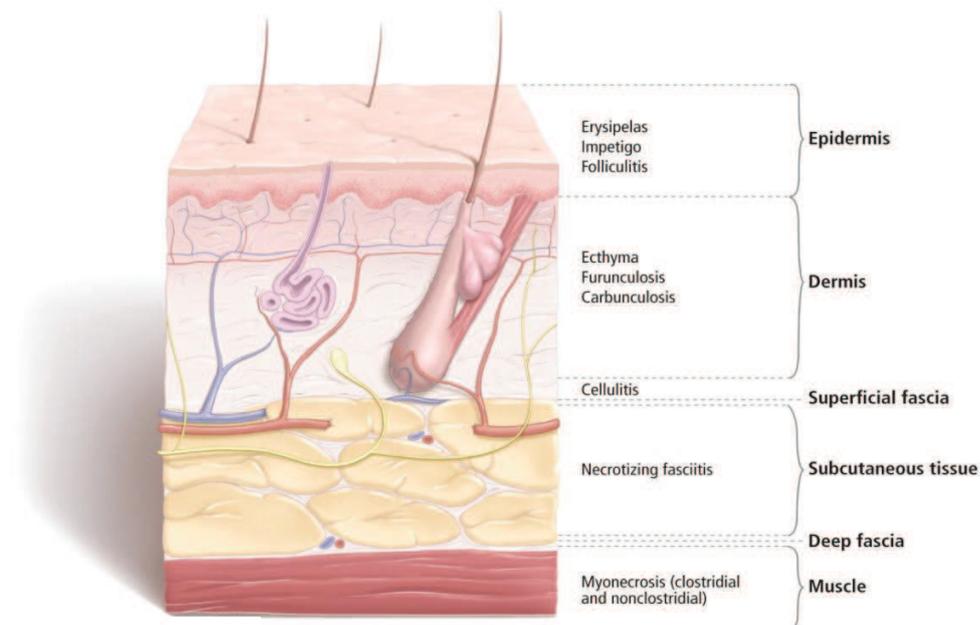


Figure 10. Localisation physiologique des infections de la peau et des tissus mous liées aux staphylocoques. D'après (91).

En plus de l'implication des SNA dans les infections humaines de la peau et des tissus mous, les SNA sont également à l'origine d'une grande variété d'infections pyogènes chez les animaux (92, 93). Les mammites ou mastites sont des inflammations de la mamelle des mammifères responsables de problèmes majeurs et coûteux liées à la diminution de la production laitière. Les staphylocoques sont les principaux agents étiologiques incriminés dans ces infections (94). Bien que *S. aureus* soit décrit comme l'un des plus importants agents pathogènes de la mammite chez les bovins, les SNA sont de plus en plus reconnus comme des agents étiologiques associés aux infections intra-mammaires dans de nombreux pays (95-97). Par ailleurs, l'espèce *S. pseudintermedius* représente l'agent pathogène bactérien le plus fréquemment isolé à partir d'échantillons cliniques canins (98). Cette espèce est principalement associée aux pyodermites canines mais peut être impliquée dans presque tous les types d'infections communautaires et hospitalières (99-102). La propagation mondiale de souches résistantes à pratiquement tous les

agents antimicrobiens disponibles en médecine vétérinaire, telles que les souches *S. pseudintermedius* résistantes à la méticilline (SPRM), a considérablement compliqué la lutte contre ces espèces constituant un véritable fléau en médecine vétérinaire (103, 104). Les infections de la peau et des tissus mous se compliquent parfois d'une diffusion hématogène ou d'une extension locorégionale entraînant des pathologies plus profondes telles que les endocardites, les pneumopathies, ainsi que les infections ostéo-articulaires (IOA) associées dans un certain nombre de cas à des bactériémies (105-107). En général, *S. epidermidis* est l'espèce la plus souvent identifiée dans les infections causées par les SNA, suivie de *S. hominis*, *S. haemolyticus* et *S. capitis* (108-110). Toutefois, en tenant compte du site d'infection, cette distribution est variable. Basé principalement sur des aspects cliniques et diagnostiques, un schéma simplifié est classiquement utilisé en médecine humaine. Les staphylocoques sont divisés sur la présence ou l'absence d'une coagulase libre, en tenant compte de l'hôte principal (Figure 11). Certaines espèces montrent une préférence pour certains sites d'infection, alors que d'autres peuvent être impliquées sur plusieurs sites (111).

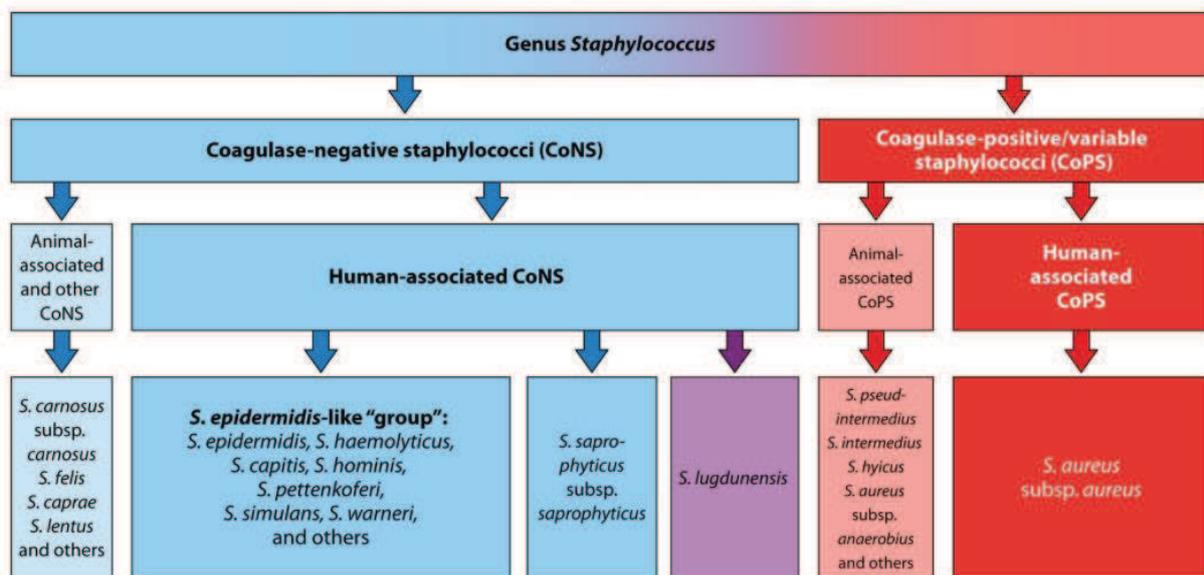


Figure 11. Schéma clinique et épidémiologique des espèces de staphylocoques, fondé sur la catégorisation de la coagulase en tant que facteur de virulence majeur et sur son impact dans la santé humaine et animal. D'après (112).

Les espèces du *S. epidermidis* Group, comprenant des staphylocoques « moyennement pathogènes » comme *S. epidermidis* et *S. capitis* sont principalement retrouvées dans les infections associées aux dispositifs médicaux tels que les bactériémies liées à la présence de corps étrangers (113). Ces espèces sont également à l'origine d'endocardites natives dans lesquelles *S. epidermidis* représentait 71% des SNA, selon une étude sur l'endocardite à l'échelle mondiale (114). Enfin, les nouveau-nés prématurés sont particulièrement prédisposés aux infections invasives du *S. epidermidis* Group. Les raisons en sont notamment l'immaturation du système immunitaire ainsi que les barrières altérées de la peau et des muqueuses des nouveau-nés prématurés. De plus, les nouveau-nés prématurés ou de faible poids à la naissance sont régulièrement exposés à des procédures invasives, notamment l'insertion de corps étrangers, au cours des soins intensifs néonataux (115). Parmi les SNA, *S. lugdunensis* est un pathogène impliqué dans l'endocardite native fulminante et dans les infections liées aux stimulateurs cardiaques et aux défibrillateurs implantables. Les endocardites infectieuses à *S. lugdunensis* se caractérisent cliniquement par leurs formes très sévères, associées à un taux de mortalité proche de 70% (116). Plusieurs rapports soulignent la capacité de *S. lugdunensis* à provoquer divers types d'infections liées à la présence de corps étrangers, tel que des bactériémies ou encore les infections articulaires sur prothèses (117-119).

Enfin, l'espèce *S. saprophyticus* représente le deuxième micro-organisme (7%) le plus fréquemment mis en cause dans les infections urinaires basses chez la jeune femme après *Escherichia coli* (75%) (120). À noter que cette prévalence varie selon les études de 1 % à plus de 42 % (121, 122). La faculté d'adhérer aux cellules uroépithéliales de cette bactérie joue un grand rôle dans sa pathogénicité.

3. Potentiel épidémique des staphylocoques

Dans les parties précédentes, nous avons pu souligner l'éventail des différentes infections liées aux staphylocoques. L'incidence de ces infections est étroitement liée à la dynamique d'émergence et de diffusion de ces bactéries en milieu communautaire et hospitalier. Ainsi, les infections à *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM), ont longtemps été limitées au milieu hospitalier même si ces SARM diffusaient occasionnellement en communauté. Depuis une

décennie, on assiste à l'émergence de plusieurs lignées dont l'origine est clairement communautaire (SARM-C), ce qui pose un réel problème de santé publique en raison de leur pouvoir pathogène élevé lié à une prévalence de la PVL chez les SARM-C supérieure à celle des souches hospitalières (123). La diffusion mondiale de certains clones de SARM-C se traduit par une augmentation importante du nombre d'infections cutanées dans de nombreux pays (124). Les génotypes les plus prévalent, désignés dans la littérature par leur séquence type ou leur pulsotype, sont le clone ST 80 présent en Europe, en Afrique du Nord et dans le Moyen-Orient, le clone USA300 aux États-Unis et la lignée pandémique ST30 (clone « South West Pacific ») en Océanie (125) (Figure 12).

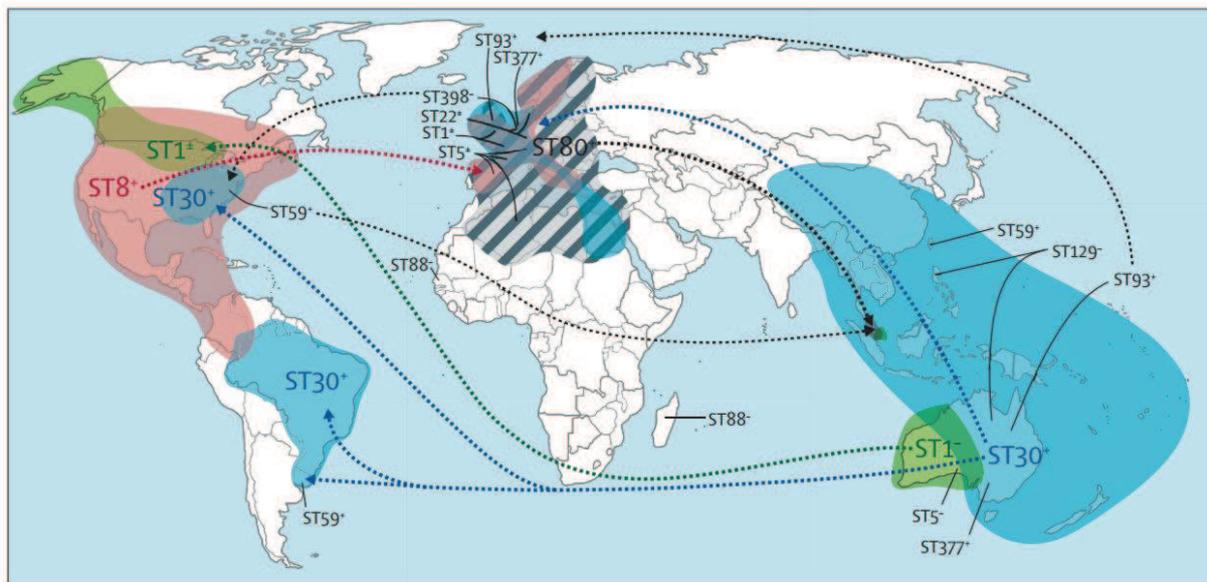


Figure 12. Distribution mondiale de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline associé à la communauté (SARM-C) par séquence type (ST). D'après (126).

Jusqu'à maintenant, la diffusion des SNA était uniquement considérée comme micro-clonale. Seul *S. aureus* était reconnu capable d'une diffusion pandémique, avec l'exemple des différents grands clones largement étudiés que nous avons cités ci-dessus. Toutefois, les SNA présentent eux aussi un potentiel de diffusion sur de larges échelles géographiques. En effet, des études récentes ont démontré le potentiel épidémique et endémique de certaines espèces de SNA

impliquées dans des infections invasives. Ainsi, il a été récemment décrit un clone appartenant à l'espèce *S. capitis*, appelé NRCS-A, impliqué spécifiquement dans les bactériémies néonatales tardives (INT, survenant après 3 jours de vie) dans différents services de réanimation néonatale à travers la France (127). Ce clone présente un profil multi-résistant atypique chez cette espèce, incluant notamment une sensibilité diminuée à la vancomycine, ce qui est problématique car la vancomycine est l'antibiotique de première ligne en cas de suspicion d'INT (128). Les résultats recueillis en 2015 auprès de 47 des 57 services de réanimation néonatale en France ont indiqué que seulement 4 services étaient exempts du clone NRCS-A. Dans les 43 autres services, les souches NRCS-A représentaient jusqu'à 46% de toutes les bactériémies. Plus récemment, Butin *et al.* ont montré que le clone NRCS-A n'était pas présent uniquement en France mais présentait en fait une distribution endémique mondiale avec une présence dans au moins 17 pays à travers le monde, spécifiquement dans les services de réanimation néonatale (129) (Figure 13). Ce potentiel épidémique des SNA est également illustré à travers la description récente par Lee *et al.* de trois lignées de *S. epidermidis*, responsables de bactériémies. Caractérisées par une résistance à la rifampicine acquise par l'apparition de mutations spécifiques sur le gène *rpoB*, ces lignées multirésistantes et adaptées aux hôpitaux ont émergées au cours des dernières décennies et ont diffusées dans le monde entier (130).

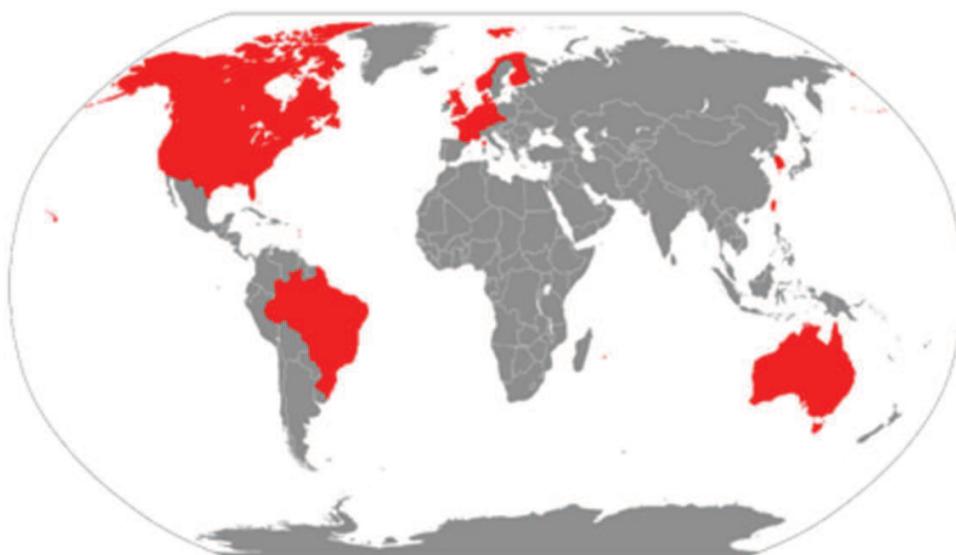


Figure 13. Distribution mondiale du clone *S. capitis* NRCS-A responsable de bactériémies néonatales isolé en services néonatales. Source interne au laboratoire.

II. LES INFECTIONS OSTEO-ARTICULAIRES

A. Généralités

Les infections ostéo-articulaires (IOA) regroupent plusieurs entités cliniques hétérogènes ayant en commun l'invasion et la destruction progressive des tissus osseux et cartilagineux par un ou plusieurs micro-organismes. Elles rassemblent une extrême diversité de situations cliniques en fonction du site ostéo-articulaire atteint, du ou des germes en cause, du terrain et de la présence ou non de matériel. Sous le terme d'IOA, sont ainsi regroupées les arthrites septiques, les ostéomyélites aiguës, les ostéites chroniques, les spondylodiscites, ainsi que les infections sur implants orthopédiques (infection sur prothèse articulaire ou matériel d'ostéosynthèse). Quel que soit le contexte clinique, les IOA sont toujours considérées comme des infections graves pouvant engager à un stade précoce le pronostic vital du patient et à un stade tardif un pronostic fonctionnel sévère.

Les IOA peuvent être particulièrement difficiles à traiter et présenter des critères de complexité. Connues sous le terme d'IOA complexes (IOAc), leur prise en charge nécessite un niveau particulièrement élevé d'expertise, de compétence et de moyens diagnostiques et thérapeutiques. Plusieurs critères de complexité sont associés aux IOA : (i) épidémiologiques en lien avec le terrain du patient (comorbidité, risque anesthésique et/ou allergique aux antibiotiques) ; (ii) microbiologiques (micro-organismes difficiles à traiter, multirésistants) ; (iii) chirurgicaux (chirurgies lourdes en plusieurs temps, avec reconstruction des parties molles et/ou reconstruction osseuse) ; et (iv) évolutifs (rechute et chronicité). La prise en charge de ces IOAc nécessite des compétences multidisciplinaires et donc une analyse des dossiers cliniques en présence d'infectiologues, de chirurgiens orthopédistes, d'anesthésistes, de réanimateurs, de rhumatologues, de radiologues, de rééducateurs et de microbiologistes.

B. Classification

Les IOA constituent un groupe très hétérogène de situations cliniques, classées selon leur mécanisme de contamination, leur localisation anatomique, leur délai d'évolution, le mécanisme ayant conduit à l'infection, et la présence ou non de matériel orthopédique.

1. Mécanismes de contamination

La contamination du tissu ostéo-articulaire par un agent infectieux peut résulter : i) d'une origine hématogène, constituant alors une localisation septique secondaire au cours d'une bactériémie ; ii) d'une inoculation directe survenant lors d'un traumatisme (fracture ouverte), ou d'un geste invasif (ponction, infiltration, chirurgie) ; ou iii) de l'extension d'un foyer infectieux par contiguïté (infections des tissus mous, escarre adjacent) (131) (Figure 14).

Chez l'adulte, les **IOA hématogènes** surviennent principalement chez des patients de plus de 50 ans, à l'exception des usagers de drogues intraveineuses. Leur survenue est liée aux facteurs de risque usuels de bactériémie, et notamment la présence d'un cathéter veineux central ou d'une sonde urinaire à demeure, l'épuration extra-rénale, l'existence d'une infection urinaire, et la drépanocytose (132). Les portes d'entrée cutanée, pulmonaire, dentaire et urinaire sont les plus fréquentes. Les IOA hématogènes sont généralement mono-microbiennes, alors que les autres mécanismes étiologiques engendrent plus fréquemment des infections pluri-microbiennes (132).

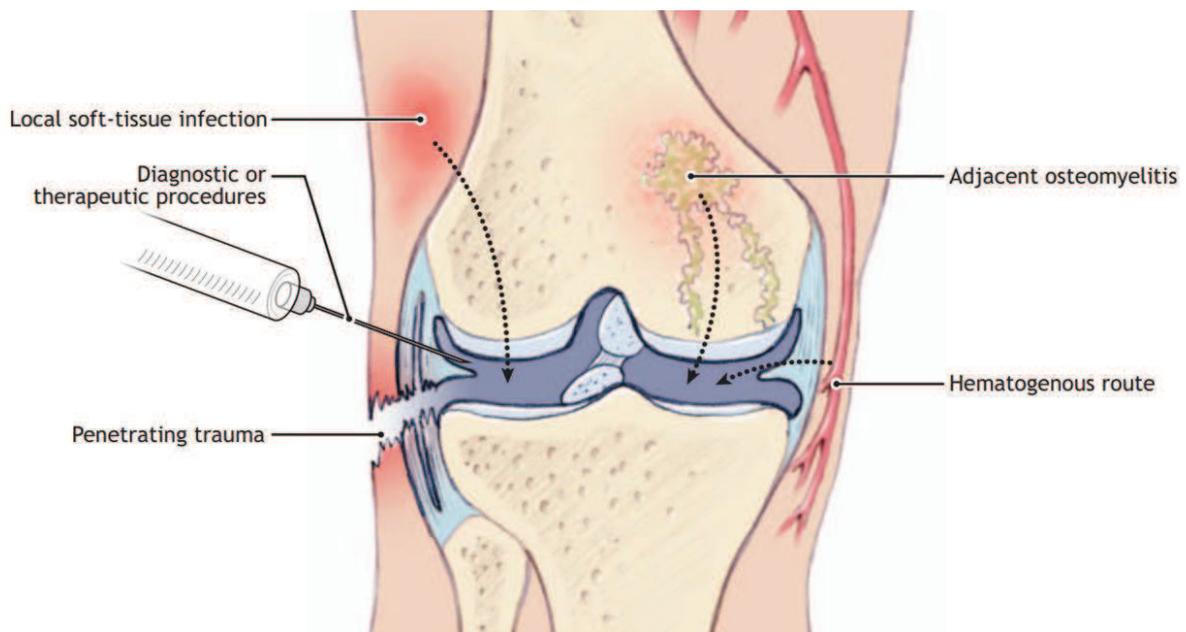


Figure 14. Mécanismes de contamination bactérienne des Infections Ostéo-Articulaires (IOA).
D'après (133).

Chez l'enfant et l'adolescent, les IOA hémato-gènes sont des infections qui affectent principalement les régions les plus vascularisées du squelette en croissance. En effet, en raison des échanges sanguins spécifiques, la métaphyse peut être très facilement infectée par les bactéries. De plus, les phagocytes vasculaires sont absents dans ces segments, ce qui favorise l'apparition de lésions endothéliales d'origine bactérienne, associées à une thrombose secondaire, et entraîne des nécroses dans les métaphyses. Les portes d'entrée de ces bactéries sont principalement situées au niveau de la sphère ORL (voies nasales, cavité buccale, voies respiratoires). Les IOA hémato-gènes de l'enfant sont essentiellement localisées sur les os longs et les membres inférieurs comme le tibia et le fémur qui représentent 50% des cas d'IOA hémato-gènes (134-136) (Figure 15).

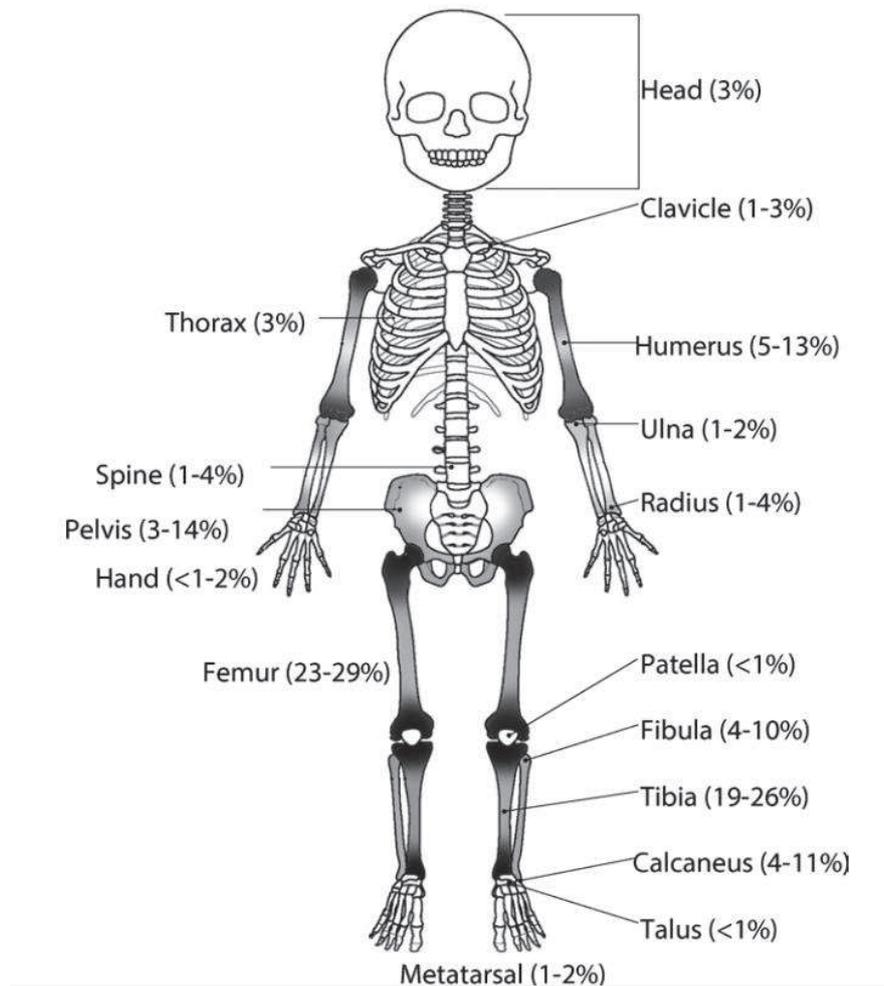


Figure 15. Fréquence relative des IOA hémotogènes chez l'enfant. Les infections affectent plus généralement les zones à croissance rapide et touchent davantage les membres inférieurs que les membres supérieurs. D'après (136)

Le mode de contamination par **inoculation directe** du germe constitue la deuxième voie d'infection. L'effraction peut être accidentelle ou iatrogène, médicale ou chirurgicale, à la suite d'une plaie pénétrante, d'une ponction articulaire, d'une infiltration, d'une arthroscopie, ou encore d'une arthrographie. Le risque de survenue d'une IOA par effraction accidentelle est étroitement lié à la gravité de fracture ouverte. Le système de classification des fractures ouvertes le plus utilisé dans la pratique clinique est celui proposé par Gustilo (137). Ce système est basé sur la taille de la lésion cutanée, le degré de contamination, la capacité de couverture

osseuse et la lésion vasculaire du membre. Allant du type I au type IIIC, les lésions osseuses et des tissus mous sont de plus en plus graves avec un risque croissant de complications potentielles (138, 139).

Enfin, la contamination par **contiguïté** trouve son origine dans un foyer septique dont la porte d'entrée est une plaie chronique. Les ostéites sur pied diabétique en sont l'exemple type et sont directement liées au diabète par conjonction de complications multifactorielles de type neurologiques, artérielles et infectieuses chez les patients. Elles constituent une entité à part qui ne sera pas abordée dans ce travail. En effet, leur physiopathologie, associant troubles vasculaires et nerveux, phénomènes mécaniques et infectieux est particulière et implique une prise en charge spécifique (140).

2. Localisations anatomiques

L'arthrite septique est une infection de la cavité articulaire, le genou étant le site le plus fréquemment impliqué (141, 142). La contamination est soit d'origine hématogène soit d'origine exogène par inoculation directe. Elle survient à la suite d'une injection articulaire (infiltration, arthroscopie), d'une intervention chirurgicale ou d'un traumatisme articulaire ouvert (morsure). L'infection est favorisée par la riche vascularisation de la membrane synoviale, une matrice extracellulaire favorisant l'adhésion bactérienne, et le tropisme articulaire des bactéries mises en cause. Le développement bactérien dans la synovie engendre une inflammation avec hyperplasie synoviale et le recrutement de leucocytes dans le liquide articulaire. La production locale d'espèces réactives de l'oxygène, la libération d'enzymes protéolytiques (métalloprotéases, enzymes lysosomales) et de toxines bactériennes contribuent à la destruction du cartilage (chondrolyse) et la diffusion à l'os sous-chondral (Figure 16). Du fait de l'inextensibilité de la capsule limitant la cavité articulaire, l'inflammation locale provoque une hyperpression intra-articulaire responsable d'une ischémie locale accélérant la destruction de l'articulation (143).

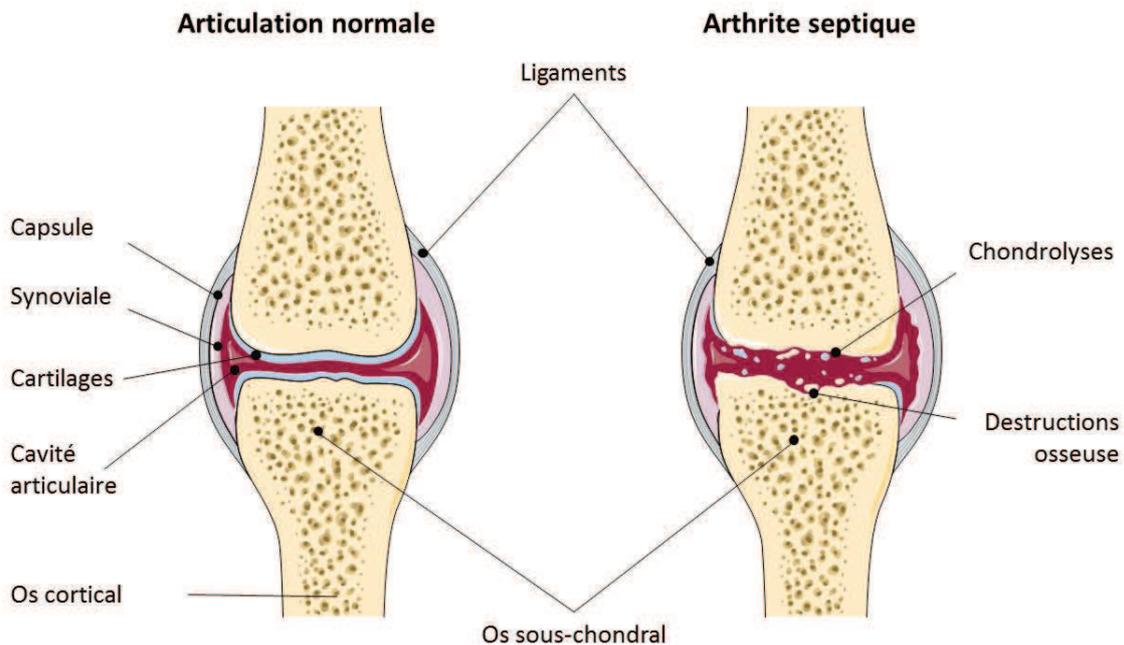


Figure 16. Comparaison entre une articulation normale et une articulation atteinte d'une arthrite septique. Source personnelle illustrée à l'aide du service Smart Servier medical art (<https://smart.servier.com/>).

Le second type d'IOA correspond aux infections du tissu osseux proprement dites, qui regroupent une large gamme d'infections (ostéites, ostéomyélites et spondylodiscites). L'ostéite se définit par l'infection du tissu osseux compliquant un traumatisme osseux à foyer ouvert et/ou apparaissant dans les suites d'une chirurgie orthopédique. Le processus infectieux initial aboutit à une réaction inflammatoire locale qui, associée à la multiplication bactérienne, entraîne des micro-thromboses vasculaires osseuses localisées. L'évolution se fait vers la formation de séquestres, correspondant à des zones de tissus osseux infectés et nécrotiques, caractéristiques de la chronicisation des ostéites. Le terme d'ostéomyélite désigne classiquement une atteinte des os longs par contamination hématogène spontanée sans cause extérieure, situation clinique retrouvée classiquement chez l'enfant et l'adolescent qui possèdent des cartilages de croissance sujets à ce type d'infection. L'inflammation due à l'infection entraîne une nécrose progressive et une destruction du tissu osseux (3,10–12). L'infection peut se limiter à une zone distincte de l'os ou atteindre à la fois la moelle osseuse, le cortex, le périoste ou les tissus mous environnants. La classification de Cierny-Mader permet de

distinguer les 4 types d'ostéomyélites en fonction du stade anatomique et de l'état physiologique du patient (Figure 17) (144). Bien qu'elle ne se soit pas encore véritablement imposée dans les pays germanophones et francophones, cette classification est très utilisée dans les pays anglo-saxons.

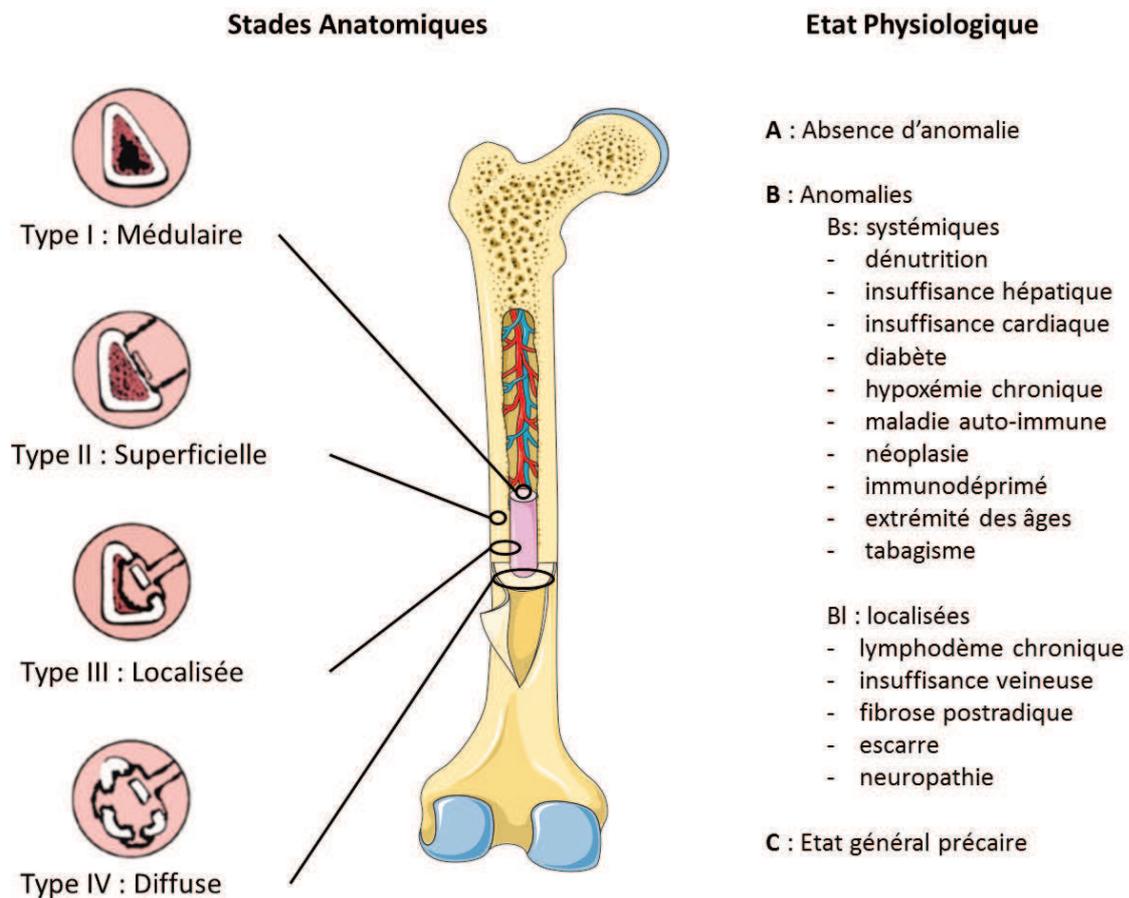


Figure 17. Classification de Cierny-Mader des ostéomyélites selon le site anatomique. Type I : Ostéomyélite intramédullaire, nécrose limitée à la médullaire. Type II : Ostéomyélite superficielle, nécrose à la surface exposée, Type III : Ostéomyélite localisée (séquestre cortical), nécrose bien individualisable, atteinte localisée de la corticale. Type IV : Ostéomyélite diffuse atteinte circonférentielle de la corticale. Source adaptée et illustrée à l'aide du service Smart Servier medical art (<https://smart.servier.com/>). D'après (144, 145).

Enfin, les spondylodiscites constituent une forme particulière d'ostéomyélite atteignant les disques intervertébraux et les plateaux vertébraux adjacents. L'infection est principalement hématogène, bien que l'étiologie puisse également être exogène (rare). Le point de départ se trouve au niveau du corps vertébral richement vascularisé réalisant des microthrombi septiques. La propagation se fait vers le disque intervertébral avasculaire, puis à la vertèbre adjacente. La corticale osseuse, fragilisée, peut se rompre et entraîner des complications mécaniques. Des abcès peuvent se former à partir de l'espace intervertébral et fuser en paravertébral ou épidual (Figure 18). Il s'agit de la localisation d'ostéomyélite la plus commune chez l'adulte. Le rachis lombaire est le plus fréquemment atteint, suivi des vertèbres thoraciques puis cervicales (146, 147).

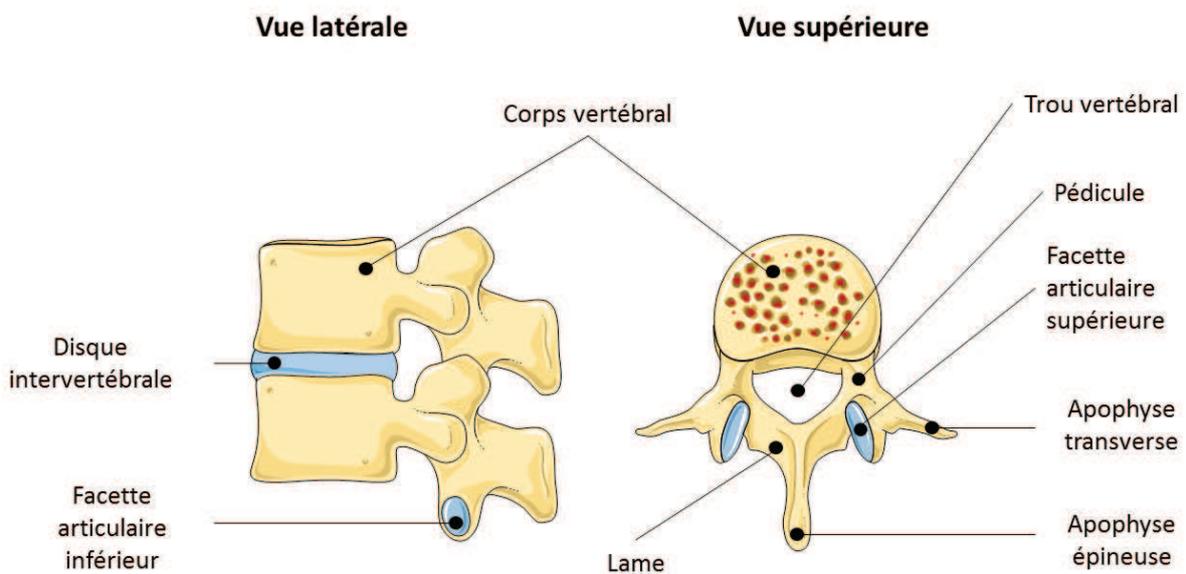


Figure 18. Schéma d'une vertèbre lombaire observée en vue latérale et supérieure. Source personnelle illustrée à l'aide du service Smart Servier medical art (<https://smart.servier.com/>).

3. Classification selon le matériel orthopédique

Les implants orthopédiques ont révolutionné l'orthopédie et sont aujourd'hui indispensables pour cette discipline. Ils sont principalement utilisés pour la fixation osseuse et le remplacement des articulations (Figure 19). Toutefois, la présence de matériel augmente considérablement le risque de développer une infection, en l'occurrence la survenue d'IOA pour le cas des matériaux orthopédiques (148). Ces derniers sont constitués de un ou plusieurs biomatériaux se définissant comme des matériaux non vivants utilisés dans un dispositif médical, à des fins thérapeutiques ou non, et appelés à interagir avec les systèmes biologiques. Les biomatériaux doivent être biocompatibles en répondant à certaines caractéristiques distinctes : (i) être non toxiques, (ii) s'intégrer aux réponses du système immunitaire de l'hôte et (iii) ne pas présenter d'effets secondaires délétères. Les biomatériaux peuvent désigner des métaux tels que l'acier inoxydable (alliage d'acier et de chrome) et le titane (Ti), les polymères de synthèse tels que le polyéthylène de masse molaire très élevée (UHMPE) ou encore les ciments liquides formulés à base de méthacrylate de méthyle.

Les infections sur matériel ostéo-articulaire, appelés aussi IMOA, sont classées selon le type de matériel impliqué dans l'infection. Les infections sur matériel d'ostéosynthèse regroupent les infections sur matériel interne (tiges, clous, vis, plaques, greffons) et les fixateurs externes. En général, le matériel interne est apposé à l'os ou situé en position centromédullaire et l'ablation est souvent impossible ou à reporter après une longue période. Concernant les fixateurs externes, ceux-ci sont utilisés en cas de traumatisme sévère, par exemple une fracture ouverte de grade III. Posé à une distance suffisante de la fracture, ils permettent de consolider les os cassés au moyen de segments métalliques munis de tiges communiquant avec l'extérieur.

Les infections sur prothèse ostéo-articulaire (IPOA) sont représentées majoritairement par les infections sur prothèse de genou, de hanche et de coude. Leur ablation ne peut être envisagée qu'au prix d'une dégradation fonctionnelle importante. Enfin, les infections sur substituts osseux constituent le 3^{ème} type d'IMOA. La guérison de l'infection sur substituts osseux nécessite presque toujours son ablation.



Figure 19. Principaux matériels médicaux utilisés en chirurgie orthopédique. (A) Plaque cervicale ANTIPOD utilisée pour la fusion cervicale du rachis ; (B) Cage cervicale élastique (CCE) utilisée pour l'adaptation à l'espace intervertébrale ; (C) Prothèse de genou modulaire rotatoire à charnière; (D) Tige fémorale. Source : <http://www.groupe-lepine.com/accueil.html>

4. Classification selon la durée d'évolution entre signes cliniques et prise en charge

La durée d'évolution représente un facteur pronostic essentiel influençant les décisions thérapeutiques comme le type de chirurgie et la durée de l'antibiothérapie. La définition du caractère aigu ou chronique n'est pas universelle au sein des différents acteurs de l'équipe médicale. En clinique, celle-ci repose sur l'étude des symptômes, le caractère aigu des IOA se présente le plus souvent avec des signes inflammatoires locaux (douleur, rougeur, chaleur) et généraux (fièvre, syndrome inflammatoire biologique), alors que les IOA chroniques ne génèrent qu'un faible syndrome inflammatoire biologique, l'absence de fièvre étant alors fréquente. Les IOA chroniques sont associées à la présence de fistules, de lésions osseuses radiologiques et de séquestres osseux, zones de tissus osseux nécrotiques bloquant la diffusion des antibiotiques et l'action du système immunitaire. En bactériologie, la présence de biofilm,

structure dynamique constituée d'une matrice extracellulaire adhésive et protectrice sécrétée par les bactéries, et la présence du morphotype Small Colony Variant (SCV), caractérisé par un métabolisme ralenti et une sensibilité moindre à certains antibiotiques, isolées des prélèvements profonds sont considérées comme des signes de passage à la chronicité au cours des IOA. Enfin, pour le chirurgien orthopédique, l'infection aiguë est celle qui serait susceptible de guérir sans ablation du matériel prothétique. Au final, le délai au-delà duquel une IOA doit être considéré comme chronique est très discuté et probablement très variable en fonction des situations. Toutefois, en l'absence de définition objective de la chronicité, un délai arbitraire de 3 à 4 semaines entre le début des signes cliniques et la prise en charge est habituellement retenu pour distinguer les IOA aiguës des IOA chroniques (149).

En cas d'IMOA, et particulièrement d'IPOA, le délai entre la pose du matériel et l'infection permet d'orienter sur le mécanisme et l'étiologie bactérienne. En plus du caractère aigu ou chronique, la classification de Trampuz et Zimmerli classe les IPOA en fonction du délai d'apparition des symptômes après l'implantation. Ainsi, se distinguent : (i) les infections précoces (délai inférieur à 3 mois entre la pose du matériel et le diagnostic), elles sont généralement provoquées par des pathogènes virulents tels que *S. aureus* ; (ii) les infections retardées (entre le 3^{ème} et le 24^{ème} mois après la pose), habituellement acquises en peropératoire et dues à des pathogènes de faible virulence, tels que les SNA ou *Propionibacterium acnes* ; et (iii) les infections tardives (après le 24^{ème} mois), presque toujours d'origine hématogène et liées souvent à des bactériémies affectant la peau, les voies respiratoires, les intestins ou les voies urinaires (150, 151). Il existe d'autres classifications, comme celle de Tsukayama qui distingue les IPA postopératoires précoces (< 1 mois), tardives (> 1 mois), hématogènes, et celles diagnostiquées devant la positivité de prélèvements bactériologiques lors d'un remplacement de prothèse présumée aseptique (152, 153). Enfin, la classification de McPherson prend en compte le type d'infection, les comorbidités et le statut immunitaire du patient, ainsi que l'état de la plaie, et est directement corrélée au pronostic des IPA (154, 155).

C. Epidémiologie

1. Données démographiques

En France, chaque séjour hospitalier, en établissement public ou privé, est enregistré dans une base nationale médico-administrative du Programme Médicalisé des Systèmes d'Information (PMSI). L'analyse des données du PMSI a permis d'évaluer l'impact médico-économique des IOA et leur épidémiologie hospitalière. Sur les 17 millions d'hospitalisations recensées en France en 2013, 48 386 cas d'IOA ont été répertoriés (8). L'incidence globale brute était de 70 / 100 000 habitants avec une fréquence augmentant avec l'âge (pic au-delà de 80 ans). Les hommes apparaissaient plus touchés que les femmes (sexe-ratio H/F = 1,6) et l'âge moyen était de 65,4 ans (Figure 20). L'arthrite septique représente 50% des cas d'IOA, suivie de l'ostéomyélite (37%) et de la spondylodiscite (10%). En plus de l'âge et des antécédents médicaux du patient (diabète, tabagisme, immunité...), la présence de matériel constitue un facteur de risque majeur pour la survenue d'IOA. Plus d'un tiers des cas (35%) concernait une IOA sur matériel (IMOA) pour lesquelles le taux de rehospitalisation était supérieur à 20%. Le risque d'infection sur IPOA après remplacement de prothèse de genou ou de hanche est de 0.5 à 2% (156, 157). Par rapport aux données de surveillance portant sur les IOA au sein de la population française en 2008, le nombre de patients concernés par les IOA a fortement augmenté (+34%). Les données apportées dans cette étude sont en phase avec les observations des autres études internationales. En l'occurrence, toutes témoignent d'un fardeau important pour les patients et les systèmes de santé accompagnés d'une incidence globale en augmentation au fil du temps (158, 159). Cette inflation de l'incidence est en adéquation avec les études qui prédisent une augmentation du nombre de poses de prothèses, de matériels d'ostéosynthèse, de substituts osseux et d'allogreffes (160, 161). En effet, pour le seul cas des poses de prothèse, plus de 100 000 prothèses totales de hanche (PTH) et 50 000 prothèses totales de genou (PTG) sont mises en place chaque année en France. Le nombre de prothèses articulaires mises en place a presque doublé ces dernières années en Allemagne et aux Etats-Unis (162). En effet, le vieillissement de la population dans les pays développés, ainsi que les nouveaux modes de vie des seniors

(voyages, sports, etc.), mais aussi des plus jeunes (sports extrêmes, motos, AVP etc.) associé au changement de mode de vie et de consommation (obésité, faible activité physique), laisse présager une augmentation exponentielle du recours à l'implantation de matériels orthopédiques, et donc des IPOA (161).

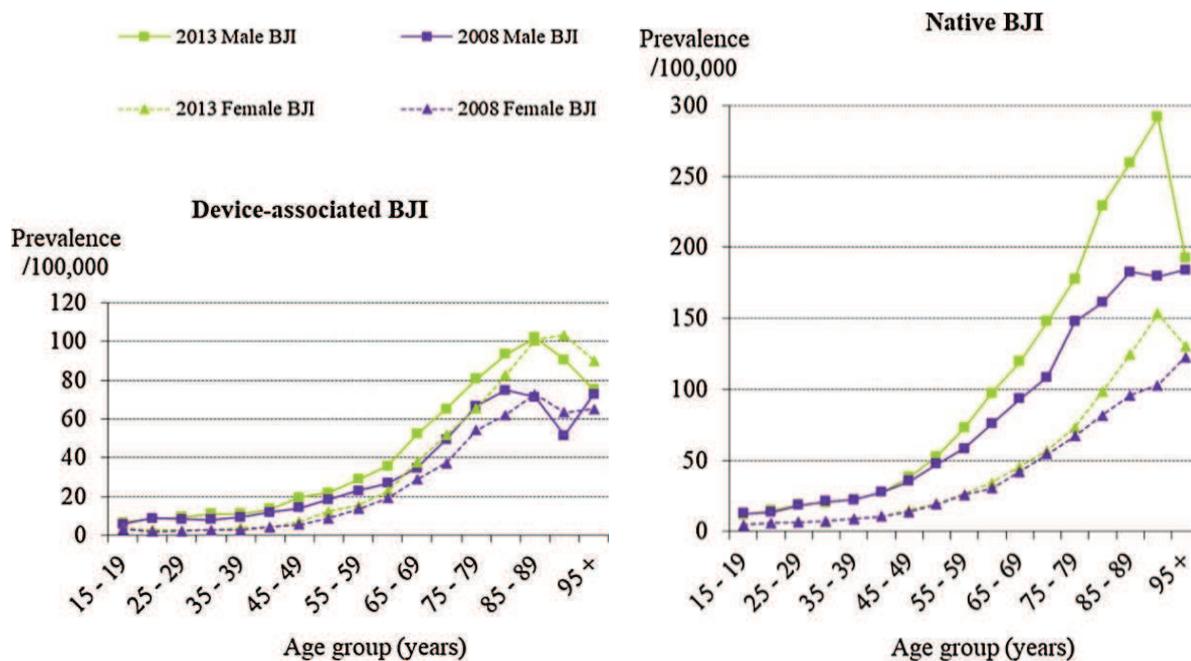


Figure 20. Prévalence des infections ostéo-articulaires (IOA) natives et sur matériel, selon le sexe et l'année 2008 vs 2013, en France. D'après (8).

2. Mortalité - Morbidité

Le taux de mortalité des patients hospitalisés souffrant d'IOA a été évalué à 5.2% en 2013, ce qui représente 1 928 décès selon les données du PMSI (2013). Le taux de mortalité est plus élevé chez les hommes que chez les femmes avec un âge moyen de 77,8 ans. Les patients qui présentaient des IOA avec une comorbidité étaient 7 fois plus susceptibles de mourir que les patients qui ne présentaient pas de comorbidité. Les principales pathologies associées aux IOA avec haut risque de mortalité sont les maladies cardiaques et vasculaires, le diabète et les plaies ulcéreuses (Figure 21).

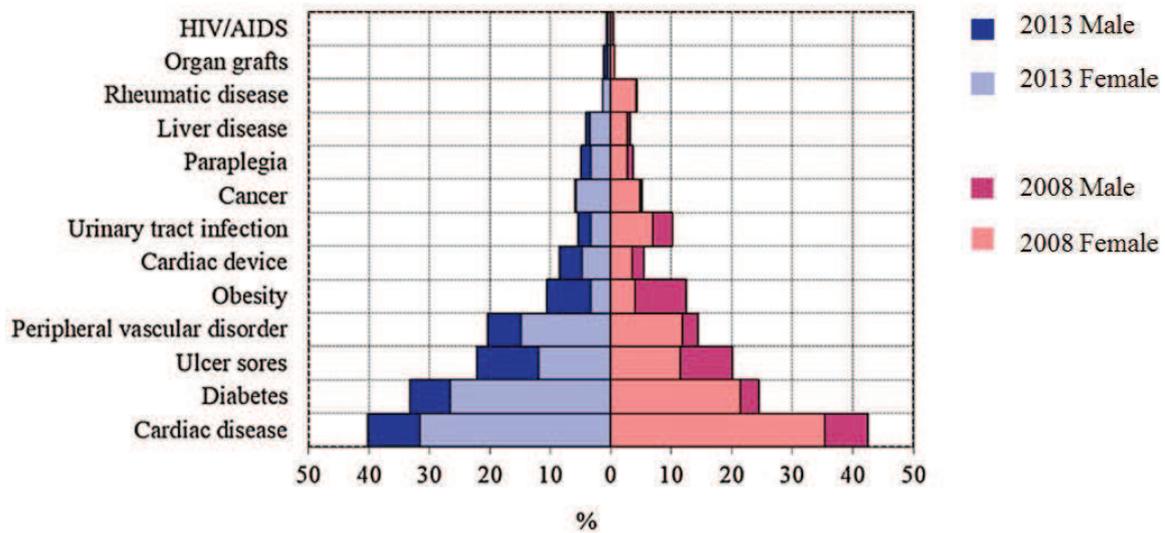


Figure 21. Comorbidités par sexe pour les infections ostéo-articulaires, 2008 vs 2013, en France. D'après (8).

En plus de présenter une létalité importante, les IOA sont associées à de lourdes séquelles impactant le fonctionnement physique et la qualité de vie des patients (autonomie, activités quotidiennes). En effet, la morbidité est évaluée à 30% pour les spondylodiscites et elle peut atteindre 40% pour le cas des arthrites septiques (132, 163-165).

3. Données économiques

Les IOA nécessitent le plus souvent une approche multidisciplinaire complexe, associant une prise en charge chirurgicale parfois lourde à une antibiothérapie prolongée initialement intraveineuse. En conséquence, ces infections nécessitent des hospitalisations prolongées d'une durée moyenne à chaque hospitalisation de 17.5 jours, qui en cas de séjour en service de chirurgie et/ou de patient avec comorbidité peut être beaucoup plus élevée (>30 jours) (8). Le coût global de prise en charge d'une infection sur prothèse articulaire (IPA) a été évalué entre 45 000 et 80 000 euros (166-168). En France, le coût total lié aux IOA pour l'assurance maladie s'élève à 450 millions € en 2013 contre 259 millions € en 2008 (151).

4. Etiologie bactérienne

La répartition des agents infectieux responsables d'IOA apparaît très hétérogène selon les études, car elle est dépendante des facteurs favorisants, de la zone géographique, du type d'infection, du sexe et de l'âge du patient. La grande majorité des IOA implique un seul pathogène (74.6 %), et sont donc qualifiées d'IOA mono-microbiennes. Les bactéries représentent clairement les micro-organismes les plus incriminés dans les IOA, elles sont isolées dans 98% des prélèvements (8). Loin derrière, les seconds micro-organismes retrouvés dans les IOA sont les champignons, représentés principalement par les levures. *Staphylococcus* représente le genre le plus prévalent (>65%) (8, 169). Une étude rétrospective publiée en 2013 dresse le bilan épidémiologique microbien des IOA du CHU de Lille. D'après les données de cette étude, l'espèce *S. aureus* représenterait 19,1 % de l'ensemble des prélèvements ostéo-articulaires (n=5006) isolés entre 2002 et 2011. *S. aureus* ne représentait que 33 % des souches de staphylocoques isolées chaque année. Les données présentées dans cette étude montrent que les SNA étaient isolés sur l'ensemble des prélèvements issus d'IOA dans 38,4 % en moyenne, ce qui suggère que les SNA sont les pathogènes les plus fréquemment mis en évidence à l'instar d'autres séries (9, 10). Toutefois, si l'on s'intéresse à l'épidémiologie bactérienne en distinguant les IOA natives sur IMOA, les prévalences bactériennes sont différentes au sein des staphylocoques. Ainsi, *S. aureus* apparaît responsable de 35 à 65 % des IOA natives, et de 12 à 23 % des infections sur matériel. En revanche, les SNA ne représentent que 5 et 17 % des IOA natives, mais sont isolés dans 30 à 43 % des infections sur matériel (170, 171). Par ailleurs, on notera que dans la majorité des séries cliniques, les SNA sont toujours considérés comme une seule entité clinique sans jamais être distingués au niveau de l'espèce. Cela a pour conséquence de limiter les informations épidémiologiques bactériennes pour ce groupe, bien qu'il constitue le groupe le plus prévalent dans les IOA considérées dans leur globalité (172). Toutefois, il existe une étude rétrospective multicentrique conduite en France qui a analysé la distribution des différentes espèces SNA isolées d'IMOA. La distribution de 215 cas IMOA liées au SNA était la suivante : *S. epidermidis* (60%), *S. capitis* (11%), *Staphylococcus lugdunensis* (10%), *S. caprae* (5%), *Saphylococcus warneri* (4%), *Staphylococcus hominis* (3%), *Staphylococcus haemolyticus* (3%) enfin les autres espèces (4%) (173). Concernant les autres

espèces, on retrouve plus rarement l'espèce *S. pseudintermedius* qui est souvent incriminée dans des infections présentant un tableau clinique très sévère (174, 175).

Parmi, les autres coques à gram positifs on retrouve aussi les streptocoques et entérocoques qui représentent pour leur part 7,7 % et 5,3 % des souches isolées. Ils sont majoritairement associés à des portes d'entrée dentaires et digestives. Les Bacilles à Gram Négatif (BGN) de type entérobactéries et non fermentants sont eux retrouvés respectivement dans 12,1 % et 4.9 % des IOA.

L'épidémiologie des infections ostéo-articulaires chez l'enfant est, elle, très différente de l'épidémiologie rencontrée chez l'adulte. *Kingella kingae* est un cocco-bacille, à Gram négatif commensal de l'oropharynx des nourrissons, récemment reconnu comme le principal germe responsable d'IOA chez l'enfant de moins de 4 ans, devançant même les staphylocoques. Le diagnostic des infections à *K. kingae* par culture de prélèvements ostéo-articulaires étant peu rentable, les nouvelles technologies de biologie moléculaire par Polymerase Chain Reaction (PCR) ont permis d'améliorer la détection de *K. Kingae*, qui est une bactérie à culture difficile car fragile une fois le prélèvement réalisé (176). Les IOA à *K. kingae*, comprenant des arthrites, des ostéomyélites et des spondylodiscites, sont le plus souvent facile à traiter et peuvent survenir sous forme de petites épidémies en collectivité (177, 178).

III. INTERACTION HOTE-PATHOGENE AU SEIN DES IOA

STAPHYLOCOCCIQUES

Le chapitre précédent a permis de définir l'ensemble des infections pouvant être regroupées sous le terme d'IOA tout en dressant de manière exhaustive les données épidémiologiques qui leurs sont associées. Cette troisième partie traitera des aspects physiopathologiques des IOA liées aux staphylocoques par la description des mécanismes mis en jeu lors de l'interaction entre le pathogène et son hôte. Nous présenterons dans un premier temps le rôle de la colonisation bactérienne qui se présente comme un facteur de risque majeur dans la survenue des IOA, puis nous détaillerons les mécanismes d'invasions cellulaires et toxiques et leurs implications dans les IOA staphylococciques. Enfin, nous traiterons du biofilm, qui se présente comme un mécanisme primordial dans l'établissement des IOA.

A. La colonisation

1. Un facteur de risque majeur

Les staphylocoques sont des colonisateurs communs de la peau des mammifères (179). Ils sont capable de coloniser à la fois les couches supérieures (couche cornée) et inférieures (couche basale) de l'épiderme des individus en bonne santé (180). *S. epidermidis* est l'espèce la plus fréquemment retrouvée dans les études de portage cutané. Considérée comme universelle, cette espèce colonise l'épiderme de l'ensemble de la population (181). Le portage de *S. aureus* est moins fréquent, environ 20 à 30% des personnes sont colonisées de façon permanente, 30% de façon intermittente alors que 50% de la population n'est jamais colonisée (14, 182). *S. hominis* et *S. capitis* sont d'autres colonisateurs cutanés fréquents chez l'Homme, ces derniers se trouvent principalement sur la tête et plus fréquemment à la puberté (181). D'autres espèces

comme *S. haemolyticus* et *S. warneri* sont retrouvés moins fréquemment sur la peau humaine. En outre, les êtres humains peuvent être colonisés de manière transitoire par des espèces qui colonisent normalement les animaux de compagnie ou de ferme, telles que *S. sciuri* ou *S. pseudintermedius*.

La transition du commensalisme à l'infection est un processus complexe et potentiellement coûteux pour les staphylocoques. Les facteurs de l'hôte tels que les brèches de la peau et l'immunosuppression facilite le passage des bactéries vers un comportement pathogène, alors que les conditions homéostatiques les biaisent vers un comportement mutualiste. Du côté bactérien, c'est essentiellement l'expression des gènes de virulence qui oriente le comportement des bactéries vers un comportement mutualiste ou pathogène (Figure 22).

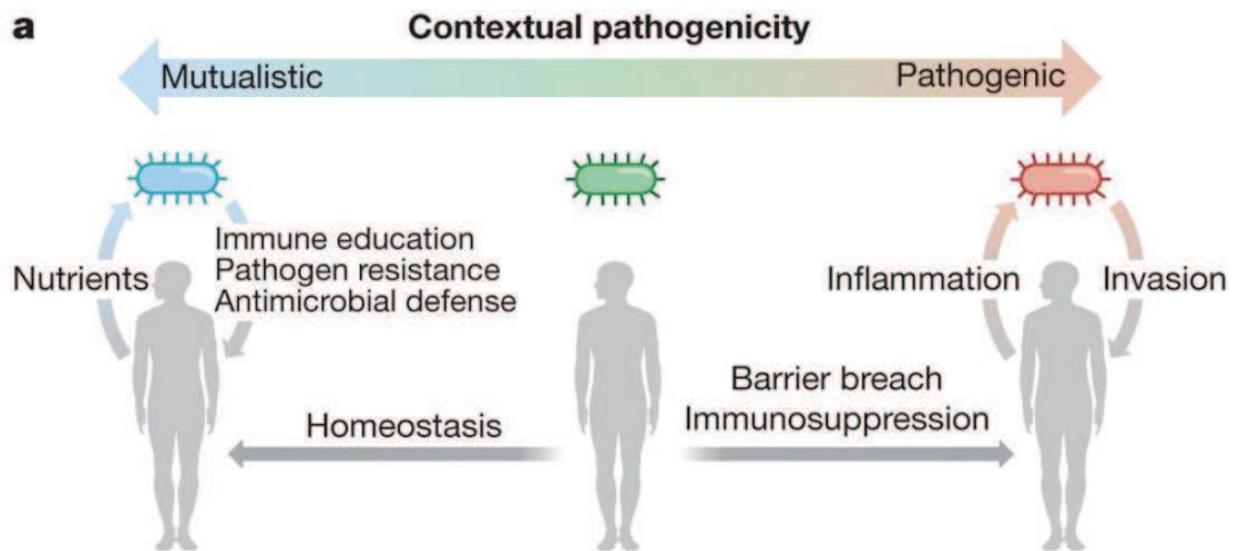


Figure 22. Transition du mutualisme à la pathogénicité orchestrée par les facteurs d’hôtes et les facteurs bactériens. D’après (183).

La colonisation nasale par *S. aureus* est un facteur de risque bien établi dans la survenue des IOA postopératoires. En utilisant des méthodes de génotypage, de type MLST et typage de la protéine A (spa-typing), Skråmm *et al.* ont confirmé que la colonisation par *S. aureus*

augmentait de 5,8 fois le risque de survenue d'infections postopératoires. Ils ont ainsi démontré que les souches *S. aureus* responsables de l'infection du site opératoire et de l'infection péri-prothétique ultérieure sont souvent génétiquement identiques à la souche isolée au niveau nasal chez le patient (184). Ainsi, l'un des principaux facteurs de modification du risque opératoire est le dépistage préopératoire de *S. aureus* associé à sa décolonisation systémique si l'espèce est présente. De nombreuses sociétés savantes comme l'IDSA (Infectious Diseases Society of America) ou la Dutch Working Party on Antibiotic Policy recommandent une décolonisation via l'utilisation d'antibiotiques comme la mupirocine avant certaines chirurgies lourdes comme les chirurgies prothétiques ou cardiaques (185-188). Cette procédure permet de réduire de manière significative le taux d'infections du site opératoire. Un essai randomisé contrôlé en double aveugle contre placebo a montré que le taux d'infections postopératoires au site chirurgical était 5 fois inférieur (0.3% et 1.7%, respectivement) après le dépistage et le traitement approprié des patients colonisés (189, 190).

Concernant les SNA, ils colonisent la peau de leurs hôtes sans avoir apparemment évolué pour causer des infections. Ils maintiennent une relation généralement commensale avec leurs hôtes ce qui soulève la question de savoir pourquoi il est avantageux pour ces espèces de maintenir un faible niveau de virulence. Massey *et al.* ont mis au point un modèle mathématique démontrant que pour une espèce présentant un niveau élevé de transmission asymptomatique, comme *S. epidermidis*, les souches avirulentes sont plus compétitives que les souches virulentes (191). La mise en évidence d'éléments permettant de distinguer les souches pouvant être invasives et pathogènes parmi celles colonisant la peau et les muqueuses à susciter beaucoup d'intérêt ces dernières années. Sur la base d'approches pangénomiques, il a été démontré que les souches invasives et commensales de *S. epidermidis* ne pouvaient être distinguées sur la base de leurs facteurs de virulence (192). De la même manière, aucune différence n'a été observée entre les souches de portage et les souches invasives quant aux adhésines, reflétant leur importance aussi bien dans la colonisation que dans l'infection (193). Enfin, une étude récente a montré l'impossibilité de différencier les deux groupes de souches de *S. epidermidis* commensales ou invasives sur la base des capacités de formation de biofilm et d'internalisation dans les cellules de l'hôte (194). Ces données renforcent l'hypothèse retenue par certains

auteurs selon laquelle les souches de portage et les souches invasives constituent une seule et même entité microbiologique. La colonisation est donc généralement considérée comme une condition préalable à la plupart des infections à staphylocoques. L'opportunisme de ces espèces, considérées comme des « pathogènes accidentels », suggère que la fréquence des infections est en grande partie déterminée par (i) l'abondance de ces espèces sur le corps humain, comme l'atteste le chiffre de 60% d'IPOA due à *S. epidermidis*, premier agent commensal chez l'homme et par (ii) des conditions spécifiques liées à l'hôte (193, 195).

2. Résistances aux pressions physico-chimiques et immunologiques

Une colonisation efficace exige une résistance importante aux pressions environnementales de la barrière cutanéomuqueuse. En premier lieu, les bactéries doivent supporter les forces mécaniques s'exerçant à la surface de l'épiderme telles que le renouvellement de l'épithélium, le frottement physique et l'écoulement fluïdique (196).

En plus des stress mécaniques, la transpiration entraîne des modifications considérables de la concentration en sel et du pH. Les glandes sudoripares qu'elles soient eccrines ou apocrines, sécrètent de l'eau et des électrolytes contribuant à l'augmentation de la concentration saline et à l'acidification de la peau. Par ailleurs, les glandes sébacées ayant pour fonction la production du sébum, participent également de manière indirecte à cette acidification du pH. En effet, les triglycérides contenus dans le sébum sont dégradés par les bactéries propioniques comme *Propionibacterium acnes* pour produire des acides gras libres, qui contribuent au pH acide de la surface cutanée (197, 198). Le dessèchement de la peau représente aussi un frein pour la colonisation bactérienne. Les zones cutanées les plus humides sont retrouvées au niveau des glandes sudoripares. Toutefois, la densité des glandes diffère considérablement entre les différentes zones de la peau. Les bras et les jambes, présentant une plus faible densité en glandes sudoripares, sont plus secs et contiennent par conséquent des densités plus faibles de bactéries. Enfin, les différences de température cutanée des différentes zones du corps peuvent entraîner des différences de degré de colonisation bactérienne (196).

Face aux stress environnementaux, les staphylocoques ont développé plusieurs stratégies de survie. En réponse aux conditions osmotiques élevées, en particulier dans les environnements riches en sel, le transport de composés organiques, appelés osmoprotecteurs est un élément essentiel pour la survie des staphylocoques. Ces molécules servent de solutés cytoplasmiques qui équilibrent les relations de l'eau, sans interférer avec les activités cytoplasmiques. L'accumulation de ces osmoprotecteurs, tels que la choline, la proline et la glycine bêtaïne, se réalise par l'intermédiaire de systèmes de transports comme les systèmes PutP, OpuC et OpuD chez *S. aureus* (199). Une activité osmoprotectrice a également été constaté chez certaines espèces SNA, comme pour les espèces *S. epidermidis* et *S. saprophyticus*. Dans un milieu prédéfini avec une force osmotique influencée par la concentration en NaCl, ces espèces ont présenté une meilleur survie en présence d'osmoprotecteurs tel que la proline, la glycine bêtaïne et la proline bêtaïne, avec une efficacité de survie supérieur en présence de la proline bêtaïne (200). Récemment, Vermassen *et al.* ont montré par des études transcriptomiques que l'espèce *Staphylococcus xylosus* était capable de répondre au stress osmotique généré par le sel par une surexpression des gènes impliqués dans le transport et la synthèse des osmoprotecteurs, ainsi que dans l'extrusion des ions Na⁺ et H⁺. Une sous expression du gène *mscL*, codant pour un canal mécanosensible à grande conductance a également été constatée. Ainsi, la bactérie empêche l'efflux d'eau et maintient son intégrité physique (201) (Figure 23).

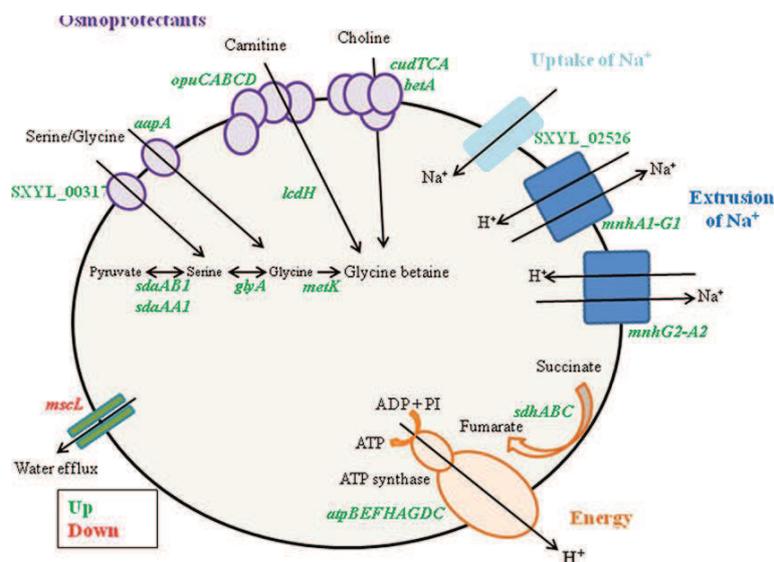


Figure 23. Réponse au stress osmotique chez l'espèce *S. xylosus*. D'après (201).

En plus d'une barrière physique, la peau forme également une barrière immunologique constituée essentiellement par la présence de nombreuses cellules immunitaires résidentes dans l'épiderme et le derme. Celles-ci incluent (i) les cellules dendritiques, appelées aussi cellules de Langerhans, et les macrophages dans l'épiderme, (ii) les cellules dendritiques myéloïdes et plasmacytoïdes, les mastocytes, les lymphocytes T et B, les cellules plasmiques et les cellules NK (Natural Killer) dans le derme. En plus des cellules immunes, les kératinocytes de l'épiderme sont équipés de récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires (Pattern Recognition Receptor, PRRs), tels que les récepteurs membranaires de type Toll (Toll-like receptors, TLR) et les récepteurs cytoplasmiques NOD (Nucleotid-binding Oligomerization Domain proteins, NLR) qui reconnaissent des motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP). Après la reconnaissance des PAMP, les PRRs déclenchent l'activation du facteur de transcription NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) qui contrôle la production de médiateurs pro-inflammatoires comme les cytokines (chimioquinas et interleukines) et les peptides antimicrobiens (PAMs). Les PAMs jouent un rôle majeur dans l'action du système immunitaire inné sur la peau. Ils sont pour la plupart cationiques : on compte parmi eux les défensines et les cathélicidines qui agissent par liaison aux membranes des staphylocoques chargées négativement (anionique) par forces électrostatiques. Il en résulte une agrégation des peptides entraînant la formation de canaux affectant la perméabilité de la membrane des bactéries. Des PAMs de nature anionique existent également sur les surfaces cutanées, notamment la dermcidine, principalement sécrétée par les glandes sudoripares eccrines. Leur mode d'action est indépendante de la charge membranaire staphylococcique et de la charge peptidique. En effet, la dermcidine agit directement sur la synthèse de l'ARN et des protéines de la bactérie (202-204). Les cellules épithéliales sont également capables de sécréter une enzyme aux propriétés lytiques, appelée le lysozyme. Cette enzyme lyse la paroi des bactéries en s'attaquant au peptidoglycane par hydrolyse des liaisons covalentes entre l'acide N-acétyl-muramique et le 4^e atome de carbone du N-acétyl-glucosamine (205, 206). La Table 1 présente les principaux PAMs retrouvés sur la peau humaine reconnus pour leurs actions sur les staphylocoques.

Tableau 1. Peptides antimicrobiens (PAMs) humains et protéines présentes sur la peau décrits pour leurs activités anti-staphylococciques. Adapté d'après (179).

PAMs	Taille (kDa)	Cellules sécrétrices	Espèces pour lesquelles une activité a été démontrée
Defensins			
hBD-1	47 aa; 5.0 kDa	Keratinocytes, sebocytes	Aucune activité à la concentration en sel physiologique
hBD-2	41 aa; 4.3 kDa	Keratinocytes, sebocytes	Aucune activité à la concentration en sel physiologique
hBD-3	45 aa; 5.2 kDa	Keratinocytes	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>
hBD-4	50 aa; 6.0 kDa	Keratinocytes	<i>S. aureus</i>
Cathelicidins			
LL-37	37 aa; 4.5 kDa	Keratinocytes, sebocytes	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>
Autres			
Dermcidin (DCD-1)	47 aa; 4.7 kDa	Eccrine sweat glands	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>
Adrenomedullin	52 aa; 6 kDa	Keratinocytes, sebocytes, follicule pileux, glandes sudoripares	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>
Elafin (SKALP)	57 aa; 6.0 kDa	Keratinocytes	<i>S. aureus</i>
Protéines & Peptides			
Lysozyme	130 aa; 14.7 kDa	Keratinocytes, sebocytes, follicules pileux	<i>S. simulans</i> , <i>S. sciuri</i> etc
Antileukoprotease (ALP, SLPI)	107 aa; 14 kDa	Keratinocytes	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>
Psoriasin	101 aa; 11.5 kDa	Keratinocytes, sebocytes	<i>S. aureus</i>
RNase7	128 aa; 14.5 kDa	Keratinocytes	<i>S. aureus</i>

Malgré cette pression immune, les staphylocoques représentent les principaux colonisateurs bactériens de la peau humaine. Plusieurs mécanismes efficaces permettant de lutter contre l'action des PAMs ont été rapportés. Les staphylocoques ont la capacité de sécréter des protéases présentant de grandes spécificités de substrat capables de dégrader les PAMs. Ainsi, il a été démontré que la protéase SepA décrite chez *S. epidermidis* dégrade la β -Defensin-3 (hBD-3) et la dermcidine (207). De façon identique, *S. aureus* sécrète une protéase hétérologue, l'aureolysine, capable de dégrader la cathelicidine LL-37 (208). Une autre protéine codée par un bactériophage inséré dans le chromosome de *S. aureus*, appelée la staphylokinase, présente une action contre les PAMs. Une fois sécrétée, cette protéine se lie aux α -défensines, supprimant ainsi l'activité antimicrobienne par séquestration (209). La présence des gènes codant pour une staphylokinase-like a été décrite chez plusieurs espèces de staphylocoques comme *S. aureus*, *S. epidermidis* et *S. sciuri* (210-212). En outre, il existe des transporteurs situés sur la membrane des bactéries qui exportent les PAMs dans le compartiment extracellulaire. Dans un modèle de mesure des concentrations minimales inhibitrices (CMI) en PAMs, utilisant des souches *S. aureus* MW2 isogéniques pour les gènes *vraFG*, Li *et al.* ont mis en évidence un rôle important du transporteur *vraFG* dans la résistance aux PAMs cationiques. Ils ont constaté des CMI jusqu'à 15 fois inférieures chez les souches délétées pour *vraFG* par rapport aux souches mères. En revanche, aucune action du transporteur n'a été constatée pour les PAMs anioniques (dermcidine) (213).

Enfin, de nombreuses espèces de staphylocoques sont résistantes à l'activité enzymatique du lysozyme, notamment *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. xylosus* et *S. lugdunensis*. Des études conduites par mutagenèse dirigée ont montré que l'enzyme OatA, formant le O-acétyle du peptidoglycane, est le principal facteur contribuant à cette résistance face à l'action du lysozyme (206, 214, 215).

3. Adhésion aux tissus de l'hôte

Une exigence essentielle de la colonisation des surfaces de l'hôte est l'adhérence aux cellules de l'hôte. L'adhésion aux tissus est conditionnée par des adhésines microbiennes, connues sous le nom de cell wall-anchored proteins (CWA). Essentielles au succès de l'organisme en tant que bactéries commensales mais également en tant qu'agents pathogènes, ces adhésines considérées comme des facteurs de virulence favorisent le maintien des bactéries sur les surfaces tissulaires par des liaisons puissantes qui empêchent le détachement des bactéries soumises aux forces physiques mentionnées ci-dessus. Les protéines CWA se caractérisent par la présence d'une séquence signal de sécrétion dépendante du système d'exportation « Sec » à l'extrémité amino-terminale des protéines CWA et un signal de tri qui comprend (i) un motif de clivage LPXTG par une sortase, (ii) un domaine hydrophobe et (iii) une succession de résidus chargés positivement à l'extrémité C-terminale. Les deux derniers sous-domaines retiennent la protéine dans la membrane lors de la sécrétion, ce qui permet aux sortases telle que la sortase A (SrtA) de se lier au motif conservé LPXTG et d'exercer leurs fonctions de transpeptidase permettant de lier la protéine de surface au pont peptidique du peptidoglycane (216, 217). Foster *et al.* propose une classification des protéines CWA en quatre groupes définis sur la base de la présence de motifs spécifiques : (i) la famille MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules), définie par des domaines repliés de type IgG-like, (ii) la famille des protéines à motif NEAT (Near iron transporter), impliquée dans la capture de l'hème à partir de l'hémoglobine, (iii) la famille des protéines organisées en faisceaux à triple hélices répétées en tandem et (iv) la famille de protéines au motif G5 – E répétées, caractérisés par cinq résidus de glycine conservés qui adoptent un pli de type β en triple hélice (Figure 24) (218).

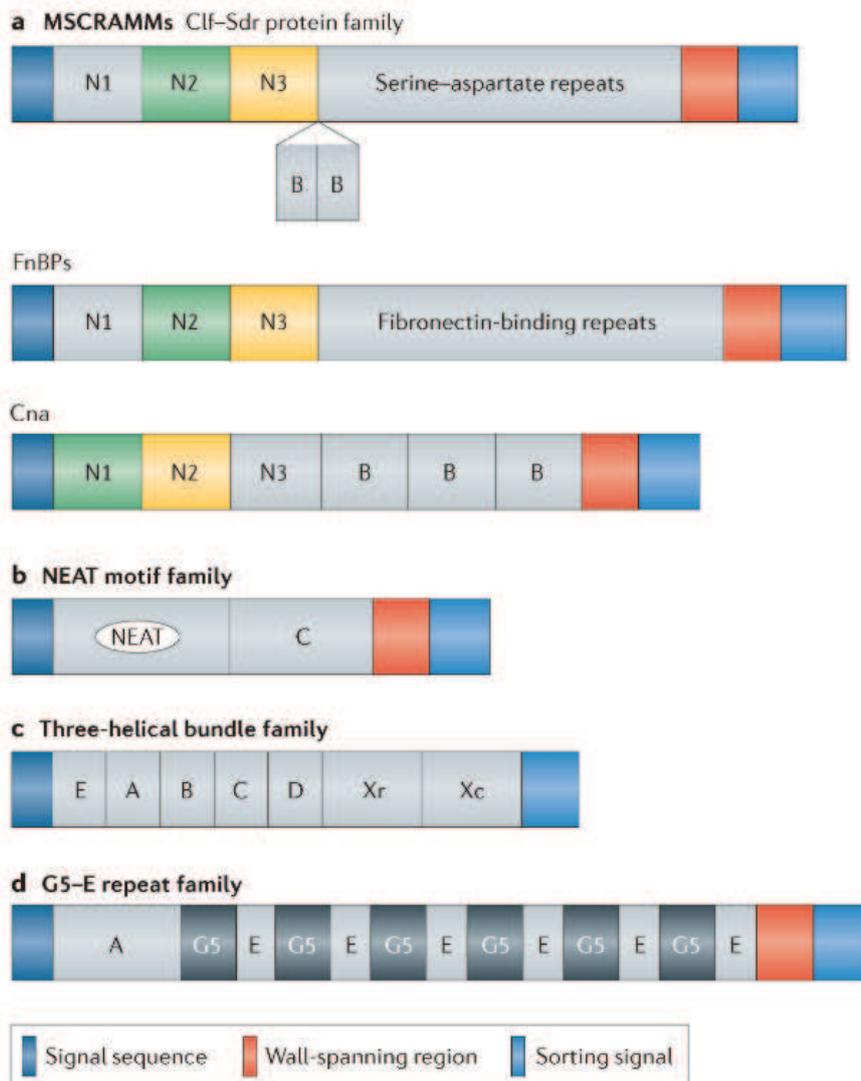


Figure 24. Classification des protéines CWA sur la base de motifs structuraux. (a) Microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs). Les MSCRAMMs sont des protéines étroitement liés à la protéine clumping factor A (ClfA) présentant un motif de répétition serine-aspartate (Sdr). (b) Famille des protéines à motif NEAT (Near iron transporter), (c) Famille des protéines organisées en faisceaux à triple hélices répétées en tandem. (d) Famille de protéines au motif G5 – E répétés. D’après (218).

Parmi les protéines CWA, les MSCRAMMs représentent le groupe le plus important pour la colonisation bactérienne (219, 220). Ces protéines se lient avec des degrés variables aux protéines de la matrice extracellulaire de l’hôte (MEC), telles que la fibronectine, le fibrinogène, la laminine et la vitronectine. Les MSCRAMMs sont généralement composés d’une partie

étendue qui recouvre la paroi cellulaire du staphylocoque et d'une partie exposée qui interagit avec la protéine hôte (Figure 25).

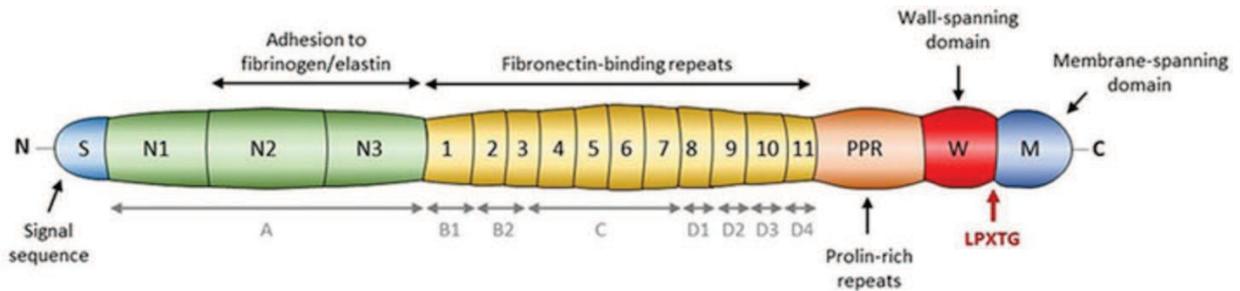


Figure 25. Représentation schématique d'une protéine MSCRAMMs : La protéine FnBPA de *S. aureus*. Les MSCRAMMs présentent une organisation commune de domaine structural : une séquence signal (S) suivie d'un domaine de liaison au ligand (A), d'une région répétée B (B), d'une région de répétition (R), d'une région couvrant la paroi (W), d'un motif LPXTG; région transmembranaire (M); d'un domaine cytoplasmique (C). D'après (221).

Il existe une redondance fonctionnelle significative parmi les MSCRAMMs staphylococciques, ce qui permet de garantir que cette étape critique de la colonisation des tissus soit réalisée de manière efficace (Tableau 2). En revanche, il existe une spécificité d'hôte qui dépend des variations inter-espèces entre les différentes adhésines. Ainsi, une étude ayant porté sur 28 isolats de *S. epidermidis* d'origine humaine, n'a montré aucune adhérence significative au stratum corneum bovin, alors que la majorité des souches (93%) adhéraient au stratum corneum humain (222).

En plus d'un rôle majeur dans la colonisation des tissus de l'hôte, les MSCRAMMs jouent un rôle pivot dans d'autres mécanismes de virulence notamment dans la formation du biofilm et dans l'internalisation des bactéries au sein des cellules de l'hôte (221, 223).

Tableau 2. Protéines staphylococciques de type CWA et récepteurs humains connus correspondant. Adapté d'après (180).

Récepteurs Hôte	Adhésines	Espèces	Réf.
Collagène de type I	Cna	<i>S. aureus</i>	(224)
	Eap/Map	<i>S. aureus</i>	(225)
	Emp	<i>S. aureus</i>	(226)
	GehD	<i>S. epidermidis</i>	(227)
	SdrF	<i>S. epidermidis</i>	(228)
	SdrL	<i>S. saprophyticus</i>	(229)
Cytokeratin-10	ClfB	<i>S. aureus</i>	(230)
	IsdA	<i>S. aureus</i>	(231)
Fibrinogène	Aaa	<i>S. aureus</i>	(232)
	Atl	<i>S. aureus</i>	(233)
	ClfA	<i>S. aureus</i>	(234)
	ClfB	<i>S. aureus</i>	(235)
	Eap/Map	<i>S. aureus</i>	(225)
	Emp	<i>S. aureus</i>	(226)
	AtIL	<i>S. lugdunensis</i>	(236)
	SdrG	<i>S. epidermidis</i>	(237)
	Fbl	<i>S. lugdunensis</i>	(238, 239)
	FnbpA	<i>S. aureus</i>	(240)
	FnbpB	<i>S. aureus</i>	(240)
	IsdA	<i>S. aureus</i>	(241)
	SpsD	<i>S. pseudintermedius</i>	(242)
SpsL	<i>S. pseudintermedius</i>	(242)	
UafB	<i>S. saprophyticus</i>	(243)	
Fibronectine	Aaa	<i>S. aureus</i>	(232)
	Aae	<i>S. epidermidis</i>	(244)
	Aas	<i>S. saprophyticus</i>	(245)
	AtIC	<i>S. caprae</i>	(246)
	Atl	<i>S. aureus</i>	(233)
	AtIL	<i>S. lugdunensis</i>	(236)
	Eap/Map	<i>S. aureus</i>	(225)
	Emp	<i>S. aureus</i>	(226)
	EmbP	<i>S. epidermidis</i>	(247)
	FnbpA	<i>S. aureus</i>	(240)
	FnbpB	<i>S. aureus</i>	(240)
	IsdA	<i>S. aureus</i>	(241)
	SdrG	<i>S. epidermidis</i>	(248, 249)
	SdrI	<i>S. saprophyticus</i>	(250)
	SpsD	<i>S. pseudintermedius</i>	(242)
	SpsL	<i>S. pseudintermedius</i>	(242)
UafB	<i>S. saprophyticus</i>	(243)	
Involucrin	IsdA	<i>S. aureus</i>	(231)
Keratinocyte lipids/glycolipids	Pls	<i>S. aureus</i>	(251)
Loricrin	ClfB	<i>S. aureus</i>	(252)
	IsdA	<i>S. aureus</i>	(231)
Vitronectine	AtIE	<i>S. epidermidis</i>	(253)
	AtIL	<i>S. lugdunensis</i>	(236)

B. Internalisation et persistance

Longtemps considérées comme des bactéries extracellulaires exclusives, la capacité de certaines espèces de staphylocoques à être internalisées et à persister dans des cellules a été décrite. Ce phénotype a été rapporté dans différents types de cellules hôtes qualifiées de « phagocytes non professionnels » telles que les ostéoblastes mais également les cellules épithéliales, endothéliales, ou encore les myoblastes (236, 254-259). La présence intracellulaire des staphylocoques est souvent évoquée dans un contexte infectieux. Toutefois, la présence de staphylocoques dans les cellules les plus profondes de l'épiderme des individus en bonne santé a également été détectée (Figure 26) (260).

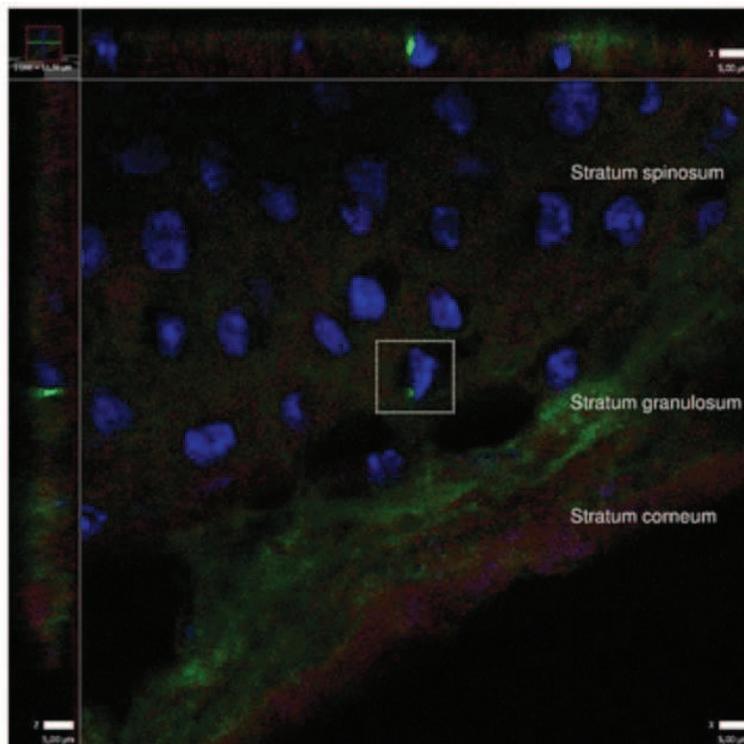


Figure 26. Localisation intracellulaire de staphylocoques dans les cellules épithéliales d'un individu sain observées par microscopie confocale à balayage laser de coupes congelées de biopsie nasale. Les bactéries sont détectées par immunomarquage en émettant une fluorescence verte. La projection est construite à partir de plans successifs Z (0,2 µm d'épaisseur) à l'objectif x63. L'image à gauche et en haut correspondent à une vue verticale dans le plan Z. D'après (260).

La capacité d'invasion des cellules a été démontrée dans plusieurs modèles *in vitro* et *ex vivo* utilisant des cellules phagocytaires non professionnelles de différentes espèces animales comme l'Homme ou la souris (Figure 27) (261, 262).

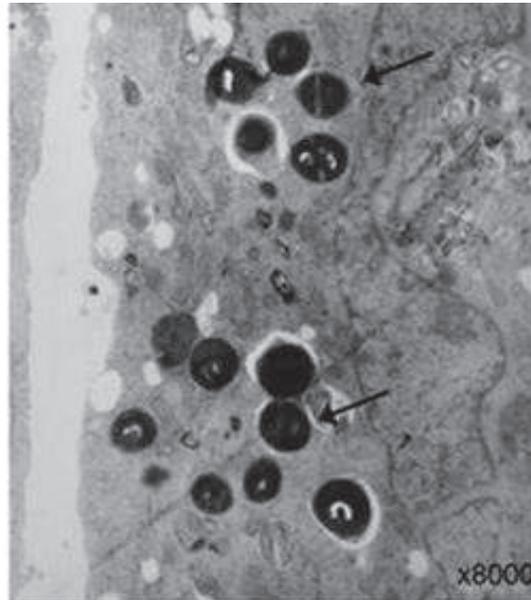


Figure 27. Photographie au microscope électronique à transmission de cellules endothéliales bovines infectées par *S. epidermidis*. Les flèches indiquent les bactéries en division avec un septum. (Grossissement $\times 8000$). D'après (263).

L'internalisation est un phénomène également observée *in vivo* (264). Ainsi, Bosse *et al.* ont par exemple rapporté le cas d'un patient âgé de 73 ans souffrant d'une ostéite fibulaire chronique et récurrente, chez lequel une biopsie osseuse a été réalisée. En microscopie électronique, cette biopsie a révélé la présence de staphylocoques à l'intérieur d'ostéocytes et des ostéoblastes (Figure 28).

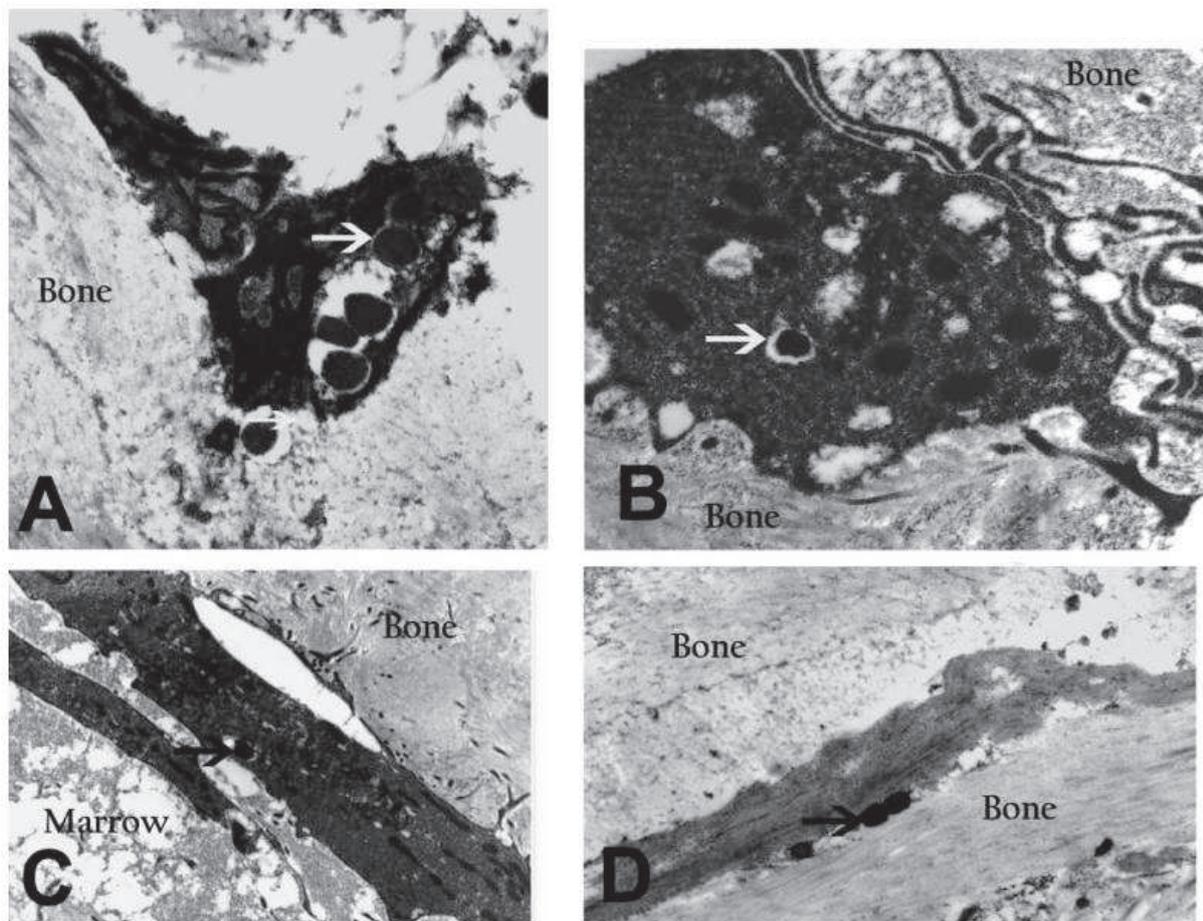


Figure 28. Photographies en microscopie électronique à transmission de staphylocoques dans les ostéocytes (A et B x 15,000), les ostéoblastes (C x 5,000) et la matrice osseuse (D x 15,000). D'après (264).

Dans le contexte des IOA, l'internalisation n'est pas un mécanisme indispensable dans l'établissement de l'infection. En revanche, celle-ci rend les IOA particulièrement difficiles à traiter. A l'abri des cellules immunitaires et des antibiotiques, les bactéries intracellulaires constituent un réservoir bactérien pouvant expliquer la chronicité et les rechutes des IOA observées cliniquement. La résistance vis-à-vis des antibiotiques s'opère d'une part par la restriction du spectre antibiotique capable de pénétrer le compartiment intracellulaire des cellules eucaryotes et d'autre part par l'émergence de populations bactériennes phénotypiquement différentes en réponse aux conditions de stress intracellulaire. Ellington *et al.* ont ainsi mis en évidence par microscopie électronique à transmission (MET) une

augmentation par 10 de l'épaisseur de la capsule après 24h de persistance intracellulaire de *S. aureus* dans un modèle d'infection d'ostéoblastes humains (265).

L'internalisation des staphylocoques dans les cellules hôtes est un mécanisme largement décrit pour l'espèce *S. aureus*. Il est en effet maintenant bien établi que du côté de la bactérie, l'entrée dans les cellules phagocytaires non professionnelles, telles que les ostéoblastes, repose sur un processus passif démontré par le fait que les staphylocoques qu'ils soient vivants ou tués par la chaleur présentent la même capacité d'internalisation (262). La seule présence, sur la paroi de la bactérie, d'adhésines de type FnBP (Fibronectin Binding Protein, FnBP) staphylococciques liant la fibronectine (Fn) suffit pour assurer l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules hôtes (266). Il existe en fait chez *S. aureus* deux protéines homologues FnBPA et FnBPB présentant une multitude de régions répétées à fortes affinités pour la fibronectine avec lesquelles cette dernière interagit à la surface de la bactérie en formant une structure de type « fermeture éclair » (267, 268). Sur le versant cellulaire, le mécanisme d'internalisation repose sur un processus actif s'apparentant à un phénomène d'endocytose. Plusieurs études ont démontré que l'intégrine humaine $\alpha_5\beta_1$, présente sur la membrane cellulaire, fonctionne comme un co-ligand de la fibronectine (269). Une liaison tripartite FnBPs bactériennes, fibronectine plasmatique et intégrine cellulaire $\alpha_5\beta_1$ déclencherait l'internalisation de la bactérie dans le compartiment cytosolique de la cellule hôte (Figure 29). Bien que les FnBPs jouent évidemment un rôle essentiel dans le processus physiopathologique d'internalisation, les souches délétées en FnBPs continuent néanmoins à être internalisées mais à des niveaux bien inférieurs ce qui démontre l'existence de mécanismes annexes (233). L'intervention d'une autre adhésine de *S. aureus*, la protéine d'adhérence extracellulaire Eap, a été démontrée. Cette dernière permet l'internalisation de *S. aureus* et peut compenser au moins partiellement la perte des FnBP (257, 270). Cette adhésine naturellement sécrétée est impliquée dans l'agrégation bactérienne, l'adhésion et l'invasion des cellules épithéliales et fibroblastiques et dans l'inhibition du recrutement de neutrophiles (271-274). Bien que l'interaction entre Eap et le récepteur ICAM-1 ait déjà été décrite, aucune étude n'a encore démontré de façon définitive le rôle du récepteur ICAM-1 dans le processus d'internalisation de *S. aureus* (275). Un autre indice témoignant que la voie FnBP-Fn- $\alpha_5\beta_1$ n'est pas le seul mécanisme d'internalisation, est l'inhibition incomplète de

l'internalisation par le blocage de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ ou de la Fn par des anticorps. Ainsi, dans l'étude de Kintarak *et al.* l'utilisation d'un anticorps anti- $\alpha_5\beta_1$ induisait une réduction de 85% de l'internalisation de *S. aureus* dans les kératinocytes H357 (276, 277). L'internalisation de *S. aureus* est donc un processus complexe et implique probablement plusieurs facteurs.

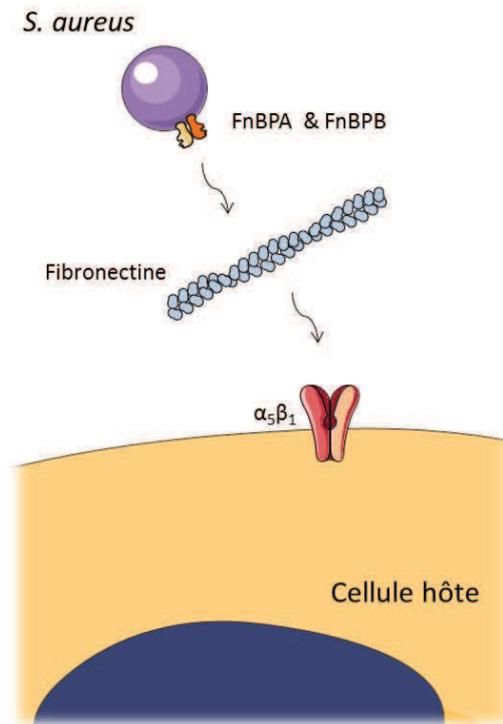


Figure 29. Mécanismes d'internalisation dans les cellules hôtes par *S. aureus*. L'internalisation de *S. aureus* nécessite une liaison tripartite entre les FnBPs, la fibronectine de la matrice extracellulaire et l'intégrine cellulaire $\alpha_5\beta_1$. (Source personnelle).

En ce qui concerne la capacité des SNA à être internalisés par les ostéoblastes, les rares données disponibles sont controversées. En effet, en utilisant six souches *S. epidermidis* dont seulement une souche clinique isolée d'une IOA, Khalil *et al.* ont rapporté que *S. epidermidis* est capable d'envahir les ostéoblastes humains (MG63) via une voie indépendante de la fibronectine (258). Les résultats de ces auteurs indiquaient que les souches *S. epidermidis* ont des capacités très variables pour envahir les cellules osseuses. Trois des souches examinées n'envahissaient pas les cellules osseuses à un niveau quantifiable, tandis que les trois autres souches étaient rapportées

comme capables de s'internaliser, bien que les niveaux d'internalisation étaient jusqu'à 12 fois différents d'une souche à l'autre (10 000 et 120 000 Unité Formatrice de Colonie ; UFC) correspondant à 0.24 % de l'inoculum de départ pour la souche présentant le phénotype le plus marqué. En revanche, en utilisant un plus large panel d'isolats cliniques d'IOA (n=22), Valour *et al.* ont démontré à l'aide d'un modèle d'infection *in vitro* de type « Gentamicin Protection assay » (GPA) avec des ostéoblastes MG63, que les taux d'internalisation de *S. epidermidis* dans les ostéoblastes étaient extrêmement faibles suggérant que ce mécanisme n'est probablement pas impliqué dans les IOA à *S. epidermidis* (278). En effet, ces auteurs ont constaté un niveau d'internalisation de 5 000 UFC correspondant à 0.013 % de l'inoculum de départ. Des études ont également été conduites chez d'autres espèces de SNA, les travaux de Hussain *et al.* suggèrent que *S. lugdunensis* est capable d'envahir les cellules endothéliales, épithéliales et fibroblastiques. En effet, ces auteurs rapportent le rôle important de l'adhésine/autolysine AtIL dans l'internalisation de *S. lugdunensis* par les cellules eucaryotes (236). Au contraire, Campoccia *et al.* n'ont rapporté aucune internalisation de cet agent pathogène dans les ostéoblastes humains (MG63) et suggèrent donc que l'invasion n'est pas un mécanisme impliqué dans les IOA liées à cette espèce (279). Cette question reste donc à éclaircir pour les espèces citées ci-dessus et à explorer pour les autres espèces de SNA.

C. Les mécanismes toxiques

La sévérité des IOA staphylococciques est en grande partie liée à la production de toxines. La sécrétion de celles-ci conduit à un degré plus élevé d'inflammation et à une destruction du tissu cartilagineux et osseux plus importante qui a pour conséquence un développement plus efficace de l'infection (280, 281). Les toxines sont généralement définies comme des substances toxiques pour les cellules humaines et animales synthétisées par les micro-organismes. Elles peuvent être regroupées en trois catégories : (i) les toxines à tropisme membranaire, qui peuvent fonctionner avec un récepteur ou de façon non spécifique (récepteur-indépendante), (ii) les toxines superantigéniques et (iii) les exfoliatines. Dans le contexte physiopathologique des IOA, les toxines à tropisme membranaire sont celles qui jouent le rôle le plus important. En effet, elles participent activement à la sévérité de ces infections, considérées comme des

infections aiguës. Ces toxines ont pour cible principale la membrane plasmique des cellules de l'immunité (polynucléaires, macrophages). Après sécrétion dans le milieu extracellulaire, elles entraînent la formation d'un pore à la surface de la cellule, provoquant l'efflux de métabolites dans le milieu extracellulaire et donc la mort de la cellule (Figure 30) (282).

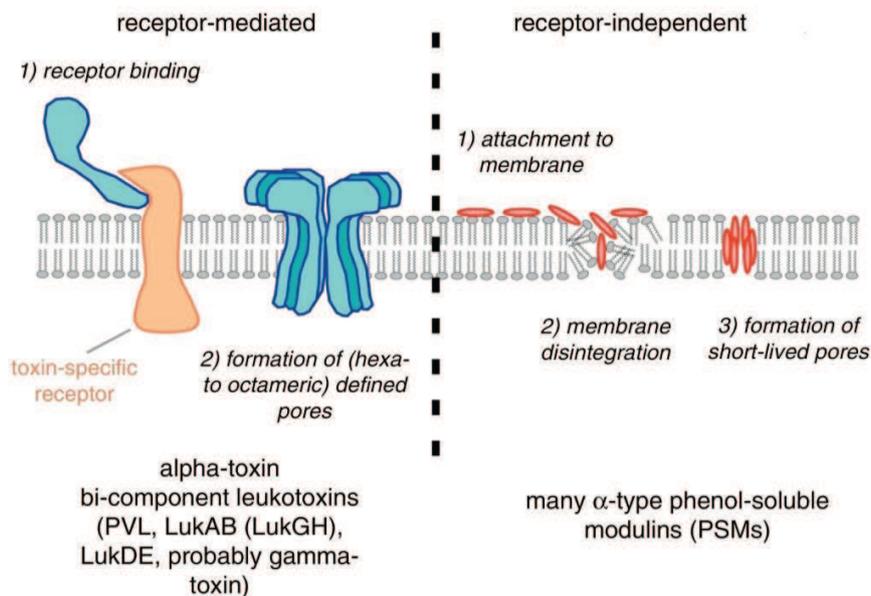


Figure 30. Schéma représentant le mécanisme d'action des toxines membranaires. Les toxines à récepteur dépendant se lient aux récepteurs spécifiques sur lesquels se forme un pore défini. Les toxines à récepteur non dépendant s'attachent à la membrane cytoplasmique d'une manière non spécifique et entraînent une désintégration membranaire. D'après (283).

On distingue deux classes de toxines au sein des toxines membranaires. La première regroupe les toxines synergohyménotropes, qui sont des toxines à deux composantes, non associées mais agissant en synergie. La seconde classe regroupe les toxines cytotoxiques pouvant agir de façon individuelle afin de conduire à la formation de pores comme les hémolysines α et β ou encore les phénols-soluble modulins (PSMs).

Parmi les toxines synergohyménotropes, la leucocidine Pantone-Valentine (PVL) est sans aucun doute la toxine qui a été la plus documentée chez *S. aureus*. En plus d'un rôle dans la gravité des infections de la peau et des muqueuses, telles que les abcès cutanés ou les fasciites nécrosantes, la sécrétion de PVL a également été mise en évidence dans les infections ostéo-

articulaires sévères (284-286). En clinique, Dohin *et al.* ont mené une étude basée sur des données cliniques, microbiologiques et biochimiques visant à comparer les IOA liées aux souches *S. aureus* à PVL positif et celles liées aux souches à PVL négatif. Les résultats de cette étude clinique ont montré que les IOA liées aux *S. aureus* à PVL positif étaient statistiquement plus sévères et nécessitaient un traitement plus prolongé. Ainsi, les IOA liées aux *S. aureus* à PVL positif étaient plus à même de provoquer des complications locales et nécessitaient souvent un drainage chirurgical répété (287). Dans un modèle d'ostéomyélite de lapin, en utilisant une souche clinique *S. aureus* appartenant à la lignée USA300 et son mutant isogénique $\Delta lukS/F-PV$, Crémieux *et al.* ont démontré une implication de la PVL dans les complications locales, telle que la déformation osseuse et la formation d'abcès musculaires (288). Le rôle des leucocidines dans la pathogenèse d'autres espèces de staphylocoques est particulièrement illustré par la leucocidine LukSF-I, codée par *S. pseudintermedius*, un agent pathogène principalement associé aux infections chez le chien mais parfois rencontré dans des formes très sévères d'IOA chez l'Homme. Cette leucocidine présente une similitude de séquence d'acides aminés importante avec la PVL et la leucocidine LukED de *S. aureus* et présente la capacité de cibler les phagocytes canins mais aussi humains (289, 290). Toutefois, aucune donnée n'existe à ce jour sur le lien entre les leucocidines des SNA et le développement des IOA. Des toxines de type leucocidine à deux composantes ont également été trouvées chez les espèces *Staphylococcus argenteus*, *Staphylococcus schweitzeri* et *Staphylococcus delphini*. On notera la présence des leucocidines exclusivement au groupe des staphylocoques à coagulase-positives (SCoP).

Parmi les toxines cytotoxiques, les PSMs se présentent comme des petits peptides amphipathiques sécrétés sous la dépendance du système *agr* (291). Ils ont été découverts pour la première fois chez *S. epidermidis* par Klebanoff *et al.* à l'occasion de la découverte de peptides pro-inflammatoires qui se répartissaient dans la phase phénolique lors de l'extraction au phénol chaud de surnageant de culture de souches de *S. epidermidis*, d'où leur nom (292). Les PSMs sont divisés en 2 groupes : les PSM α , dont la séquence peptidique est composée de 20 à 25 acides aminés ayant une structure en hélice alpha et les PSM β d'une taille de 40 à 45 acides aminés ayant une structure en feuillet beta. Chez *S. aureus*, l'analyse des séquences peptidiques ont permis de différencier 5 types de PSM α (PSM α 1 à PSM α 4 et δ -toxin) et 2 types de PSM β

(PSM β 1 et PSM β 2). Chez *S. epidermidis*, quatre PSM α (PSM α , PSM γ , PSM δ , PSM ϵ) et deux PSM β (PSM β 1 et PSM β 2) ont été identifiés (Figure 31) (293). Le PSM γ est constitué de 25 acides aminés et a été identifié comme étant la toxine δ . Celle-ci est codée par le gène *hld*, qui est localisé au niveau du système régulateur *agr* (294). Par ailleurs, bien que ces PSMs soient codées par le core-génome, les cassettes SCCmec (staphylococcal cassette chromosome mec) portant le support génétique de la résistance à la méticilline, peuvent pour certains coder un PSM de type α appelé PSM-mec (295). Le PSM-mec est retrouvé dans les cassettes SCCmec de types II, III et VIII, retrouvés dans de nombreuses souches de SARM, SERM et SPRM (respectivement *S. aureus*, *S. epidermidis* et *S. pseudintermedius* résistants à la méticilline) (296).

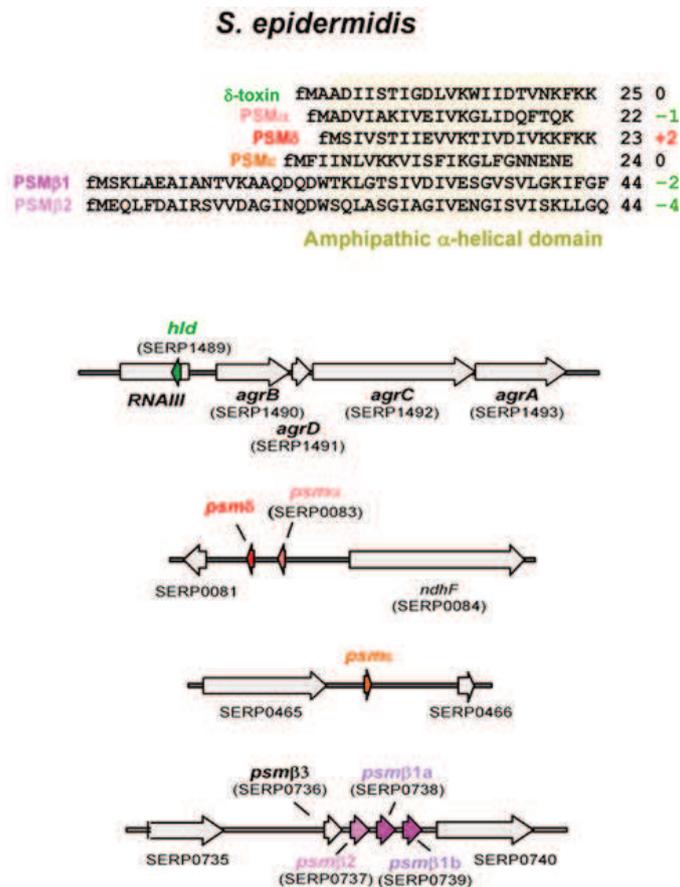


Figure 31. Descriptions PSMs décrits chez *S. epidermidis*. Les séquences acides aminées sont présentées en haut de la figure. Les nombres à droite montrent la charge nette des peptides à pH = 7.0. En bas de la figure sont présentés les gènes respectifs. L'annotation des gènes tient compte de la souche *S. epidermidis* RP62A. D'après (297).

Le pouvoir cytolytique des PSM est principalement attribué aux PSM α . Les PSM de type β sont en effet pas ou très peu cytotoxiques (293). Grâce à leurs structures amphipathiques leur permettant de déstabiliser les membranes plasmiques, les PSM α forment des agrégats à la surface des cellules conduisant à la formation de pores transmembranaires responsables de la cytolysse. De manière intéressante, une activité cytolytique a été constatée sur plusieurs types de cellules telles que les PMN et les érythrocytes pouvant provenir d'espèces animales différentes (Homme, souris et lapins) (298, 299).

Par comparaison à *S. aureus*, plusieurs études ont observé une plus faible capacité cytolytique des surnageants de *S. epidermidis* (293, 294, 300). Après mesure des profils de production des PSMs chez les souches *S. epidermidis* par rapport à ceux de *S. aureus*, Gordon *et al.* ont démontré que la faible activité cytotoxique des surnageants de *S. epidermidis* s'explique non pas par une capacité cytolytique amoindrie des PSMs, mais plutôt par une production *in vitro* plus faible ne permettant pas d'atteindre des concentrations suffisantes pour exercer une activité cytotoxique marquée (293). Concernant les autres espèces SNA, Rautenberg *et al.* ont montré à partir d'analyses en RP-HPLC/MS menées sur des surnageants de culture bactérienne, que de nombreuses espèces comme *S. lugdunensis*, *S. haemolyticus* ou encore *S. warneri* avaient la capacité de produire des PSMs (301). Récemment, Da *et al.* se sont plus spécifiquement consacrés à la description des PSMs de l'espèce *S. haemolyticus*. Les auteurs ont montré que *S. haemolyticus* sécrétait dans les surnageants de culture un PSM de type α et 3 PSM de type β . L'activité hémolytique testée sur des érythrocytes humains était médiée par le seul PSM α (302).

En plus de leurs actions sur la membrane cytoplasmique des cellules, les PSMs possèdent également un rôle dans l'échappement des phagosomes après phagocytose des bactéries par les cellules phagocytaires. En effet, il a été montré que la production des PSM est fortement augmentée lorsque la bactérie est internalisée par des phagocytes professionnels ou non professionnels, au sein même des phago-lysosomes. La sécrétion des PSMs promeut l'échappement des bactéries à leur destruction permettant ainsi leur libération dans le milieu cytoplasmique (Figure 32) (303). Par ailleurs, Rasigade *et al.* ont montré à l'aide d'un modèle GPA que les PSM agissaient comme des toxines intracellulaires. Ils ont observé une réduction

d'environ 50% du niveau de cytotoxicité intracellulaire sur des ostéoblastes infectés par des souches *S. aureus* délétées pour les PSM α (*psma1- α 4*) par comparaison avec la souche sauvage *S. aureus* SF8300 (304). En plus de ces constatations *in vitro*, Davido *et al.* ont démontré sur un modèle *in vivo* d'ostéomyélite sur lapin que les PSM de *S. aureus* USA300 étaient impliqués dans la dissémination bactérienne osseuse pendant la phase précoce de l'infection. Ainsi, les PSM participent à l'invasion et à la destruction des ostéoblastes du tissu osseux. Bien que le rôle des PSM dans l'établissement des IOA ne fasse nul doute pour *S. aureus*, aucune étude ne s'est intéressée au rôle des PSM produits par les SNA dans le contexte des IOA. Ces toxines hautement conservées au sein du genre *Staphylococcus* spp. pourraient également agir dans la destruction des tissus, dans l'échappement à la clairance phagocytaire, à la dissémination des bactéries et par conséquent au développement des infections liées au SNA.

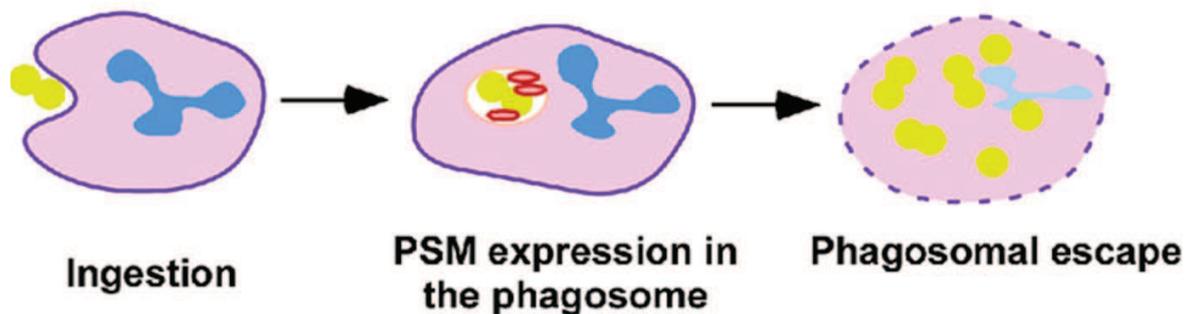


Figure 32. Mécanisme de destruction intracellulaire des cellules phagocytaires par les PSMs. D'après (297).

En plus de leur implication dans la lyse cellulaire, les PSMs ont été associés à d'autres activités pléiotropes notamment (i) un rôle pro-inflammatoire par activation du formyl-peptide receptor 2 (FPR2), entraînant l'activation des neutrophiles, la chimiotaxie et la libération de cytokines, (ii) un rôle compétitif en tant que antimicrobiens ou encore (iii) un rôle dans la maturation et le développement du biofilm (305, 306) (Figure 33).

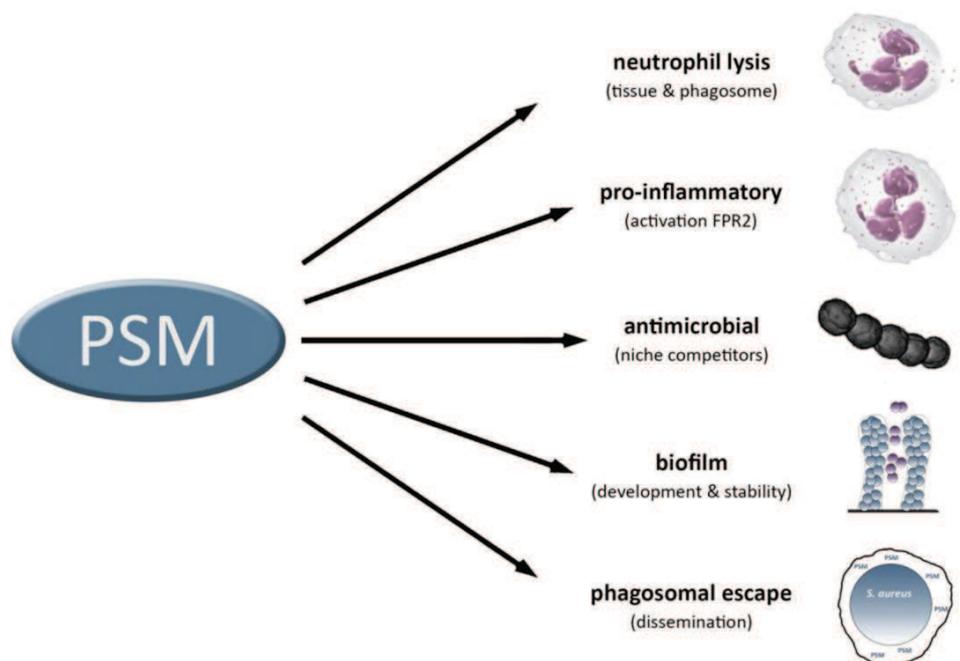


Figure 33. Action pléiotropique des PSMs pendant l'infection. D'après (307, 308).

D. Le biofilm chez les staphylocoques

1. Aspects généraux

Le biofilm représente une communauté de micro-organismes en contact avec une surface, enrobée dans une matrice adhésive et protectrice, riche en polymères extracellulaires. C'est un mode de vie bactérien sessile qui s'oppose physiologiquement au mode de vie planctonique. Les biofilms jouent un rôle important dans de nombreux mécanismes écologiques terrestres et aquatiques (309). Cependant, leur développement présente des inconvénients dans de nombreux domaines notamment en santé humaine et animale, comme en témoigne leur implication dans 60 à 70% des infections nosocomiales (310). Ainsi, les études sur le biofilm suscitent aujourd'hui un véritable intérêt en recherche comme le démontre parfaitement l'augmentation exponentielle des publications sur le sujet d'après la base de données PubMed (+295% en 10 années). En tant que colonisateurs habituels de la peau humaine, les

staphylocoques sont les agents les plus incriminés dans les infections associées au biofilm en présence de dispositifs médicaux implantés comprenant notamment les infections sur cathéters, les endocardites et les infections sur prothèses articulaires (IPA) (311).

2. Etapes de formation du biofilm

Les biofilms peuvent se former sur des surfaces abiotiques comme des dispositifs médicaux implantés décrits précédemment, ou sur des surfaces biotiques pouvant être les tissus de l'hôte, ou des dispositifs médicaux ayant été recouverts de protéines de la matrice extracellulaire par contact avec le plasma sanguin. Généralement, le biofilm est décrit comme un processus cyclique en trois étapes principales : l'adhésion, la prolifération / maturation et le détachement (dispersion) (Figure 34).

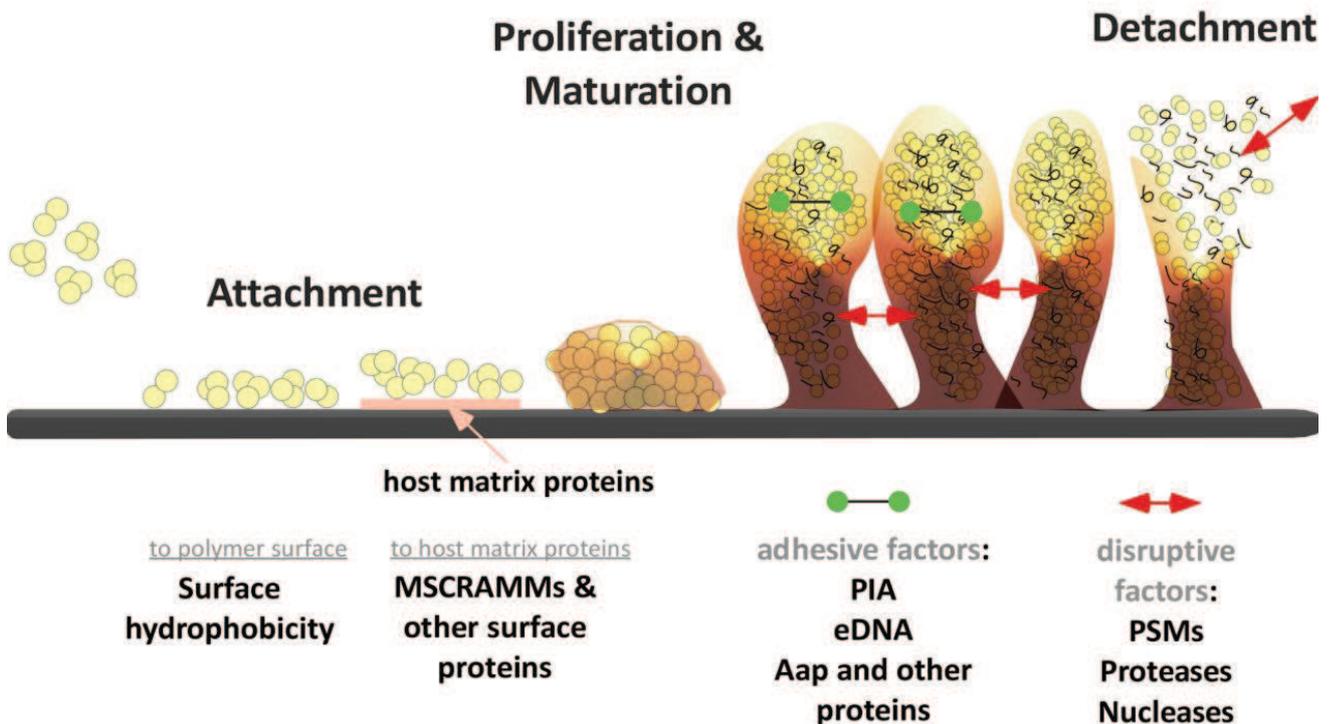


Figure 34. Etapes de formation du biofilm. D'après (311).

La première étape est l'adhésion des bactéries à une surface servant de support, bien que dans les biofilms « flottant », cette étape ne soit pas indispensable. Contrairement aux organismes mobiles, qui peuvent atteindre les surfaces de manière active en utilisant des flagelles, les staphylocoques entrent en contact avec les surfaces de manière passive.

Sur les surfaces abiotiques, l'attachement est principalement rendu possible par les propriétés de surface des matériaux et des bactéries mettant en jeu plusieurs forces d'interactions physicochimiques principalement les interactions hydrophobes ou les forces de van der Waals (312). Des composants de la paroi des staphylocoques comme les acides téichoïques (WTA) et les acides lipotéichoïques (LTA) favorisent également l'adhésion sur les surfaces abiotiques. De plus, il a été rapporté une implication de certaines protéines CWA dans l'attachement abiotique particulièrement les adhésines/autolysine AtIA et AtIE respectivement présentes chez *S. aureus* et *S. epidermidis* (313, 314). Par comparaison des séquences génétiques, des protéines homologues ont été caractérisées dans les génomes d'autres espèces de SNA en particulier chez *S. caprae* (AtIC), *S. lugdunensis* (AtIL), *S. pseudintermedius* (AtIPS), *S. saprophyticus* (Aas), *S. warneri* (AtIWM) sans jamais établir de lien direct avec l'adhésion sur les surfaces abiotiques (315-318). En utilisant des techniques de mutagenèse aléatoire par transposon (Tn917) afin d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans le biofilm, Cucarella *et al.* sont parvenus à isoler une souche *S. aureus* présentant un phénotype négatif pour le biofilm. Les chiffres ont montré que le transposon avait été inséré au niveau d'un locus présentant la séquence génétique d'une protéine de paroi appelée Bap (biofilm associated protein), pour laquelle les auteurs ont démontré une implication dans la formation du biofilm par adhésion sur les surfaces abiotiques (319).

Sur les surfaces biotiques, l'adhésion est principalement assurée par des protéines de surface des staphylocoques appartenant à la famille des MSCRAMMs qui reconnaissent des protéines de la MEC de l'hôte, notamment la fibronectine, le fibrinogène, la vitronectine et d'autres molécules matricielles. Chez *S. aureus* les protéines liant le fibrinogène et la fibronectine, incluent les facteurs d'agglutination A et B (ClfA, ClfB), la famille des protéines riches en sérine / aspartate (SdrC, D, E) et les protéines liant la fibronectine FnBPA, FnBPB. L'adhésion de *S. aureus* aux collagènes et aux tissus cartilagineux est assurée par la protéine Cna (collagen-

binding surface protein), qui se lie au collagène. Chez les SNA, plusieurs études ont démontré le rôle essentiel de certaines protéines MSCRAMMs dans l'installation d'un biofilm. La délétion du gène *sdrG* ou encore l'utilisation d'un anticorps bloquant ciblant spécifiquement la protéine SdrG ont conduit à une diminution de l'adhérence de *S. epidermidis* aux surfaces recouvertes de fibrinogène (320, 321). Arrecubieta *et al.* ont mis en évidence l'implication de la protéine SdrF dans les étapes précoces du biofilm en lien avec sa capacité à adhérer au collagène. En utilisant des anticorps bloquants ciblant spécifiquement la protéine SdrF, ces auteurs ont observé une réduction considérable de l'adhésion sur les dispositifs médicaux (322). Par ailleurs, d'autres protéines de surface peuvent liées les surfaces biotiques de manière non covalente, parmi celles-ci se trouvent principalement les adhésines/autolysines de type Atl, ou encore les protéines géantes Embp de *S. epidermidis* et son homologue Ebh chez *S. aureus*, capable de lier la fibronectine (323, 324).

Une fois adhérees aux surfaces abiotiques ou biotiques, des micro-colonies bactériennes se constituent pour former un biofilm mature tridimensionnel nécessitant une adhésion intercellulaire importante. Ceci est possible notamment grâce à la sécrétion de molécules polymériques constituant la matrice extracellulaire du biofilm (325). Les polymères matriciels du biofilm ont une nature chimique variable et incluent des polysaccharides, des protéines et des acides teichoïques. En plus de ces molécules activement sécrétées, les substances libérées par les cellules mortes eucaryotes et procaryotes contribuent également à la matrice du biofilm. La plus notable est l'ADN chargé négativement, qui, après sa libération, est appelé ADN extracellulaire (ADNe).

Les exopolysaccharides (EPS) représentent les composants de la MEC les plus retrouvés dans la formation du biofilm. Les staphylocoques produisent un EPS de nature cationique, appelé l'adhésine polysaccharidique (PIA) également désigné sous le nom de poly-N-acetyl- β -(1-6)-glucosamine (PNAG) (326, 327). La biosynthèse du PIA est réalisée par l'expression des gènes de l'opéron *ica* (intercellulaire adhesion). Ce dernier comprend 5 gènes : les gènes *icaA*, *icaD*, *icaB* et *icaC* (co-transcrits à partir d'un unique promoteur en amont) et un gène régulateur, *icaR* situé en amont de *icaA* et transcrit en sens inverse des 4 autres gènes. La protéine IcaA est une N-acetylglucosamine transférase qui, avec la protéine IcaD, aboutissent à la production d'un

oligomère N-acétylglucosamine. La chaîne de PIA est alors exportée par la protéine transmembranaire IcaC. Après exportation, le polymère est pris en charge par la protéine de surface IcaB dont le rôle est de dé-acétyler certains résidus N-acetyl glucosamine. Cette réaction va donner au polymère son caractère cationique, essentiel à l'attachement aux surfaces biotiques et abiotiques (Figure 35).

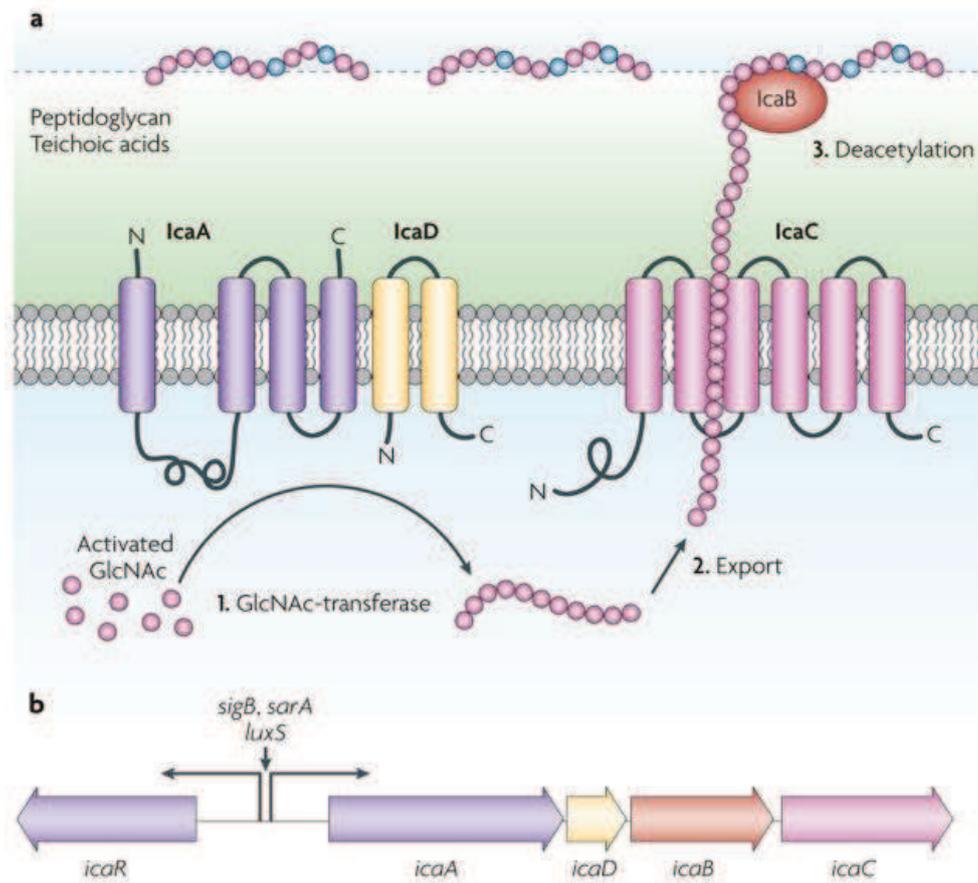


Figure 35. Organisation de l'opéron *ica* et biosynthèse de l'adhésine polysaccharidique (PIA). D'après (193).

Cependant, la présence de PIA n'est pas un facteur universel et indispensable dans la formation des biofilms des staphylocoques. Des macromolécules comprenant des protéines polymériques et des polymères non protéiques peuvent entrer dans la composition de la matrice extracellulaire du biofilm chez les isolats *ica* négatifs ou viennent renforcer la fonction du PIA

chez des isolats *ica* positifs. Parmi les nombreuses protéines de surface impliquées dans la formation de biofilms staphylococciques, les protéines associées à l'accumulation Aap et SasG, respectivement décrite chez *S. epidermidis* et *S. aureus*, se distinguent par leurs capacités à s'auto-polymériser et à former des fibrilles qui interconnectent les bactéries (193, 328, 329). Des études ciblant le rôle de PIA dans la formation de biofilm chez *S. lugdunensis* ont révélé que le polymère n'était pas *in vitro* un composant majeur de la matrice extracellulaire du biofilm formé chez certaines souches cliniques malgré la présence de l'opéron *icaADBC*. Les biofilms produits par les isolats étaient sensibles aux traitements à la protéase, ce qui suggère que la formation du biofilm dans ces cas était principalement assurée par des facteurs protéiques (330). Les polymères extracellulaires non protéiques impliqués dans la formation de biofilm comprennent les acides teichoïques WTA et l'ADN extracellulaire (331). La contribution spécifique des acides teichoïques dans la matrice du biofilm n'a été démontrée que pour les WTA de *S. epidermidis* (331). En revanche, il est clairement établi chez plusieurs espèces staphylococciques que l'ADNe libéré par les cellules mortes contribue à la composition du biofilm. La charge polyanionique de l'ADN permet de lier ensemble plusieurs molécules, et apparaît donc comme un important facteur d'adhésion intercellulaire. Par ailleurs, cette libération d'ADNe peut être indépendante de la lyse bactérienne. En délétant le gène *comEB*, Rajendran *et al.* ont observé une diminution de la formation du biofilm chez *S. lugdunensis* expliqué par une diminution de la quantité d'ADNe, sans constater de différence de viabilité. En revanche, le mécanisme par lequel *comEB* agit sur la libération d'ADNe reste encore inconnue (332). Enfin, il est important de noter que la composition du biofilm au sein des staphylocoques n'est pas constante. Il existe une variabilité inter et intra-espèces indéniable en ce qui concerne sa composition (333). Le biofilm grandit jusqu'à devenir macroscopique, on dit qu'il a atteint sa phase mature. Il prend alors une forme en 3 dimensions s'apparentant à une forme de champignon dans lequel passent des flux de matières. Les bactéries peuvent présenter différents états physiologiques (anaérobie, dormance,...) en fonction de leur localisation dans le biofilm sous l'effet des conditions environnementales variables (accès ou non aux substrats, oxygénation, pH, accumulation ou non de métabolites issus des bactéries enchâssées dans le biofilm).

Après la maturation du biofilm, des bactéries isolées ou même des groupes de bactéries peuvent se dissocier et se retrouver dans la circulation sanguine. Cette étape, appelée dissémination, aboutit à la colonisation d'autres sites anatomiques, conduisant à l'apparition de métastases de l'infection. Le détachement des cellules du biofilm peut être provoqué par plusieurs mécanismes comme l'action des enzymes qui dégradent les polymères, des nucléases, des protéases ou des PSM de type β . Cette étape est sans doute l'étape la moins documentée pour l'instant. Plusieurs études suggèrent que ce processus de détachement est soumis à l'action d'un mécanisme régulateur, appelé le quorum sensing, qui contrôle l'expression coordonnée de certains gènes au sein de la population. Il faut noter que plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont démontré l'implication du système *agr* dans la régulation du quorum sensing des staphylocoques (334, 335).

3. Impact du biofilm dans la genèse des IOA

L'utilisation de plus en plus fréquente de dispositifs médicaux implantés conduit à l'augmentation d'une grande variété d'infections causées par les staphylocoques. La physiopathologie de ces infections, notamment celles des IOA sur matériel (IMOA) est en grande partie liée initialement à la constitution d'un biofilm sur ces corps étrangers qui peuvent être en l'occurrence soit du matériel d'ostéosynthèse ou bien des prothèses articulaires (Figure 36).



Figure 36. Photographie d'une prothèse de genou recouverte de biofilm. Source interne.

L'origine de la contamination provient principalement de l'inoculation directe de bactéries commensales colonisant les muqueuses ou la peau, au moment de la mise en place du matériel. Les bactéries rencontrent au niveau du matériel un environnement favorable à leur développement même en cas de faible inoculum. Peu de temps après la mise en place du matériel, ce dernier est rapidement recouvert de protéines de la matrice extracellulaire de l'hôte, permettant aux bactéries introduites ou restantes (lors d'un débridement) de coloniser et d'initier un biofilm (336). La composition du matériel est variable et différente selon les pièces utilisées. En effet, différents composants sont utilisés comme le titane et ses alliages, l'acier inoxydable, le chrome-cobalt, le silicone, les céramiques et l'hydroxyapatite. Le polyéthylène est quant à lui classiquement retrouvé au niveau des pièces mobiles des dispositifs articulaires. Chaque composant possède ses propres caractéristiques physico-chimiques et mécaniques, pouvant influencer les capacités d'adhésion des bactéries pathogènes et les niveaux de risque d'infection (337, 338). Parmi celles-ci, la plus notable est la rugosité du matériel (339). En dehors de l'adhésion, le matériel ne semble pas influencer les autres étapes de la constitution de biofilm. Ainsi, une étude conduite sur *S. epidermidis* a montré que la sensibilité de l'infection était similaire pour les implants en titane et en acier inoxydable dans un modèle *in vivo* murin. De plus, le moment de l'inoculation semble avoir un effet majeur sur l'évolution de l'infection, une infection étant plus persistante si l'inoculation était périopératoire que si elle était postopératoire (340, 341).

Dans le cas d'IOA natives sans matériels, un biofilm peut également se former sur un tissu osseux nécrosé. Le tibia et le fémur sont les sites les plus à risque en raison d'un flux sanguin plus faible. Les forces de flux représentent des facteurs primordiaux impactant directement les étapes d'adhésion, mais pouvant également influencer les étapes de maturation (porosité du biofilm, architecture, diffusion des substrats) et de dispersion (342, 343). Une fois la bactérie inoculée, la réponse inflammatoire, l'augmentation de la pression osseuse et la diminution du pH provoquée par la cellulite locale induisent une nécrose du tissu osseux (344). Un sequestrum peut alors se former. Si l'infection perdure, un involucrum, correspondant à une croissance osseuse en dehors de l'os existant, peut également apparaître (345). Un biofilm mature peut

alors se mettre en place sur ces structures, complexifiant la prise en charge thérapeutique (Figure 37).

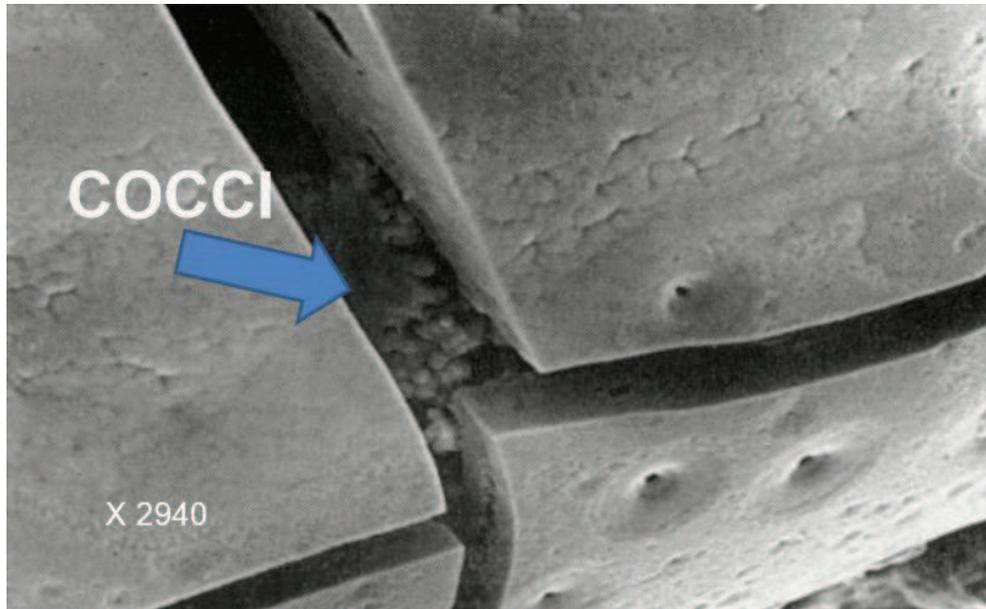


Figure 37. Photographie au microscope électronique à balayage (MEB) d'un biofilm staphylococcique indiqué par la flèche, au sein d'un séquestre osseux. On notera que les grandes cassures observées correspondent à des artéfacts de préparation pour la réalisation de la MEB. (Grossissement x2940). D'après (346).

Le biofilm joue un rôle majeur dans l'échec thérapeutique et dans la chronicisation des IOA (347, 348). Ainsi, plusieurs études ont cherché à comparer la sensibilité aux antibiotiques des bactéries planctoniques et des bactéries sessiles. Tremblay *et al.* ont étudié l'effet de la formation du biofilm sur l'action de plusieurs antibiotiques comme la novobiocine (349). Ils ont mesuré la CMI (concentration minimale inhibitrice) ainsi que la CMEB (concentration minimale d'éradication du biofilm) chez plusieurs espèces SNA telles que *S. haemolyticus*, *S. simulans* ou encore *S. epidermidis*. La CMI pour la pénicilline G augmentait de $\leq 0,5 \mu\text{g} / \text{mL}$ à $64 \mu\text{g} / \text{mL}$, tandis que la CMEB allait de $32 \mu\text{g} / \text{mL}$ à $1024 \mu\text{g} / \text{mL}$. Cela signifie que les isolats étaient 16 à 1028 \times plus résistants à la pénicilline G. Pour la novobiocine, la CMI variait de $\leq 2 \mu\text{g} / \text{mL}$ à $64 \mu\text{g} / \text{mL}$ et la CMEB allait de $64 \mu\text{g} / \text{mL}$ à $> 4096 \mu\text{g} / \text{mL}$, soit des concentrations d'antibiotiques 32–2048 \times plus importantes (349). Cette tolérance non spécifique aux antibiotiques présentée

par les bactéries en biofilm s'explique par plusieurs mécanismes. L'un des premiers décrits est l'altération de la diffusion des antibiotiques au sein du biofilm. En effet, la MEC agit comme une barrière physique pouvant réduire la pénétration des antibiotiques par encombrement ou par interaction avec les charges électriques des composants (350). Singh *et al.* ont ainsi pu observer une réduction de diffusion pour l'oxacilline, la cefotaxime et la vancomycine au travers les biofilms de *S. aureus* et de *S. epidermidis* (351). Toutefois, il est difficile de conclure quant à la capacité de la MEC à réduire la diffusion des antibiotiques étant donné que la composition de cette dernière est inter et intra-espèces dépendante. Une étude récente de Singh *et al.* insiste sur le fait que la diffusion dépend de l'antibiotique, de l'espèce mais également de la souche (352). On peut aussi insister sur le manque d'éléments permettant d'affirmer la relevance des corrélations des études réalisées *in vitro*, c'est-à-dire des biofilms formés *in vitro* par rapport à la réalité clinique des biofilms formés *in vivo* dont la structure, la composition et le comportement physiologique sont probablement très éloignés. Un autre mécanisme de tolérance aux antibiotiques est le ralentissement de la croissance bactérienne au sein des biofilms. En effet, selon la profondeur du biofilm dans laquelle les bactéries se trouvent, l'environnement varie en termes de pH, de nutriments, de métabolites secondaires et d'oxygène. Plus on s'éloigne de la surface du biofilm, moins la quantité de nutriments et d'oxygène est importante, plus la quantité de métabolites augmente, plus le pH est acide (353). Les bactéries vont répondre en s'adaptant à cet environnement, entraînant des modifications phénotypiques et mêmes génétiques qui peuvent être à l'origine de la tolérance à certains antibiotiques. L'effet d'antibiotiques actifs sur les bactéries en croissance, telles les bêta-lactamines, est alors réduit (354). Enfin, l'apparition de bactéries persistantes en dormance, représentant environ 1 % de la population bactérienne représente un mécanisme majeur dans la tolérance aux antibiotiques. Ces bactéries présentes dans un état de dormance, peuvent retourner à un état de croissance lorsque l'antibiotique n'est plus présent (355).

En plus de l'inefficacité de la plupart des antibiotiques sur les bactéries en biofilm, s'ajoute l'altération de la réponse immunitaire sur les bactéries en biofilm. Dans un contexte infectieux Costerton *et al.* ont proposé un paradigme appelé « phagocytose frustrée » impliquant l'action du système immunitaire sur les bactéries en biofilm. La présence d'un biofilm stimule la réponse

immunitaire et attire les macrophages sur le site via un mécanisme de relargage d'antigènes. La phagocytose, y compris l'action des anticorps opsonisants sont inefficaces sur les bactéries sessiles, alors que parallèlement la libération d'enzymes par les phagocytes (polynucléaires et macrophages) est capable d'endommager les tissus adjacents, pouvant favoriser un descellement de la prothèse et une dissémination de l'infection (Figure 38) (356).

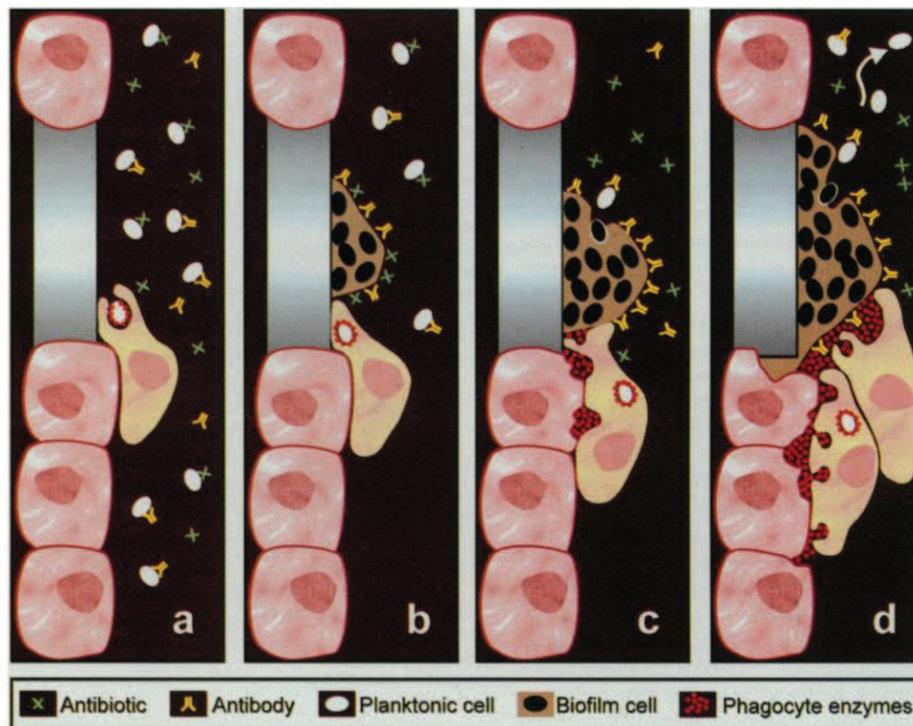


Figure 38. Rôle du biofilm dans l'échec des mécanismes de défense de l'hôte. (a) Bactéries planctoniques facilement éliminées par le système immunitaire (anticorps et phagocytes) et par les antibiotiques, (b) bactéries sessiles contenues dans un biofilm, résistantes au système immunitaire et à certains antibiotiques, (c) phagocytose inopérante et libération tout de même des enzymes phagocytaires, (d) lésions des tissus et dissémination de l'infection. D'après (356).

Au final, le biofilm ne doit pas être considéré comme mécanisme uniquement dépendant de la bactérie, mais plutôt comme un mécanisme multifactoriel impliquant la bactérie par ses facteurs de virulence, l'hôte et son système immunitaire par sa réponse inflammatoire mais aussi le matériel ou l'os par ses propriétés de surface. Une meilleure compréhension de cette interaction est cruciale et nous permettrait de pouvoir développer de nouvelles approches thérapeutiques.

TRAVAIL PERSONNEL

INTRODUCTION

La revue de la littérature présentée dans la section précédente a permis de souligner la problématique complexe de la prise en charge des IOA. De nombreuses inconnues demeurent quant à la physiopathologie de ces infections, notamment celles dues aux *Staphylococcus non-aureus* (SNA). Ces connaissances limitées compliquent ainsi le diagnostic et la prise en charge des patients. Le travail accompli au cours de cette thèse a eu pour objectif d'améliorer les connaissances sur les mécanismes physiopathologiques mis en jeu au cours de ces infections.

Le début de nos travaux a porté sur les capacités d'internalisation, de persistance ainsi que le pouvoir cytotoxique de 16 espèces de SNA dans un modèle *in vitro* d'invasion d'ostéoblastes humains. Cette approche a permis i) de révéler une importante variabilité inter-espèce, et ii) de mettre en évidence le phénotype atypique de certaines espèces, notamment l'espèce *S. pseudintermedius*. Après avoir confirmé nos observations sur un large panel de souches cliniques de *S. pseudintermedius*, nous avons ensuite caractérisé les partenaires moléculaires impliqués dans les mécanismes d'internalisation sur le versant bactérien (protéines FnBP-like) et sur le versant cellulaire (intégrines $\alpha 5\beta 1$). Ces données ont permis d'aboutir à une première publication en premier auteur dans le journal « *Frontiers in Microbiology* » (IF = 4.02, Rang B).

Staphylococcus pseudintermedius est un pathogène opportuniste responsable d'infections particulièrement sévères chez le chien et plus rarement chez l'Homme. Nos premiers travaux ont mis en évidence son comportement atypique au sein des SNA notamment par (i) sa capacité à s'internaliser au moins aussi efficacement que *S. aureus* dans les cellules phagocytaires non-professionnelles (NPPc) comme les ostéoblastes, (ii) par son fort pouvoir cytotoxique vis-à-vis des cellules osseuses, encore plus marqué que celui de *S. aureus* pourtant connu pour être l'agent pathogène le plus agressif au sein des staphylocoques. La suite de nos travaux a donc été consacrée à l'identification des facteurs de virulence impliqués dans la cytotoxicité de cette espèce. D'abord identifiés *in silico*, des modèles *in vitro* ont permis de valider le pouvoir cytotoxique de différentes toxines présentes chez *S. pseudintermedius* sur plusieurs types

cellulaires. L'ensemble de ces modèles ont démontré l'implication de deux types de "Pore forming toxins" (PFTs) dans la cytotoxicité induite par *S. pseudintermedius* : (i) la leucocidine Luk-I, et (ii) les phenols soluble modulins (PSMs) représentés par la δ -toxine et le PSM ϵ . Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication en premier auteur dans le Journal « Frontiers in Cellular and Infection Microbiology » (IF = 3.52, Rang B).

La capacité d'internalisation et de persistance intracellulaire est un phénomène majeur impliqué dans la physiopathologie des IOA. Les liaisons entre les adhésines staphylococciques (MSCRAMMs) et la fibronectine de la matrice extra-cellulaire sont essentielles pour initier cette internalisation. En effet, à la fois pour *S. aureus* et *S. pseudintermedius*, le mécanisme d'internalisation nécessite une adhésion avec la fibronectine à l'aide des adhésines FnBP-like, respectivement FnBPA/B et SpsD/L. Les MSCRAMMs liant la fibronectine présentent donc un rôle majeur dans le processus d'invasion cellulaire chez les staphylocoques. A partir d'une étude génomique *in silico*, la suite de nos travaux a été de cribler les protéines FnBP-like au sein du genre *Staphylococcus* spp. Les résultats de ces analyses nous ont permis de mettre en évidence une protéine présentant une forte identité chez l'espèce *S. delphini* avec les mêmes motifs caractéristiques des FnBP-like. Ces travaux ont permis de mettre en évidence la capacité d'internalisation de *S. delphini* dans les NPPc à l'aide d'un mécanisme FnBP-like/Fibronectine/ $\alpha 5\beta 1$. Les résultats ont donné lieu à une publication en premier auteur soumise dans le journal « Transboundary and Emerging Diseases » (IF = 3.50, Rang B)

L'ensemble des travaux présentés ci-dessus ont permis de montrer que seulement 2 espèces de SNA sur toutes celles testées étaient capables d'être internalisées par les NPPc dans le modèle *in vitro* mis en place. Par conséquent, ce mécanisme ne semble pas être impliqué de façon majeure dans la physiopathologie des IOA à SNA. Dans ce contexte, la suite de nos travaux a été consacrée à l'étude d'un second mécanisme important dans la physiopathologie des IOA, le biofilm. Les six espèces de SNA les plus prévalentes dans les IOA (*S. epidermidis*, *S. lugdunensis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. caprae*, *S. capitis*) ont été étudiées en utilisant une collection de souches cliniques responsables d'IOA recueillies au début du projet de thèse. Sachant que les SNA sont principalement responsables d'infections sur matériels de prothèse et d'ostéosynthèse, nous avons été amenés à développer spécifiquement pour ce projet une

méthode d'étude du biofilm sur biomatériaux de type inox, titane et polyéthylène utilisés en chirurgie orthopédique dans le cadre d'une collaboration avec le Groupe Lépine®. Cette approche novatrice nous a permis de disposer de données plus proches des conditions réelles d'interactions matériel/bactérie chez le patient, donc plus pertinentes avec une valeur ajoutée translationnelle forte. Les résultats vont donner lieu à une publication en première auteur qui sera prochainement soumise dans le journal « Clinical Microbiology and Infection » (IF = 5.40, Rang B).

Au final, l'objectif global de cette thèse a été d'approfondir les connaissances sur les interactions hôtes-pathogènes mises en jeu lors d'IOA liées aux SNA. Le cahier des charges de nos travaux était de dépister des mécanismes physiopathologiques pertinents dans la compréhension des IOA, permettant l'amélioration du diagnostic et de la prise en charge des patients.

**PREMIERE PUBLICATION: Pathophysiological
mechanisms of *Staphylococcus non-aureus* Bone and
Joint Infection: interspecies homogeneity and specific
behavior of *S. pseudintermedius***

La meilleure compréhension des infections ostéo-articulaires (IOA) est un enjeu majeur de santé publique en raison du nombre de cas par an en France (>40000/an) et de son coût individuel et sociétal (mortalité 5%, morbidité 40%, invalidité partielle ou totale temporaire ou définitive, surcoût médical direct 288M€/an en France). Les staphylocoques sont les microorganismes les plus fréquemment impliqués (>60%) dans ces infections particulièrement difficiles à traiter. Plusieurs études ont mis en évidence des mécanismes physiopathologiques clés impliqués chez *S. aureus* dans l'installation et le passage à la chronicité de ces infections : (i) formation de biofilm, (ii) internalisation et persistance intracellulaire des staphylocoques dans les cellules osseuses. Ces deux mécanismes conduisent à la sanctuarisation des bactéries qui se retrouvent protégées de l'action à la fois du système immunitaire et de nombreux antibiotiques. Longtemps uniquement considérés comme des commensaux de la peau et des muqueuses, les *Staphylococcus non-aureus* (SNA) sont désormais reconnus comme des pathogènes opportunistes majeurs, notamment dans les IOA chez les patients porteurs de prothèses. Étonnement, très peu de données sont disponibles sur les rôles physiopathologiques de ces mêmes mécanismes au cours des IOA liées à ces espèces.

L'objectif de ce travail a ainsi été d'étudier 15 souches de référence appartenant à 15 espèces différentes de SNA en termes de (i) capacité d'adhérer à la fibronectine humaine sur la base de tests *in vitro* en microplaques (ii) capacité d'internalisation, de persistance et de cytotoxicité

intracellulaire à l'aide d'un modèle *in vitro* de type « Gentamicin Protection Assay » d'infection d'ostéoblastes humains par les staphylocoques. Notre étude a constitué la première évaluation de la capacité d'interaction d'un large panel d'espèces du genre *Staphylococcus* avec les ostéoblastes.

En comparaison à la souche contrôle *S. aureus* 8325-4, seule la souche de référence appartenant à l'espèce *S. pseudintermedius* a été capable d'adhérer aussi efficacement à la fibronectine humaine. Cette souche présentait également la faculté unique de s'internaliser, de persister dans le compartiment intracellulaire et d'être cytotoxique vis-à-vis des cellules osseuses. Ces premiers résultats ont été confirmés sur un panel de 17 souches cliniques de *S. pseudintermedius*, permettant de démontrer le caractère conservé de ces 3 phénotypes au sein de l'espèce *S. pseudintermedius*. En outre, en comparant dans le même modèle des lignées d'ostéoblastes murines exprimant ou pas l'intégrine cellulaire β_1 , nous avons pu montrer que l'internalisation de *S. pseudintermedius* était complètement abolie en présence des ostéoblastes déficients en β_1 intégrine. Ces résultats nous ont permis de démontrer l'implication de l'intégrine β_1 dans le processus d'invasion, déjà décrit chez *S. aureus*.

En résumé, nos résultats suggèrent que l'internalisation dans les ostéoblastes n'est pas un mécanisme physiopathologique mis en jeu par la plupart des SNA au cours des IOA. Toutefois, *S. pseudintermedius* semble être une exception et sa capacité à envahir puis à induire une cytotoxicité dans les NPPC pourrait expliquer les formes infectieuses sévères liées à cette espèce (exsudat purulent, nécrose, forte inflammation) chez l'Homme et surtout chez le chien.



Pathophysiological Mechanisms of *Staphylococcus Non-aureus* Bone and Joint Infection: Interspecies Homogeneity and Specific Behavior of *S. pseudintermedius*

Yousef Maali^{1,2}, Patrícia Martins-Simões^{1,2}, Florent Valour^{1,3}, Daniel Bouvard^{4,5}, Jean-Philippe Rasigade^{1,6}, Michele Bes⁶, Marisa Haenni⁷, Tristan Ferry^{1,3}, Frédéric Laurent^{1,2,6*} and Sophie Trouillet-Assant^{1,2†}

¹ Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111, CNRS UMR5308, Université de Lyon 1, ENS de Lyon, Team "Pathogenesis of staphylococcal infections", Lyon, France, ² Department of Clinical Microbiology, Northern Hospital Group, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France, ³ Infectious Diseases Department, Northern Hospital Group, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France, ⁴ INSERM U1209, Albert Bonniot Institute, Grenoble, France, ⁵ Université Grenoble Alpes, Grenoble, France, ⁶ National Reference Center of Staphylococci, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France, ⁷ ANSES – French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety, Lyon, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Miguel Cache Teixeira,
University of Lisbon, Portugal

Reviewed by:

Haider Abdul-Lateef Mousa,
University of Basrah, Iraq
Marquita Vernescia Gittens-St.Hilaire,
University of the West Indies,
Barbados

*Correspondence:

Frédéric Laurent
frederic.laurent@univ-lyon1.fr

† These senior authors have
contributed equally to this work.

Specialty section:

This article was submitted to
Infectious Diseases,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 03 May 2016

Accepted: 24 June 2016

Published: 12 July 2016

Citation:

Maali Y, Martins-Simões P, Valour F, Bouvard D, Rasigade J-P, Bes M, Haenni M, Ferry T, Laurent F and Trouillet-Assant S (2016) Pathophysiological Mechanisms of *Staphylococcus Non-aureus* Bone and Joint Infection: Interspecies Homogeneity and Specific Behavior of *S. pseudintermedius*. *Front. Microbiol.* 7:1063. doi: 10.3389/fmicb.2016.01063

Implicated in more than 60% of bone and joint infections (BJIs), *Staphylococci* have a particular tropism for osteoarticular tissue and lead to difficult-to-treat clinical infections. To date, *Staphylococcus aureus* internalization in non-professional phagocytic cells (NPPCs) is a well-explored virulence mechanism involved in BJI chronicity. Conversely, the pathophysiological pathways associated with *Staphylococcus non-aureus* (SNA) BJIs have scarcely been studied despite their high prevalence. In this study, 15 reference strains from 15 different SNA species were compared in terms of (i) adhesion to human fibronectin based on adhesion microplate assays and (ii) internalization ability, intracellular persistence and cytotoxicity based on an *in vitro* infection model using human osteoblasts. Compared to *S. aureus*, *S. pseudintermedius* was the only species that significantly adhered to human fibronectin. This species was also associated with high (even superior to *S. aureus*) internalization ability, intracellular persistence and cytotoxicity. These findings were confirmed using a panel of 17 different *S. pseudintermedius* isolates. Additionally, *S. pseudintermedius* internalization by osteoblasts was completely abolished in β_1 integrin-deficient murine osteoblasts. These results suggest the involvement of β_1 integrin in the invasion process, although this mechanism was previously restricted to *S. aureus*. In summary, our results suggest that internalization into NPPCs is not a classical pathophysiologic mechanism of SNA BJIs. *S. pseudintermedius* appears to be an exception, and its ability to invade and subsequently induce cytotoxicity in NPPCs could explain its severe and necrotic forms of infection, notably in dogs, which exhibit a high prevalence of *S. pseudintermedius* infection.

Keywords: *Staphylococcus non-aureus*, *Staphylococcus pseudintermedius*, bone and joint infection (BJI), invasion, fibronectin, integrin $\alpha_5\beta_1$

INTRODUCTION

Bone and joint infections (BJIs) represent a major public health issue, with an annual mortality rate near 5% and a classically reported relapse rate of 20–30% that can reach 80% in specific populations (Lentino, 2003). However, *Staphylococci* represent the most prevalent aetiologic agents, causing more than 60% of all BJIs. These pathogens are classically separated into two groups: (i) *Staphylococcus aureus*, involved in acute and chronic BJIs due to its large panel of virulence and persistence factors and (ii) *Staphylococcus non-aureus* (SNA) species, classically considered as less virulent, opportunistic pathogens that are primarily responsible for chronic implant-associated BJIs.

Several studies have explored the pathophysiology of *S. aureus* in BJIs and have elucidated mechanisms implicated in the course of chronic infections using *in vitro* and *in vivo* approaches. Two key mechanisms have been identified to explain the high rate of treatment failure of *S. aureus* BJIs: (i) the formation of biofilm, which is defined as the community of microbes that adhere to a biotic or an abiotic surface and that are covered by an adhesive protective matrix, and (ii) internalization and sanctuarization by which invasive bacteria actively induce their own uptake by phagocytosis into host cells, where they establish a protected niche within which they can replicate. Biofilm and intracellular lifestyles help *S. aureus* evade most antibiotics and the immune system. SNA is highly prevalent (even superior to *S. aureus* in some series) in cases of prosthetic joint infections (PJIs), of which *S. epidermidis* accounts for 30–43%. However, little is known regarding the behavior of the SNA species during the course of an infection (Zimmerli et al., 2004; Lourtet-Hascoett et al., 2015). Concerning biofilm formation, the few studies that have included panels of clinical isolates (i.e., *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*) have highlighted a marked variability within each species (Seifert et al., 2005; Fredheim et al., 2009; Oliveira et al., 2015; Szczuka et al., 2015). Regarding the ability of SNA to be internalized by osteoblasts, the scarce data available are controversial. Indeed, using a single clinical strain isolated from BJI, Khalil et al. (2007) reported that *S. epidermidis* is able to invade human osteoblasts via a fibronectin-independent pathway. In contrast, we previously demonstrated using a large panel of clinical isolates that the extent of invasion in an *in vitro* infection model were so low that this mechanism is likely not involved in BJI with *S. epidermidis* (Valour et al., 2013). In the same way, Hussain et al. (2015) suggested that the *S. lugdunensis* invasion of endothelial, epithelial and fibroblastic cells is mediated by the bacterial autolysin AtlL whereas Campoccia et al. (2015) reported no internalization of this pathogen by human osteoblasts. In addition to these controversies, this issue remains under debate for all other *Staphylococci* species.

In this context, the aim of the present study was to determine whether the various SNA species exhibit distinct behaviors in terms of their capacities to adhere, invade and persist in osteoblasts under the same experimental conditions using an *in vitro* infection model. For this purpose, a screening approach using a panel of 15 reference isolates belonging to 15 different SNA species was employed. The original data obtained for

the *S. pseudintermedius* reference strain led us to extend the investigation to include a set of 17 clinical isolates of this species and to explore the bacterial and cellular factors involved in the process of internalization using murine osteoblasts defective for β_1 integrins.

MATERIALS AND METHODS

Human Ethics Statement

This study was approved by the French South-East ethics committee (reference number 2013-018). In accordance with French legislation, written informed patient consent was not required for the use of the collected clinical isolates.

Bacterial Strains and Culture Media

A collection of 15 reference strains of different SNA species was used (Table 1). The laboratory strain *S. aureus* 8325-4, well characterized for its ability to bind to fibronectin and to invade osteoblasts, was used as a positive control in each experiment. Its isogenic mutant, DU5883 (inactivated for the *fnbA/B* genes and therefore unable to adhere or to invade osteoblasts), was used as a negative control. Seventeen human and animal clinical *S. pseudintermedius* isolates were also included. The identities of all strains were confirmed via matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS, bioMérieux, Marcy-L'Etoile, France). Details on the characteristics of the isolates are summarized in Table 1. Prior to the assays, strains were cultured overnight in brain heart infusion medium (BHI; bioMérieux) aerobically at 36°C.

Microplate Assay of Bacterial Adhesion to Fibronectin

The assays of bacterial adhesion to fibronectin were performed *in vitro* in 96-wells flat-bottom microplates, as described elsewhere (Rasigade et al., 2011). Briefly, the wells were coated with 200 μ L of human fibronectin (Dutscher SAS, Brumath, France) at 50 μ g/mL (18 h, 4°C). They were then washed three times (20 min, 37°C) with Phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 1% foetal bovine serum (FBS). Meanwhile, after an overnight broth culture in BHI medium, bacterial suspensions were adjusted to an OD₆₀₀ of 1 ± 0.05 , corresponding to a concentration of approximately 1×10^9 cells/mL. Bacteria were then centrifuged (12,000 g, 2 min), and the pellets were washed and suspended in PBS. One hundred microliters of each bacterial suspension were incubated in the fibronectin-coated plates for 45 min at 37°C with mild shaking. The wells were then washed 3 times with PBS to remove non-adherent bacteria. Then, adherent bacteria were fixed with glutaraldehyde (2.5% v/v in 0.1 M PBS, 2 h at 4°C) and stained with crystal violet (0.1% m/v) for 30 min at room temperature. After 3 washes with PBS, the total remaining stain impregnating the adherent bacteria was solubilized by incubating the wells with Triton X-100 solution (0.2% v/v – H₂O; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) at room temperature for 30 min. The adhesion of bacteria to fibronectin was finally

TABLE 1 | Description of the strains used in this study.

Staphylococcus spp. (Reference strains)			S. pseudintermedius (Clinical isolates)	
Species/sub-species	Strain	Origin	Isolate	Origin
<i>S. aureus</i>	8325-4	Human corneal ulcer	N°1	Human skin lesion
<i>S. aureus</i> Δ <i>fnb</i>	DU 5883	Human corneal ulcer	N°2	Human nasal carriage
<i>S. intermedius</i>	CCM 5739	Pigeon nose	N°3	Human blood culture
<i>S. pseudintermedius</i>	LMG 22219	Cat lung tissue	N°4	Human CSF (Cerebrospinal fluid)
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	CCM 2734	Human skin	N°5	Human skin lesion
<i>S. caprae</i>	CCM3573	Goat milk	N°6	Human pacemaker
<i>S. epidermidis</i>	CCM 2124	Human nose	N°7	Human bone biopsy
<i>S. gallinarum</i>	CCM 3572	Chicken skin	N°8	Human aspiration
<i>S. haemolyticus</i>	CCM 2737	Human skin	N°9	Human blood culture
<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	DSM 20328	Human skin	N°10	Human drain fluid
<i>S. lugdunensis</i>	ATCC 43809	Human axillary node	N°11	Dog skin pustule
<i>S. pettenkoferi</i>	CIP 107711	Human blood	N°12	Human hip prosthesis
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	CCM 883	Human urine	N°13	Human leg abscess
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>	ATCC 29062	Gray squirrel skin	N°14	Human nasal carriage
<i>S. simulans</i>	ATCC 27848	Human skin	N°15	Human skin lesion
<i>S. warneri</i>	CCM 2730	Human Skin	N°16	Horse skin lesion
<i>S. xylosum</i>	ATCC 29971	Human skin	N°17	Human bone fistula

assessed spectrophotometrically by measuring the OD₆₂₀ of each well using a plate reader (Auto Reader Model 680, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The results are expressed as the means \pm standard deviation of the OD₆₂₀ for 3 experiments performed in quadruplicate. The values obtained for each strain were normalized to those of the reference strain *S. aureus* 8325-4.

Osteoblast Culture

All cell culture reagents were obtained from GIBCO (Paisley, United Kingdom). Human MG63 osteoblastic cells (LGC Standards, Teddington, UK) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 2 mM L-glutamine and 25 mM HEPES and supplemented with 10% FBS and 100 U/ml penicillin and streptomycin ("growth medium with antibiotics"). In addition, two murine osteoblastic cell lines were specifically used for the exploration of the internalization process: (i) the OB- $\beta_1^{fl/fl}$ cell line, expressing the functional integrin β_1 subunit, (ii) the OB- $\beta_1^{-/-}$ cell line, deficient in the expression of the β_1 integrin subunit after the conditional deletion of the *itgb1* gene. Both cell lines were derived from calvaria of transgenic mice bearing *itgb1*-floxed alleles. OB- $\beta_1^{fl/fl}$ cells were then immortalized as previously described via retroviral infection with the SV40 large T-antigen (Brunner et al., 2011). Next, OB- $\beta_1^{-/-}$ cells were obtained from the parental OB- $\beta_1^{fl/fl}$ cell line after expressing Cre recombinase. All cells were maintained at 1 passage per week.

Determination of the Invasion Capacity and Persistence of *Staphylococcus* spp. in Osteoblasts

Osteoblasts were seeded at 80,000 cells per well on 24-well tissue culture plates (Falcon, Le Pont de Claix, France) in 1 mL

of growth medium with antibiotics. One day later, the cells were washed twice with 1 mL of DMEM before the addition of bacteria. Bacterial suspensions in growth medium without antibiotics were added to the cell culture wells at a multiplicity of infection (MOI) of 100:1, as previously described (Trouillet et al., 2011). After 2 h of co-culture of the bacteria and osteoblasts in a 37°C/5% CO₂ incubator, the wells were washed twice with 1 mL of DMEM. They were then incubated for 1 h in medium containing 200 μ g/mL gentamicin to kill only the extracellular bacteria. The cells used for the measurement of intracellular persistence were then incubated in medium containing 40 μ g/mL gentamicin throughout the remainder of the experiment to eliminate potentially released bacteria from dead cells into the culture medium during the incubation. Osteoblasts used to evaluate internalization (3 h post-infection) and intracellular persistence (24 post-infection) were lysed via osmotic shock. To quantify the intracellular bacteria, dilutions of cell lysates were plated in duplicate on Trypticase Soy Agar (TSA; bioMérieux, Marcy-L'Etoile, France) plates, followed by incubation overnight at 36°C. To evaluate cytotoxicity, lactate dehydrogenase (LDH) release from damaged cells 24 h post-infection was quantified in the cell culture supernatant based on a colorimetric method using a Dimension Vista automated clinical chemistry analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, USA).

DNA Extraction of *S. pseudintermedius* Strains

DNA was extracted after suspending the bacterial colonies in 500 μ L of Quick Extract (Epicentre®, Madison, WI, USA). A thermal shock was applied; this shock included a first step at 65°C for 30 min and a second step at 98°C for 20 min (PTC 100, Heated Lid Thermal Cycler, MJ Research).

DNA Amplification of Targeted Genes

Consensus sequences for *spsD* and *spsL* were obtained using Seaview software (version 4.5.4) after aligning the sequences of the genes of interest (*spsD* and *spsL*) obtained from four public whole genome sequence (WGS) genomes of *S. pseudintermedius*: strain ED99 (GenBank acc. num.: CP002478.1), strain K7 (GenBank acc. num.: BARM01000000), strain E140 (GenBank acc. num.: ANOI01000001) and strain HKU10-03 (GenBank acc. num.: CP002439.1). Specific primers targeting the conserved regions in the consensus region of each gene of interest (*spsD* and *spsL*) were designed using Primer 3 software. The reaction mixture used and the PCR program used for amplification are presented in Supplementary Table S1.

Statistical Analysis

Non-parametric statistical Mann–Whitney *U* tests and *B* tests with a threshold of significance of 0.05 were used to determine statistically significant differences. All analyses were performed using XLSTAT software (Pearson Edition, developed by Addinsoft v.2014). The results were expressed as the means and 95% confidence intervals derived from three independent experiments performed in triplicate.

RESULTS

Adhesion of *Staphylococcus Non-aureus* to Human Fibronectin

The capacity of each isolate to adhere to fibronectin *in vitro* was evaluated after staining with crystal violet and measuring the OD₆₂₀, which is directly related to the amount of adherent bacteria. *S. aureus* 8325-4 and the DU5883 mutant were used to validate the protocol. The ability of the *fnb*-deleted DU5883 strain to adhere to fibronectin was reduced by 76% compared to the wild type strain ($p < 0.001$, **Figure 1A**). The results, which are expressed as percentages of the *S. aureus* 8325-4 adhesion rate (100%), showed that the adhesion rates of all of the tested SNA isolates were below the adhesion rate the negative control DU5883 ($24.87 \pm 2.90\%$). The only exception was *S. pseudintermedius*, which exhibited a significantly higher adhesion rate ($100.25 \pm 13.72\%$) than DU5883 ($p < 0.001$). Additionally, the adhesion rate of *S. pseudintermedius* was in the range of the adhesion rates observed for *S. aureus* 8325-4.

Internalization and Persistence of SNA Isolates in Human Osteoblasts

The internalization (3 h post-infection) and persistence (24 h post-infection) abilities of the strains in MG63 osteoblasts were assessed using a gentamicin protection assay, and the results are expressed as percentages of internalized inoculum (**Figure 1B**). With the exception of *S. pseudintermedius*, all of the tested SNA strains exhibited lower internalization and persistence rates than DU5883 *S. aureus* Δfnb , which was used as the negative control ($0.01 \pm 0.01\%$ and $<0.01\%$, respectively). In contrast, *S. pseudintermedius* demonstrated significantly higher internalization ability ($0.99 \pm 0.20\%$) and

persistence ($0.63 \pm 0.14\%$) in osteoblasts than *S. aureus* 8325-4 ($0.35 \pm 0.15\%$ and $0.32 \pm 0.09\%$, respectively; $p < 0.001$). In addition, although *S. capitis* displays internalization ability in osteoblasts, this species cannot persist in the intracellular compartment.

Cytotoxicity of SNA Isolates to Human Osteoblasts

The cytotoxicity of SNA isolates to MG63 osteoblasts at 24-h post-infection was determined by measuring the levels of LDH released from damaged osteoblasts in the culture supernatant. The cells infected with the reference strain *S. pseudintermedius* exhibited a significantly higher rate of cytotoxicity ($126.22 \pm 3.27\%$, $p < 0.001$) than the uninfected cells (100%). This level of cytotoxicity was even higher than the cytotoxicity observed after infection with *S. aureus* 8325-4 ($103.52 \pm 3.97\%$, $p < 0.001$). Notably, cells infected with all other SNA species showed no cytotoxicity compared to uninfected cells ($100 \pm 1.87\%$; $p = 0.55$, **Figure 1C**).

Behavior of a Set of Clinical Isolates of *S. pseudintermedius*

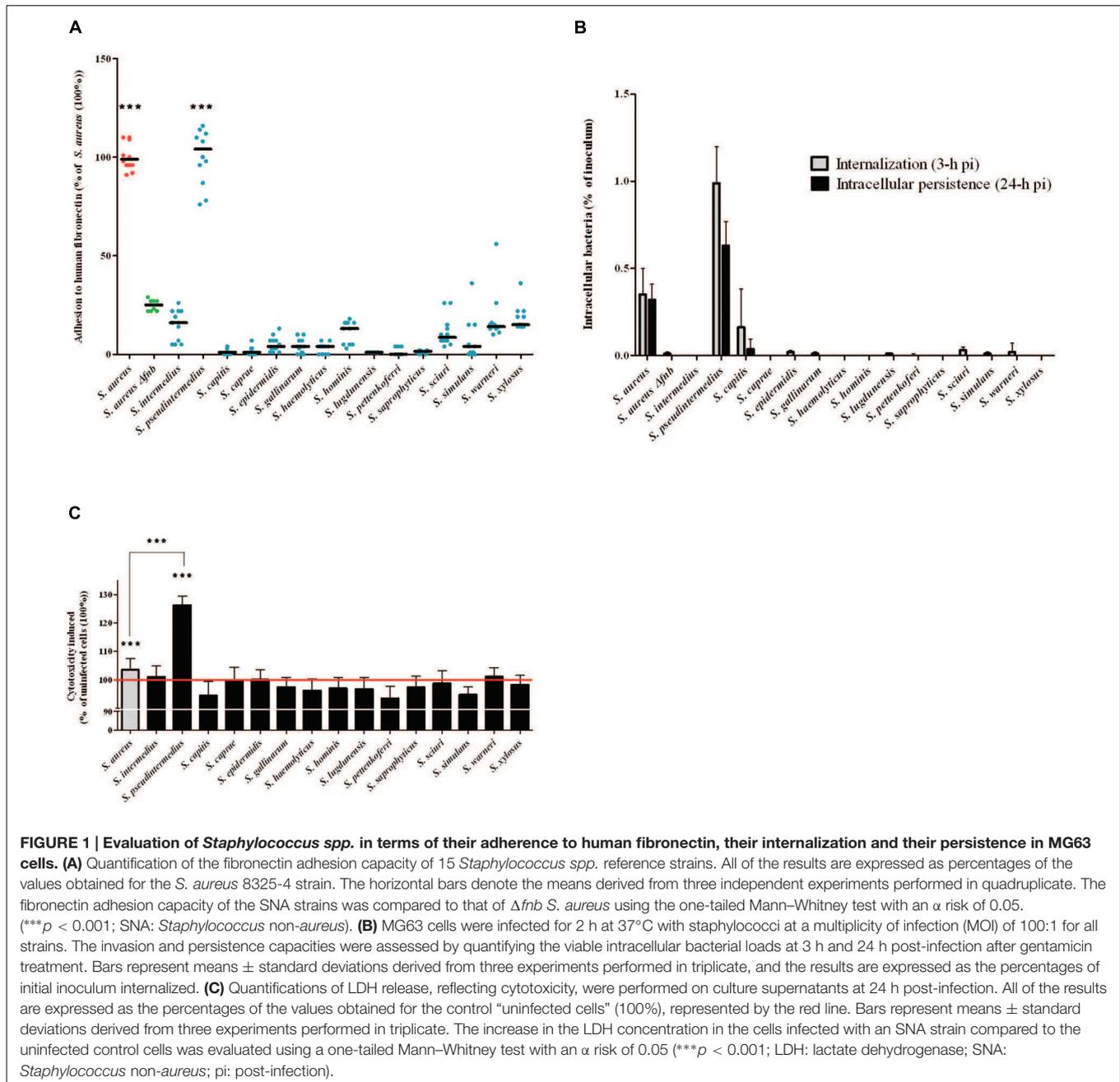
The original results observed for the reference strain *S. pseudintermedius* led us to investigate whether it's particularly high abilities to adhere to fibronectin and internalize into osteoblasts was species-specific and consequently observed for other *S. pseudintermedius* isolates. Sixteen out of the 17 tested clinical *S. pseudintermedius* isolates adhered significantly more frequently than DU5883 Δfnb *S. aureus* ($24.87 \pm 2.90\%$; $p < 0.01$). The adhesion rate of *S. pseudintermedius* isolates varied from $28.54 \pm 1.7\%$ to $109.74 \pm 2.28\%$ compared to *S. aureus* 8325-4, which was used as a reference (100%; **Figure 2A**). In addition, 14 out of the 15 gentamicin-susceptible isolates exhibited higher internalization and persistence rates than DU5883 Δfnb *S. aureus* based on the gentamicin protection assay ($p < 0.01$ – **Figure 2B** and Supplementary Figure S1). Concerning infection-induced cytotoxicity, 14 out of 15 isolates harbored a comparable phenotype to the reference strain, and cells infected with these isolates exhibited a significantly higher cytotoxicity rate ($p < 0.001$) than uninfected cells (100%; Supplementary Figure S1).

spsD and *spsL* Amplification via PCR

spsD and *spsL* (*S. pseudintermedius* surface proteins), the two genes potentially involved in the internalization process due to their high homology to *S. aureus* FnBPs, were investigated. The results of the amplification of both *spsD* and *spsL* showed the presence of these genes in all *S. pseudintermedius* isolates ($n = 18$), including the strain n°15, which was unable to adhere to fibronectin or become internalized.

Characterization of the Cellular Pathways Involved in the Internalization of *S. pseudintermedius*

To determine if the internalization mechanism of *S. pseudintermedius* in osteoblasts involves the cellular integrin

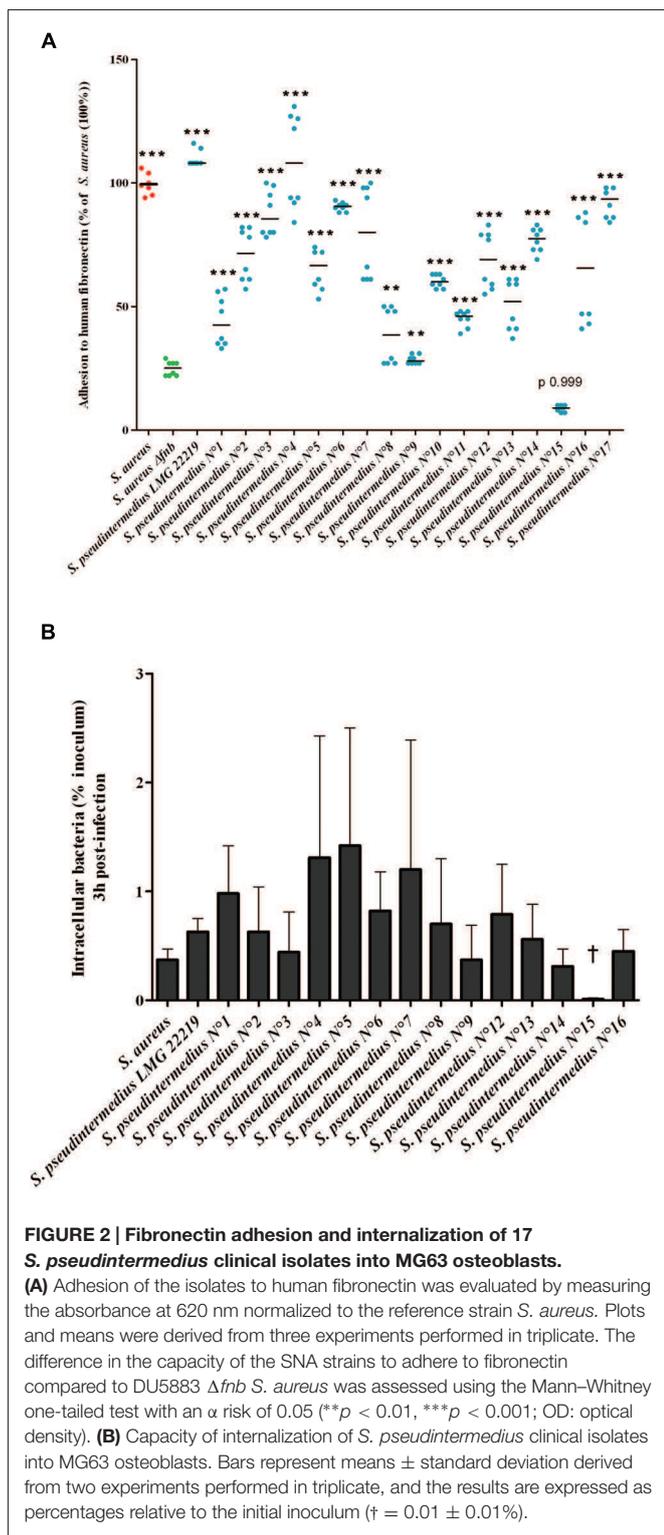


$\alpha_5\beta_1$, as described for *S. aureus*, an *in vitro* model comparing two murine osteoblast cell lines, OB- $\beta_1^{fl/fl}$ and OB- $\beta_1^{-/-}$ (i.e., with and without β_1 integrins, respectively), was used (Figure 3). We evaluated the internalization ability of *S. aureus* 8325-4 (positive control), *S. aureus* DU5883 (negative control), and *S. pseudintermedius* LMG 22219 (reference strain). As expected, although the rate of internalization of the OB- $\beta_1^{fl/fl}$ cells reached $1.14 \pm 0.41\%$ of the inoculum for *S. aureus* 8325-4, a complete loss of internalization was observed for the OB- $\beta_1^{-/-}$ cells ($0.01 \pm 0.01\%$, $p < 0.001$). Similarly, the *S. pseudintermedius* strain demonstrated a high capacity of internalization among OB- $\beta_1^{fl/fl}$ cells ($3.12 \pm 1.2\%$ of the inoculum), but this capacity

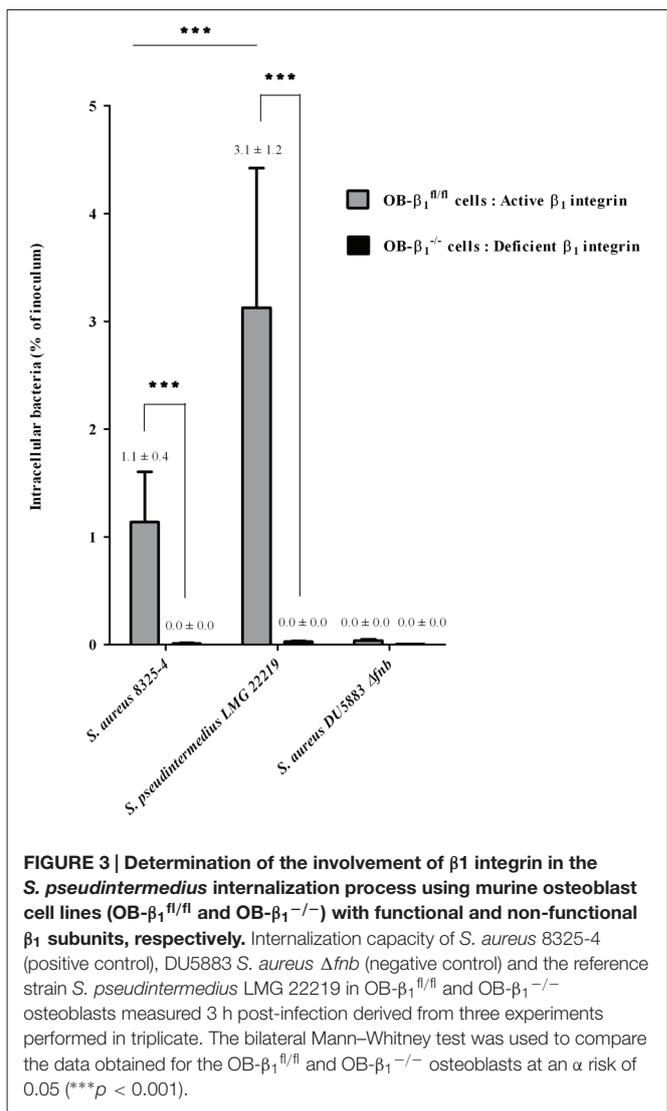
was abolished in OB- $\beta_1^{-/-}$ cells ($0.03 \pm 0.02\%$, $p < 0.001$). Of note, internalization of *S. pseudintermedius* into OB- $\beta_1^{fl/fl}$ osteoblasts was 2.7-fold higher than the internalization of the *S. aureus* strain ($p < 0.001$). These data demonstrated that the mechanism underlying *S. pseudintermedius* internalization is β_1 integrin dependent.

DISCUSSION

The aim of the present study was to investigate the ability and impact of internalization of various SNA species into



osteoblasts, a mechanism implicated in the chronicity of BJIs. A screening approach using 15 reference strains of 15 different SNA species was used to evaluate the capacity of SNA isolates to (i) adhere to fibronectin, (ii) become internalized and persist intracellularly, and (iii) induce the death of human



osteoblasts. Our results revealed a homogeneous behavior among the different investigated virulence phenotypes for most of the SNA species tested. Indeed, all of the species except one (14/15) were unable to adhere to fibronectin, to become internalized, to persist in the intracellular compartment and to induce cytotoxicity in human osteoblasts. These observations suggest that internalization into NPPCs is likely not a major pathophysiological mechanism associated with the chronicity and/or recurrence of BJIs with most SNA species.

To our best knowledge, this is the first study to compare the interactions between human NPPCs and a large panel of staphylococcal species under the same experimental conditions. This screening approach, using one strain per species, was used to quickly identify possible atypical features of an SNA species. However, this approach may also represent a limitation because our results may not be generalizable at the species level. Nevertheless, the few studies

of SNA species that have included a panel of strains have reported that internalization into NPPCs is a feature shared among SNA species (Valour et al., 2013; Campoccia et al., 2015).

In contrast to the other tested species, *S. pseudintermedius* showed a significant capacity to adhere to fibronectin, to become internalized and to persist in osteoblasts, even more so than *S. aureus*. Using a complementary panel of 17 *S. pseudintermedius* clinical isolates, we confirmed that all of the tested isolates except one (strain n°15) exhibited the same phenotype as the reference strain. Interestingly, the strain that was unable to invade osteoblasts was also the only strain unable to adhere to fibronectin. This observation suggested the involvement of fibronectin in the internalization process and, as a consequence, indicated that fibronectin-binding proteins expressed on the bacterial surface could play a role in the internalization process of *S. pseudintermedius*, as demonstrated in *S. aureus*, via interactions with FnBPA and FnBPB, which are encoded by the *fnbA* and *fnbB* genes, with fibronectin. However, Bannoehr et al. (2011) reported the absence of the *fnbA* and *fnbB* genes from the genomes of *S. pseudintermedius* available in the NCBI database but the presence of two cell wall-anchored (CWA) proteins, SpsD and SpsL, could putatively bind to fibronectin. Concomitantly, in line with our results, a recent study showed that *S. pseudintermedius* is able to be internalized by canine progenitor epidermal keratinocytes (CPEKs), another type of NPPCs (Pietrocola et al., 2015). The authors demonstrated that either SpsD or SpsL is sufficient for the internalization of *S. pseudintermedius* into CPEKs. Here, we detected the presence of these two genes in all of the clinical isolates of this species, including the only isolate that exhibited no adhesion to fibronectin and no internalization. Moreover, using the murine osteoblast cell lines OB- $\beta_1^{fl/fl}$ and OB- $\beta_1^{-/-}$, we showed that internalization was abolished when the interaction between the bacteria and cellular β_1 integrin is compromised. This finding confirmed a key role of this integrin in the bacterial internalization process. These results are in agreement with the observations of Pietrocola et al. (2015) who used a different approach based on $\alpha_5\beta_1$ integrin-blocking antibodies. Taken together, the results concerning the *S. pseudintermedius* cellular invasion process appear to be consistent with those for *S. aureus*, in which 3 effectors are involved in the invasion process: (i) the CWA proteins SpsD and SpsL, as opposed to FnBPA and FnBPB in *S. aureus*; (ii) fibronectin; and (iii) the $\alpha_5\beta_1$ integrins of human and canine NPPCs. This evidence suggests that this mechanism is independent of the cell type and origin.

In addition, after internalization, the intraosteoblastic lifestyle of *S. pseudintermedius* was associated with a high level of cytotoxicity, even greater than that observed for *S. aureus* 8325-4 and a large panel of clinical *S. aureus* isolates (data not shown). This result suggests that *S. pseudintermedius* likely expresses several specific virulence factors in the intracellular compartment. Pietrocola et al. (2015) hypothesized that a leukotoxin similar to the *S. aureus* Panton-Valentine leucocidin (PVL) termed Luk-I, which is encoded by the two co-transcribed

genes *lukS* and *lukF*, may be involved in *S. pseudintermedius* virulence (Bannoehr and Guardabassi, 2012; Cheung et al., 2014). In fact, it has been demonstrated that similar to PVL, Luk-I targets human polymorphonuclear leukocytes (Riegel et al., 2011). Moreover, we and others demonstrated that the intracellular cytotoxicity of *S. aureus* is related to phenol-soluble modulins (PSM) expression, although PVL does not contribute to the intracellular cytotoxic activity of the bacteria on osteoblasts (Rasigade et al., 2013). Thus, regarding the invasion process, the mechanism is likely similar for *S. pseudintermedius*, for which cell death is likely involved in the expression of PSMs, whose genes are present in all available *S. pseudintermedius* genomes (Cheung et al., 2014). Notably, the presence of PSMs has been described in the SNA species, although they are unable to be internalized by osteoblasts, as demonstrated in our study. In addition to their involvement in intracellular cytotoxicity, PSMs have been associated with pleiotropic activities (biofilm formation and spreading processes) that could play a role in infections with these species (Tsompanidou et al., 2013; Dastgheyb et al., 2015).

Our results raise interesting questions about *S. pseudintermedius*. In fact, the invasion process of *S. pseudintermedius* mirrors that of *S. aureus*, as cellular invasion involved the SpsD and SpsL proteins for the former and the FnBPA and FnBPB proteins for the latter. The mechanism of NPPCs cytotoxicity also appears to be similar between these species. In fact, even if *S. pseudintermedius* is not a common agent of human disease, it is a major veterinary pathogen responsible for a high proportion of canine infections, including cutaneous infections (such as pyoderma) associated with purulent necrotizing infections (Bannoehr and Guardabassi, 2012) and BJIs (Miedzobrodzki et al., 2010). These severe forms of infection are in agreement and likely for a part related to the high cytotoxicity observed after *S. pseudintermedius* invasion into host cells. The reason underlying the low prevalence of *S. pseudintermedius* in human infections is questionable and is in opposition to the intensive and close contact between humans and pets in which a high prevalence of *S. pseudintermedius* is observed, primarily among dogs [including an increasing prevalence of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* (Duim et al., 2015)]. Indeed, only a few sporadic human of *S. pseudintermedius* infection have been reported, mostly after contact with dogs (Van Hoovels et al., 2006; van Duijkeren et al., 2011). These findings can be explained by a specific host tropism, related to the differential ability of *S. pseudintermedius* and *S. aureus* to colonize dogs and humans, respectively. Hanselman et al. (2009) reported rates of *S. pseudintermedius* colonization of 4.1% in humans but of 46% in dogs. This difference could be associated with the presence of (i) specific factors, such as microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs), in each of the two staphylococcal species and/or (ii) specific cell-surface targets of MSCRAMMs present on mucosal cells. This hypothesis is reinforced by the findings of a recent study that compared the adhesiveness of human and canine strains of *S. pseudintermedius*. The results showed that the canine strain adhered more efficiently to canine corneocytes than to human corneocytes. Furthermore,

strains isolated from humans exhibited similar adhesion abilities between the two cell types; this result suggested an adaptation of these strains to colonize a new host (Latronico et al., 2014).

CONCLUSION

Screening of a large panel of SNA species showed that persistence in NPPCs is likely not a widespread and predominant pathophysiological pathway underlying the chronicity of infection with SNA, especially BJI. These findings emphasize the need for studies focused on biofilm formation by SNA species that are implicated in BJIs, which can represent another pathophysiological pathway of BJI persistence. *S. pseudintermedius* appears to be an exception, as this species exhibited abilities to invade and then induce cytotoxicity to NPPCs that were similar to the characteristics of *S. aureus*. This evidence could explain the severe and necrotic forms of infection caused by *S. pseudintermedius* in pets, which exhibit a high prevalence of *S. pseudintermedius* infection.

REFERENCES

- Bannoehr, J., Ben Zakour, N. L., Reglinski, M., Inglis, N. F., Prabhakaran, S., Fossum, E., et al. (2011). Genomic and surface proteomic analysis of the canine pathogen *Staphylococcus pseudintermedius* reveals proteins that mediate adherence to the extracellular matrix. *Infect. Immun.* 79, 3074–3086. doi: 10.1128/IAI.00137-11
- Bannoehr, J., and Guardabassi, L. (2012). *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Vet. Dermatol.* 23, 253–266, e251–e252. doi: 10.1111/j.1365-3164.2012.01046.x
- Brunner, M., Millon-Fremillon, A., Chevalier, G., Nakchbandi, I. A., Mosher, D., Block, M. R., et al. (2011). Osteoblast mineralization requires beta1 integrin/ICAP-1-dependent fibronectin deposition. *J. Cell Biol.* 194, 307–322. doi: 10.1083/jcb.201007108
- Campoccia, D., Testoni, F., Ravaioli, S., Cangini, I., Maso, A., Speziale, P., et al. (2015). Orthopedic implant-infections. Incompetence of *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis* and *Enterococcus faecalis* to invade osteoblasts. *J. Biomed. Mater. Res. A* doi: 10.1002/jbm.a.35564 [Epub ahead of print].
- Cheung, G. Y., Joo, H. S., Chatterjee, S. S., and Otto, M. (2014). Phenol-soluble modulins—critical determinants of *Staphylococcal* virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 698–719. doi: 10.1111/1574-6976.12057
- Dastgheyb, S. S., Villaruz, A. E., Le, K. Y., Tan, V. Y., Duong, A. C., Chatterjee, S. S., et al. (2015). Role of phenol-soluble modulins in formation of *Staphylococcus aureus* biofilms in synovial fluid. *Infect. Immun.* 83, 2966–2975. doi: 10.1128/IAI.00394-15
- Duim, B., Verstappen, K. M., Broens, E. M., Laarhoven, L. M., van Duijkeren, E., Hordijk, J., et al. (2015). Changes in the population of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* and the dissemination of antimicrobial resistant phenotypes in the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* 54, 283–288. doi: 10.1128/JCM.01288-1215
- Fredheim, E. G., Klingenberg, C., Rohde, H., Frankenberger, S., Gaustad, P., Flaegstad, T., et al. (2009). Biofilm formation by *Staphylococcus haemolyticus*. *J. Clin. Microbiol.* 47, 1172–1180. doi: 10.1128/JCM.01891-08
- Hanselman, B. A., Kruth, S. A., Rousseau, J., and Weese, J. S. (2009). Coagulase positive *Staphylococcal* colonization of humans and their household pets. *Can. Vet. J.* 50, 954–958.
- Hussain, M., Steinbacher, T., Peters, G., Heilmann, C., and Becker, K. (2015). The adhesive properties of the *Staphylococcus lugdunensis* multifunctional autolysin

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the experiments: FL and ST-A. Performed the experiments: YM. Data collection: YM. Data analysis: PM, ST-A and YM. Data interpretation: PM, ST-A and FL. Drafting manuscript: YM and ST-A. Revising manuscript content: FV, DB, MB, MH, J-PR, TF, ST-A, and FL. FL takes responsibility for the integrity of the data analysis.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and Allocations de Recherche du Ministère de la Recherche.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01063>

- AtL and its role in biofilm formation and internalization. *Int. J. Med. Microbiol.* 305, 129–139. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.11.010
- Khalil, H., Williams, R. J., Stenbeck, G., Henderson, B., Meghji, S., and Nair, S. P. (2007). Invasion of bone cells by *Staphylococcus epidermidis*. *Microbes Infect.* 9, 460–465. doi: 10.1016/j.micinf.2007.01.002
- Latronico, F., Moodley, A., Nielsen, S. S., and Guardabassi, L. (2014). Enhanced adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* sequence type 71 to canine and human corneocytes. *Vet. Res.* 45, 70. doi: 10.1186/1297-9716-45-70
- Lentino, J. R. (2003). Prosthetic joint infections: bane of orthopedists, challenge for infectious disease specialists. *Clin. Infect. Dis.* 36, 1157–1161. doi: 10.1086/374554
- Lourtet-Hascoett, J., Bicart-See, A., Felice, M. P., Giordano, G., and Bonnet, E. (2015). Is Xpert MRSA/SA SSTI real-time PCR a reliable tool for fast detection of methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococci* in periprosthetic joint infections? *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 83, 59–62. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.04.009
- Miedzobrodzki, J., Kasprowicz, A., Bialecka, A., Jaworska, O., Polakowska, K., Wladyka, B., et al. (2010). The first case of a *Staphylococcus pseudintermedius* infection after joint prosthesis implantation in a dog. *Pol. J. Microbiol.* 59, 133–135.
- Oliveira, F., Lima, C. A., Bras, S., Franca, A., and Cerca, N. (2015). Evidence for inter- and intraspecies biofilm formation variability among a small group of coagulase-negative *Staphylococci*. *FEMS Microbiol. Lett.* 362:fnv175. doi: 10.1093/femsle/fnv175
- Pietrocola, G., Gianotti, V., Richards, A., Nobile, G., Geoghegan, J. A., Rindi, S., et al. (2015). Fibronectin binding proteins SpsD and SpsL both support invasion of Canine epithelial cells by *Staphylococcus pseudintermedius*. *Infect. Immun.* 83, 4093–4102. doi: 10.1128/IAI.00542-15
- Rasigade, J. P., Moulay, A., Lhoste, Y., Tristan, A., Bes, M., Vandenesch, F., et al. (2011). Impact of sub-inhibitory antibiotics on fibronectin-mediated host cell adhesion and invasion by *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* 11:263. doi: 10.1186/1471-2180-11-263
- Rasigade, J. P., Trouillet-Assant, S., Ferry, T., Diep, B. A., Sapin, A., Lhoste, Y., et al. (2013). PSMs of hypervirulent *Staphylococcus aureus* act as intracellular toxins that kill infected osteoblasts. *PLoS ONE* 8:e63176. doi: 10.1371/journal.pone.0063176
- Riegel, P., Jesel-Morel, L., Laventie, B., Boisset, S., Vandenesch, F., and Prevost, G. (2011). Coagulase-positive *Staphylococcus pseudintermedius* from animals

- causing human endocarditis. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 237–239. doi: 10.1016/j.ijmm.2010.09.001
- Seifert, H., Oltmanns, D., Becker, K., Wisplinghoff, H., and von Eiff, C. (2005). *Staphylococcus lugdunensis* pacemaker-related infection. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1283–1286. doi: 10.3201/eid1108.041177
- Szczuka, E., Telega, K., and Kaznowski, A. (2015). Biofilm formation by *Staphylococcus hominis* strains isolated from human clinical specimens. *Folia Microbiol. (Praha)* 60, 1–5. doi: 10.1007/s12223-014-0332-4
- Trouillet, S., Rasigade, J. P., Lhoste, Y., Ferry, T., Vandenesch, F., Etienne, J., et al. (2011). A novel flow cytometry-based assay for the quantification of *Staphylococcus aureus* adhesion to and invasion of eukaryotic cells. *J. Microbiol. Methods* 86, 145–149. doi: 10.1016/j.jmimet.2011.04.012
- Tsompanidou, E., Denham, E. L., Becher, D., de Jong, A., Buist, G., van Oosten, M., et al. (2013). Distinct roles of phenol-soluble modulins in spreading of *Staphylococcus aureus* on wet surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 886–895. doi: 10.1128/AEM.03157-12
- Valour, F., Trouillet-Assant, S., Rasigade, J. P., Lustig, S., Chanard, E., Meugnier, H., et al. (2013). *Staphylococcus epidermidis* in orthopedic device infections: the role of bacterial internalization in human osteoblasts and biofilm formation. *PLoS ONE* 8:e67240. doi: 10.1371/journal.pone.0067240
- van Duijkeren, E., Kamphuis, M., van der Mije, I. C., Laarhoven, L. M., Duim, B., Wagenaar, J. A., et al. (2011). Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* between infected dogs and cats and contact pets, humans and the environment in households and veterinary clinics. *Vet. Microbiol.* 150, 338–343. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.02.012
- Van Hoovels, L., Vankeerberghen, A., Boel, A., Van Vaerenbergh, K., and De Beenhouwer, H. (2006). First case of *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a human. *J. Clin. Microbiol.* 44, 4609–4612. doi: 10.1128/JCM.01308-06
- Zimmerli, W., Trampuz, A., and Ochsner, P. E. (2004). Prosthetic-joint infections. *N. Engl. J. Med.* 351, 1645–1654. doi: 10.1056/NEJMra040181

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

Copyright © 2016 Maali, Martins-Simões, Valour, Bouvard, Rasigade, Bes, Haenni, Ferry, Laurent and Trouillet-Assant. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

DEUXIEME PUBLICATION: Understanding the virulence of *Staphylococcus pseudintermedius*: a major role of Pore-Forming Toxins

Staphylococcus pseudintermedius est une bactérie commensale de la peau et des muqueuses des chiens. Son portage atteint plus de 80% chez certaines populations de ces animaux en bonne santé. Cette espèce est également l'agent pathogène bactérien le plus fréquemment retrouvé chez les chiens souffrant d'infections au niveau des oreilles, des os ou d'abcès post-chirurgicaux. *S. pseudintermedius* n'est pas un pathogène opportuniste exclusif du chien, en effet cette espèce est régulièrement isolée dans les infections humaines, principalement par transfert zoonotique de l'Animal à l'Homme. Qu'elles aient une origine canine ou humaine, les infections à *S. pseudintermedius* sont classiquement sévères en raison de processus nécrosants conduisant à une destruction profonde des cellules et des tissus. Contrairement à *S. aureus*, les mécanismes physiopathologiques impliqués dans cette virulence n'étaient pas complètement compris.

Les premiers résultats obtenus dans l'étude précédente ont permis de mettre en évidence une forte cytotoxicité intracellulaire induite après internalisation de *S. pseudintermedius*. L'objectif de ce second travail a été de chercher à identifier les facteurs de virulence responsables de l'activité cytotoxique pour différents types cellulaires qui pourraient expliquer la forte nécrose observée lors des infections à *S. pseudintermedius*. Après addition des surnageants filtrés de culture de *S. pseudintermedius* sur des cellules phagocytaires non professionnelles (NPPc), ici des ostéoblastes (MG63), la libération d'un taux élevé de LDH a permis de montrer que la cytotoxicité était principalement induite par des facteurs sécrétés. Nous avons alors concentré notre attention sur les toxines de *S. pseudintermedius*, notamment sur les pore-forming toxins

(PFT) connues pour leurs capacités à endommager les membranes plasmiques et à provoquer la lyse cellulaire.

Nos recherches *in silico*, dans la base de données publiques NCBI, de toxines de type PFT conduites par homologies avec celles connues chez *S. aureus*, ont révélé la présence de deux protéines de type PSMs (δ -toxine et PSM ϵ) ainsi que d'une leucotoxine Luk-I (LukS-I et LukF-I). Leur présence a été confirmée par PCR sur une collection de souches cliniques (n = 17). Après construction des plasmides pQE-*lukS-I* et pQE-*lukF-I*, suivie de la production chez *E. coli*, de la purification et de l'assemblage des sous-unités LukS-I et LukF-I, nous avons pu montrer que la leucotoxine recombinante Luk-I ne présentait aucune activité cytotoxique sur les NPPc, alors qu'une forte activité a pu être mise en évidence sur les cellules phagocytaires professionnelles représentées par les neutrophiles. Cette spécificité cellulaire pour les neutrophiles suggère un mécanisme d'action récepteur-dépendant, comme il a été démontré pour la PVL de *S. aureus*. Dans le but d'identifier le récepteur de Luk-I, des monocytes U937 exprimant de manière ectopique les récepteurs C5aR1 (récepteur 1 du composant 5 du complément) et CXCR2 (récepteur 2 à l'interleukine 8) ont été exposés à différentes concentrations de Luk-I recombinantes. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence pour la première fois que le récepteur cible de Luk-I est le récepteur à l'interleukine 8, le CXCR2, le C5aR1 ne jouant aucun rôle.

Contrairement à Luk-I, la δ -toxine et le PSM ϵ synthétiques ont montré une forte activité cytotoxique sur les NPPc. Cette activité était dose-dépendante (à partir de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Des études conduites sur des prélèvements *in vivo* sur les PSMs de *S. aureus* ont détectées des concentrations allant jusqu'à 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ par HPLC-MS, l'activité des concentrations testées pour la δ -toxine et le PSM ϵ , souligne la relevance des doses testées par rapport à celles retrouvées *in vivo*. L'analyse par HPLC-MS de la δ -toxine et du PSM ϵ a montré que ces toxines étaient sécrétées *in vitro* à de fortes concentrations (jusqu'à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) par des souches cliniques de *S. pseudintermedius*. Afin d'estimer la contribution des PSMs dans le pouvoir cytotoxique des *S. pseudintermedius*, un test d'inhibition par le sérum humain a été réalisé. La supplémentation en sérum humain des surnageants de culture de souches de *S. pseudintermedius*, connue pour

inhiber l'action des PSMs, a conduit à une abolition complète de la cytotoxicité, ce qui indique que les PSM sont des acteurs essentiels du phénotype cytotoxique observé sur les NPPc.

Les résultats de cette étude suggèrent que la gravité des infections à *S. pseudintermedius* est, au moins en partie, expliquée par une action combinée de Luk-I qui cible spécifiquement les cellules immunitaires exprimant le récepteur CXCR2 et les PSMs qui perturbent les membranes à la fois des NPPc et des cellules immunitaires. La présente étude confirme et renforce un peu plus le rôle clé des PSMs dans la virulence des différentes espèces appartenant au genre *Staphylococcus*.



Understanding the Virulence of *Staphylococcus pseudintermedius*: A Major Role of Pore-Forming Toxins

Yousef Maali¹, Cédric Badiou¹, Patricia Martins-Simões^{1,2,3}, Elisabeth Hodille^{1,2}, Michele Bes^{2,3}, François Vandenesch^{1,2,3}, Gérard Lina^{1,2,3}, Alan Diot¹, Frederic Laurent^{1,2,3*†} and Sophie Trouillet-Assant^{1,2,4†}

¹ Centre International de Recherche en Infectiologie, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1111, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR5308, Université de Lyon 1, École Normale Supérieure de Lyon, Team "Pathogenesis of Staphylococcal Infections," Lyon, France, ² Institut des Agents Infectieux, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France, ³ Centre National de Référence des Staphylocoques, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France, ⁴ Laboratoire Commun de Recherche Lyon Sud, Hospices Civils de Lyon-bioMérieux, Pierre Bénite, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Yinduo Ji,
University of Minnesota Twin Cities,
United States

Reviewed by:

Michael Otto,
National Institute of Allergy and
Infectious Diseases (NIAID),
United States
Chia Y. Lee,
University of Arkansas for Medical
Sciences, United States

*Correspondence:

Frederic Laurent
frederic.laurent@univ-lyon1.fr

[†]These authors have contributed
equally to this work.

Received: 16 April 2018

Accepted: 11 June 2018

Published: 28 June 2018

Citation:

Maali Y, Badiou C, Martins-Simões P,
Hodille E, Bes M, Vandenesch F,
Lina G, Diot A, Laurent F and
Trouillet-Assant S (2018)
Understanding the Virulence of
Staphylococcus pseudintermedius: A
Major Role of Pore-Forming Toxins.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 8:221.
doi: 10.3389/fcimb.2018.00221

Staphylococcus pseudintermedius is responsible for severe and necrotizing infections in humans and dogs. Contrary to *S. aureus*, the pathophysiological mechanisms involved in this virulence are incompletely understood. We previously showed the intracellular cytotoxicity induced after internalization of *S. pseudintermedius*. Herein, we aimed to identify the virulence factors responsible for this cytotoxic activity. After addition of filtered *S. pseudintermedius* supernatants in culture cell media, MG63 cells, used as representative of non-professional phagocytic cells (NPPc), released a high level of LDH, indicating that the cytotoxicity was mainly mediated by secreted factors. Accordingly, we focused our attention on *S. pseudintermedius* toxins. *In silico* analysis found the presence of two PSMs (δ -toxin and PSM ϵ) as well as Luk-I leukotoxin, the presence of which was confirmed by PCR in all clinical strains tested ($n = 17$). Recombinant Luk-I leukotoxin had no cytotoxic activity on NPPc but the ectopic expression of the CXCR2 receptor in U937 cells conferred cytotoxicity to Luk-I. This is in agreement with the lack of Luk-I effect on NPPc and the previous report of Luk-I cytotoxic activity on immune cells. Contrary to Luk-I, synthetic δ -toxin and PSM ϵ had a strong cytotoxic activity on NPPc. The secretion of δ -toxin and PSM ϵ at cytotoxic concentrations by *S. pseudintermedius* in culture supernatant was confirmed by HPLC-MS. In addition, the supplementation of such supernatants with human serum, known to inhibit PSM, induced a complete abolition of cytotoxicity which indicates that PSMs are the key players in the cytotoxic phenotype of NPPc. The results suggest that the severity of *S. pseudintermedius* infections is, at least in part, explained by a combined action of Luk-I that specifically targets immune cells expressing the CXCR2 receptor, and PSMs that disrupt cell membranes whatever the cell types. The present study strengthens the key role of PSMs in virulence of the different species belonging to *Staphylococcus* genus.

Keywords: *Staphylococcus pseudintermedius*, pore-forming toxins, phenol-soluble modulins, leukotoxin Luk-I, CXCR2 receptor, cytotoxicity, non-professional phagocytic cells, polymorphonuclear neutrophils

INTRODUCTION

Staphylococcus pseudintermedius is a skin and mucous commensal bacterium in dogs, with carriage reaching more than 80% in some populations of healthy dogs (Rubin and Chirino-Trejo, 2011; Bannoehr and Guardabassi, 2012). This species is also the most frequent bacterial pathogen in clinical canine specimens mainly from skin wounds but also the ears, bones or post-surgical abscesses (Fazakerley et al., 2009; Miedzobrodzki et al., 2010; Bannoehr and Guardabassi, 2012). In addition to this virulence profile, methicillin-resistance in *S. pseudintermedius* (MRSP) has emerged worldwide over the two last decades and the treatment of *S. pseudintermedius* infections is now considered as a clinical challenge in veterinary medicine. In addition, *S. pseudintermedius* is increasingly isolated in human infections, mainly after contacts with dogs (Somayaji et al., 2016). Thus, since the first human case was described in 2006 (endocarditis occurring after the implantation of a cardioverter-defibrillator device Van Hoovels et al., 2006), sporadic community-acquired infections as well as nosocomial outbreaks involving *S. pseudintermedius* have been reported (Starlander et al., 2014; Somayaji et al., 2016).

Whether from canine or human origin, *S. pseudintermedius* infections are classically severe due to necrotizing processes, as illustrated in dermatitis and fasciitis in which a deep destruction of cells and tissues are observed (Weese et al., 2009). *S. pseudintermedius*, often described as the “dog’s golden staph,” shares several features with *S. aureus*, notably the capacity to express a variety of virulence factors such as: (i) proteolytic enzymes including coagulase and protease (Garbacz et al., 2013), (ii) microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs), such as the staphylococcal protein A, that are host surface proteins and participate to the active tissue colonization and the evasion of the host immune system (Bannoehr et al., 2011, 2012; Balachandran et al., 2017), and (iii) toxins (Dziewanowska et al., 1996; Futagawa-Saito et al., 2004). Among the latter, pore-forming toxins (PFTs) have been extensively investigated for their ability to damage plasma membranes and lead to cell lysis (Prévost et al., 2001). Some of them induce cells death after the binding of the toxin with receptors on cell surface. This is the case for *S. aureus* bicomponent leukotoxins such as the Pantón–Valentine leukocidin (PVL) or the leukotoxin ED (LukED) which act only on immune cells because of the interaction with cell receptors C5a or CXCR2, respectively (Reyes-Robles et al., 2013; Spaan et al., 2013). *S. pseudintermedius* produces a bicomponent leukotoxin, Luk-I, composed of the secreted LukS-I and LukF-I proteins that induce cell lysis. This activity has been reported only on PMNs and to date, no receptor has yet been identified (Prevost et al., 1995). Recently, *in vitro* studies underlined the highly virulent behavior of *S. pseudintermedius* on non-professional phagocytic cells (NPPc) such as canine keratinocytes, human epithelial cells and human osteoblasts, which are the most impacted cells during *S. pseudintermedius* infections (Pietrocola et al., 2015; Maali et al., 2016). Pietrocola et al. suggested that the *S. pseudintermedius* bicomponent leukotoxin Luk-I could also be involved in the cell death observed after internalization

of *S. pseudintermedius* in NPPc (Pietrocola et al., 2015). To the best of our knowledge, this hypothesis has yet to be investigated. Phenol-soluble modulins (PSMs) represent another class of membrane damaging staphylococcal toxins. This class of amphipathic proteins has alpha-helical structure, and has a direct and receptor-independent action on the lipid bilayers of cells (Peschel and Otto, 2013). Various types of PSMs (α , β , δ -toxin...) have been described and are highly conserved among *S. aureus* or *Staphylococcus non-aureus* (SNA) strains (Cheung et al., 2014; Cameron et al., 2015; Da et al., 2017); whole genome sequencing analysis of *S. pseudintermedius* has revealed the presence of several PSMs: δ -toxin, PSM β , and PSM ϵ (Cheung et al., 2014).

Taking into consideration all of these elements, we sought to identify the virulence factors involved in the cytolytic effect on NPPc and immune cells related to severe and necrotizing *S. pseudintermedius* infections. Using *in vitro* cellular models (immune cells, NPPc, and transfected cells) and purified synthetic or recombinant toxins, bacterial culture supernatants with or without PSMs inhibitors; we identified the membrane receptor of Luk-I present on immune cells and demonstrated the specific *S. pseudintermedius* cytolytic activity of PSM ϵ and δ -toxin on both NPPc and immune cells.

MATERIALS AND METHODS

Human Ethics Statement

This study was approved by the French South-East ethics committee (reference number 2013-018). In accordance with French legislation, written informed patient consent was not required for the use of the collected clinical isolates.

Bacterial Strains and Culture Media

A collection of 17 human and animal clinical *S. pseudintermedius* isolates was used. Characteristics of the isolates are summarized in **Table 1**. Identifications of all strains were confirmed using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS; VITEK[®] MS, bioMérieux, Marcy-L’Etoile, France) (Silva et al., 2015). The strains *S. aureus* LAC USA300 and its isogenic mutant *S. aureus* LAC Δ *psm* (α , β , δ), kindly provided by Frank Deleo (National Institutes of Health, Hamilton, MT, US) were used as positive and negative controls, respectively, for cytotoxicity experiments (Wang et al., 2007; Davido et al., 2016).

Screening, Diversity, and Purification of *S. pseudintermedius* Toxins

Screening for the presence of *lukF-I* and *lukS-I* genes encoding leukocidin Luk-I, *psm ϵ* that encodes PSM ϵ , and *hld* that encodes δ -toxin was performed in the *S. pseudintermedius* isolates by PCR. Oligonucleotides and annealing temperatures are presented in the Supplementary Table 1. The resulting PCR products were sequenced (Biofidal, Lyon, France) and aligned using SeaView (Version 4.6.3; PRABI, Lyon, France) to investigate the genetic polymorphism of each gene (Gouy et al., 2010).

Purified toxins were then obtained by recombinant or synthetic production. For Luk-I, *lukS-I* and *lukF-I* genes were amplified by PCR using chromosomal DNA of

TABLE 1 | Description of the strains used.

Species	Strains	Origin
<i>S. aureus</i>	LAC USA300 WT	Human blood
<i>S. aureus</i>	LAC USA300 Δ psm (α, β, δ)	Human blood
<i>S. pseudintermedius</i>	LMG 22219	Feline lung tissue
<i>S. pseudintermedius</i>	LMG 22220	Horse skin lesion
<i>S. pseudintermedius</i>	N900260	Human skin lesion
<i>S. pseudintermedius</i>	N930300	Human nasal carriage
<i>S. pseudintermedius</i>	N940453	Human blood culture
<i>S. pseudintermedius</i>	N950082	Human cerebrospinal fluid
<i>S. pseudintermedius</i>	LY19990344	Human skin lesion
<i>S. pseudintermedius</i>	ST20091777	Human pacemaker
<i>S. pseudintermedius</i>	ST20101529	Human bone biopsy
<i>S. pseudintermedius</i>	ST20112488	Human aspiration
<i>S. pseudintermedius</i>	ST20112499	Human blood culture
<i>S. pseudintermedius</i>	ST20120906	Human drain fluid
<i>S. pseudintermedius</i>	ST20121859	Dog skin pustule
<i>S. pseudintermedius</i>	ST20141177	Human hip prosthesis
<i>S. pseudintermedius</i>	ST20141277	Human leg abscess
<i>S. pseudintermedius</i>	ST20141366	Human nasal carriage
<i>S. pseudintermedius</i>	ST20141676	Human skin lesion

S. pseudintermedius LMG 22219 using flanking primers, the sequences of which are presented in Supplementary Table 1. PCR products were codigested with *Bam*HI and *Sal*I enzymes (New England Biolabs, Ipswich, MA, US) then purified using the High Pure PCR Product Purification kit (Roche, Meylan, France) and ligated using T4 DNA Ligase (Promega, Madison, WI, USA) into the pQE-30 plasmid (Qiagen, Courtaboeuf, France). The resulting pQE-*lukS-I* and pQE-*lukF-I* plasmids were transformed into *E. coli* strain M15. Recombinant His-tagged toxins were expressed in LB medium and purified with Ni-nitrilotriacetic acid columns (Qiagen) before being dialyzed against phosphate-buffered saline (PBS). After protein purity was checked using SDS-PAGE and protein quantification performed using the Bradford method, LukS-I and LukF-I were combined and used for the cytotoxicity assays described below.

For PSMs, amino acid sequences corresponding to PSM ϵ and the two variants of δ -toxin (variant ED99 and variant HKU10-03) were synthesized and purified to >90% by Genecust (Dudelange, Luxembourg) using high-performance liquid chromatography (HPLC).

HPLC-MS Analysis of PSM ϵ and δ -Toxin Secreted in Bacterial Supernatants

Staphylococcal supernatants of tested strains were prepared by growing staphylococci bacteria in brain heart infusion (BHI) medium (bioMérieux) in a rotary shaker (190 rpm) at 37°C for 22 h, followed by centrifugation for 10 min at 3,000 \times g. The filtered supernatants were stored at -80°C before being tested. For PSM quantification, bacterial supernatants were diluted 1:5 in methanol at 4°C, and incubated for 10 min at 4°C for cold precipitation to eliminate particulate matter. After centrifugation

at 10,000 \times g for 5 min, PSM ϵ and δ -toxin (variant ED99 and variant HKU10-03) were quantified using a targeted approach by HPLC—mass spectrometry (HPLC-MS) in an Agilent® system as described previously (Hodille et al., 2016).

Synthetic or Recombinant *S. pseudintermedius* Toxins Cytotoxic Assay

All cell culture reagents were obtained from Gibco (Paisley, United Kingdom). Human MG63 osteoblastic cells (LGC Standards, Teddington, UK), an NPPc cell line, were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 2 mM L-glutamine and 25 mM HEPES and supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) as well as 100 U/mL penicillin and streptomycin. Cells were passaged twice a week and were used in experiments up to passage 20 after being thawed from a stock culture.

U937 cells (human promyelocytic cell line) and U937 cells stably transfected with human C5a receptor (U937-C5aR), or with the CXCR2 (U937-CXCR2) kindly provided by Jos A. G. Van Strijp (Department of Medical Microbiology, Utrecht, Netherlands), were cultured at 37°C, 5% CO₂ in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640 containing 10% heat-inactivated FBS (Kew et al., 1997).

Human polymorphonuclear neutrophils (PMNs) collected from the blood of healthy donors were isolated by density gradient centrifugation on Ficoll/Histopaque (Sigma-Aldrich) (Veldkamp et al., 2000). Viability of PMNs was determined by trypan blue exclusion and ranged from 95 to 99%. PMN were maintained at 37°C, 5% CO₂ in RPMI 1640 containing 10% heat-inactivated FBS.

The cytotoxicity induced by the staphylococcal toxins was evaluated by measuring propidium iodide (PI) incorporation in to cells exposed to toxins using a fluorescence cell sorter (Spark®, TECAN, Zürich, Switzerland). Briefly, MG63 osteoblasts were seeded at 10⁴ cells per well on 96-well tissue culture plates (Falcon, Le Pont de Claix, France) in 100 μ L of culture media. After 24 h, the cells were washed three times with 100 μ L of PBS (Gibco). Immune cells (U937 and PMN) at 10⁵ cells per well were seeded in tissue culture plates the day of the experiment. All cells were incubated for 3 h at 37°C with toxins and PI (1.25 μ g.mL⁻¹). For the Luk-I toxin, 0.5 to 5 μ g.mL⁻¹ were tested after dilution in culture medium. For PSM ϵ and the two δ -toxin variants, 0.1 to 100 μ g.mL⁻¹ were tested after dilution in DMEM (Flammier et al., 2016).

The negative control (Cneg) corresponded to the same experiment without toxin. The positive control (Cpos) was obtained using complete cell lysis solution (Triton X100 0.1%). As previously described, cell lysis due to toxins was expressed as percentages using the following formula: % = $\frac{\text{Test}-\text{Cneg}}{\text{Cpos}-\text{Cneg}} \times 100$ (Hodille et al., 2016).

S. pseudintermedius Culture Supernatants Cytotoxicity Assay

Because of the high autofluorescence of BHI medium, the cytotoxic effect of culture supernatant on NPPc could

not be performed using IP incorporation. To circumvent this issue, cytotoxicity was evaluated by measuring Lactate dehydrogenase (LDH) release in the cell culture supernatant using a colorimetric method (Dimension Vista automated clinical chemistry analyzer, Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, USA). In parallel, the cytotoxic effect of the supernatant was investigated by microscopy; after being fixed using formaldehyde 4% for 20 min, and stained 30 min using Giemsa stain, modified solution (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions, cells were observed under a light microscope Leica DMi1 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) at a magnification of $\times 20$. The supernatant from cytotoxic *S. aureus* LAC USA300 strain was used as positive control, and sterile BHI medium was used as negative control.

Osteoblasts were seeded at 100,000 cells per well on 24-well tissue culture plates (Falcon) in 1 mL of culture media. After 24 h, the cells were washed twice with 1 mL of DMEM before the addition of filter-sterilized (0.22 μm) staphylococcal culture supernatants. Serum inhibition of PSM cytotoxic activity in supernatant was tested using pooled human serum obtained from healthy donors provided by the French national public blood service (*Etablissement Français du Sang*, Lyon, France). Filter-sterilized supernatants were mixed with or without 5% inactivated human serum for 10 min at room temperature

(Surewaard et al., 2012). Then, NPPC (osteoblasts) were incubated for 4 h at 37°C, 5% CO₂.

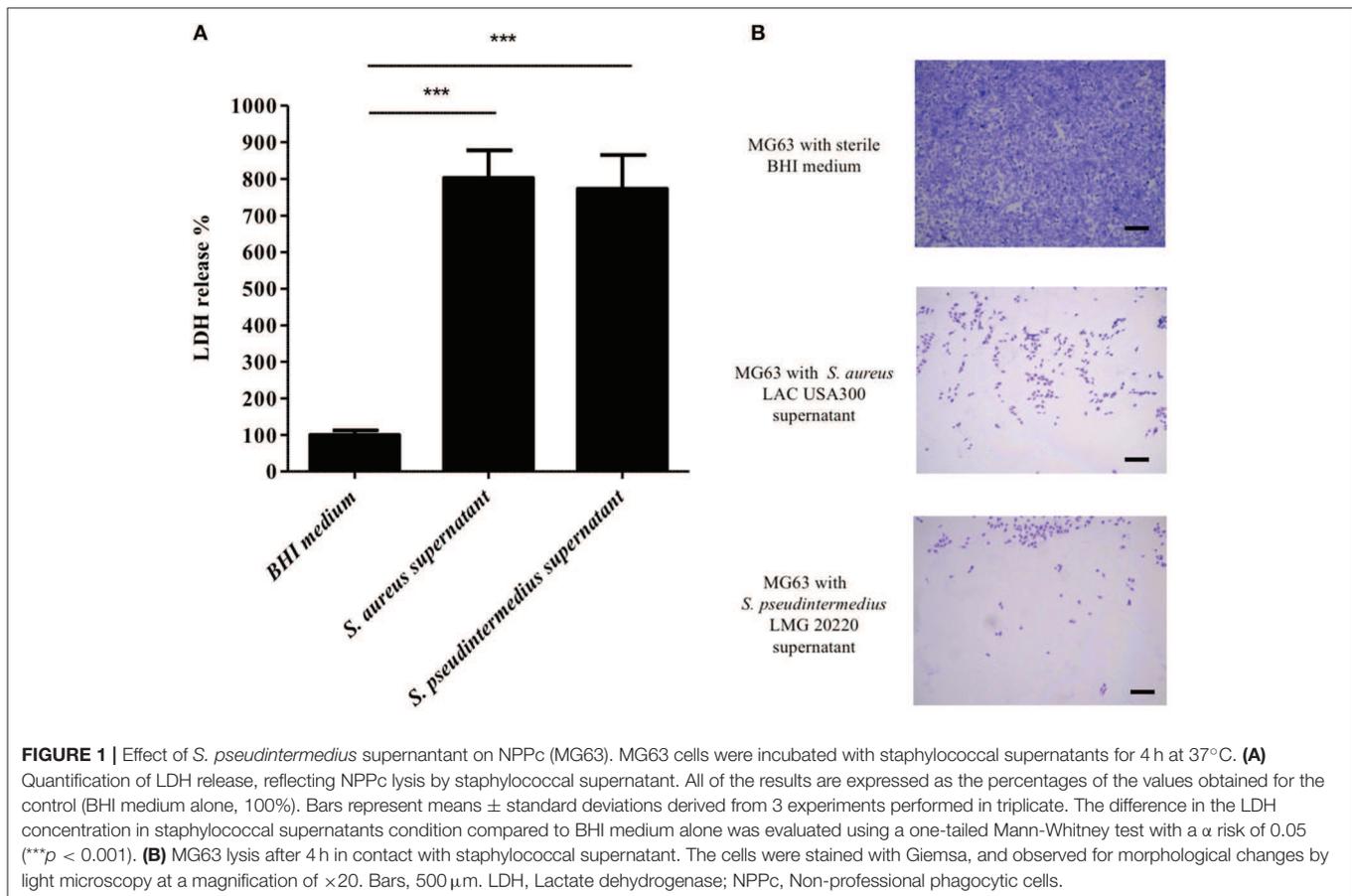
Statistical Analysis

Non-parametric statistical Mann-Whitney *U*-tests and B tests with a threshold of significance of 0.05 were used to determine statistically significant differences. All analyses were performed using XLSTAT software (Pearson Edition, developed by Addinsoft v.2014; New York, NY, US).

RESULTS

Cytolytic Activity of *S. pseudintermedius* Supernatants

Knowing that the supernatant of *S. pseudintermedius* is able to induce the death of human PMNs (Riegel et al., 2011), we specifically performed an *in vitro* cytotoxic assay to evaluate its capacity to also kill non-immune cells, such as NPPC. First, cytolytic activity expressed as the means \pm standard deviations quantified by LDH release from osteoblasts incubated with *S. pseudintermedius* LMG 20220 culture supernatant (773 \pm 92%), was significantly higher than those observed in the control condition (100 \pm 12%, $p < 0.001$; **Figure 1A**). Like *S. pseudintermedius*, *S. aureus* culture supernatant has a high cytotoxic effect on NPPC. Second, the microscopic observations



indicated a high cytotoxic action of the supernatant from *S. pseudintermedius* LMG 20220 on MG63 cells, as demonstrated by the lysis area compared to the uniform cell layer observed in the control condition; the same phenotypic profile was observed for the hyper virulent strain *S. aureus* LAC USA300 (Figure 1B). These results demonstrate that the cytotoxicity induced by *S. pseudintermedius* is mediated by secreted virulence factors, which prompted us to investigate the specific bacterial factors involved, especially among staphylococcal toxins with cellular tropism.

Luk-I Toxin Distribution and Activity

PCR experiments found that all *S. pseudintermedius* isolates were positive for *lukF-I* / *lukS-I* genes. The use of recombinant Luk-I (combining *lukS-I* and *lukF-I*) allowed us to specifically analyze

in vitro the cytotoxic capacity of this toxin. PMNs were used as control because the activity of Luk-I on these cells has been previously described (Prevost et al., 1995). As expected, a very high cytotoxic activity was observed for the PMNs cells, and this was found at the lowest concentration of recombinant Luk-I tested ($0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; Figure 2A). Conversely, the same toxin had no cytotoxic activity against NPPc for all tested concentrations (from 0.5 to $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). In order to identify the mechanism of this specific activity for PMNs, we tested the activity of toxins on wild-type U937 cells and transfected U937 cells that express the C5a or CXCR2 receptors; Luk-I had a high cytotoxic action only on cells that expressed the CXCR2 receptor (Figure 2B). This result suggests that the toxin Luk-I exhibits a tropism for myeloid cells expressing the CXCR2 receptor.

Genetic Characterization, Distribution, and Production of PSM ϵ and δ -Toxin in *S. pseudintermedius*

Due to the absence of activity for Luk-I on NPPc (MG63 cells), we speculated that PSMs could be the key virulence factors implicated in the *S. pseudintermedius* virulence observed on these cells. Two PSMs with cellular tropisms have been identified in *S. pseudintermedius* using *in silico* analysis based on the NCBI database: PSM ϵ and the δ -toxin, for which two variants (ED99 and HKU10-03) have been described (Cheung et al., 2014). We therefore screened for the presence of these PSMs in the collection of clinical strains. Sequencing of the PCR products found the presence of *psm ϵ* and *hld* in all *S. pseudintermedius* isolates ($n = 17$). For δ -toxin, 14/17 isolates (82%) harbored the variant ED99 while 3/17 (18%) harbored the variant HKU10-03 (Table 2).

To investigate the expression of these 3 PSMs, we quantified the level of their secretion in the supernatant of strains *S. pseudintermedius* LMG 20220 and *S. pseudintermedius* ST20112488, which respectively secrete δ -toxin variant ED99 and variant HKU10-03 according to the genetic profile (Supplementary Figure 1). Both PSM ϵ and the two δ -toxin variants were detected and distinguished by HPLC-MS, and the mean \pm SD concentrations in culture supernatants ranged from $22.4 \pm 2.8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ to $159.3 \pm 83.9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Table 3).

Cytolysis Assay With Synthetic PSM Peptides

In order to evaluate the cytotoxic effect of PSMs that we identified in the collection of *S. pseudintermedius* isolates, synthetic PSM ϵ and δ -toxin variants covering the ranges of secreted concentrations were tested in an *in vitro* model

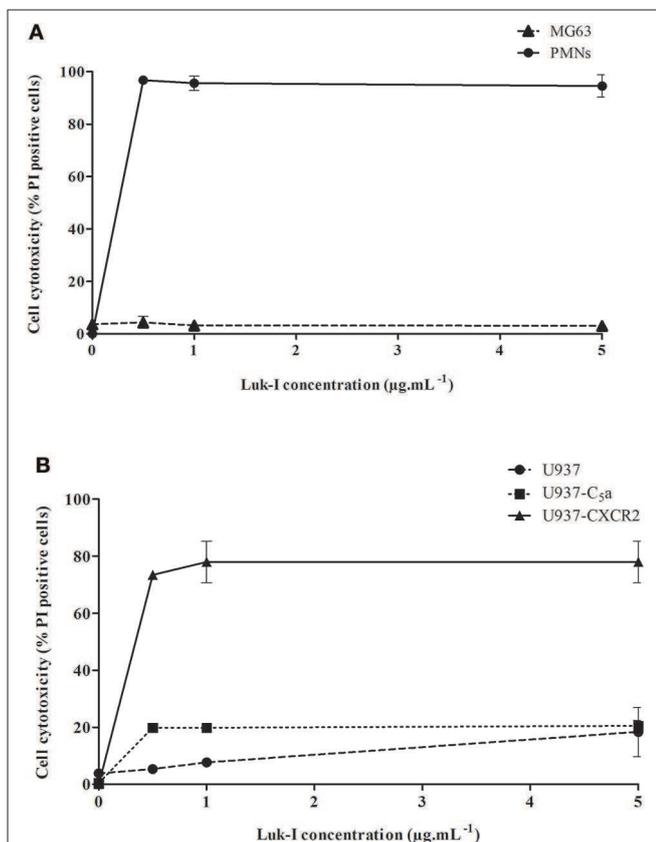


FIGURE 2 | Cytolytic activity of *S. pseudintermedius* leukotoxin Luk-I.

(A) Leukotoxin Luk-I toward NPPc (MG63) and immune cells (human PMNs).

(B) Leukotoxin Luk-I activity on wild-type U937 cells and U937 cells expressing the C5a or CXCR2 receptors. Cells were incubated with increasing doses of recombinant Luk-I (from 0.5 to $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 3 h at 37°C . Cell death was measured by staining cells with propidium iodide (PI) and detected with a fluorescence cell sorter. The percentage of cell lysis was calculated as $\% = \frac{\text{Test} - \text{Tneg}}{\text{Tpos} - \text{Tneg}} \times 100$. The values represent the means \pm standard deviations derived from one experiment performed in triplicate representative of two others. NPPc, Non-professional phagocytic cells; PMNs, Polymorphonuclear neutrophils; PI, Propidium iodide; U937-C5a, U937 cells transfected with C5a receptor; U937-CXCR2, U937 cells transfected with CXCR2 receptor.

TABLE 2 | Amino acid sequence of *S. pseudintermedius* phenol-soluble modulins (PSM).

PSM name/annotated as	Amino acid sequence	Prevalence
PSM ϵ	MFIIIDLIKKVIEFLKGLFGNKG	17/17
δ -toxin (ED99)	MAADIISTIVEFVKLIAETVAKFIK	14/17
δ -toxin (HKU10-03)	MAADIISTIVEFVKLIAETVEKFIKK	3/17

(Figure 3). All types of PSMs tested were cytotoxic for NPPc in a dose-dependent manner. Knowing that PSMs have a receptor-independent and direct action on the lipid bilayers of cells, as expected, human PMNs were also sensitive to the different *S. pseudintermedius* PSMs (Supplementary Figure 2).

Human Serum Inhibition on Staphylococcal Culture Supernatant

To confirm the hypothesis that the virulence observed on the NPPc was mediated mainly by the PSMs secreted by *S. pseudintermedius*, a serum inhibition assay was conducted firstly on *S. aureus* LAC USA300 strains and its isogenic mutant Δ *psm* (α , β , δ) (Figure 4). LDH release results were expressed as percentages of control condition (100%, medium alone). A complete abolition of cytotoxicity capacity of *S. aureus* LAC USA300 supernatant was found after the addition of human serum (LDH release - $99.02 \pm 7.14\%$). No significant difference was observed between *S. aureus* Δ *psm* (α , β , δ) supernatant in the presence or not of human serum. This result confirmed

the specific effect of human serum on PSM activity. Secondly, similarly to that found with *S. aureus* LAC USA300, the cytolytic activity of the strains *S. pseudintermedius* LMG 22220 (expressing PSM ϵ and δ -toxin variant ED99) and *S. pseudintermedius* ST20112488 (expressing PSM ϵ and δ -toxin variant HKU10-03) were completely abolished in presence of human serum addition (respectively, $1097.22 \pm 143.84\%$ vs. $106.71 \pm 14.84\%$, $p < 0.001$ and $1081.94 \pm 224.04\%$ vs. $96.68 \pm 11.71\%$, $p < 0.001$). Moreover, the cytotoxicity induced by synthetic PSMs peptides was completely inhibited in presence of inactivated human serum whereas Luk-I activity is not affected (Supplementary Figure 3). The data indicates the preponderant PSM action in the cytotoxicity of NPPc and consequently the key role of these in the virulence of *S. pseudintermedius*.

DISCUSSION

S. pseudintermedius is an opportunistic pathogen responsible for particularly severe infection both in humans and dogs. The severity of these infections has been illustrated by several clinical cases including cellulitis, purulent exudate, inflammation, and necrosis (Weese et al., 2009; Stegmann et al., 2010; Riegel et al., 2011; Mayer and Rubin, 2012; Lee et al., 2015; Darlow et al., 2017; Robb et al., 2017). Contrary to *S. aureus*, for which a panel of virulence factors have been identified and characterized in the various pathophysiological contexts, knowledge about the pathogenesis of *S. pseudintermedius* remains limited. Through *in vitro* assays, the present study allowed us to identify the key players of the high cellular virulence associated with *S. pseudintermedius* infections.

The study found that the supernatant of *S. pseudintermedius* had a strong cytotoxic effect on NPPc suggesting that this cytotoxicity is mediated, at least in part, by secreted virulence factors. Several authors have suggested that Luk-I (present in all *S. pseudintermedius* isolates tested) could be responsible for cell death induction in NPPc (Garbacz et al., 2013; Pietrocola et al., 2015). Herein, no cytotoxic activity was observed with the recombinant Luk-I toxin against NPPc over the range of concentrations tested, conversely to that found for PMN cells. The lack of Luk-I activity on NPPc led us to draw parallels with *S. aureus* leukotoxins that induce cell lysis only on immune cells harboring specific receptors. To address this question, we performed an *in vitro* assay with U937 promyelocytic cells stably transfected with C5a and CXCR2 receptors, which are respectively the target receptors of PVL and LukED leukotoxin. The results indicate that Luk-I induces cell death via the CXCR2 receptor specifically present on immune cells (PMNs, macrophages) as previously reported for leukotoxin LukED for *S. aureus*, explaining the absence of cytotoxicity observed in NPPc. This feature is likely related to the high homology between Luk-I and LukED (Spaan et al., 2017). Interestingly, this receptor, found both in humans and dogs, also shares a high homology (75%) (Hall et al., 2010).

Wang et al. have reported the contribution of a family of pro-inflammatory and cytolytic staphylococcal peptide toxins, called PSMs, in several disease manifestations (Wang et al., 2007).

TABLE 3 | Phenol-soluble modulins (PSM) concentrations in *S. pseudintermedius* supernatants.

<i>S. pseudintermedius</i> isolates	Concentrations ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
	PSM ϵ	δ -toxin (ED99)	δ -toxin (HKU10-03)
<i>S. pseudintermedius</i> ST20112488	35.54 ± 4.74	ND	102.34 ± 63.47
<i>S. pseudintermedius</i> LMG 22220	22.40 ± 2.80	159.31 ± 83.91	ND

Stationary-phase culture filtrates from 22 h at 37°C of two *S. pseudintermedius* isolates were analyzed by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS). PSMs concentrations are expressed as the mean \pm SD. (ND, Not detected).

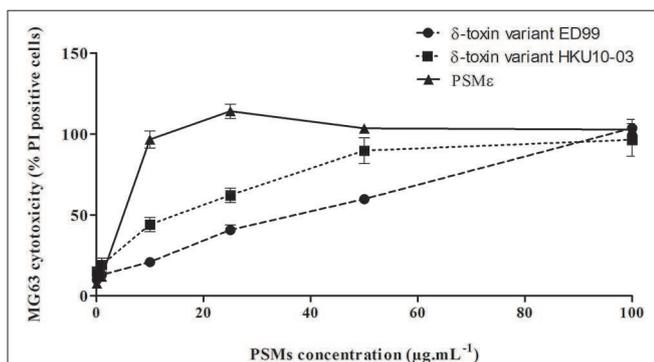
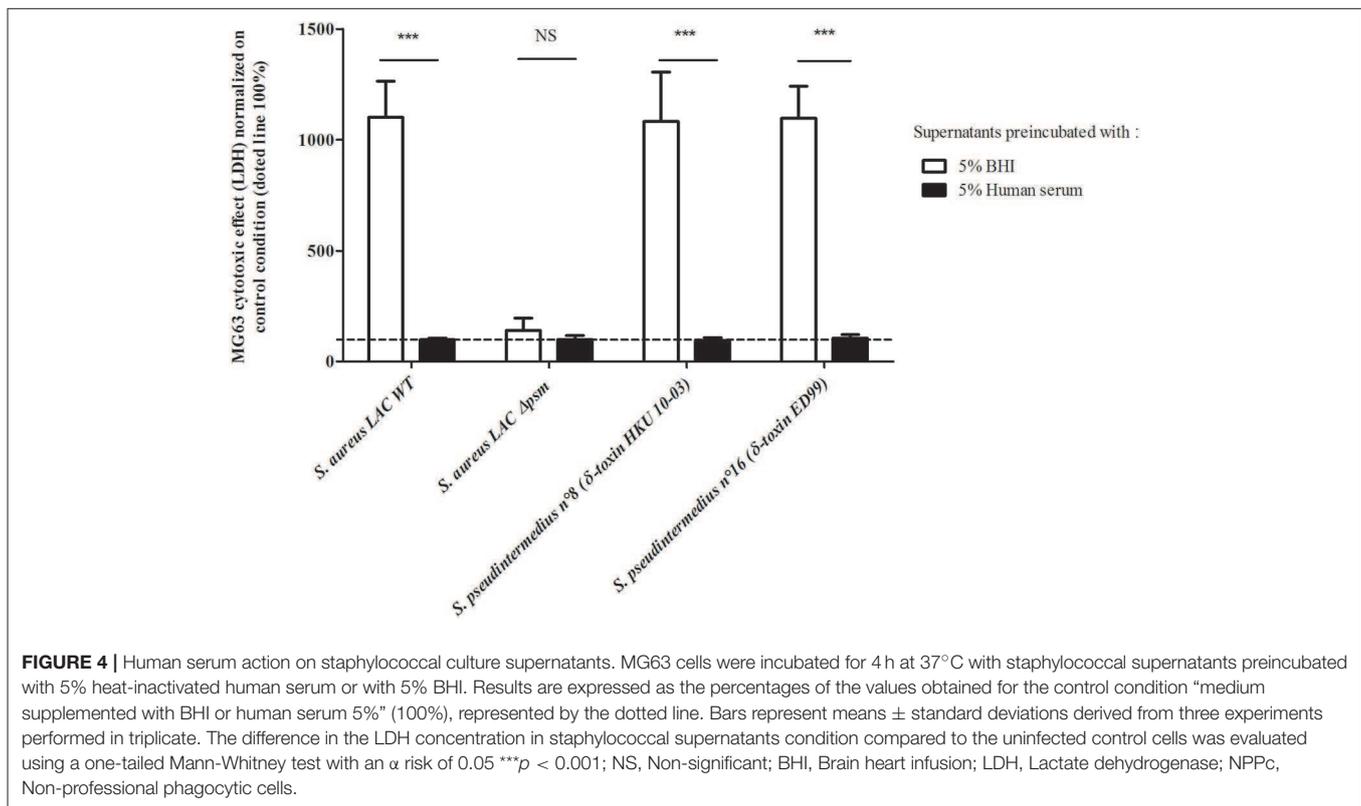


FIGURE 3 | Cytolytic activity of *S. pseudintermedius* PSMs. MG63 cells were incubated with increasing concentrations (from 0.1 to 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) of synthetic PSM ϵ , δ -toxin (ED99) or δ -toxin (HKU10-03) for 3 h at 37°C. Cell death was measured by staining cells with propidium iodide and detected with a fluorescence cell sorter. The percentage of cell lysis was calculated as $\% = \frac{\text{Test} - \text{Tneg}}{\text{Tpos} - \text{Tneg}} \times 100$. The values represent the means \pm standard deviations derived from one experiment performed in triplicate representative of two others. NPPc, Non-professional phagocytic cells; PMNs, Polymorphonuclear neutrophils; PSM, Phenol-soluble modulins; PI, Propidium iodide.

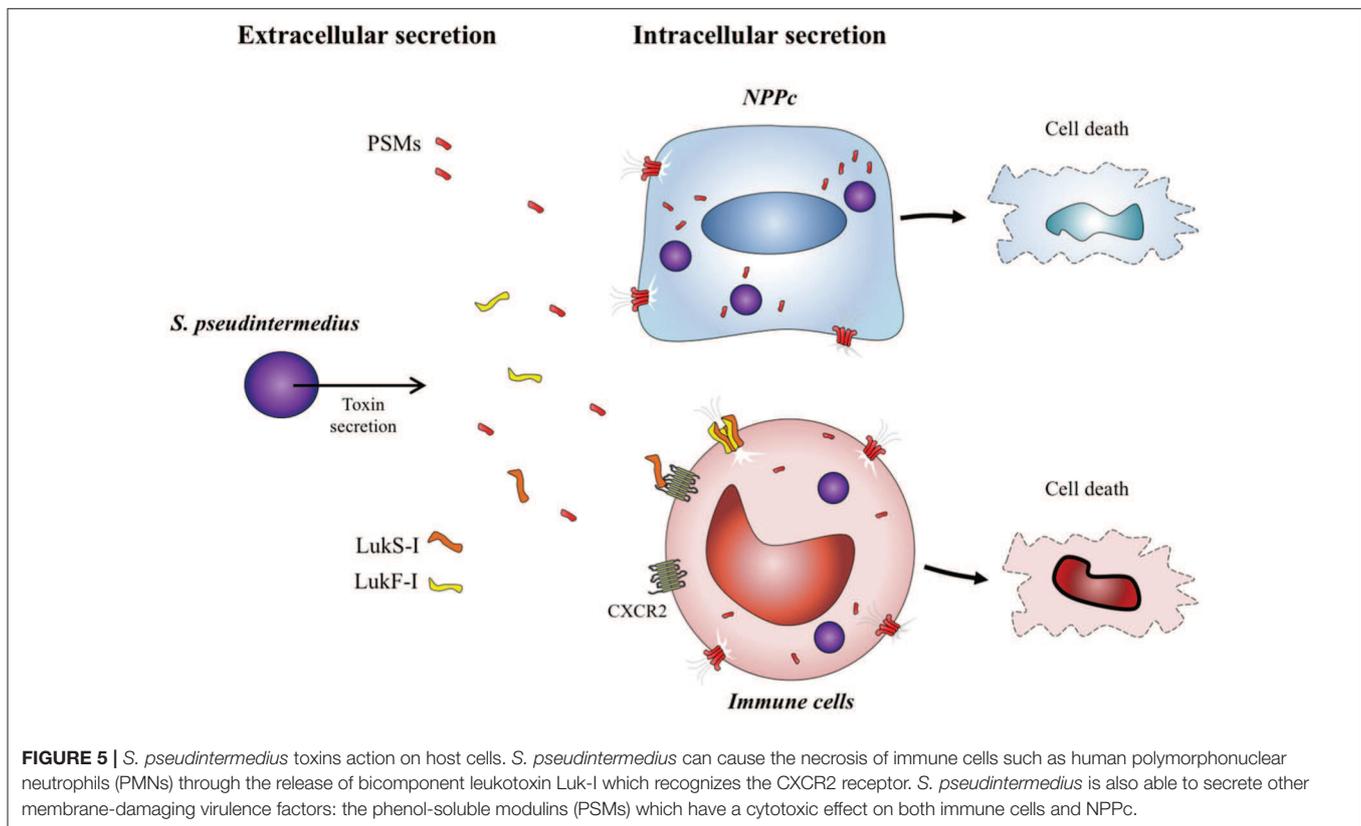


Moreover, Cheung et al. reported that PSMs δ , β , ϵ were present in the genome of *S. pseudintermedius* through *in silico* studies (Cheung et al., 2014). Herein, *psm ϵ* and *hld* genes, encoding for the two PSMs described in *S. pseudintermedius* able to induce cytolysis, were present in all clinical isolates (Table 1) (Otto, 2014). Analysis by HPLC-MS of δ -toxin and PSM ϵ showed that these toxins were secreted at a high level (up to 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) by clinical *S. pseudintermedius* strains in *in vitro* conditions. Regarding the level of PSMs secreted *in vivo*, to the best of our knowledge, only one study has reported data on *S. aureus*; on *in vivo* samples of human pus, in which PSMs concentrations were detected up to 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Hodille et al., 2016). Using synthetic peptides, we found that all *S. pseudintermedius* PSMs studied herein are able to induce osteoblast death in a dose-dependent manner. These results confirm the cytolytic action of α -class PSMs for which it is well established in the literature that these peptides can disrupt plasma membranes independently of cell type (Wang et al., 2007; Otto, 2014). Because most α -type PSMs are sometimes too short to be annotated in genome sequences and to yield significant results in similarity analysis, *in silico* studies do not allow the detection of all α -type *psm* genes in a given genome. It would be of interest to more deeply explore the potential presence of other PSMs involved in the virulence of *S. pseudintermedius*.

The construction of isogenic mutant Δ *psm* would have been the classical way to definitively confirm that PSMs are the main factors responsible for *S. pseudintermedius* cytotoxicity on NPPc. Unfortunately, isogenic gene deletion mutants are extremely

difficult to obtain in this species, which is further compounded by the multiplicity of PSMs and their functional redundancy, making it necessary to produce sequential, multiple knockouts for *psm* gene loci; such a construction was unsuccessful (data not shown). Faced with this technical limit, we chose another strategy which involved the addition of human serum that is known to be specific inhibitors of PSM action (Surewaard et al., 2012). This led to a complete loss of the cytotoxicity effect of *S. pseudintermedius* supernatant, attesting to the role of PSMs in the virulence of *S. pseudintermedius*.

The results of the present study reinforce the central role of PSMs in the virulence of staphylococci. These molecules are widespread among staphylococcal species and participate in pleiotropic action such as cytolysis (Rasigade et al., 2013; Da et al., 2017), surface colonization (Tsompanidou et al., 2013), biofilm structure and biofilm detachment (Wang et al., 2011). *S. pseudintermedius* is preferentially involved in skin and soft tissue infections with muco-purulent exudates, environments in which these amphipathic toxins retain all their active properties. In addition, *S. pseudintermedius* presents the rare capacity to internalize into host cells, therefore the intracellular compartment also constitutes a microenvironment for the accumulation of PSMs and protection from serum lipoproteins (Rasigade et al., 2013). Virulence of *S. pseudintermedius* is explained mainly by PSMs acting both in the extracellular and intracellular compartments of cells and by a selective action of Luk-I toxins acting on immune cells expressing CXCR2 receptors (Figure 5).



The present study helps elucidate bacterial pathophysiological mechanisms that could explain the severity of human and animal infections related to *S. pseudintermedius* which behaves similarly to *S. aureus*. Both harbor a variety of common virulence factors including similar/homologous MSCRAMMs, bi-component leukotoxin and PSMs, and both species are able to induce clinically severe infections. *In vitro*, they exhibit the same behavior toward human cells: they are similarly able to attack, invade and lyse human cells. Interestingly, while *S. pseudintermedius* infections are highly prevalent in pets, especially in dogs, in which it colonizes in particular mucocutaneous sites, such as the nose, mouth and anus with a carriage rate that reaches 92% in some studies, human *S. pseudintermedius* infections are scarce and classically occur after contact with animals and in presence of skin barrier defects (Allaker et al., 1992a,b; Rubin and Chirino-Trejo, 2011; Bannoehr and Guardabassi, 2012). This could be explained by the carriage rate in humans, which has been demonstrated to be very low (Paul et al., 2011; Trouillet-Assant et al., 2015). In contrast, *S. aureus* infections are very common in humans and related to preexisting nasal carriage (self-contamination) or to transmission from colonized health caregivers. This suggests that the host specificity of the two species might be related to the specific colonizing capacity of each species. Further studies deserve to be conducted to explore this differential ability and to identify the mechanisms.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

FL and ST-A: conceived and designed the experiments; YM and CB: performed the experiments; YM: data collection; YM, CB, PM-S, and EH: data analysis; MB, FV, AD, GL, ST-A, and FL: data interpretation; YM and ST-A: drafting manuscript; CB, EH, MB, GL, AD, ST-A, and FL: revising manuscript content; FL: takes responsibility for the integrity of the data analysis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and Allocations de Recherche du Ministère de la Recherche. We thank Dr. Yvonne Benito for her generous technical assistance on molecular biology. We thank Dr. Karen Moreau for her help on the Light Microscopy (Leica DMI1). We thank Dr. Carla de Haas in Utrecht for the cell lines. We thank Philip Robinson for language editing and critical reading the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2018.00221/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Allaker, R. P., Lloyd, D. H., and Bailey, R. M. (1992a). Population sizes and frequency of staphylococci at mucocutaneous sites on healthy dogs. *Vet. Rec.* 130, 303–304. doi: 10.1136/vr.130.14.303
- Allaker, R. P., Lloyd, D. H., and Simpson, A. I. (1992b). Occurrence of *Staphylococcus intermedius* on the hair and skin of normal dogs. *Res. Vet. Sci.* 52, 174–176. doi: 10.1016/0034-5288(92)90006-N
- Balachandran, M., Bemis, D. A., and Kania, S. A. (2017). Expression and function of protein A in *Staphylococcus pseudintermedius*. *Virulence* 9, 390–401. doi: 10.1080/21505594.2017.1403710
- Bannoehr, J., Ben Zakour, N. L., Reglinski, M., Inglis, N. F., Prabhakaran, S., Fossom, E., et al. (2011). Genomic and surface proteomic analysis of the canine pathogen *Staphylococcus pseudintermedius* reveals proteins that mediate adherence to the extracellular matrix. *Infect. Immun.* 79, 3074–3086. doi: 10.1128/IAI.00137-11
- Bannoehr, J., Brown, J. K., Shaw, D. J., Fitzgerald, R. J., van den Broek, A. H., and Thoday, K. L. (2012). *Staphylococcus pseudintermedius* surface proteins SpsD and SpsO mediate adherence to *ex vivo* canine corneocytes. *Vet. Dermatol.* 23, 119–24, e26. doi: 10.1111/j.1365-3164.2011.01021.x
- Bannoehr, J., and Guardabassi, L. (2012). *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Vet. Dermatol.* 23, 253–66, e51–2. doi: 10.1111/j.1365-3164.2012.01046.x
- Cameron, D. R., Jiang, J. H., Hassan, K. A., Elbourne, L. D., Tuck, K. L., Paulsen, I. T., et al. (2015). Insights on virulence from the complete genome of *Staphylococcus capitis*. *Front. Microbiol.* 6:980. doi: 10.3389/fmicb.2015.00980
- Cheung, G. Y., Joo, H. S., Chatterjee, S. S., and Otto, M. (2014). Phenol-soluble modulins—critical determinants of staphylococcal virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 698–719. doi: 10.1111/1574-6976.12057
- Da, F., Joo, H. S., Cheung, G. Y. C., Villaruz, A. E., Rohde, H., Luo, X., et al. (2017). Phenol-soluble modulins of *Staphylococcus haemolyticus*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7:206. doi: 10.3389/fcimb.2017.00206
- Darlow, C. A., Paidakos, N., Sikander, M., and Atkins, B. (2017). A spinal infection with *Staphylococcus pseudintermedius*. *BMJ Case Rep.* 2017:bcr-2017-221260. doi: 10.1136/bcr-2017-221260
- David, B., Saleh-Mghir, A., Laurent, F., Danel, C., Couzon, F., Gatin, L., et al. (2016). Phenol-soluble modulins contribute to early sepsis dissemination not late local USA300-osteomyelitis severity in rabbits. *PLoS ONE* 11:e0157133. doi: 10.1371/journal.pone.0157133
- Dziewanowska, K., Edwards, V. M., Deringer, J. R., Bohach, G. A., and Guerra, D. J. (1996). Comparison of the beta-toxins from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*. *Arch. Biochem. Biophys.* 335, 102–108. doi: 10.1006/abbi.1996.0486
- Fazakerley, J., Nuttall, T., Sales, D., Schmidt, V., Carter, S. D., Hart, C. A., et al. (2009). Staphylococcal colonization of mucosal and lesional skin sites in atopic and healthy dogs. *Vet. Dermatol.* 20, 179–184. doi: 10.1111/j.1365-3164.2009.00745.x
- Flammier, S., Rasigade, J. P., Badiou, C., Henry, T., Vandenesch, F., Laurent, F., et al. (2016). Human monocyte-derived osteoclasts are targeted by staphylococcal pore-forming toxins and superantigens. *PLoS ONE* 11:e0150693. doi: 10.1371/journal.pone.0150693
- Futagawa-Saito, K., Sugiyama, T., Karube, S., Sakurai, N., Ba-Thein, W., and Fukuyasu, T. (2004). Prevalence and characterization of leukotoxin-producing *Staphylococcus intermedius* in Isolates from dogs and pigeons. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5324–5326. doi: 10.1128/JCM.42.11.5324-5326.2004
- Garbacz, K., Zarnowska, S., Piechowicz, L., and Haras, K. (2013). Pathogenicity potential of *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from canine carriers and from dogs with infection signs. *Virulence* 4, 255–259. doi: 10.4161/viru.23526
- Gouy, M., Guindon, S., and Gascuel, O. (2010). SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27, 221–224. doi: 10.1093/molbev/msp259
- Hall, J. A., Chinn, R. M., Vorachek, W. R., Gorman, M. E., and Jewell, D. E. (2010). Aged Beagle dogs have decreased neutrophil phagocytosis and neutrophil-related gene expression compared to younger dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 137, 130–135. doi: 10.1016/j.vetimm.2010.05.002
- Hodille, E., Cuerq, C., Badiou, C., Bienvenu, F., Steghens, J. P., Cartier, R., et al. (2016). Delta hemolysin and phenol-soluble modulins, but not alpha hemolysin or panton-valentine leukocidin, induce mast cell activation. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6:180. doi: 10.3389/fcimb.2016.00180
- Kew, R. R., Peng, T., DiMartino, S. J., Madhavan, D., Weinman, S. J., Cheng, D., et al. (1997). Undifferentiated U937 cells transfected with chemoattractant receptors: a model system to investigate chemotactic mechanisms and receptor structure/function relationships. *J. Leukoc. Biol.* 61, 329–337. doi: 10.1002/jlb.61.3.329
- Lee, J., Murray, A., Bendall, R., Gaze, W., Zhang, L., and Vos, M. (2015). Improved detection of *Staphylococcus intermedius* group in a routine diagnostic laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 53, 961–963. doi: 10.1128/JCM.02474-14
- Maali, Y., Martins-Simoes, P., Valour, F., Bouvard, D., Rasigade, J. P., Bes, M., et al. (2016). Pathophysiological mechanisms of staphylococcus non-aureus bone and joint infection: interspecies homogeneity and specific behavior of *S. pseudintermedius*. *Front. Microbiol.* 7:1063. doi: 10.3389/fmicb.2016.01063
- Mayer, M. N., and Rubin, J. E. (2012). Necrotizing fasciitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* at a previously irradiated site in a dog. *Can. Vet. J.* 53, 1207–1210.
- Miedzobrodzki, J., Kaspruwicz, A., Bialecka, A., Jaworska, O., Polakowska, K., Wladyka, B., et al. (2010). The first case of a *Staphylococcus pseudintermedius* infection after joint prosthesis implantation in a dog. *Pol. J. Microbiol.* 59, 133–135.
- Otto, M. (2014). Phenol-soluble modulins. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 164–169. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.11.019
- Paul, N. C., Moodley, A., Ghibaudo, G., and Guardabassi, L. (2011). Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in small animal veterinarians: indirect evidence of zoonotic transmission. *Zoon. Public Health* 8, 533–539. doi: 10.1111/j.1863-2378.2011.01398.x
- Peschel, A., and Otto, M. (2013). Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 667–673. doi: 10.1038/nrmicro3110
- Pietrocola, G., Gianotti, V., Richards, A., Nobile, G., Geoghegan, J. A., Rindi, S., et al. (2015). Fibronectin binding proteins spsd and spsl both support invasion of canine epithelial cells by *Staphylococcus pseudintermedius*. *Infect. Immun.* 83, 4093–4102. doi: 10.1128/IAI.00542-15
- Prevost, G., Bouakham, T., Piemont, Y., and Monteil, H. (1995). Characterisation of a synergohymenotropic toxin produced by *Staphylococcus intermedius*. *FEBS Lett.* 376, 135–140. doi: 10.1016/0014-5793(95)01260-9
- Prévost, G., Mourey, L., Colin, D. A., and Menestrina, G. (2001). Staphylococcal pore-forming toxins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 257, 53–83. doi: 10.1007/978-3-642-56508-3_4
- Rasigade, J. P., Trouillet-Assant, S., Ferry, T., Diep, B. A., Sapin, A., Lhoste, Y., et al. (2013). PSMs of hypervirulent *Staphylococcus aureus* act as intracellular toxins that kill infected osteoblasts. *PLoS ONE* 8:e63176. doi: 10.1371/journal.pone.0063176
- Reyes-Robles, T., Alonzo, F. 3rd., Kozhaya, L., Lacy, D. B., Unutmaz, D., and Torres, V. J. (2013). *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED targets the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 to kill leukocytes and promote infection. *Cell Host Microbe* 14, 453–459. doi: 10.1016/j.chom.2013.09.005
- Riegel, P., Jesel-Morel, L., Laventie, B., Boisset, S., Vandenesch, F., and Prevost, G. (2011). Coagulase-positive *Staphylococcus pseudintermedius* from animals causing human endocarditis. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 237–239. doi: 10.1016/j.ijmm.2010.09.001
- Robb, A. R., Wright, E. D., Foster, A. M. E., Walker, R., and Malone, C. (2017). Skin infection caused by a novel strain of *Staphylococcus pseudintermedius* in a Siberian husky dog owner. *JMM Case Rep.* 4:jmmcr005087. doi: 10.1099/jmmcr.0.005087
- Rubin, J. E., and Chirino-Trejo, M. (2011). Prevalence, sites of colonization, and antimicrobial resistance among *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from healthy dogs in Saskatoon, Canada. *J. Vet. Diagn. Invest.* 23, 351–354. doi: 10.1177/104063871102300227
- Silva, M. B., Ferreira, F. A., Garcia, L. N., Silva-Carvalho, M. C., Botelho, L. A., Figueiredo, A. M., et al. (2015). An evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from canine infections. *J. Vet. Diagn. Invest.* 27, 231–235. doi: 10.1177/1040638715573297
- Somayaji, R., Priyantha, M. A., Rubin, J. E., and Church, D. (2016). Human infections due to *Staphylococcus pseudintermedius*, an emerging zoonosis of canine origin: report of 24 cases. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 85, 471–476. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.05.008

- Spaan, A. N., Henry, T., van Rooijen, W. J., Perret, M., Badiou, C., Aerts, P. C., et al. (2013). The staphylococcal toxin Pantón-Valentine Leukocidin targets human C5a receptors. *Cell Host Microbe* 13, 584–594. doi: 10.1016/j.chom.2013.04.006
- Spaan, A. N., van Strijp, J. A. G., and Torres, V. J. (2017). Leukocidins: staphylococcal bi-component pore-forming toxins find their receptors. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 435–447. doi: 10.1038/nrmicro.2017.27
- Starlander, G., Borjesson, S., Gronlund-Andersson, U., Tellgren-Roth, C., and Melhus, A. (2014). Cluster of infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in humans in a tertiary hospital. *J. Clin. Microbiol.* 52, 3118–3120. doi: 10.1128/JCM.00703-14
- Stegmann, R., Burnens, A., Maranta, C. A., and Perreten, V. (2010). Human infection associated with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 2047–2048. doi: 10.1093/jac/dkq241
- Surewaard, B. G., Nijland, R., Spaan, A. N., Kruijtz, J. A., de Haas, C. J., and van Strijp, J. A. (2012). Inactivation of staphylococcal phenol soluble modulins by serum lipoprotein particles. *PLoS Pathog.* 8:e1002606. doi: 10.1371/journal.ppat.1002606
- Trouillet-Assant, S., Flammier, S., Sapin, A., Dupieux, C., Dumitrescu, O., Tristan, A., et al. (2015). Mupirocin resistance in isolates of *Staphylococcus* spp. from nasal swabs in a tertiary hospital in France. *J. Clin. Microbiol.* 53, 2713–2715. doi: 10.1128/JCM.00274-15
- Tsompanidou, E., Denham, E. L., Becher, D., de Jong, A., Buist, G., van Oosten, M., et al. (2013). Distinct roles of phenol-soluble modulins in spreading of *Staphylococcus aureus* on wet surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 886–895. doi: 10.1128/AEM.03157-12
- Van Hoovels, L., Vankeerberghen, A., Boel, A., Van Vaerenbergh, K., and De Beenhouwer, H. (2006). First case of *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a human. *J. Clin. Microbiol.* 44, 4609–4612. doi: 10.1128/JCM.01308-06
- Veldkamp, K. E., Heezius, H. C., Verhoef, J., van Strijp, J. A., and van Kessel, K. P. (2000). Modulation of neutrophil chemokine receptors by *Staphylococcus aureus* supernate. *Infect. Immun.* 68, 5908–5913. doi: 10.1128/IAI.68.10.5908-5913.2000
- Wang, R., Braughton, K. R., Kretschmer, D., Bach, T. H., Queck, S. Y., Li, M., et al. (2007). Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA, (1510). *Nat. Med.* 13:4. doi: 10.1038/nm1656
- Wang, R., Khan, B. A., Cheung, G. Y., Bach, T. H., Jameson-Lee, M., Kong, K. F., et al. (2011). *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 238–248. doi: 10.1172/JCI42520
- Weese, J. S., Poma, R., James, F., Buenviaje, G., Foster, R., and Slavic, D. (2009). *Staphylococcus pseudintermedius* necrotizing fasciitis in a dog. *Can. Vet. J.* 50, 655–656.

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

Copyright © 2018 Maali, Badiou, Martins-Simões, Hodille, Bes, Vandenesch, Lina, Diot, Laurent and Trouillet-Assant. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

TROISIEME PUBLICATION: Identification and characterization of *Staphylococcus delphini*

internalization pathway in non-professional phagocytic cells

Le mode de vie intracellulaire offre divers avantages aux agents pathogènes bactériens : ils deviennent inaccessibles à l'immunité humorale et/ou au système du complément; ils échappent à la clairance phagocytaire et à l'action des antibiotiques. Les bactéries intracellulaires sont à l'origine de la persistance de l'infection parfois sur plusieurs mois ou années conduisant aux infections chroniques et récurrentes. L'entrée dans la cellule hôte constitue l'étape clé du processus d'invasion des pathogènes intracellulaires. Autrefois classées comme des bactéries extracellulaires exclusifs, la capacité de quelques rares espèces staphylococciques à être internalisées et à persister a été rapportée dans de nombreux types de cellules hôtes qualifiées de «phagocytes non professionnels» telles que les ostéoblastes, les cellules épithéliales, endothéliales, ou encore les kératinocytes. En tenant compte des données bibliographiques déjà disponibles et celles rapportées dans notre première publication, seules les espèces *S. aureus* et *S. pseudintermedius* ont été clairement identifiées comme des bactéries intracellulaires facultatives. Pour ces deux espèces, le mécanisme d'entrée dans la cellule hôte implique une interaction tripartite entre une adhésine staphylococcique FnBP-like, la fibronectine de la matrice extracellulaire et l'intégrine cellulaire $\alpha_5\beta_1$. En dehors de ces deux espèces, la question de savoir si d'autres espèces du genre *Staphylococcus* présentent une capacité d'internalisation via une voie FnBP-like reste toujours en suspens. Ainsi, cette troisième publication s'inscrit dans l'objectif de répondre à cette problématique.

Dans un premier temps, nos travaux ont porté sur la recherche par criblage *in silico* de nouvelles protéines apparentées aux FnBPs chez les souches appartenant aux espèces *Staphylococcus non-aureus*. Les résultats de cette approche ont permis de mettre en évidence une protéine hypothétique, nommée par la suite SdsY, présente dans les génomes séquencés de l'espèce *Staphylococcus delphini*. Cette protéine présentait une forte homologie avec les FnBP-like, particulièrement avec la protéine SpsD de *S. pseudintermedius* et partageait tous les domaines caractéristiques des protéines de type FnBPs tels que la séquence signal de sécrétion et un domaine A au niveau de l'extrémité N-terminale, une région de répétition C-terminale et un motif de liaison au peptidoglycane (LPXTG) au niveau de l'extrémité C-terminal. Ces premières observations ont ensuite été confirmées sur un panel de sept isolats de *S. delphini*, permettant de démontrer par PCR la conservation du gène *sdsY* dans cette espèce. Les tests *in vitro* d'adhésion à la fibronectine et d'internalisation dans les cellules NPPc ont révélé un comportement intracellulaire facultatif pour les souches de cette espèce stipulant un rôle indispensable de la fibronectine dans le processus d'internalisation. En outre, en utilisant des lignées d'ostéoblastes murines avec et sans intégrine cellulaire β_1 , nos travaux ont montré que l'internalisation de *S. delphini* était complètement abolie en présence des ostéoblastes déficients en β_1 intégrine. Ces résultats témoignent une fois de plus de l'implication de l'intégrine β_1 dans le processus d'invasion, et renforce l'hypothèse d'une interaction tripartite via SdsY, la fibronectine et l'intégrine cellulaire $\alpha_5\beta_1$.

En résumé, cette étude a permis de mettre en lumière la capacité invasive d'une nouvelle espèce au sein du genre *Staphylococcus* et d'en identifier le mécanisme au versant cellulaire. Actuellement nous testons dans nos modèles *in vitro* les mutants qui expriment de façon hétérologue la protéine SdsY pour définitivement valider la méthodologie mise en place dans cet article. Ainsi, nous pourrions alors confirmer le rôle majeur de SdsY dans la voie d'internalisation de *S. delphini* dans les NPPc.



Identification and characterization of *Staphylococcus delphini* internalization pathway in non-professional phagocytic cells

Journal:	<i>Transboundary and Emerging Diseases</i>
Manuscript ID	TBED-OA-499-19
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	21-Jun-2019
Complete List of Authors:	Maali, Yousef; Centre International de Recherche en Infectiologie; Hospices Civils de Lyon, Department of Clinical Microbiology Diot, Alan; Centre International de Recherche en Infectiologie; Hospices Civils de Lyon, Department of Clinical Microbiology Martins-Simões, Patrícia; Centre International de Recherche en Infectiologie; Hospices Civils de Lyon, Centre National de Référence des Staphylocoques Bes, Michele; Centre International de Recherche en Infectiologie; Hospices Civils de Lyon, Centre National de Référence des Staphylocoques Bouvard, Daniel; Albert Bonniot Institute, INSERM U1209; Université Grenoble Alpes Vandenesch, Francois; Centre International de Recherche en Infectiologie; Hospices Civils de Lyon, Department of Clinical Microbiology; Hospices Civils de Lyon, Centre National de Référence des Staphylocoques Verhoeven, Paul; Saint-Etienne University Hospital Bellevue Site, Laboratory of Infectious Agents and Hygiene; Université Jean Monnet Saint-Etienne, Groupe Immunité Muqueuses et Agents Pathogènes Laurent, Frédéric; Centre International de Recherche en Infectiologie; Hospices Civils de Lyon, Department of Clinical Microbiology; Hospices Civils de Lyon, Centre National de Référence des Staphylocoques Trouillet-Assant, Sophie; Centre International de Recherche en Infectiologie; Hospices Civils de Lyon, Department of Clinical Microbiology
Subject Area:	Bacterial pathogens, Pathogenesis, <i>Staphylococcus delphini</i> , Fibronectin-binding proteins FnBPs, Non-professional phagocytic cells, Fibronectin, Integrin $\alpha_5\beta_1$

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4
5 1 **Identification and characterization of *Staphylococcus delphini***
6
7
8 2 **internalization pathway in non-professional phagocytic cells**
9
10
11 3

12
13 4 **Running title: Staphylococcal internalization in non-professional phagocytic cells**
14
15

16 5
17
18 6 Yousef Maali ^{1,2}, Alan Diot ^{1,2}, Patrícia Martins-Simões ^{1,2}, Michele Bes ^{1,3}, Daniel Bouvard
19
20 7 ^{4,5}, François Vandenesch ^{1,2,3}, Paul O. Verhoeven ^{6,7}, Frederic Laurent ^{1,2,3} ¶*, Sophie Trouillet-
21
22 8 Assant ^{1,2} ¶
23
24
25
26 9

27
28
29 10 ¹ CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Université de Lyon; Inserm
30 11 U1111; Ecole Normale Supérieure de Lyon; Université Lyon 1 ; CNRS, UMR5308; Lyon,
31 12 France.
32 13

33 14 ² Department of Clinical Microbiology, Northern Hospital Group, Hospices Civils de Lyon,
34 15 Lyon, France
35 16

36 17 ³ Centre National de Référence des Staphylocoques, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France
37 18

38 19 ⁴ INSERM U1209, Albert Bonniot Institute, Grenoble, France
39 20
40 21

41 22 ⁵ Université Grenoble Alpes, France
42 23

43 24 ⁶ Laboratory of Infectious Agents and Hygiene, University Hospital of Saint-Etienne, Saint-
44 25 Etienne, France
45 26
46 27

47 28 ⁷ GIMAP (Groupe Immunité Muqueuses et Agents Pathogènes) EA3064, Faculté de
48 29 Médecine, Université Jean Monnet, Université de Lyon, Saint-Etienne, France
49 30
50 31

51 32 *Corresponding author
52 33

53 34 E-mail: frederic.laurent@univ-lyon1.fr
54 35
55 36

56 37 ¶ Frederic Laurent and Sophie Trouillet-Assant should be considered joint senior author.
57 38
58 39
59 40
60 41

35 Summary

36 Intracellular life of bacteria is widely acknowledged as an important mechanism in chronic
37 and recurring infection. Among the *Staphylococcus* genus, only *Staphylococcus aureus* and
38 *Staphylococcus pseudintermedius* have been clearly identified so far as intracellular
39 *Staphylococcus* species in non-professional phagocytic cells (NPPCs), for which the host cell
40 entry mechanism is mainly fibronectin-binding dependent. Identifying the species that can be
41 internalized in NPPCs is crucial to better characterize the differential staphylococcal
42 pathophysiology. Herein we used the bioinformatics tools made available by the NCBI to
43 search possible new fibronectin-binding proteins (FnBPs)-like in *Staphylococcus* species. *In*
44 *silico* search revealed the presence of a hypothetical protein WP_019165356.1 in
45 *Staphylococcus delphini*, namely *Staphylococcus delphini* surface protein Y (SdsY), sharing
46 an identity of 68, 36 and 39% with the *Staphylococcus pseudintermedius* surface protein D
47 (SpsD), *S. aureus* FnBPA and FnBPB respectively. SdsY protein possess the typical structure
48 of FnBPs-like, including an N-terminus signal sequence, an A domain, a characteristic region
49 with repeated pattern, and an LPXTG cell wall anchor motif. The *sdsY* gene was found in all
50 *S. delphini* strains from our collection (n=7). The level of adhesion to immobilized fibronectin
51 was significantly higher in all *S. delphini* strains tested as compared with the fibronectin-
52 binding deficient *S. aureus* DU5883 strain. By using an *in vitro* model of human osteoblasts
53 infection, the level of internalization of all *S. delphini* strains tested was significantly higher
54 than it was with the invasive-incompetent *S. aureus* DU5883 strain. These findings were
55 confirmed by phenotype restoration after plasmidic expression of SdsY repeats into the *S.*
56 *aureus* DU5883 strain. Additionally, using murine osteoblast cell lines OB- $\beta_1^{fl/fl}$ and OB- $\beta_1^{-/-}$,
57 the involvement of β_1 integrin was demonstrated in *S. delphini* internalization. Our study
58 demonstrates that more staphylococcal species than previously expected are able to invade
59 NPPCs and propose a technical way to identify FnBPs-like.

1
2
3 60 **Key words:** Fibronectin; Fibronectin-binding proteins FnBPs; Integrin $\alpha_5\beta_1$; Invasion ; Non-
4
5 61 professional phagocytic cells; *Staphylococcus delphini*
6
7
8
9 62

13 63 **Introduction**

16 64 Bacteria belonging to the genus *Staphylococcus*, composed of more than 50 species, are
17
18 65 responsible for a variety diseases from benign to serious infections originating from both
19
20 66 community-acquired and nosocomial infections (Becker, Heilmann, & Peters, 2014; A. P.
21
22 67 Foster, 2012). Staphylococcal infections are associated with high rates of morbidity and
23
24 68 mortality, the latter reaches 30% in cases of bacteremia and up to 66% in cases of endocarditis
25
26 69 (Tong, Davis, Eichenberger, Holland, & Fowler, 2015; van Hal et al., 2012). Within the
27
28 70 *Staphylococcus* genus, although *Staphylococcus aureus* is the most prevalent and virulent
29
30 71 pathogen, *Staphylococcus non-aureus* (SNA) species, classically considered as less virulent,
31
32 72 opportunistic pathogens that are primarily responsible for chronic infections, have become
33
34 73 major nosocomial pathogens (Beca et al., 2015; Becker, et al., 2014; Chapman, Bauman, &
35
36 74 Daniel, 2013). This could be explained by the increased numbers of immunocompromised
37
38 75 patients, as well as by the use of inserted foreign bodies (Hira et al., 2013; Sievert et al., 2013;
39
40 76 von Eiff, Peters, & Heilmann, 2002). However, the physiopathology of SNA-related
41
42 77 infections remains far from being understood.
43
44
45
46
47
48

49 78 Conversely, various pathophysiological mechanisms have been identified to explain the
50
51 79 chronicization of *S. aureus*, including the formation of biofilm, the secretion of specific
52
53 80 virulence factors, and the internalization in non-professional phagocytic cells (NPPCs) (Bui,
54
55 81 Conlon, & Kidd, 2017; Hill & Imai, 2016; Hira, et al., 2013; Otto, 2008; Seilie &
56
57 82 Wardenburg, 2017; Sievert, et al., 2013; von Eiff, et al., 2002). This latter mechanism allows
58
59
60

1
2
3 83 the bacteria to evade the host innate immune system and antibiotics, and thus survive inside a
4
5 84 wide variety of mammalian cells which leads to chronic and recurring infection (Hamza et al.,
6
7 85 2013; Rollin et al., 2017). A plethora of studies have described this mechanism for *S. aureus*,
8
9 86 showing that this bacteria can invade and persist within various NPPCs, such as epithelial
10
11 87 cells (Wang et al., 2013), osteoblasts (Trouillet et al., 2011) and fibroblasts (Hagggar et al.,
12
13 88 2003). The internalization of *S. aureus* into cells is an active phenomenon from the cell side,
14
15 89 controlled by the actin cytoskeleton, but a passive phenomenon from the bacterial side. On the
16
17 90 cell side, the integrin $\alpha_5\beta_1$ binds to fibronectin of the extracellular matrix via the Arg-Gly-Asp
18
19 91 (RGD) motif (Huveneers, Truong, Fassler, Sonnenberg, & Danen, 2008). On the bacteria side,
20
21 92 the surface fibronectin-binding proteins (FnBPs), belonging to microbial surface components
22
23 93 recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs), bind the fibronectin to trigger
24
25 94 bacterial internalization (Ahmed et al., 2001; T. J. Foster & Hook, 1998; Pietrocola et al.,
26
27 95 2015; Sinha et al., 2000). Although alternative invasion mechanisms involving other
28
29 96 MSCRAMMs have been proposed in the literature, the FnBPs-Fibronectin- $\alpha_5\beta_1$ integrin
30
31 97 pathway is acknowledged as the most predominant (Josse, Laurent, & Diot, 2017). FnBPs are
32
33 98 characterized by a Sec-dependent secretory signal sequence at the N-terminus, a N-terminal A
34
35 99 domain comprising three separately folded sub-domains (N1, N2, and N3), an A variable
36
37 100 repeat region, a C-terminal peptidoglycan-binding motif (LPXTG) attached to the wall- and
38
39 101 membrane-spanning domains anchored to the cell wall. Two homologous FnBPs have been
40
41 102 described for *S. aureus*, FnBPA and FnBPB, encoded respectively by the *fnbA* and *fnbB* loci,
42
43 103 with very similar domain organizations and sequences (Jonsson, Signas, Muller, & Lindberg,
44
45 104 1991). Although, there is no doubt for *S. aureus* for its capacity to be internalized in NPPCs
46
47 105 and the infections' pathophysiological consequences of this mechanism, the question of
48
49 106 whether SNA can also act as facultative intracellular pathogens in NPPCs is still debated. For
50
51 107 instance, only a few MSRAMMs involved in cellular internalization have been identified for
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 108 the SNA species. We and others have described the two FnBPs-like SpsD and SpsL as being
4
5 109 sufficient for internalization of *S. pseudintermedius* in bone and epithelial cells, via an
6
7 110 interaction with fibronectin (Maali et al., 2016; Pietrocola, et al., 2015). In addition to having
8
9 111 strong homology with *S. aureus* FnBPs, SpsD and SpsL share the same characteristic motifs.
10
11
12 112 For the other SNA species, the little data available are contradictory; for instance, while
13
14 113 Hussain *et al.* suggested the involvement of the autolysin AtIL in the internalization process
15
16 114 of *Staphylococcus lugdunensis* (Hussain, Steinbacher, Peters, Heilmann, & Becker, 2015),
17
18 115 other authors highlighted the incapacity of *S. lugdunensis* to be internalized in NPPCs using a
19
20 116 panel of clinical and reference strains (Campoccia et al., 2015; Maali, et al., 2016).
21
22
23
24

25 117 To identify other species that can be internalized in NPPCs, we sought for identification of
26
27 118 FnBPs-like involved in invasion process on NPPCs. Using *in silico* analysis and *in vitro*
28
29 119 cellular models, we identified a new protein, denominated *Staphylococcal delphini* surface
30
31 120 protein Y (SdsY), expressed by strains belonging to the species *S. delphini*, homologous to
32
33 121 *S. aureus* and *S. pseudintermedius* fibronectin-binding proteins and showed its role in
34
35 122 bacterial internalization and the mechanism of internalization.
36
37
38
39
40
41
42
43

44 123

44 124 **Materials and methods**

48 125 ***In silico* analysis of fibronectin-binding protein homologs**

51 126 The search for FnBPs homologs was performed using the BlastX search algorithm (translated
52
53 127 nucleotide protein query against protein database) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
54
55 128 and NCBI's nr protein database (Altschul, Gish, Miller, Myers, & Lipman, 1990). We used as
56
57 129 query sequences the *fnb* genes currently characterized in the litterature: *fnbA* and *fnbB* of
58
59 130 *S. aureus* Mu50 and *spsD*, *spsL* of *S. pseudintermedius* ED99 (Ben Zakour, Bannoehr, van

1
2
3 131 den Broek, Thoday, & Fitzgerald, 2011; Kuroda et al., 2001). The search was restricted to the
4
5 132 *Staphylococcus* group (taxid: 90964); the *S. aureus* (taxid: 1280) and *S. pseudintermedius*
6
7 133 (taxid: 283734) species were excluded from the search. All results with a minimum identity \geq
8
9 134 50% and a minimum of sequence coverage \geq 80% were considered as positive. The
10
11 135 identification of a hypothetical SdsY in the genome of *S. delphini* strain 8086 (GeneBank
12
13 136 accession number NZ_CAIA01000117.1) led us to sequence the genome of the reference
14
15 137 strain *S. delphini* DSM20771^T (ATCC 49171) and deposit it in the GenBank database under
16
17 138 the accession number PRJNA389509. The predicted FnBP-like were further characterized by:
18
19 139 i) searching for functional domains using EMBL-EBI InterPro Scan
20
21 140 (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>), ii) structural analysis carried out with the PHYRE2 (Protein
22
23 141 Homology/analogY Recognition Engine) fold recognition server
24
25 142 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/>) (Bannoehr et al., 2011).

143 **Bacterial strains and culture media**

144 Seven *S. delphini* isolates were included in the study: five clinical strains isolated from
145 camelids (Bannoehr et al., 2007), the strain *S. delphini* 8086 isolated from equidae (Ben
146 Zakour, Beatson, van den Broek, Thoday, & Fitzgerald, 2012), and the reference strain
147 *S. delphini* DSM 20771^T isolated from a dolphin (Varaldo P, 1988) (Table 1). As described by
148 Gharsa *et al.* the identification was carried out by PCR-restriction fragment length
149 polymorphism of the *pta* gene with the *MboI* enzyme (Supporting Information 1 and 2)
150 (Bannoehr, Franco, Iurescia, Battisti, & Fitzgerald, 2009; Gharsa et al., 2015). The strain
151 *S. aureus* 8325-4, a strain well characterized for its ability to bind fibronectin and to invade
152 osteoblasts, was used as a positive control in each experiment. Its isogenic mutant, DU5883
153 (inactivated for the *fnbA/B* genes and therefore unable to adhere or invade osteoblasts), was
154 used as a negative control (Table 1). Prior to the assays, strains were incubated overnight in

1
2
3 155 brain heart infusion medium (BHI; BioMérieux, Marcy-L'Etoile, France) aerobically at 36°C
4
5 156 for 18 hours.
6
7

8 157 **Illumina Sequencing and *de novo* assembly.**

9
10
11 158 *S. delphini* DSM 20771^T genomic DNA was extracted using a QIAcube extraction kit
12
13 (Qiagen, Hilden, Germany). The Nextera XT DNA preparation kit (Illumina, San Diego, CA,
14 159 USA) was used to generate sequencing libraries from 1 ng of DNA. Whole-genome
15
16 160 sequencing was done using an Illumina NextSeq 500 sequencer (Illumina) to generate 150-bp
17
18 161 paired-end reads. The raw paired-end reads were cleaned from potential contamination by the
19
20 162 adapters during the Nextera XT protocol using Trimmomatic v0.36 (Bolger, Lohse, & Usadel,
21
22 163 2014). After being quality filtered, the reads were assembled with SPAdes v3.9.0 using the
23
24 164 “careful” option and the SPAdes error correction (BayesHammer module) turned on
25
26 165 (Bankevich et al., 2012).
27
28
29
30
31
32

33 167 **Detection of target genes in *S. delphini* isolates**

34
35
36 168 Consensus sequence for *sdsY* gene was obtained using Seaview software (version 4.5.4) after
37
38 169 aligning the sequences obtained from the two public whole genome sequences (WGS) of
39
40 170 *S. delphini* strains (strains 8086 (GenBank acc. num. NZ_CAIA01000117.1) and strain
41
42 171 DSM 20771^T (GenBank acc. num. PRJNA389509)) (Gouy, Guindon, & Gascuel, 2010).
43
44 172 Specific primers selected from the consensus sequence of the gene of interest (*sdsY*) were
45
46 173 designed using Primer 3 software (Untergasser et al., 2012). The reaction mixture and the
47
48 174 PCR program used for amplification are available as Supporting Information 3.
49
50
51
52

53 175 **Expression of SdsY repeats into *S. aureus* lacking *fnbA/B* genes**

54
55
56 176 The plasmids pFnBR0 (expresses FnBPA variant containing no fibronectin-binding repeats)
57
58 177 and pFnBR1-11 (expresses full-length of FnBPA) were kindly provided by Ruth Massey
59
60

1
2
3 178 (Edwards, Potter, Meenan, Potts, & Massey, 2011). We inserted the predicted repeats of SdsY
4
5 179 (residues 525 to 1003) into the plasmid pFnBPR0 using a prolonged overlap extension-PCR
6
7
8 180 (POE-PCR) strategy (Edwards, Potts, Josefsson, & Massey, 2010; You, Zhang, & Zhang,
9
10 181 2012). Briefly, the insert corresponding to the repeats of SdsY was amplified from the
11
12 182 genomic DNA of the *S. delphini* strain DSM20771, using Q5 HotSart Polymerase (NEB,
13
14 183 Ipswich, USA) with the primers Rfor
15
16 184 GCGAACGGAAATGAGAAAATACTTATTCTCCTGTAATGACTTTCCA and Rrev
17
18 185 GGCGTTGGTGGCACGATTGGTTCG/ATTTTCTTTAGGATCTTTTGGCT. The pFnBR1-
19
20 186 11 plasmid was opened by inverse PCR using primers that were designed to delete the repeats
21
22 187 of FnBPA, TGGAAAGTCATTACAGGAGAATAAGTATTTTTCTCATTTCGGTTCGC
23
24 188 (Nrev) and AGCCAAAAGATCCTAAAGAAAATGAACCAATCGTGCCACCAACGCC
25
26 189 (Cfor) to obtain the plasmid pFnBPR0. After being cleaned up using the MinELute PCR
27
28 190 Purification kit (Qiagen), the products of each PCR they were mixed in a 1:1 molar ratio at a
29
30 191 concentration of 2ng/ μ L for the insert and the POE-PCR ran as previously described (You, et
31
32 192 al., 2012). Then, *E. coli* DH5 α were transformed with 5 μ L of the POE-PCR product and
33
34 193 positive clones were selected on LB + ampicillin 100 μ g/mL. After plasmids purification using
35
36 194 a miniprep kit (Qiagen) from *E. coli*, the *S. aureus* RN4220 strain was transformed by
37
38 195 electroporation and positive clones were selected on Trypcase Soy Agar (TSA; BioMérieux)
39
40 196 + chloramphenicol 10 μ g/mL as previously described (Edwards, et al., 2010). Plasmids were
41
42 197 recovered using a combination of lysostaphin and the Qiagen miniprep kit and re-transformed
43
44 198 into the invasive-incompetent *S. aureus* DU5883 strain. The complete plasmidic map of
45
46 199 pFnBR0::*sdsY-rep* is available as Supporting Information 4.
47
48
49
50
51
52
53

200 **Microplate adhesion to fibronectin assay**

201 The fibronectin adhesion assay was performed *in vitro* in 96-flat bottom well plates as
202 previously described (Rasigade et al., 2011). Briefly, the wells were coated with 200 μ L of

1
2
3 203 human fibronectin (Dutsher SAS, Brumath, France) at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (18 h, 4°C). They were then
4
5 204 washed three times (20 min, 37°C) with PBS supplemented with 1% fetal bovine serum
6
7 205 (FBS). Meanwhile, after an overnight broth culture in BHI at 36°C, bacterial suspensions
8
9 206 were adjusted to an OD_{620} of 1 ± 0.05 corresponding to approximately 1×10^9 cells/mL. One
10
11 207 milliliter of each suspension was centrifuged (12,000 g, 2 min) and pellets were washed and
12
13 208 suspended in PBS. One hundred microliters of each bacterial suspension were incubated in
14
15 209 the fibronectin-coated plate for 30 min at 37°C with mild shaking. Wells were then washed 3
16
17 210 times with PBS to remove non-adherent bacteria. Adherent bacteria were fixed with
18
19 211 glutaraldehyde (2.5% v/v in 0.1M PBS, 2 h at 4°C) and stained with crystal violet (0.1% m/v)
20
21 212 for 30 min at room temperature. After 3 PBS washes, the total remaining stain impregnating
22
23 213 the adherent bacteria was solubilized using 100 μL Triton X100 solution (0.2% v/v - H_2O ;
24
25 214 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at room temperature for 30 min. Quantification of
26
27 215 adherent bacteria to fibronectin was assessed by measuring the OD_{620} for each well using a
28
29 216 spectrophotometer (Auto Reader Model 680, BioRad, Hercules, CA, USA). The results were
30
31 217 expressed as the mean \pm standard deviation (SD) of OD_{620} in 3 experiments performed in
32
33 218 quadruplicate. The values were normalized to the reference strain *S. aureus* 8325-4.
34
35
36
37
38
39
40

41 **Cell culture**

42
43 220 All cell culture reagents were obtained from GIBCO (Paisley, United Kingdom). Human
44
45 221 MG63 osteoblastic cells (LGC Standards, Teddington, United Kingdom) were cultured in
46
47 222 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 2 mM L-glutamine and 25 mM
48
49 223 HEPES, supplemented with 10% FBS and 100 U/ml penicillin and streptomycin ("growth
50
51 224 medium with antibiotics"). Two murine osteoblastic cell lines were used for the quantification
52
53 225 of the internalization process: the OB- $\beta_1^{\text{fl/fl}}$ cell line, expressing the functional integrin β_1
54
55 226 subunit, and the OB- $\beta_1^{-/-}$ cell line, deficient in the expression of the β_1 integrin subunit after
56
57 227 the conditional deletion of the *itgbl* gene. As previously described, both cell lines were
58
59
60

1
2
3 228 derived from calvaria of transgenic mice bearing *itgb1*-floxed alleles. OB- $\beta 1^{fl/fl}$ cells were
4
5 229 then immortalized via retroviral infection with the SV40 large T-antigen; OB- $\beta 1^{-/-}$ cells were
6
7
8 230 obtained from the parental OB- $\beta 1^{fl/fl}$ cell line after expressing Cre recombinase (Brunner et
9
10 231 al., 2011). All cells were maintained at 1 passage per week.

232 **Determination of the invasion capacity of *S. delphini* strains**

16 233 Osteoblasts were seeded at 80,000 cells per well into 24-well tissue culture plates (Falcon, Le
17
18 234 Pont-de-Claix, France) in 1 mL of growth medium with antibiotics. One day later, cells were
19
20
21 235 washed twice with 1 mL of DMEM before the addition of bacteria. Bacterial suspensions in
22
23 236 growth medium without antibiotics were added to the cell culture wells at a multiplicity of
24
25 237 infection (MOI) of 100 as previously described (Trouillet, et al., 2011). After 2 h of co-culture
26
27
28 238 of bacteria and osteoblasts in a 37°C/5% CO₂ incubator, the wells were washed twice with 1
29
30 239 mL of DMEM. They were then incubated for 1 h in medium containing 200 µg/mL
31
32 240 gentamicin to specifically kill the extracellular bacteria. To evaluate the internalization rate,
33
34
35 241 osteoblasts were then lysed by osmotic shock using water and dilutions of cell lysates were
36
37 242 plated using the easySpiral® instrument (Interscience, Saint Nom, France) in duplicate on
38
39 243 Trypcase Soy Agar (TSA; BioMérieux) plates before being incubated at 36°C to quantify the
40
41 244 number of colonies corresponding to intracellular bacteria.

245 **Statistical Analysis**

46
47
48 246 Results are expressed as mean ± SD derived from three independent experiments. The non-
49
50 247 parametric Mann-Whitney U test was used; p values below 5% were considered as statistically
51
52 248 significant. All analyses were performed with GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc.,
53
54 249 San Diego, CA, USA).

55
56
57
58 250
59
60

251 **Results**

252 ***In silico* analysis and identification of a new *fnb* gene homologs** 253 **among clinical isolates**

254 *In silico* searches using the NCBI database allowed us to identify the hypothetical protein
255 WP_019165356.1 that is encoded by the *S. delphini* strain 8086 (NZ_CAIA01000117.1). This
256 hypothetical protein presented 68% identity with the SpsD protein from the
257 *S. pseudintermedius* strain ED99. Furthermore, this protein also had 36% identity with
258 FnBPA and 39% FnBPB from *S. aureus* Mu50. These results led us to perform the WGS of
259 the reference strain *S. delphini* DSM20771^T (ATCC 49171) and deposit it in the GenBank
260 database under the accession number PRJNA389509. Thus, the complete sequence of the
261 FnBP-like, called *Staphylococcal delphini* surface protein Y (SdsY), was determined and the
262 protein sequence was deposited in the GeneBank database under the accession number
263 MF282008. SdsY protein encoded by *S. delphini* DSM 20771^T had 77% identity with the
264 SpsD protein of the *S. pseudintermedius* strain ED99 and possess the typical motifs of
265 MSCRAMM proteins, including an N-terminus signal sequence, an A domain, a characteristic
266 repeat region and an LPXTG cell wall anchor motif (Figure 1). PCR amplification targeting
267 *sdsY* revealed the presence of the gene in all *S. delphini* isolates ($n = 7$).

268

269 **Capacity to bind human fibronectin and to invade osteoblasts.**

270 *In vitro* fibronectin binding assays revealed that all *S. delphini* strains tested were able to
271 adhere significantly more (mean \pm SD: 50.0 \pm 12.4% to 110.5 \pm 15.3%; relative to *S. aureus*
272 8325-4) than the negative control *S. aureus* DU5883 lacking the *fnbA* and *B* genes (29.4 \pm
273 6.0%; all $p < 0.001$, Figure 2A). In addition, the internalization levels in MG63 osteoblasts for

1
2
3 274 all *S. delphini* strains were similar or higher than it were for *S. aureus* 8325-4 (Figure 2B). In
4
5 275 order to confirm the key role of SdsY repeats for fibronectin binding and cells invasion, we
6
7 276 expressed in the invasive-incompetent *S. aureus* DU5883 strain, a chimeric protein composed
8
9 277 of the backbone (N-terminal A domain and C-terminal domain) of FnBPA of *S. aureus* with
10
11 278 the predicted repeats of SdsY. The *S. aureus* DU5883 strain transformed with the
12
13 279 pFnBPR0::*sdsY*-rep showed significant higher fibronectin adhesion and MG63 internalization
14
15 280 compared to those observed with *S. aureus* DU5883 strain carrying the empty plasmid
16
17 281 pFnBPR0 (Figure 3). The expression of SdsY repeats in *S. aureus* DU5883 strain enabled to
18
19 282 recover adhesiveness and invasiveness similar to that of the *S. delphini* DSM 20771.
20
21
22
23
24
25 283

28 284 **Characterization of the cellular pathways involved in the** 29 30 31 285 **internalization process of *S. delphini***

32
33
34
35 286 To determine whether the internalization mechanism of *S. delphini* in osteoblasts involves the
36
37 287 cellular integrin $\alpha_5\beta_1$, as described for *S. aureus*, an *in vitro* model comparing two murine
38
39 288 osteoblast cell lines, OB- $\beta_1^{\text{fl/fl}}$ and OB- $\beta_1^{-/-}$, was used. We investigated the internalization
40
41 289 capacity of *S. aureus* 8325-4 (positive control), *S. aureus* DU5883 (negative control), and
42
43 290 *S. delphini* DSM 20771^T (reference strain). As expected, a complete loss of internalization of
44
45 291 *S. aureus* 8325-4 was observed for OB- $\beta_1^{-/-}$ cells as compared to OB- $\beta_1^{\text{fl/fl}}$ cells ($p < 0.001$). A
46
47 292 similar abolition was obtained for the *S. delphini* DSM 20771^T strain comparing the two cell
48
49 293 lines ($p < 0.001$) (Figure 4), which suggests that *S. delphini* internalization process was widely
50
51 294 mediated by β_1 integrin.
52
53
54
55
56
57 295

296 Discussion

297 The intracellular lifestyle provides various advantages for bacterial pathogens. After
298 internalization in NPPCs, bacteria become inaccessible to humoral and complement-mediated
299 attack; they avoid shear stress-induced clearance and they evade antibiotic activities. Thus,
300 bacterial intracellular location allows persistence of bacteria leading to chronic and recurrent
301 infection (Ray, Marteyn, Sansonetti, & Tang, 2009). Host cell entry is the key step of the
302 invasion process. Identifying the *Staphylococcus* species able to be internalized in host cells is
303 crucial to better characterize a contributing pathophysiological mechanism related to SNA
304 infections but also to provide new approaches for avoiding or prevent cellular invasion.

305 The *in silico* screening approach allow us to identify a hypothetical protein, called SdsY,
306 within the *S. delphini* genomes, showing identity with staphylococcal FnBPs/FnBP-like. This
307 protein showed a high homology with the SpsD protein of *S. pseudintermedius* and shares all
308 the characteristic domains of FnBP-type including a secretory signal sequence at the N-
309 terminus, an N-terminal A domain, a C-terminal repeat region, and a C-terminal
310 peptidoglycan-binding motif (LPXTG) (T. J. Foster, Geoghegan, Ganesh, & Hook, 2014).
311 The analysis also found the presence of similar proteins already defined as FnBPs in
312 *S. argenteus* and *S. schweitzeri* genomes; both species have been recently described and
313 belong to a complex closely related to *S. aureus* (Tong et al., 2015).

314 The screening approach used to detect FnBP-like may present some limits. For several
315 staphylococcal species, only unassembled genomes are available and, as a consequence, the
316 genes of interest can be truncated if they are located at the beginning or the end of a contig.
317 Moreover, the identity and coverage thresholds, from which a protein may be considered as
318 FnBP-like, were set relatively high, and therefore it cannot be excluded that other proteins of
319 interest have been missed using this approach. This is illustrated by the report of Ben Zakour

1
2
3 320 *et al.* who used a different approach (BlastP with a minimum identity of 40% and minimum
4
5 321 sequence coverage of 80%) to screen the distribution of virulence factors, including FnBP-
6
7 322 like in eight staphylococcal species such as *S. delphini*, *S. intermedius*, *S. epidermidis* or *S.*
8
9 323 *haemolyticus*; they found no orthologous protein-coding sequences for FnBPA/B or for
10
11 324 SpsD/L in the various genomes analyzed (Ben Zakour, et al., 2012). However, high thresholds
12
13 325 were chosen herein owing to the high functional redundancy of MSCRAMMs that have
14
15 326 evolved to play multiple roles and so contain similar motifs that are in fact able to recognize
16
17 327 variable and different proteins of the extracellular matrix (T. J. Foster, et al., 2014; Keane et
18
19 328 al., 2007) .

20
21
22
23
24 329 Using a panel of seven *S. delphini* isolates, we confirmed by PCR that all of the tested isolates
25
26 330 were positive for *sdsY* gene. Investigation of the capacity of *S. delphini* to be internalized into
27
28 331 NPPCs found homogeneous behavior among the seven tested strains. In line with *in silico*
29
30 332 results, our *in vitro* results revealed that all strains were able to be internalized in the
31
32 333 intracellular compartment of human osteoblasts. Currently, among staphylococci, only *S.*
33
34 334 *aureus* and *S. pseudintermedius* are reported as intracellular pathogens; in both, fibronectin is
35
36 335 involved in the internalization process by forming a bridge between $\alpha_5\beta_1$ integrin on the
37
38 336 cellular side and FnBPs-like (FnBPA/B and SpsD/L) on the bacteria (Maali, et al., 2016;
39
40 337 Pietrocola, et al., 2015). By using invasive-incompetent *S. aureus* DU5883 strain expressing a
41
42 338 chimeric protein composed of the backbone of FnBPA of *S. aureus* with the predicted repeats
43
44 339 of SdsY; we demonstrated here that SdsY is involved in fibronectin adhesion and host cell
45
46 340 invasion in *S. delphini*. Using murine osteoblast cell lines OB- $\beta_1^{fl/fl}$ and OB- $\beta_1^{-/-}$, we showed
47
48 341 that host cell entry was abolished when the interaction between the bacteria and cellular β_1
49
50 342 integrin is compromised. This finding confirmed a key role of this integrin in *S. delphini*
51
52 343 internalization process.
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 344 Especially described in animal infections such as equidae and mustilidae, a recent study
4
5 345 demonstrates the involvement of *S. delphini* in human infections (Gharsa, et al., 2015;
6
7 346 Guardabassi et al., 2012; Magleby et al., 2019). Considering the complexity of identifying
8
9 347 *Staphylococcus intermedius* group (SIG) species in routine diagnostic laboratory, the
10
11 348 prevalence of *S. delphini*-related infections is likely to be underestimated (Lee et al., 2015).
12
13
14 349 As *S. aureus* and *S. pseudintermedius*, *S. delphini* have the ability to invade NPPCs using an
15
16 350 FnBPs-fibronectin- $\alpha 5\beta 1$ integrin pathway. The results of the present study suggest that these
17
18 351 3 species that belong to the coagulase-positive staphylococci (CoPS) group share a common
19
20 352 pathophysiological mechanism that can explain the genesis of infections. They also prompt to
21
22 353 initiate further studies within the various species belonging to *Staphylococcus* genus to
23
24 354 accurately investigate the ability of these species to be internalized.
25
26
27
28
29 355

32 **Acknowledgements**

33
34
35
36 357 This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
37
38 358 (INSERM) and Allocations de Recherche du Ministère de la Recherche. We thank the
39
40 359 Reference National Center of Staphylococci for the strains collection. We thank Dr. Ruth
41
42 360 Massey (Bristol, UK), who kindly provided us the plasmids pFnBR0 and pFnBR1-11. We
43
44 361 thank Philip Robinson for language editing and critical reading of the manuscript.
45
46
47
48 362

52 **Conflict of Interest Statement**

53
54
55 364 The authors declare no financial conflict of interest.
56
57
58
59
60

365 **References**

- 367 Ahmed, S., Meghji, S., Williams, R. J., Henderson, B., Brock, J. H., & Nair, S. P. (2001).
368 Staphylococcus aureus fibronectin binding proteins are essential for internalization by
369 osteoblasts but do not account for differences in intracellular levels of bacteria. *Infect*
370 *Immun*, 69(5), 2872-2877. doi: 10.1128/IAI.69.5.2872-2877.2001
- 371 Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local
372 alignment search tool. *J Mol Biol*, 215(3), 403-410. doi: 10.1016/S0022-
373 2836(05)80360-2
- 374 Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., . . .
375 Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications
376 to single-cell sequencing. *J Comput Biol*, 19(5), 455-477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021
- 377 Bannoehr, J., Ben Zakour, N. L., Reglinski, M., Inglis, N. F., Prabhakaran, S., Fossum, E., . . .
378 Fitzgerald, J. R. (2011). Genomic and surface proteomic analysis of the canine
379 pathogen Staphylococcus pseudintermedius reveals proteins that mediate adherence to
380 the extracellular matrix. *Infect Immun*, 79(8), 3074-3086. doi: 10.1128/IAI.00137-11
- 381 Bannoehr, J., Ben Zakour, N. L., Waller, A. S., Guardabassi, L., Thoday, K. L., van den
382 Broek, A. H., & Fitzgerald, J. R. (2007). Population genetic structure of the
383 Staphylococcus intermedius group: insights into agr diversification and the emergence
384 of methicillin-resistant strains. *J Bacteriol*, 189(23), 8685-8692. doi: JB.01150-07
- 385 Bannoehr, J., Franco, A., Iurescia, M., Battisti, A., & Fitzgerald, J. R. (2009). Molecular
386 diagnostic identification of Staphylococcus pseudintermedius. *J Clin Microbiol*, 47(2),
387 469-471. doi: 10.1128/JCM.01915-08
- 388 Beca, N., Bessa, L. J., Mendes, A., Santos, J., Leite-Martins, L., Matos, A. J., & da Costa, P.
389 M. (2015). Coagulase-Positive Staphylococcus: Prevalence and Antimicrobial
390 Resistance. *J Am Anim Hosp Assoc*, 51(6), 365-371. doi: 10.5326/JAAHA-MS-6255
- 391 Becker, K., Heilmann, C., & Peters, G. (2014). Coagulase-negative staphylococci. *Clin*
392 *Microbiol Rev*, 27(4), 870-926. doi: 10.1128/CMR.00109-13
- 393 Ben Zakour, N. L., Bannoehr, J., van den Broek, A. H., Thoday, K. L., & Fitzgerald, J. R.
394 (2011). Complete genome sequence of the canine pathogen Staphylococcus
395 pseudintermedius. *J Bacteriol*, 193(9), 2363-2364. doi: 10.1128/JB.00137-11
- 396 Ben Zakour, N. L., Beatson, S. A., van den Broek, A. H., Thoday, K. L., & Fitzgerald, J. R.
397 (2012). Comparative genomics of the Staphylococcus intermedius group of animal
398 pathogens. *Front Cell Infect Microbiol*, 2, 44. doi: 10.3389/fcimb.2012.00044
- 399 Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina
400 sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
- 401 Brunner, M., Millon-Fremillon, A., Chevalier, G., Nakchbandi, I. A., Mosher, D., Block, M.
402 R., . . . Bouvard, D. (2011). Osteoblast mineralization requires beta1 integrin/ICAP-1-
403 dependent fibronectin deposition. *J Cell Biol*, 194(2), 307-322. doi:
404 10.1083/jcb.201007108
- 405 Bui, L. M., Conlon, B. P., & Kidd, S. P. (2017). Antibiotic tolerance and the alternative
406 lifestyles of Staphylococcus aureus. *Essays Biochem*, 61(1), 71-79. doi:
407 10.1042/EBC20160061
- 408 Campoccia, D., Testoni, F., Ravaioli, S., Cangini, I., Maso, A., Speziale, P., . . . Arciola, C. R.
409 (2015). Orthopedic implant-infections. Incompetence of Staphylococcus epidermidis,
410 Staphylococcus lugdunensis and Enterococcus faecalis to invade osteoblasts. *J Biomed*
411 *Mater Res A*. doi: 10.1002/jbm.a.35564

- 1
2
3 412 Chapman, J. C., Bauman, S. E., & Daniel, C. R., 3rd. (2013). Coagulase positive
4 413 staphylococcal infection: a major cause of eczema exacerbations. *J Miss State Med*
5 414 *Assoc*, 54(4), 101-102.
- 6
7 415 Edwards, A. M., Potter, U., Meenan, N. A., Potts, J. R., & Massey, R. C. (2011).
8 416 *Staphylococcus aureus* keratinocyte invasion is dependent upon multiple high-affinity
9 417 fibronectin-binding repeats within FnBPA. *PLoS One*, 6(4), e18899. doi:
10 418 10.1371/journal.pone.0018899
- 11 419 Edwards, A. M., Potts, J. R., Josefsson, E., & Massey, R. C. (2010). *Staphylococcus aureus*
12 420 host cell invasion and virulence in sepsis is facilitated by the multiple repeats within
13 421 FnBPA. *PLoS Pathog*, 6(6), e1000964. doi: 10.1371/journal.ppat.1000964
- 14 422 Foster, A. P. (2012). Staphylococcal skin disease in livestock. *Vet Dermatol*, 23(4), 342-351,
15 423 e363. doi: 10.1111/j.1365-3164.2012.01093.x
- 16 424 Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K., & Hook, M. (2014). Adhesion, invasion and
17 425 evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev*
18 426 *Microbiol*, 12(1), 49-62. doi: 10.1038/nrmicro3161
- 19 427 Foster, T. J., & Hook, M. (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends*
20 428 *Microbiol*, 6(12), 484-488. doi: S0966-842X(98)01400-0 [pii]
- 21 429 Gharsa, H., Slama, K. B., Gomez-Sanz, E., Gomez, P., Klibi, N., Zarazaga, M., . . . Torres, C.
22 430 (2015). Characterisation of nasal *Staphylococcus delphini* and *Staphylococcus*
23 431 *pseudintermedius* isolates from healthy donkeys in Tunisia. *Equine Vet J*, 47(4), 463-
24 432 466. doi: 10.1111/evj.12305
- 25 433 Gouy, M., Guindon, S., & Gascuel, O. (2010). SeaView version 4: A multiplatform graphical
26 434 user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol*,
27 435 27(2), 221-224. doi: 10.1093/molbev/msp259
- 28 436 Greene, C., McDevitt, D., Francois, P., Vaudaux, P. E., Lew, D. P., & Foster, T. J. (1995).
29 437 Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-
30 438 binding proteins and studies on the expression of *fnb* genes. *Mol Microbiol*, 17(6),
31 439 1143-1152. doi: 10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17061143.x
- 32 440 Guardabassi, L., Schmidt, K. R., Petersen, T. S., Espinosa-Gongora, C., Moodley, A., Agerso,
33 441 Y., & Olsen, J. E. (2012). Mustelidae are natural hosts of *Staphylococcus delphini*
34 442 group A. *Vet Microbiol*, 159(3-4), 351-353. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.04.004
- 35 443 Haggar, A., Hussain, M., Lonnie, H., Herrmann, M., Norrby-Teglund, A., & Flock, J. I.
36 444 (2003). Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances
37 445 internalization into eukaryotic cells. *Infect Immun*, 71(5), 2310-2317.
- 38 446 Hamza, T., Dietz, M., Pham, D., Clovis, N., Danley, S., & Li, B. (2013). Intra-cellular
39 447 *Staphylococcus aureus* alone causes infection in vivo. *Eur Cell Mater*, 25, 341-350;
40 448 discussion 350. doi: 10.22203/eCM
- 41 449 Hill, P. B., & Imai, A. (2016). The immunopathogenesis of staphylococcal skin infections - A
42 450 review. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 49, 8-28. doi: S0147-9571(16)30080-7
- 43 451 Hira, V., Kornelisse, R. F., Sluijter, M., Kamerbeek, A., Goessens, W. H., de Groot, R., &
44 452 Hermans, P. W. (2013). Colonization dynamics of antibiotic-resistant coagulase-
45 453 negative *Staphylococci* in neonates. *J Clin Microbiol*, 51(2), 595-597. doi:
46 454 10.1128/JCM.02935-12
- 47 455 Hussain, M., Steinbacher, T., Peters, G., Heilmann, C., & Becker, K. (2015). The adhesive
48 456 properties of the *Staphylococcus lugdunensis* multifunctional autolysin AtlL and its
49 457 role in biofilm formation and internalization. *Int J Med Microbiol*, 305(1), 129-139.
50 458 doi: 10.1016/j.ijmm.2014.11.010
- 51 459 Huvneers, S., Truong, H., Fassler, R., Sonnenberg, A., & Danen, E. H. (2008). Binding of
52 460 soluble fibronectin to integrin alpha5 beta1 - link to focal adhesion redistribution and
53 461 contractile shape. *J Cell Sci*, 121(Pt 15), 2452-2462. doi: 10.1242/jcs.033001

- 1
2
3 462 Jonsson, K., Signas, C., Muller, H. P., & Lindberg, M. (1991). Two different genes encode
4 463 fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*. The complete nucleotide
5 464 sequence and characterization of the second gene. *Eur J Biochem*, *202*(3), 1041-1048.
6 465 Josse, J., Laurent, F., & Diot, A. (2017). Staphylococcal Adhesion and Host Cell Invasion:
7 466 Fibronectin-Binding and Other Mechanisms. *Front Microbiol*, *8*, 2433. doi:
8 467 10.3389/fmicb.2017.02433
9 468 Keane, F. M., Loughman, A., Valtulina, V., Brennan, M., Speziale, P., & Foster, T. J. (2007).
10 469 Fibrinogen and elastin bind to the same region within the A domain of fibronectin
11 470 binding protein A, an MSCRAMM of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, *63*(3),
12 471 711-723. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05552.x
13 472 Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., . . . Hiramatsu, K.
14 473 (2001). Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*.
15 474 *Lancet*, *357*(9264), 1225-1240. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04403-2
16 475 Lee, J., Murray, A., Bendall, R., Gaze, W., Zhang, L., & Vos, M. (2015). Improved detection
17 476 of *Staphylococcus intermedius* group in a routine diagnostic laboratory. *J Clin*
18 477 *Microbiol*, *53*(3), 961-963. doi: 10.1128/JCM.02474-14
19 478 Maali, Y., Martins-Simoes, P., Valour, F., Bouvard, D., Rasigade, J. P., Bes, M., . . .
20 479 Trouillet-Assant, S. (2016). Pathophysiological Mechanisms of *Staphylococcus Non-*
21 480 *aureus* Bone and Joint Infection: Interspecies Homogeneity and Specific Behavior of
22 481 *S. pseudintermedius*. *Front Microbiol*, *7*, 1063. doi: 10.3389/fmicb.2016.01063
23 482 Magleby, R., Bemis, D. A., Kim, D., Carroll, K. C., Castanheira, M., Kania, S. A., . . .
24 483 Westblade, L. F. (2019). First reported human isolation of *Staphylococcus delphini*.
25 484 *Diagn Microbiol Infect Dis*. doi: S0732-8893(18)30400-0
26 485 Novick, R. (1967). Properties of a cryptic high-frequency transducing phage in
27 486 *Staphylococcus aureus*. *Virology*, *33*(1), 155-166. doi: 0042-6822(67)90105-5
28 487 Otto, M. (2008). Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*, *322*, 207-228.
29 488 Pietrocola, G., Gianotti, V., Richards, A., Nobile, G., Geoghegan, J. A., Rindi, S., . . .
30 489 Speziale, P. (2015). Fibronectin Binding Proteins SpsD and SpsL Both Support
31 490 Invasion of Canine Epithelial Cells by *Staphylococcus pseudintermedius*. *Infect*
32 491 *Immun*, *83*(10), 4093-4102. doi: 10.1128/IAI.00542-15
33 492 Rasigade, J. P., Moulay, A., Lhoste, Y., Tristan, A., Bes, M., Vandenesch, F., . . . Dumitrescu,
34 493 O. (2011). Impact of sub-inhibitory antibiotics on fibronectin-mediated host cell
35 494 adhesion and invasion by *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol*, *11*, 263.
36 495 Ray, K., Marteyn, B., Sansonetti, P. J., & Tang, C. M. (2009). Life on the inside: the
37 496 intracellular lifestyle of cytosolic bacteria. *Nat Rev Microbiol*, *7*(5), 333-340. doi:
38 497 10.1038/nrmicro2112
39 498 Rollin, G., Tan, X., Tros, F., Dupuis, M., Nassif, X., Charbit, A., & Coureuil, M. (2017).
40 499 Intracellular Survival of *Staphylococcus aureus* in Endothelial Cells: A Matter of
41 500 Growth or Persistence. *Front Microbiol*, *8*, 1354. doi: 10.3389/fmicb.2017.01354
42 501 Seilie, E. S., & Wardenburg, J. B. (2017). *Staphylococcus aureus* pore-forming toxins: The
43 502 interface of pathogen and host complexity. *Semin Cell Dev Biol*. doi: S1084-
44 503 9521(17)30207-0
45 504 Sievert, D. M., Ricks, P., Edwards, J. R., Schneider, A., Patel, J., Srinivasan, A., . . . Fridkin,
46 505 S. (2013). Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated
47 506 infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the
48 507 Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infect Control Hosp*
49 508 *Epidemiol*, *34*(1), 1-14. doi: 10.1086/668770
50 509 Sinha, B., Francois, P., Que, Y. A., Hussain, M., Heilmann, C., Moreillon, P., . . . Herrmann,
51 510 M. (2000). Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding

- 1
2
3 511 proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect Immun*, 68(12), 6871-6878. doi:
4 512 10.1128/iai.68.12.6871-6878.2000
- 5 513 Tong, S. Y., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G., Jr. (2015).
6 514 *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical
7 515 manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*, 28(3), 603-661. doi:
8 516 10.1128/CMR.00134-14
- 9 517 Tong, S. Y., Schaumburg, F., Ellington, M. J., Corander, J., Pichon, B., Leendertz, F., . . .
10 518 Giffard, P. M. (2015). Novel staphylococcal species that form part of a
11 519 *Staphylococcus aureus*-related complex: the non-pigmented *Staphylococcus argenteus*
12 520 sp. nov. and the non-human primate-associated *Staphylococcus schweitzeri* sp. nov.
13 521 *Int J Syst Evol Microbiol*, 65(Pt 1), 15-22. doi: 10.1099/ij.s.0.062752-0
- 14 522 Trouillet, S., Rasigade, J. P., Lhoste, Y., Ferry, T., Vandenesch, F., Etienne, J., & Laurent, F.
15 523 (2011). A novel flow cytometry-based assay for the quantification of *Staphylococcus*
16 524 *aureus* adhesion to and invasion of eukaryotic cells. *J Microbiol Methods*, 86(2), 145-
17 525 149. doi: 10.1016/j.mimet.2011.04.012
- 18 526 Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen,
19 527 S. G. (2012). Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*, 40(15),
20 528 e115. doi: gks596
- 21 529 van Hal, S. J., Jensen, S. O., Vaska, V. L., Espedido, B. A., Paterson, D. L., & Gosbell, I. B.
22 530 (2012). Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clin Microbiol*
23 531 *Rev*, 25(2), 362-386. doi: 10.1128/CMR.05022-11
- 24 532 Varaldo P, K.-b. R., Biavasco F, Satta G, Heinz Schleifer K. (1988). *Staphylococcus delphini*
25 533 sp. nov., a Coagulase-Positive Species Isolated from Dolphins. *Int J Syst Evol*
26 534 *Microbiol*, 38, 436-439.
- 27 535 von Eiff, C., Peters, G., & Heilmann, C. (2002). Pathogenesis of infections due to coagulase-
28 536 negative staphylococci. *Lancet Infect Dis*, 2(11), 677-685. doi: S1473309902004383
- 29 537 Wang, J. H., Zhang, K., Wang, N., Qiu, X. M., Wang, Y. B., & He, P. (2013). Involvement of
30 538 phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt signaling pathway in beta1 integrin-mediated
31 539 internalization of *Staphylococcus aureus* by alveolar epithelial cells. *J Microbiol*,
32 540 51(5), 644-650. doi: 10.1007/s12275-013-3040-x
- 33 541 You, C., Zhang, X. Z., & Zhang, Y. H. (2012). Simple cloning via direct transformation of
34 542 PCR product (DNA Multimer) to *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Appl Environ*
35 543 *Microbiol*, 78(5), 1593-1595. doi: 10.1128/AEM.07105-11

551 **Tables**552 **Table 1. Strains used in the present study.**

Species	Strains code	Origin	Reference
<i>S. aureus</i>	8325-4	Human	(Novick, 1967)
<i>S. aureus</i> Δ <i>fnbA/B</i>	DU 5883	Human	(Greene et al., 1995)
<i>S. aureus</i> Δ <i>fnbA/B</i>	DU 5883 (pFnBPR1-11)	Human	(Edwards, et al., 2010)
<i>S. aureus</i> Δ <i>fnbA/B</i>	DU 5883 (pFnBPR0)	Human	(Edwards, et al., 2010)
<i>S. aureus</i> Δ <i>fnbA/B</i>	DU 5883 (pFnBPR0:: <i>sdsY-rep</i>)	Human	This study
<i>S. delphini</i>	8086	Horse	(Ben Zakour, et al., 2012)
<i>S. delphini</i>	DSM 20771 ^T	Dolphin	(Varaldo P, 1988)
<i>S. delphini</i>	HT 20030674 (D1)	Camel	(Bannoehr, et al., 2007)
<i>S. delphini</i>	HT 20030676 (D2)	Camel	(Bannoehr, et al., 2007)
<i>S. delphini</i>	HT 20030677 (D3)	Camel	(Bannoehr, et al., 2007)
<i>S. delphini</i>	HT 20030679 (D4)	Camel	(Bannoehr, et al., 2007)
<i>S. delphini</i>	HT 20030680 (D5)	Camel	(Bannoehr, et al., 2007)

553

554

555

556 **Figure legends**

557 **Fig. 1. Schematic representation of SdsY from *S. delphini* DSM 20771^T.** SdsY includes a
558 signal sequence (dark blue; S) at the N terminus, followed by an A domain spans residues 37
559 to 524 (light blue; N1, N2, N3), a connecting domain in yellow (C; residues 525 to 1003), a
560 proline-rich repeats spans residues 1004 to 1084 (light red; PPR), and the wall (red; W) and
561 membrane (cyan; M) spanning domains at the extreme C terminus spans residues 1085 to
562 1160 (Pietrocola, et al., 2015).

563

1
2
3 564 **Fig. 2. Determination of capacity of *S. delphini* to adhere human fibronectin *in vitro* and**
4
5 565 **to be internalized in MG63 cells.** (A) Quantification of the fibronectin adhesion capacity of
6
7 566 seven *S. delphini* strains. All results are expressed as the proportion of the values obtained for
8
9 567 the *S. aureus* 8325-4 strain. The horizontal bars denote the mean derived from three
10
11 568 independent experiments performed in quadruplicate. The fibronectin adhesion capacity of *S.*
12
13 569 *delphini* isolates were compared to *S. aureus* Δ *fnbA/B* using the one-tailed Mann-Whitney
14
15 570 test with an α risk of 0.05. (***) $p < 0.001$). (B) Quantification of *S. delphini* internalization in
16
17 571 osteoblasts MG63 cells. Bars represent the mean \pm standard deviation derived from three
18
19 572 experiments performed in triplicate, and the results are expressed as internalized bacteria
20
21 573 CFU/100,000 cells. CFU, Colony-Forming Unit.
22
23
24
25
26
27 574

28
29
30 575 **Fig. 3. Determination of the capacity of DU5883 strain complemented with pFnBR0,**
31
32 576 **pFnBR1-11 or pFnBR0::*sdsY*-rep to adhere human fibronectin *in vitro* and to be**
33
34 577 **internalized in MG63 cells.** (A) Quantification of the fibronectin adhesion capacity of
35
36 578 *S. aureus* DU5883 expressing pFnBR1-11 or pFnBR0::*sdsY*-rep. All results are expressed as
37
38 579 the proportion of the values obtained for the *S. aureus* 8325-4 strain. The horizontal bars
39
40 580 denote the mean derived from three independent experiments performed in quadruplicate.
41
42 581 Asterisks indicates a significant difference (***) $p < 0.001$; one-tailed Mann-Whitney)
43
44 582 compared with *S. aureus* DU5883 harboring the empty plasmid pFnBPR0. (B) MG63
45
46 583 invasion by *S. aureus* DU5883 expressing pFnBR1-11 or pFnBR0::*sdsY*-rep. Internalized
47
48 584 bacteria were measured as indicated above. Bars represent the mean \pm standard deviation
49
50 585 from three independent experiments performed in triplicate. Asterisks indicates a significant
51
52 586 difference (***) $p < 0.001$; one-tailed Mann-Whitney) compared with *S. aureus* DU5883
53
54 587 harboring the empty plasmid pFnBPR0. CFU, Colony-Forming Unit.
55
56
57
58
59
60

1
2
3 588 **Fig. 4. Evaluation of the involvement of β_1 integrin in the *S. delphini* internalization**
4
5 589 **process using murine osteoblast cell lines (OB- $\beta_1^{fl/fl}$ and OB- $\beta_1^{-/-}$) with functional and**
6
7 **non-functional β_1 subunits, respectively.** The internalization capacity of *S. aureus* 8325-4
8 590 (positive control), DU5883 *S. aureus* $\Delta fnbA/B$ (negative control), and the reference strain
9 591 (*S. delphini* DSM 20771^T) in OB- $\beta_1^{fl/fl}$ and OB- $\beta_1^{-/-}$ osteoblasts were measured 3 hours post-
10 592 infection from three experiments performed in triplicate. The bilateral Mann-Whitney test was
11
12 593 used to compare the data obtained for the OB- $\beta_1^{fl/fl}$ and OB- $\beta_1^{-/-}$ osteoblasts with an α risk of
13
14 594 0.05 (***) ($p < 0.001$).
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

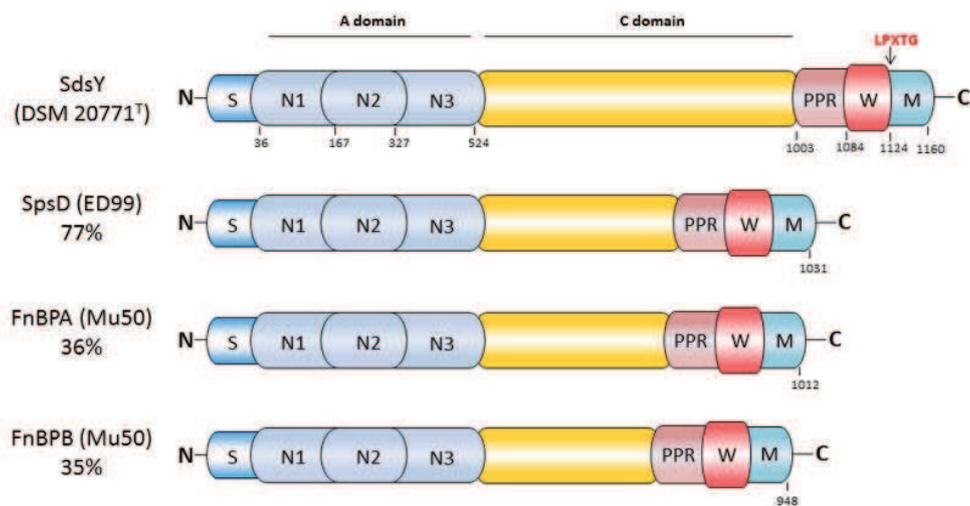


Fig. 1. Schematic representation of SdsY from *S. delphini* DSM 20771^T. SdsY includes a signal sequence (dark blue; S) at the N terminus, followed by an A domain spans residues 37 to 524 (light blue; N1, N2, N3), a connecting domain in yellow (C; residues 525 to 1003), a proline-rich repeats spans residues 1004 to 1084 (light red; PPR), and the wall (red; W) and membrane (cyan; M) spanning domains at the extreme C terminus spans residues 1085 to 1160 (Pietrocola, et al., 2015).

67x50mm (300 x 300 DPI)

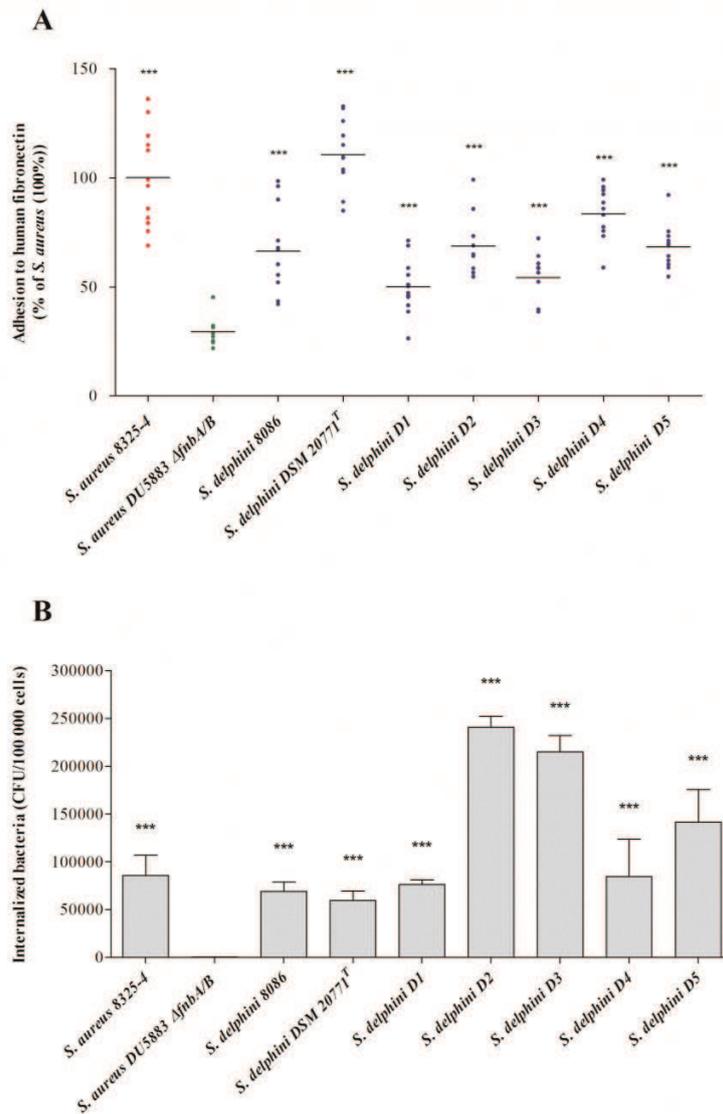


Fig. 2. Determination of capacity of *S. delphini* to adhere human fibronectin in vitro and to be internalized in MG63 cells. (A) Quantification of the fibronectin adhesion capacity of seven *S. delphini* strains. All results are expressed as the proportion of the values obtained for the *S. aureus* 8325-4 strain.

The horizontal bars denote the mean derived from three independent experiments performed in quadruplicate. The fibronectin adhesion capacity of *S. delphini* isolates were compared to *S. aureus* Δ *fnbA/B* using the one-tailed Mann-Whitney test with a risk of 0.05. (***) $p < 0.001$. (B) Quantification of *S. delphini* internalization in osteoblasts MG63 cells. Bars represent the mean \pm standard deviation derived from three experiments performed in triplicate, and the results are expressed as internalized bacteria CFU/100,000 cells. CFU, Colony-Forming Unit.

750x1133mm (72 x 72 DPI)

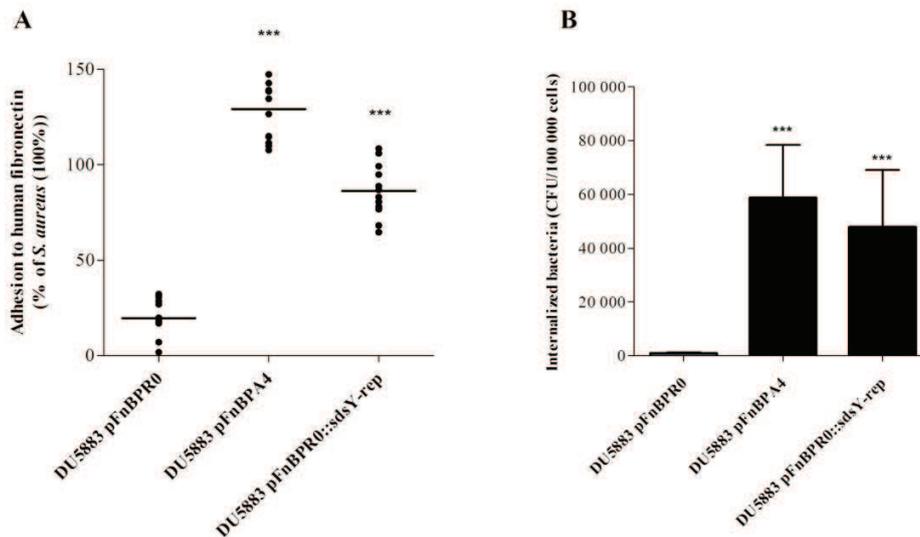


Fig. 3. Determination of the capacity of DU5883 strain complemented with pFnBR0, pFnBR1-11 or pFnBR0::sdsY-rep to adhere human fibronectin *in vitro* and to be internalized in MG63 cells. (A)

Quantification of the fibronectin adhesion capacity of *S. aureus* DU5883 expressing pFnBR1-11 or pFnBR0::sdsY-rep. All results are expressed as the proportion of the values obtained for the *S. aureus* 8325-4 strain. The horizontal bars denote the mean derived from three independent experiments performed in quadruplicate. Asterisks indicates a significant difference (***) $p < 0.001$; one-tailed Mann-Whitney) compared with *S. aureus* DU5883 harboring the empty plasmid pFnBPR0. (B) MG63 invasion by *S. aureus* DU5883 expressing pFnBR1-11 or pFnBR0::sdsY-rep. Internalized bacteria were measured as indicated above. Bars represent the mean \pm standard deviation from three independent experiments performed in triplicate. Asterisks indicates a significant difference (***) $p < 0.001$; one-tailed Mann-Whitney) compared with *S. aureus* DU5883 harboring the empty plasmid pFnBPR0. CFU, Colony-Forming Unit.

259x154mm (300 x 300 DPI)

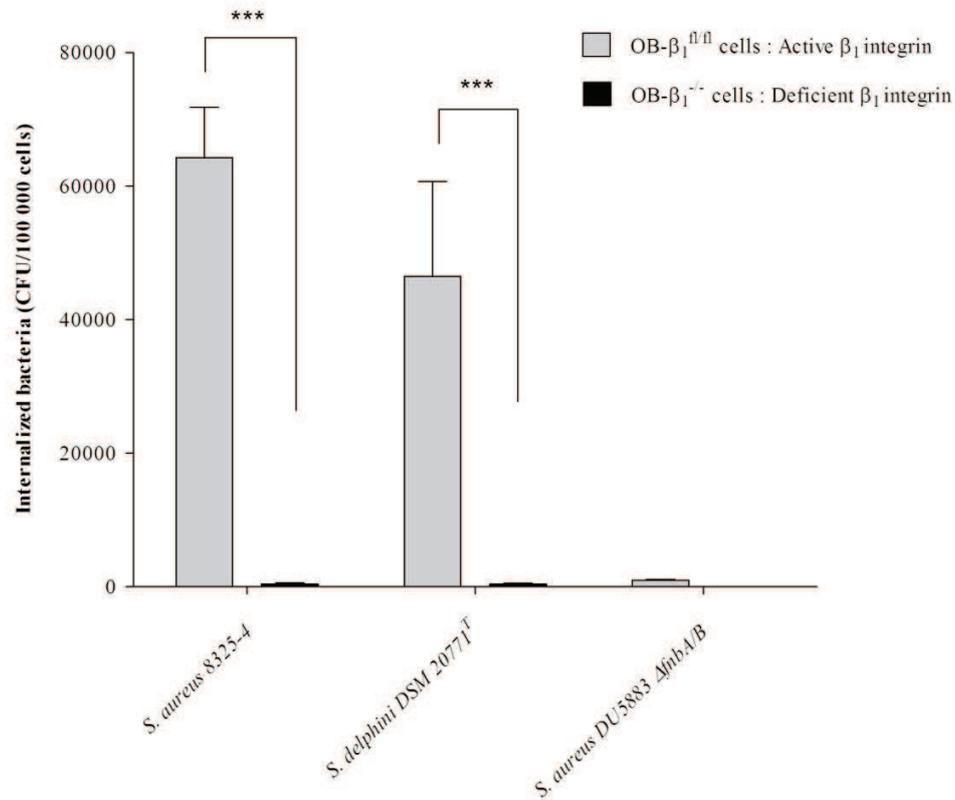


Fig. 4. Evaluation of the involvement of β_1 integrin in the *S. delphini* internalization process using murine osteoblast cell lines (OB- $\beta_1^{fl/fl}$ and OB- $\beta_1^{-/-}$) with functional and non-functional β_1 subunits, respectively. The internalization capacity of *S. aureus* 8325-4 (positive control), DU5883 *S. aureus* Δ fnbA/B (negative control), and the reference strain *S. delphini* DSM 20771^T in OB- $\beta_1^{fl/fl}$ and OB- $\beta_1^{-/-}$ osteoblasts were measured 3 hours post-infection from three experiments performed in triplicate. The bilateral Mann-Whitney test was used to compare the data obtained for the OB- $\beta_1^{fl/fl}$ and OB- $\beta_1^{-/-}$ osteoblasts with an α risk of 0.05 (***) $p < 0.001$.

193x167mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6 **Supporting Information 1. Identification of *S. delphini* isolates by PCR-restriction**
7 **fragment length polymorphism of the *pta* gene.** DNA was extracted using the Quick
8 Extract kit (Epicentre®, Madison, WI, USA). PCR amplification of a fragment of the *pta* gene
9 was carried out in a 25 µl volume with 0.2 µM of each primer (*pta*F, ATG TCT AGT TTA
10 TTA GAT GTA CTT, and *pta*R, TTT TGT TGA GAA GCT TAA CA), 0.2 mM of dNTPs,
11 1.5 mM MgCl₂, 0.5 U Taq DNA polymerase. Thermocycling conditions were as followed:
12 95°C for 5 min followed by 30 cycles of 95°C for 1 min, 51°C for 1 min, and 72°C for 1 min,
13 with a final incubation of 72°C for 10 min. The amplicons were sequenced by Biofidal® in
14 double strand analysis. The genetic sequences obtained were verified using the chromas
15 software (Version 2.5). Enzymatic digestion of the *pta* fragments described by Bannoehr et al,
16 was performed using the computer platform RestrictionMapper (Version 3).
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Supporting Information 2. (A) Digests of the *pta* PCR products using *Mbo*I enzyme; (B) Sequences of the partial *pta* genes from different staphylococcal species. Bioinformatic analysis of the *pta* gene sequencing products shows an absence of the *Mbo*I site restriction for all *S. delphini* isolates.

A

Staphylococcal strains	Fragments in bp with <i>Mbo</i> I	Cut-off frequency
<i>S. delphini</i> 8086	320	0
<i>S. delphini</i> DSM 20771	320	0
<i>S. delphini</i> D1	320	0
<i>S. delphini</i> D2	320	0
<i>S. delphini</i> D3	320	0
<i>S. delphini</i> D4	320	0
<i>S. delphini</i> D5	320	0
<i>S. pseudintermedius</i> LMG22219	213 + 107	1
<i>S. pseudintermedius</i> LMG22220	213 +107	1

B

```

1 delphini HT 20030674
2 delphini HT 20030676
3 delphini HT 20030677
4 delphini HT 20030679
5 delphini HT 20030680
6 delphini DSM 20771
7 delphini 0086
8 Pseudintermedius IMG 2219
9 Pseudintermedius IMG 2220
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

```

For Review Only

Supporting Information 3. Conditions of amplification for the *sdsY* gene via. (A) The reaction mixture for the PCR assays. DNA was extracted using the kit Quick Extract (Epicentre®, Madison, WI, USA). (B) Sequences of the primers used for PCR. (C) Program used for DNA amplification.

A

PCR mixture components	Volume
Buffer 10X	2.5 µL
MgCl ₂ 25 mM	0.75 µL
dNTP (deoxynucleoside triphosphate) 20 mM	4 µL
Primer 1 10 µM	1 µL
Primer 2 10 µM	1 µL
Taq polymerase 5 U/µL	0.1 µL
DNA	2 µL
H ₂ O	13.65 µL

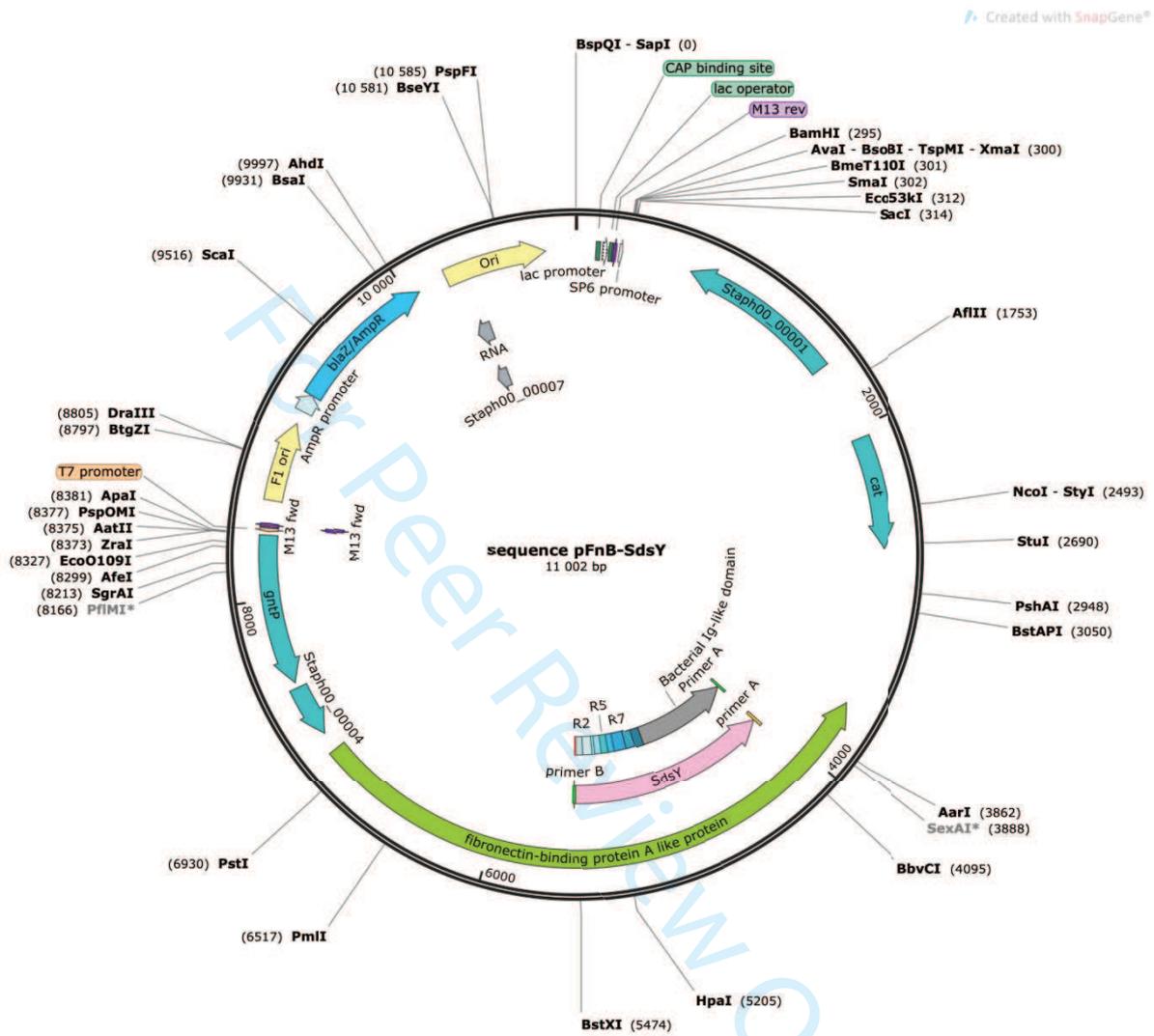
B

Primers
Forward <i>sdsY</i> 5' GAACGACAAACCTGTACCGC 3'
Reverse <i>sdsY</i> 5' TCGTACTGACCGCTCACATT 3'

C

PCR Step	Times and temperatures	
Initial denaturation	5 min - 94°C	
Cyclic denaturation	30 sec - 94°C	} x25 cycles
Cyclic hybridization	30 sec - 60°C	
Cyclic elongation	1 min - 72°C	
Final elongation	5 min - 72°C	

Supporting Information 4. Complete restriction map of pFnBR0::sdsY-rep.



QUATRIEME PUBLICATION: Impact of biomaterial on coagulase-negative staphylococci (CoNS) biofilm

Les infections ostéo-articulaires constituent un groupe très hétérogène de situations cliniques, classées en fonction de leur localisation anatomique, de leur durée d'évolution, du mécanisme conduisant à l'infection et/ou de la présence ou non de matériel orthopédique. Les IOA sur matériel représentent 35% de l'ensemble des IOA et 64% des IOA complexes. Sur le plan étiologique, les SNA sont les bactéries les plus prévalentes dans ces IOA sur matériel dans lesquelles elles représentent 30 à 43% des échantillons cliniques. Considéré comme un facteur de risque dans la survenue d'infections liées au SNA, la présence de matériel constitue une niche écologique pouvant induire une dépression immunitaire locale, créant un environnement propice à la colonisation bactérienne et au développement de biofilms. Par conséquent, les biomatériaux représentés principalement en chirurgie orthopédique par le titane, l'acier inoxydable et divers polymères, constituent des substrats abiotiques d'ancrage pour l'adhésion bactérienne et la formation de biofilm. Ces biomatériaux diffèrent par leurs caractéristiques chimiques (charge et hydrophobicité) et mécaniques (topographie, rugosité et rigidité) pouvant influencer positivement ou négativement la formation du biofilm.

Bien qu'il existe des preuves d'une association entre la présence de biomatériaux et le développement d'IOA liées au SNA, peu de données sont disponibles sur le rôle éventuel joué par les différents biomatériaux dans la formation du biofilm en fonction des différentes espèces de SNA. L'objectif de ce travail a ainsi été d'évaluer la formation du biofilms des 6 espèces de SNA les plus fréquemment isolées d'IOA sur matériel, sur les biomatériaux les plus couramment utilisés en chirurgie orthopédique.

Dans ce contexte, nous avons été amenés à développer spécifiquement pour ce projet une méthode novatrice d'étude du biofilm sur biomatériaux (inox, titane et polyéthylène) adaptée de la technique «Calgary Biofilm Device», les inserts en plastiques étant remplacés par des plots en métal ou polymères. En collaboration avec le Groupe Lépine®, spécialiste français des implants orthopédiques, des cylindres de biomatériaux de taille standardisée ont été fabriqués afin d'étudier la formation du biofilm des SNA sur inox, titane et polyéthylène de masse molaire très élevée (UHMPE).

Aucune différence significative n'a été observée entre les trois biomatériaux orthopédiques pour l'ensemble des espèces de SNA testées à l'exception de l'espèce *S. epidermidis* pour laquelle une formation de biofilm significativement plus importante a été observée sur l'UHMWPE par rapport aux autres biomatériaux testés. Nos résultats montrent également une variabilité inter-espèces au sein des SNA. Ainsi les espèces *S. haemolyticus* et *S. warneri* se distinguaient clairement des autres espèces par leur incapacité, quelles que soient les souches utilisées, à former un biofilm. N'ayant pas les mêmes mécanismes physiopathologiques impliqués dans la mise en place et le développement des IOA d'une espèce à l'autre, ces données sont particulièrement importantes car elles suggèrent que contrairement aux pratiques actuelles en clinique, les SNA ne doivent pas être considérés comme une entité clinique unique. Nos résultats peuvent avoir des conséquences cliniques pertinentes, en particulier dans la gestion de l'infection articulaire péri-prothétique après une arthroplastie totale du genou. Bien que la plupart des experts recommandent l'échange d'insert en polyéthylène lors du débridement sans retrait de la prothèse en cas d'infection précoce, cette pratique n'est pas toujours respectée. Compte tenu du tropisme observé de *S. epidermidis* pour le polyéthylène, notre étude encourage fortement l'échange de l'insert en polyéthylène pour cette espèce afin de réduire considérablement la charge bactérienne. Enfin, par cette étude, par leur forte production de biofilm indépendante du biomatériau, nous encourageons également à accorder une plus grande attention aux espèces *S. capitis* et *S. lugdunensis*, considérées comme des forts producteurs de biofilm quel que soit le biomatériau. Ces deux espèces sont de plus en plus reconnues comme des agents pathogènes majeurs dans les infections nosocomiales telles

que les bactériémies liées aux dispositifs médicaux et les endocardites, pour lesquelles le biofilm constitue un mécanisme de virulence majeur.

Cet article sera très prochainement soumis sous forme de « Research note » dans le journal « Clinical Microbiology and Infection » et cela avant le dépôt définitif du manuscrit.

Impact of the biomaterial on coagulase-negative staphylococci biofilm formation

Y. Maali¹, A. Monteix¹, J. Tasse¹, P.A Clerc¹, M. Bergot¹, F. Valour^{1,2,3}, T. Ferry¹, S. Lustig^{1,4}, J. Josse¹, S. Trouillet-Assant^{1,5#}, F. Laurent^{1,2*#}

¹ Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111, CNRS UMR5308, Université de Lyon 1, ENS de Lyon, Team “Pathogenesis of staphylococcal infections”, Lyon, France.

² Institut des Agents Infectieux, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

³ Centre National de Référence des Staphylocoques, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

⁴ Orthopedic Surgery departments, Hospices Civils de Lyon, France

⁵ Laboratoire Commun de Recherche Lyon Sud, Hospices Civils de Lyon-bioMérieux, Pierre Bénite, France.

These senior authors have contributed equally to this work.

*Corresponding author: Pr. Frédéric Laurent, Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111, CNRS UMR5308, Université de Lyon 1, ENS de Lyon, Team “Pathogenesis of staphylococcal infections”, Lyon, France.

Département de Bactériologie - Institut des Agents Infectieux. Groupement Hospitalier Nord, 103 Grande Rue de la Croix-Rousse, 69004 Lyon, France.

Tel: +33 (0)4 72 07 18 37; E-mail: frederic.laurent@univ-lyon1.fr

31 **Abstract**

32 Biofilm formation on prosthetic and osteosynthesis materials constitutes a major
33 pathophysiological mechanism in bone and joint infections (BJIs). Coagulase-negative
34 Staphylococci (CoNS) are the most common pathogens in these infections. Through this study,
35 we evaluated the impact of different biomaterials used in orthopedics on biofilm formation ability
36 for several species. We selected 5 isolates of the 6 species with highest prevalence in BJI:
37 *S. capitis*, *S. caprae*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis* and *S. warneri*. The
38 orthopedic biomaterials studied were stainless steel (AISI 316L), titanium (TA6V) and very high
39 molecular weight polyethylene (UHMWPE). Biomaterials were designed as uniform cylindrical
40 pegs and sterilized by gamma rays. The biofilm formed on the surface of the biomaterials, was
41 measured after 24 h at 37 °C by plate count of viable bacteria (CFU / mm²). Heterogeneity of
42 behavior was observed between the different CoNS species. *S. capitis* and *S. lugdunensis* species
43 showed high biofilm formation capacity instead of other species like *S. haemolyticus* and
44 *S. warneri*. Concerning biomaterial impact, the results shows identical biofilm formation
45 capacities for the three orthopedic biomaterials for all species expected for *S. epidermidis* for
46 which asignificant higher biofilm formation was observed on UHMWPE. Biomaterials
47 composition used in orthopedics does not seem to impact mainly the mature biofilm for the
48 majority of CoNS, contrary to species tropism.

49

50

51

52

53

54

55 **Introduction**

56 Bone and joint infections (BJIs) are a very heterogeneous group of clinical situations, classified
57 according to their anatomical location, their time of evolution, the mechanism leading to
58 infection, and the presence or absence of orthopedic material. The mortality and morbidity rates
59 of hospitalized patients with BJIs were evaluated at 5.2% and 40% respectively [1]. Device-
60 associated BJIs represent 35 % of overall BJIs, and 64 % of complex BJIs [1]. Etiologically,
61 Coagulase-negative staphylococci (CoNS), composed of more than 40 species, are the most
62 frequently bacteria identified in device-associated BJIs in which they represent 30-43% of
63 clinical samples. The use of medical device is significantly associated with increased risk of BJIs
64 [2]. Indeed, patients with medical device are x4 to x160 times more likely to develop an infection
65 than those without medical device (Odds ratio = 4.0 – 670.4; 95%) [3].

66 The presence of material triggers a local tissue response, which includes inflammation, formation
67 of granulation tissue and fibrous encapsulation [4], promoting bacterial colonization and biofilm
68 development on materials. Considered as the most important pathophysiological mechanisms
69 involved in CoNS device-associated infections, biofilm first-step were largely influenced by the
70 biomaterial [5, 6]. Learned societies as the International Organization for Standardization and the
71 American Society for testing and Materials licensed only few biomaterials used as orthopedic
72 implant. In modern orthopedics surgery, titanium, stainless steel and various polymers, including
73 ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE) are biomaterials the most frequently used.
74 These materials differ in both chemical (charge and hydrophobicity) and mechanical
75 characteristics (topography, roughness and stiffness) which influence bacterial adherence and
76 biofilm formation [7].

77 Although there is evidence of the association between the presence of biomaterial and the
78 development of CoNS device-associated BJIs, few data are available on the impact of biomaterial
79 on the biofilm formation of different CoNS species. This *in vitro* study aim to compare the level
80 of biofilm formation of six CoNS species most frequently responsible for device-associated BJIs
81 on three different biomaterials commonly used in orthopedic surgery. This allowed us to study
82 inter-species variability within CoNS, despite most studies address CoNS as a whole and do not
83 distinguish between different species.

84 **Methods**

85 This study was approved by the French South-East ethics committee (reference number 2013-
86 018). In accordance with French legislation, written informed patient consent was not required
87 for the use of the collected clinical isolates. In this study, using a collection of clinical strains
88 derived from mono-microbial BJIs collected in the orthopedic department of Hospices Civils de
89 Lyon (HCL), we selected 5 isolates of the 6 species with highest prevalence in BJI: *S. capitis*, *S.*
90 *caprae* *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis* and *S. warneri* [5]. Identification of all
91 CoNS isolates was confirmed by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass
92 spectrometry (MALDI-TOF-MS) as previously described [8]. Then, we assessed the capacity of
93 biofilm formation of each isolate on different orthopedic biomaterials: stainless steel (AISI
94 316L), titanium (TA6V) and ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE). Uniform
95 cylindrical pegs of orthopedic biomaterial, were manufactured by a supplier of medical and
96 surgical orthopedics equipment (Groupe Lépine, Genay, France) and sterilized by gamma rays.
97 Biomaterial pegs were then fixed into the lid of 24-well flat bottom cell culture plates (Corning
98 Inc., Corning, NY, USA). Then, bacterial biofilms were formed by immersing the pegs lid into 2
99 ml of overnight cultures standardized (3×10^8 UFC/mL⁻¹) in BHI 1% glucose (D-(+)-glucose,

100 Biosolve, France) on 24-well plate [9]. The biomaterials pegs lid together with the 24-well plate
101 was incubated at 37°C for 24 h. After 3 rinsing steps, the pegs were removed from the lid and the
102 biofilm was disrupted by sonication for 5 min. The disrupted biofilms were serially diluted then
103 plated on Trypcase Soy Agar (TSA; bioMérieux, Marcy-L'Etoile, France) plates to determine
104 viable cell counts (colony forming units; CFU /mm²). Results were derived from two experiments
105 performed in triplicate. Statistical analysis was performed with nonparametric tests using
106 Kruskal–Wallis and Dunn's tests for comparison among species or biomaterial groups. Two-way
107 ANOVA was applied to determine the effects of species and biomaterials on CoNS biofilm
108 formation. For all analyses, $\alpha < 0.05$ was considered statistically significant.

109

110 **Results**

111 To evaluate if the biomaterial could have an impact on biofilm formation, we assessed in each
112 species groups the Kruskal-Wallis test. No significant differences were observed between the
113 three orthopedic biomaterials for all species expected for *S. epidermidis* for which more biofilm
114 was observed on UHMWPE compared to others biomaterials ($p < 0.05$; Fig 1). Then, we have
115 measured if difference in biofilm formation capacity could be observed between CoNS species.
116 We noticed a significant difference of biofilm formation according to the species independently
117 of biomaterials composition (Kruskal-Wallis: $p < 0.05$). Dunn's test showed that *S. haemolyticus*
118 and *S. warneri*, whom can be qualified as lower producers, stand out from the other species such
119 as *S. capitis* and *S. lugdunensis* qualified as higher producers. This interspecies variability can be
120 illustrated by biofilm formation capacity up to x43 times higher for *S. capitis* compared to
121 *S. warneri*. To illustrate these differences, two-way ANOVA was used to analyze the effects of

122 species and biomaterials on CoNS biofilm formation. The results showed that only the species
123 factor significantly affected the biofilm formation of CoNS ($p < 0.05$).

124

125 **Discussion**

126 The CoNS are the most common pathogens involved in device-associated BJIs. The aim of the
127 current study was to determine the biofilm production on several orthopedics biomaterials by
128 different CoNS species. Our study shows that some species are more able to form a biofilm on
129 biomaterial than others, as *S. capitis* and *S. lugdunensis*. These data reinforces the idea to not
130 consider these species as a single clinical entity, CoNS do not have the same pathophysiological
131 mechanisms from one species to another. These findings emphasize the need for studies focused
132 on others pathophysiological pathway for species like *S. haemolyticus* and *S. warneri*, for which
133 the mechanism seems to be independent of the ability to be internalized in host cells and to form
134 a biofilm [10]. In addition, our results showed that the composition of orthopedics biomaterial
135 does not impact the biofilm formation in late times for all species expected for *S. epidermidis*.
136 Indeed, for this species a higher propensity for biofilm formation was found on polyethylene
137 compared to other biomaterials. Our results are in phase with the data available in the literature,
138 also showing a greater tropism of *S. epidermidis* biofilm for polyethylene surfaces [11]. For
139 instance, using a canine model, Petty *et al.* showed that *S. epidermidis* adhere more to polymers
140 than stainless steel, which supposedly could present a higher risk of infection. Indeed, the
141 infection rate was 250% higher on polyethylene than stainless steel [12]. Another study
142 conducted in an *in vivo* murine model, showed that the ability to form a biofilm and susceptibility
143 to induce an infection with *S. epidermidis* were similar on titanium and stainless steel [13]. Our
144 results could have relevant clinical consequences, specifically in management of peri-prosthetic

145 joint infection after total knee arthroplasty. Most experts recommend polyethylene insert
146 exchange in the debridement without removal of the prosthesis in case of early infection [14]. For
147 some studies, it is unclear if different biomaterials in the prosthetic components are more prone to
148 facilitate the bacterial adherence [15]. Our study encourages the polyethylene insert exchange of
149 joint prosthesis to drastically reduce the bacterial load, especially in case of *S. epidermidis*
150 infection. Our study encourages us to pay more attention to *S. capitis* and *S. lugdunensis* species,
151 which latter is qualified as “a wolf in sheep's clothing”. Both species are increasingly recognized
152 as major pathogens in nosocomial infections such as in foreign body-related bloodstream
153 infections and native valve endocarditis in which the biofilm could have played a major
154 pathogenic role.

155

156 **Acknowledgments**

157 This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
158 (INSERM) and Allocations de Recherche du Ministère de la Recherche. We are grateful to
159 Rodolphe Pfäifer and all the participants in this project of Groupe Lépine company for the design
160 and sharing of pegs biomaterials. We thank Emmanuel Chanard for his help in the CoNS strains
161 collection.

162

163 **Transparency Declaration**

164 The authors declare no conflicts of interest.

165

166

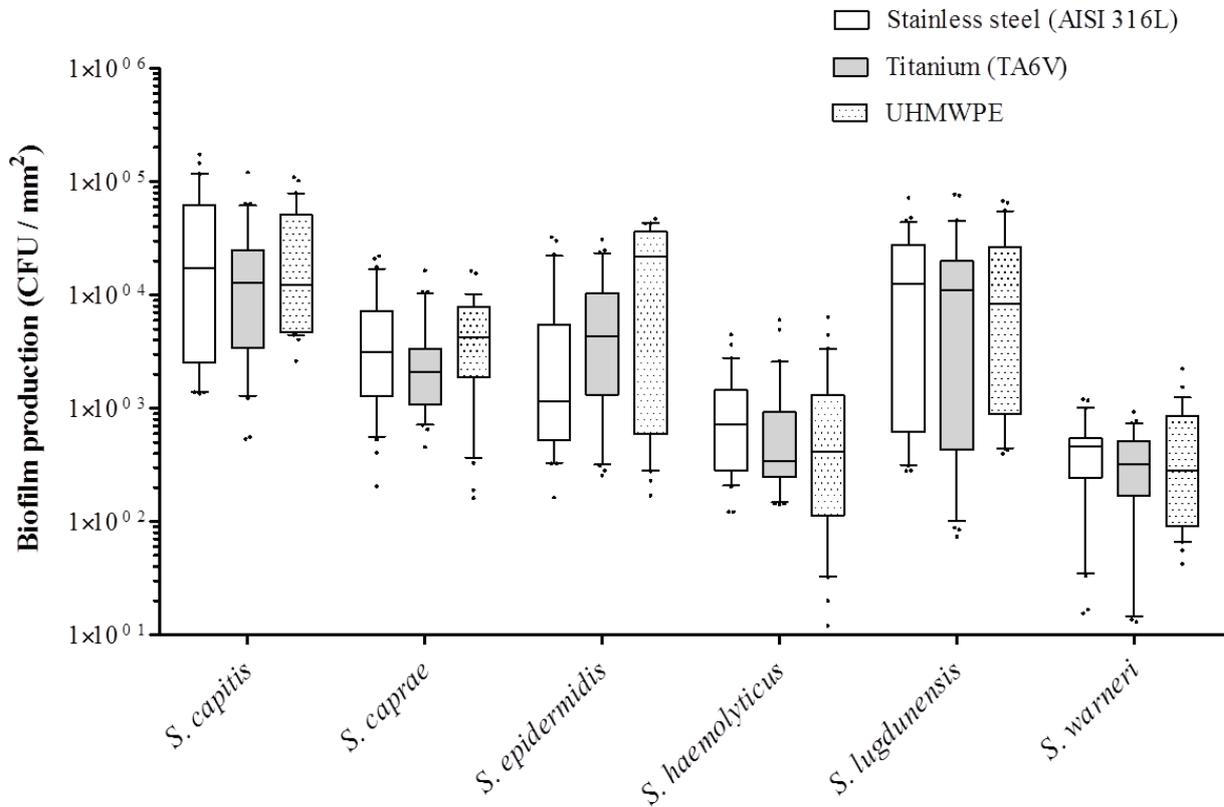
167 **References**

168

- 169 1. Laurent E, Gras G, Druon J, Rosset P, Baron S, Le-Louarn A, et al. Key features of bone
170 and joint infections following the implementation of reference centers in France. *Med Mal Infect.*
171 2018 Jun;48(4):256-62.
- 172 2. Rochford ET, Richards RG, Moriarty TF. Influence of material on the development of
173 device-associated infections. *Clin Microbiol Infect.* 2012 Dec;18(12):1162-7.
- 174 3. Korol E, Johnston K, Waser N, Sifakis F, Jafri HS, Lo M, et al. A systematic review of
175 risk factors associated with surgical site infections among surgical patients. *PLoS One.*
176 2013;8(12):e83743.
- 177 4. Anderson JM. Future challenges in the in vitro and in vivo evaluation of biomaterial
178 biocompatibility. *Regen Biomater.* 2016 Jun;3(2):73-7.
- 179 5. Yoda I, Koseki H, Tomita M, Shida T, Horiuchi H, Sakoda H, et al. Effect of surface
180 roughness of biomaterials on *Staphylococcus epidermidis* adhesion. *BMC Microbiol.* 2014 Sep
181 2;14:234.
- 182 6. Mack D, Rohde H, Harris LG, Davies AP, Horstkotte MA, Knobloch JK. Biofilm
183 formation in medical device-related infection. *Int J Artif Organs.* 2006 Apr;29(4):343-59.
- 184 7. Navarro M, Michiardi A, Castano O, Planell JA. Biomaterials in orthopaedics. *J R Soc*
185 *Interface.* 2008 Oct 6;5(27):1137-58.
- 186 8. Bergeron M, Dauwalder O, Gouy M, Freydiere AM, Bes M, Meugnier H, et al. Species
187 identification of staphylococci by amplification and sequencing of the *tuf* gene compared to the
188 *gap* gene and by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Eur*
189 *J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011 Mar;30(3):343-54.
- 190 9. Ernest EP, Machi AS, Karolcik BA, LaSala PR, Dietz MJ. Topical adjuvants
191 incompletely remove adherent *Staphylococcus aureus* from implant materials. *J Orthop Res.* 2018
192 Jun;36(6):1599-604.
- 193 10. Maali Y, Martins-Simoes P, Valour F, Bouvard D, Rasigade JP, Bes M, et al.
194 Pathophysiological Mechanisms of *Staphylococcus Non-aureus* Bone and Joint Infection:
195 Interspecies Homogeneity and Specific Behavior of *S. pseudintermedius*. *Front Microbiol.*
196 2016;7:1063.
- 197 11. Malhotra R, Dhawan B, Garg B, Shankar V, Nag TC. A Comparison of Bacterial
198 Adhesion and Biofilm Formation on Commonly Used Orthopaedic Metal Implant Materials: An
199 In vitro Study. *Indian J Orthop.* 2019 Jan-Feb;53(1):148-53.
- 200 12. Petty W, Spanier S, Shuster JJ, Silverthorne C. The influence of skeletal implants on
201 incidence of infection. Experiments in a canine model. *J Bone Joint Surg Am.* 1985
202 Oct;67(8):1236-44.
- 203 13. Hudetz D, Ursic Hudetz S, Harris LG, Luginbuhl R, Friederich NF, Landmann R. Weak
204 effect of metal type and *ica* genes on staphylococcal infection of titanium and stainless steel
205 implants. *Clin Microbiol Infect.* 2008 Dec;14(12):1135-45.
- 206 14. Pang HN, Bin Abd Razak HR, Petis S, Naudie DDR, MacDonald SJ. The role of isolated
207 polyethylene exchange in total knee arthroplasty. *EFORT Open Rev.* 2017 Mar;2(3):66-71.
- 208 15. Gomez-Barrena E, Esteban J, Medel F, Molina-Manso D, Ortiz-Perez A, Cordero-
209 Ampuero J, et al. Bacterial adherence to separated modular components in joint prosthesis: a
210 clinical study. *J Orthop Res.* 2012 Oct;30(10):1634-9.

211

212



213

214

215 **Fig 1. Box plots depicting the biofilm formation by CoNS isolates on different biomaterials**
 216 **grown in BHlg for 24h.** Data are expressed in CFU/mm² after take-off the bacteria and plate
 217 counting derived from 2 experiments performed in triplicate. The bottom and top of the box
 218 indicate the first and third quartiles, the line inside the box the median, and the ends of the
 219 whiskers the 10th and the 90th percentile values. Outliers are plotted as individual point.
 220 UHMWPE: Ultra-High Molecular Weight Polyethylene; CFU: Colony Forming Units.

221

CINQUIEME PUBLICATION (Revue): Interaction between biofilm and bone: How the presence of biofilm promotes prosthesis loosening?

Prenant en considération le vieillissement de la population, mais aussi le changement de mode de vie et de consommation de nos sociétés actuelles (obésité, faible activité physique, accidents...), le nombre d'indications médicales préconisant un remplacement total de l'articulation est en constante augmentation. En effet, le nombre annuel d'arthroplasties primaires totales de hanche et de genou devrait atteindre 635 000 et 935 000 interventions d'ici 2030, respectivement.

Une proportion infime mais significative de ces patients porteurs de prothèses articulaires est victime d'un échec de l'implant ayant pour cause le descellement de la prothèse. Deux mécanismes distincts ont été décrits comme responsables de cet échec : (i) le descellement aseptique en raison des micromouvements et/ou de la corrosion et la libération de particules d'usure provenant des différents composants du matériau implanté et (ii) le descellement septique en raison d'infection prothétique articulaire (IPA). Les complications d'origine septiques sont estimées entre 0,4 et 4% des arthroplasties d'articulations. Les complications aseptiques peuvent quant à elles représenter 2 à 18% des interventions. Le caractère aseptique du descellement des prothèses a été remis en question au fil des années, d'autant plus que les bactéries ne sont pas toujours isolées lors du diagnostic.

Dans cette revue, l'impact du biofilm sur le descellement de prothèse est discuté au travers des espèces *S. aureus*, *S. epidermidis* et *S. lugdunensis*. Après avoir introduit les mécanismes cellulaires liés au descellement aseptique et septique, cette revue discute en détail des interactions entre le biofilm, les cellules immunitaires (neutrophiles et macrophages) et les cellules osseuses (ostéoblastes et ostéoclastes). Notamment du rôle orchestré par les

neutrophiles, conduisant au développement d'un environnement inflammatoire. Cette inflammation active la résorption osseuse des ostéoclastes conduisant à l'ostéolyse périprothétique. La capacité du biofilm à moduler les populations de neutrophiles pourrait être la clé pour expliquer le descellement prothétique retrouvé dans les IPA. Cette revue est actuellement en révision dans le journal *Frontiers in Microbiology*.

Biofilm and prosthesis loosening

26 joint infection (PJI). The “aseptic” character of prosthesis loosening has been challenged over the
27 years, especially considering that bacteria can persist in biofilms and be overlooked during diagnosis.
28 Histological studies on periprosthetic tissue samples reported that macrophages are the principle cells
29 associated with aseptic loosening due to wear debris. They produce cytokines and favor a
30 inflammatory environment that induces formation and activation of osteoclasts, leading to bone
31 resorption and periprosthetic osteolysis. In prosthetic joint infections, the presence of infiltrates of
32 polymorphonuclear neutrophils is a major criterion for histological diagnosis. Neutrophils are
33 colocalized with osteoclasts and zones of osteolysis. A similar inflammatory environment also
34 develops, leading to bone resorption through osteoclasts. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus*
35 *epidermidis* and *Staphylococcus lugdunensis* are the main staphylococci observed in prosthetic joint
36 infections. They share the common feature to form biofilm. For *S. aureus* and *S. epidermidis*, the
37 interaction between biofilm and immune cells (macrophages and polymorphonuclear neutrophils)
38 differs regarding the species. Indeed, the composition of extracellular matrix of biofilm seems to
39 impact the interaction with immune cells. Recent papers also reported the major role of myeloid-
40 derived suppressor cells in biofilm-associated prosthetic joint infections with *S. aureus*. These cells
41 prevent lymphocyte infiltration and facilitate biofilm persistence. Moreover, the role of T
42 lymphocytes is still unclear and potentially underestimated. In this review, after introducing the
43 cellular mechanism of aseptic and septic loosening, we will focus on the interrelationships between
44 staphylococcal biofilm, immune cells and bone cells.

45
46
47

1. Introduction

49 With the ageing of population, the number of indications for total joint replacement is continuously
50 increasing. The annual number of primary total hip and knee arthroplasties is projected to grow to
51 635,000 and 935,000 procedures by 2030, respectively (Sloan, Premkumar, et Sheth 2018). However,
52 prosthesis loosening can happen and is related to 2 major mechanisms: (i) aseptic loosening due to
53 prosthesis micromotion and/or corrosion and release of wear particles from the different components
54 of the implanted material, (ii) septic loosening due to chronic prosthetic joint infection (PJI)
55 (Morawietz et al. 2006). The “aseptic” character of prosthesis loosening has been challenged over the
56 years, especially considering that bacteria can persist in biofilms and be overlooked during diagnosis
57 (Nelson et al. 2005; Hoenders, Harmsen, et van Luyn 2008). In this review, we discuss the role of
58 staphylococcal biofilm in prosthesis loosening, studying on *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) but

Biofilm and prosthesis loosening

59 also coagulase-negative staphylococci such as *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) and
60 *Staphylococcus lugdunensis* (*S. lugdunensis*). After introducing the cellular mechanism of aseptic
61 and septic loosening, we will focus on the interrelationships between staphylococcal biofilm, immune
62 cells and bone cells.

63

2. Cellular mechanisms associated to aseptic and septic loosening

65

2.1 Osseointegration and initial foreign body response/equilibrium

67 During the implantation of a foreign material, especially if this latter lacks of biocompatibility, an
68 adverse innate host reaction, called foreign body response, can happen. Briefly, the several stages of
69 the foreign body reaction include (i) injury due to the implantation of material, (ii) coating of the
70 material with blood proteins and formation of temporary matrix, (iii) an acute and (iv) a chronic
71 inflammation (for an exhaustive description, see Anderson et al., 2008). If the chronic inflammation
72 is not resolved, the host body finally shield off the material, enveloping it in a poorly vascularized
73 fibrous layer (Albrektsson et Albrektsson 1987). In bone tissue, a biocompatible material would
74 normally be osseointegrated without the presence of any fibrous layer. The concept of
75 osseointegration has been developed by a swedish orthopaedic surgeon called Per-Ingvar Brånemark
76 that observed a direct bone formation in contact with metal implants when he implanted dental
77 prostheses (Brånemark et al. 1969). However, a new paradigm has been recently proposed
78 concerning osseointegration. Osseointegration would be a foreign body response where interfacial
79 bone is formed to shield off the implant (Albrektsson et al. 2017). Technically, bone is a mineralized
80 collagenous matrix with few cells inside, with similarities with the fibrous layer of the classical
81 foreign body reaction. Concretely and regarding the size of an orthopaedic prosthesis,
82 osseointegration and fibrous tissue capsule formation can potentially cohabit, with zones of direct
83 interaction between bone and metal and zones where a interfacial fibrous layer is observed (Trinidad
84 et al. 2014).

85

2.2 Periprosthetic interface membrane

87 During the retrieval of a prosthesis due to aseptic and septic loosening, a periprosthetic interface
88 membrane, sometimes called synovium-like interface membrane (SLIM), can be observed at the
89 interface between the implant and the bone (Morawietz et al. 2006). The origin of this membrane is
90 not clear, it can potentially be related to the initial foreign body reaction or develops later after the
91 implantation, in case of prosthesis micromotion or wear particle release.

Biofilm and prosthesis loosening

92 This membrane is the location of cellular and enzymatic activities and production of pro-
93 inflammatory and osteolytic mediators that lead to periprosthetic osteolysis (Hoenders, Harmsen, et
94 van Luyn 2008). This membrane can also be observed in well-fixed implants, but is then
95 considerably smaller (Goldring et al. 1983). Interface membrane is considered as the best histological
96 sample for PJI diagnosis compared to bone biopsy, synovial fluid or pseudocapsule (Bori et al. 2011).
97 The cell composition of the interface membrane constitutes a major criterion to decipher if a
98 prosthesis loosening is aseptic or septic (Morawietz et al. 2006). It should be noted that SLIM does
99 not only refered to interface membrane in the Anglo-American literature but also to the synovial
100 tissue and the regenerated synovial tissue. A detailed histological classification of SLIM exists,
101 classifying the different patterns of periprosthetic tissue reactions (Krenn et Perico 2017).

102

103 **2.3 Bone cells and osteolysis**

104 Osteolysis, notably periprosthetic osteolysis, can potentially be related to a reduced bone formation
105 and/or an enhanced bone resorption. Bone tissue is classically described as a mineralized matrix
106 where three types of cells can be found: osteoblasts, osteocytes and osteoclasts (Figure 1).
107 Osteoblasts are the bone forming cells. They originate from mesenchymal stromal/stem cells that
108 differentiate along their life. During their differentiation, cells from the osteoblastic lineage
109 synthesize an organic matrix around them, mostly composed of type I collagen, that is later
110 mineralized (Blair et al. 2017). Mature osteoblasts finish as embedded in this mineralized matrix
111 and differentiate into osteocytes (Abu-Amer et Tondravi 1997). However, some osteoblasts remain
112 on the surface of the new bone and differentiate into inactive bone-lining cells, forming an epithelial
113 layer at the surface of the bone. The other osteoblasts undergo apoptosis (Abu-Amer et Tondravi
114 1997 ; Blair et al. 2017).

115 Osteoclasts are responsible for the bone resorption. They rise from the fusion of monocytic
116 precursors to form giant multinuclear cells. Bone resorption is operated by the release of H^+ protons
117 and proteases to resorb both inorganic and organic parts of the bone matrix (Adamopoulos et Mellins
118 2015). Formation and activation of osteoclasts is controlled by the production of receptor activator of
119 NF- κ B ligand (RANK-L) and osteoprotegerin (OPG). RANK-L interacts with its receptor RANK on
120 monocyte/macrophage precursors to drive their differentiation toward osteoclasts whereas OPG is a
121 soluble decoy receptor that targets RANK-L to limit osteoclastogenesis (Boyce et Xing 2008).

122 In response to damage or biomechanical stimuli, osteocytes undergo apoptosis and release RANKL.
123 It is the initial step that triggers the bone remodeling. Osteocytes also communicate with the
124 endosteal lining cells that can form a canopy over the bone remodelling compartment (BRC). All the

Biofilm and prosthesis loosening

125 cells from the osteoblastic lineage can produce RANKL and OPG and modulate the
126 osteoclastogenesis. Pro-inflammatory cytokines and chemokines can also favor the
127 osteoclastogenesis, directly by interacting with the osteoclasts (Yokota et al. 2014) or indirectly by
128 stimulating RANKL production by osteoblasts (Kwan Tat et al. 2004). Resident macrophages are
129 also present in the bone microenvironment. These osteal macrophages, called OsteoMacs, are found
130 in the canopy. They can express RANKL and are also responsible of the clearance of apoptotic
131 osteoblasts by efferocytosis process (Batoon et al. 2017).

132

2.4 Macrophages-driven osteolysis and aseptic loosening

134 Aseptic loosening can be due to 2 major factors. First, a lack of initial stability could lead to poor or
135 absent osseointegration of the prosthesis. In this case, the loosening happens early after the
136 implantation (Krismer et al. 1996). Secondly, the loosening can be related to the generation of wear
137 debris coming from components of the prosthesis and/or the cement in case of cemented prosthesis.
138 This process takes place slowly and develops chronically (Goodman 2005). Wear debris can be
139 generated either from joint replacement bearing surfaces and/or from the interfaces between the bone,
140 bone cement (in case of cemented prosthesis), and the implant surface. Different types of wear debris
141 can be produced: metal particles in case of metal-on-metal prosthesis, ultrahigh molecular weight
142 polyethylene (UHWPE) particles in case of metal-on-polyethylene prosthesis,
143 polymethylmethacrylate (PMMA) particles in case of cemented prosthesis (Pajarinen et al. 2014).
144 These particles are released in the synovial fluid and can activate the cells present in the capsular
145 neo-synovial membrane and periprosthetic interface membrane (SLIM). Histological studies
146 performed on interface membrane retrieved during the implantation of a new prosthesis demonstrated
147 that macrophages are the principal cells associated with prosthetic loosening due to wear particles
148 (Goodman et al. 1998). Macrophages can be divided in two categories: (i) resident tissue
149 macrophages (in our context, OsteoMacs) that contribute to tissue homeostasis and innate immune
150 surveillance and (ii) monocyte-derived macrophages that are recruited during damage and/or
151 infection and orchestrate the innate and adaptative responses. Different subpopulations of resident
152 macrophages are present in bone and bone marrow and contribute to bone homeostasis or
153 haematopoiesis (Batoon et al 2017).

154 In aseptic loosening due to wear debris, macrophages phagocyte the small wear debris which provoke
155 the release of chemokines and pro-inflammatory cytokines that lead to further macrophage
156 recruitment, osteoclast activation and increased bone resorption (Pajarinen et al. 2014). Sabokar *et al.*
157 also reported that human macrophages isolated from periprosthetic tissues can differentiate into

Biofilm and prosthesis loosening

158 osteoclast-like resorbing cells (Sabokbar et al. 1997). Macrophages can also fuse to form foreign
159 body or multinuclear giant cells (FBGCs or MGCs), in order to phagocyte larger particles that cannot
160 be taken in charge by macrophage alone. It has been shown that FBGCs have the capacity to dissolve
161 the mineral phase of bone *in vivo*, in a way similar to osteoclasts. However, they are not able to
162 digest the matrix fraction of bone, unlike osteoclasts (ten Harkel et al. 2015). In aseptic loosening
163 context, it has also been reported that the differentiation of monocytes to mature osteoclasts can
164 happen through the production of RANKL and TNF- α by activated fibroblasts which are present in
165 the periprosthetic interface membrane (Sabokbar et al. 2005).

166

167 **2.5 Polymorphonuclear neutrophils and septic loosening**

168 Retrieved interface membranes after septic loosening reveal the presence of inflammatory infiltrates
169 of polymorphonuclear neutrophils (PMNs), activated fibroblasts and plasma cells (Morawietz et al.
170 2006). The presence of PMNs in periprosthetic tissue samples, such as interface membrane or
171 synovial pseudocapsule, is an important criterion for the histological diagnosis of septic implant
172 failure (Bori, McNally, et Athanasou 2018). According to the guidelines from the Musculoskeletal
173 Infection Society (MSIS) / European Bone and Joint Society (EBJIS), the cut-off number of PMNs
174 for the diagnostic of PJI is “*greater than five neutrophils per high-power field in five high-power*
175 *fields observed from histologic analysis of periprosthetic tissue at $\times 400$ magnification*” (Parvizi et al.
176 2011; Ochsner, Borens, et Bodler 2014). However, low-grade infections, such as the ones due to *S.*
177 *epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci (CoNS), may be associated with a lower
178 infiltration, and periprosthetic fractures may give false positive results on histological diagnosis
179 (Bori, McNally, et Athanasou 2018). Concerning the role of PMNs in osteolysis, histological analysis
180 of patients with osteomyelitis reported that the number of osteoclasts correlated with the abundance
181 of infiltrated PMNs at the zones of bone resorption (Gaida et al. 2012). Chakravarti et al. observed
182 that bacterial stimulation up-regulated the expression of RANKL in PMNs, which stimulated bone
183 resorption when co-cultured with osteoclasts (Chakravarti et al. 2009). Interestingly, it was also
184 reported that PMNs can express RANK and be activated by RANKL. The expression of RANK by
185 PMNs is up-regulated in infected patients and could help for their recruitment to the infection site
186 (Riegel et al. 2012). PMNs are also able to produce a large panel of cytokines and chemokines,
187 potentially contributing to a pro-inflammatory environment and the activation of osteoclasts (Tecchio
188 et al. 2014). They notably produce MRP-14, which was found up-regulated in osteomyelitis and that
189 stimulates the formation of osteoclasts (Dapunt et al. 2015). Finally, as observed for macrophages in

Biofilm and prosthesis loosening

190 aseptic loosening, the recruitment of PMNs in PJI leads to the generation of a pro-inflammatory
191 environment that induces the formation and activation of osteoclasts (Gaida et al. 2012).

192

193 2.6 T lymphocytes

194 The analysis of periprosthetic interface membrane in aseptic or septic prosthesis loosening also
195 revealed the presence of other types of cells such as T lymphocytes and plasma cells. (Morawietz et
196 al., 2006). Dapunt et al. notably reported the detection of activated T lymphocytes in infected patients
197 but not in patients with aseptic loosening (Dapunt et al., 2014). In their expanded classification of the
198 types of interface membrane, Krenn and Perino describe the presence of “*scattered T lymphocytes*
199 *and plasma cells*” in wear-induced SLIM and specify that “*PMN are often associated with plasma*
200 *cells and small lymphocytic aggregates*” in infection-induced SLIM (Krenn et Perico 2017).

201

202 3. Staphylococcal biofilm

203

204 3.1. *Staphylococcus aureus* and the other staphylococci

205 *Staphylococcus* genus gathers at least 47 species and 23 sub-species. Staphylococci are generally
206 classified as coagulase-positive, such as *S. aureus*, *S. argenteus* or *S. pseudintermedius*, but most are
207 coagulase-negative species such *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* or *S. capitis* (Becker et al. 2014). In
208 chronic PJI, the most isolated pathogens are staphylococci, especially *S. aureus*, *S. epidermidis* and
209 also *S. lugdunensis* that has been highlighted in recent studies about PJI (Triffault-Fillit et al. 2018;
210 Douiri et al. 2016; Lourtet-Hascoët et al. 2016). Globally, 3 types of physiopathological mechanisms,
211 depending of the studied species, can be involved in staphylococcal chronic PJI: formation of small
212 colony variants (SCV) (see the review from Proctor et al. 2014), bacterial internalization in
213 osteoblasts (Josse, Velard et Gangloff, 2015) and formation of biofilm (Paharik et Horswill 2016).
214 For SCV formation, it has been observed for *S. aureus*, *S. epidermidis* and *S. lugdunensis* (Proctor,
215 Balwit et Vesga, 1994; von Eiff et al, 1999; Askar, Bloch et Bayston, 2018). SCV get a slow
216 metabolism that makes them more tolerant to antibiotics. Concerning the ability to be internalized, it
217 was reported for *S. aureus* in several *in vitro* experiments and some clinical histological approaches
218 reported internalized *S. aureus* in patients with BJI (Josse, Velard et Gangloff 2015; Bosse, Gruber et
219 Ramp 2005; Sendi et al. 2006). Internalization of *S. epidermidis* in osteoblasts is more controversial.
220 In *in vitro* models, two papers reported an almost total lack of internalization (Valour et al. 2013;
221 Campoccia et al. 2016) whereas a recent paper by Perez and Patel reported the ability of two clinical
222 strains of *S. epidermidis* to penetrate osteoblasts (Perez et Patel 2018). However, the level of

Biofilm and prosthesis loosening

223 internalization is similar in the 3 papers (around 100 intracellular staphylococci per 100,000
224 osteoblasts). So the real question is “does this *in vitro* result is clinically relevant?”. This is currently
225 difficult to say as no work has reported the presence of intracellular *S. epidermidis* in a clinical
226 PJI/BJI sample yet. Interestingly, *S. pseudintermedius*, a species mostly found in dogs and
227 incriminated in few human PJI/BJI cases (Darlow et al. 2017), can also be internalized in human
228 osteoblasts *in vitro* (Maali et al. 2016). Concerning *S. lugdunensis*, two papers reported its inability
229 to penetrate inside osteoblasts *in vitro* and there is no clinical report of internalized *S. lugdunensis* in
230 bone (Maali et al. 2016; Campoccia et al. 2016).

231 A common feature shared by *S. aureus*, *S. epidermidis* and *S. lugdunensis* is the ability to form
232 biofilm. It was demonstrated in *in vitro* models (Buxton et al, 1987; Richards, Gagnon et Prentis,
233 1991; Patel et Frank, 2007) and also in clinical PJI samples. The presence of biofilm of *S. aureus* has
234 been observed directly from bone cement retrieved during a revision surgery and biofilm-like
235 aggregates have been observed free in synovial fluid, supporting the role of biofilm in PJI (Stoodley
236 et al. 2008; Dastgheyb et al. 2015).

237

238 3.2. Biofilm formation, extracellular matrix and toxin production

239 Biofilm is defined as a bacterial community which is metabolically heterogeneous and embedded in a
240 self-produced extracellular matrix (Costerton, Stewart, et Greenberg 1999). The bacterial community
241 inside biofilm is heterogeneous. It is composed of active bacteria but also contains bacteria with slow
242 down metabolism (López, Vlamakis, et Kolter 2010). Due to this dormant state, these bacteria are
243 more tolerant to antibiotic and can be related to “persisters” (Waters et al. 2016). This could partly
244 explain that bacteria structured in biofilm are more tolerant to antibiotics than planktonic bacteria,
245 directly impacting the outcome of PJI management (Stewart 2015). The extracellular matrix
246 produced by the bacteria is the other important part of the biofilm, mediating inter-bacterial adhesion.
247 This matrix is composed of polysaccharides, proteins and extracellular DNA (eDNA). Production of
248 polysaccharide intercellular adhesin (PIA), also known as poly-N-acetyl- β -(1-6)-glucosamine
249 (PNAG), is mediated by genes contained in the *icaADBC* gene locus (Mack et al. 1994). PIA
250 participates to biofilm accumulation especially in *S. epidermidis* (Mack et al. 1996) but also in *S.*
251 *aureus* (Cramton et al. 1999). However, PIA-negative strains of *S. epidermidis* are also able to form
252 biofilm in a polysaccharide-independent manner. Accumulation-associated protein (aap) present at
253 the surface of *S. epidermidis*, is able to mediate cell-to-cell adhesion and biofilm formation, after
254 being processed through staphylococcal proteases or host PMNs proteases (Rohde et al. 2005). PIA-

Biofilm and prosthesis loosening

255 independent biofilm accumulation and intercellular adhesion can also be relative to multifunctional
256 cell surface proteins such as extracellular matrix binding protein (Embp) in *S. epidermidis* (Christner
257 et al. 2010) or Fibronectin binding proteins A and B (FnBP A/B) in methicillin-resistant *S. aureus*
258 (MRSA) (O'Neill et al. 2008). Biofilm matrix can also be composed of eDNA, resulting from the
259 autolysis of bacteria releasing their genomic DNA (Rice et al. 2007; Christner et al. 2012). In *S.*
260 *aureus* biofilm, DNA release is controlled by *cid* and *lrg* genes while staphylococcal thermonuclease
261 can degrade the eDNA to promote biofilm dispersal (Mann et al. 2009). It has been suggested that
262 eDNA acts as an electrostatic net, interconnecting bacterial cells through extracellular matrix proteins
263 that have been released from bacterial cytoplasm (Foulston et al. 2014; Dengler et al. 2015).
264 Recently, Sugimoto et al. reported that eDNA is a matrix component for all the strains of a MRSA
265 collection whereas PIA was observed only for a small number of isolates (Sugimoto et al. 2018).
266 Phenol-soluble modulins (PSM), a specific type of staphylococcal cytotoxins, can also play a role in
267 matrix composition. PSM are mostly known as agents that favor the dispersal of *S. aureus* biofilm
268 but they also help to structure the biofilm and to control the biofilm expansion (Periasamy et al.
269 2012). Schwartz *et al.* reported that PSM can aggregate to form amyloid fibers that can help to
270 stabilize *S. aureus* biofilm (Schwartz et al. 2012).
271 However, Zheng *et al.* recently demonstrated that PSM amyloid formation may not be of major
272 relevance for biofilm formation, even if they support that PSM can attach to eDNA in biofilm matrix
273 (Zheng et al. 2018). These findings are supported another study by Graf *et al.* that recently reported
274 that the extracellular matrix of *S. aureus* biofilm contains a large amount of toxins that keep their
275 cytotoxic activities but also play a role in the integrity of biofilm, interacting with anionic
276 components such as eDNA in the acidic matrix environment (Graf et al. 2019). These results could
277 potentially change our idea of biofilm, moving from a shelter to a “bunker” that allows staphylococci
278 to harm by producing toxins in an environment that protects them from antibiotics and immune cells.
279 Concerning *S. epidermidis*, PSM also play a role in biofilm structure *in vitro* and dispersal *in vitro*
280 and *in vivo* (Wang et al., 2011). It was recently observed that no PSM from *a* can form amyloid fibers
281 and that PSM do not seem to play a role in biofilm expansion (Le et al. 2019).
282 Host plasma proteins can also be integrated to biofilm matrix. Indeed, *S. aureus* can turn soluble
283 fibrinogen into a fibrin shield thanks to its coagulase (Coa) or its von Willebrand factor-binding
284 protein (vWbp), allowing an increased tolerance to antibiotics and to antimicrobial drugs
285 (Zapotoczna et al. 2015). Regarding *S. lugdunensis*, which is less studied as it was more recently
286 discovered, Frank and Patel showed its ability to form biofilm *in vitro*. They also reported that the
287 biofilm extracellular matrix of *S. lugdunensis* is mostly made of proteins with a small quantity of PIA

Biofilm and prosthesis loosening

288 (Frank et Patel, 2007). Other reports have also described the role of the autolysin atlL in biofilm
289 formation and the role of a competence gene, *comEB*, in DNA-dependent biofilm formation (Hussain
290 et al. 2015; Rajendran et al. 2015).

291

292 **4. Interaction between biofilm and host cells**

293 Staphylococci, especially *S. aureus*, have developed various strategies to subvert the host immune
294 responses when growing as planktonic mode (Thammavongsa et al. 2015). In addition, biofilm
295 formation can also be defined as a mean to protect from immune cells, in order to persist and develop
296 chronic infections. Here we focus on interaction between staphylococcal biofilm and immune cells
297 that can be found in PJI (PMNs, macrophages and myeloid-derived suppressor cells).

298

299 **4.1. Polymorphonuclear neutrophils**

300 PMNs are the first line of defense in PJI. Numerous infiltrates of PMNs are observed in infection-
301 induced interface membrane (Morawietz et al., 2006). They can phagocyte planktonic bacteria
302 previously opsonized or not by immunoglobulins IgG or complement component C3b. They can also
303 release bactericidal components such as reactive oxygen species or enzymes (McGuinness,
304 Kobayashi, et DeLeo 2016). However, their ability to eliminate staphylococcal biofilm differs from
305 one species to another. Indeed, PMNs can migrate towards and into *S. aureus* biofilm and clear it by
306 phagocytosis. The biofilm clearance of *S. aureus* depends on the maturation state. Indeed, a mature
307 biofilm seems more resistant to phagocytosis than a young one (Günther et al. 2009). Following
308 phagocytosis of *S. aureus* biofilm, PMNs go apoptosis in order to prevent spilling of the bactericidal
309 and cytotoxic entities (Guenther et al. 2009). Biofilm of *S. aureus* induces phagocytosis by PMNs but
310 also degranulation of lactoferrin and elastase and DNA release. A partial destruction of biofilm has
311 been observed *in vitro*, supporting that biofilm structure does not completely protect staphylococci
312 against the attack of PMNs (Meyle et al. 2010). Oxygen radical production by the PMNs also
313 participates to the clearance of *S. aureus* biofilm and is dependent on opsonization by IgG (Stroh et
314 al. 2011). Lei et al recently reported that quorum sensing dysfunctionality favors resistance to PMNs
315 in *S. aureus* biofilm infection. Indeed, accessory gene regulator (*agr*), the quorum sensing system of
316 *S. aureus*, controls the production of mostly all the toxins (especially PSM) and enzymes and
317 participate to the structuring of the biofilm. When *agr* gene or *psm* gene is deleted, the biofilm is
318 more compact and the penetration of PMNs inside biofilm is more difficult. In opposite, biofilm
319 formed by wild type strain is subject to PMNs phagocytosis (Lei et al. 2019).

Biofilm and prosthesis loosening

320 Concerning the release of DNA by PMNs, also known as neutrophil extracellular trap (NET), a
321 recent paper showed that the antimicrobial activity of released NETs are ineffective at clearing
322 biofilm of *S. aureus* (Bhattacharya et al. 2019). At the opposite, NETs could potentiate the biofilm
323 infections as eDNA was demonstrated to promote the biofilm formation (Dapunt et al. 2016).
324 Bhattacharya *et al.* also reported that leukocidins produced by *S. aureus* are required for NETosis
325 (Bhattacharya et al. 2019). Interestingly, *S. epidermidis* appears more resistant to phagocytosis by
326 PMNs and induce less apoptosis than *S. aureus* (Guenther et al. 2009). This phenomenon has been
327 related to a difference in the composition of the extracellular biofilm matrix that may affect the
328 motility of PMNs on biofilms and the ability to phagocyte. Indeed, production of PIA and Embp by
329 *S. epidermidis* reduced biofilm phagocytosis by PMNs (Vuong et al. 2004; Christner et al. 2010).
330 Opsonization by C3b and IgG has also been reported to be diminished for PIA-positive biofilm of *S.*
331 *epidermidis* compared to PIA-negative ones (Kristian et al. 2008). Cerca *et al.* suggested that the high
332 levels of PIA within the biofilm prevented a specific bacterial opsonization (Cerca et al. 2006).
333 However, Meyle et al. reported that biofilms of *S. epidermidis*, similarly to *S. aureus*, can activate
334 PMNs leading to the release of cytotoxic and bactericidal components through an extracellular
335 component, the bacterial heat shock protein GroEL (Meyle et al. 2012). Ferreirinha et al. observed in
336 a *in vivo* mouse model that PIA-producing *S. epidermidis* enables a faster recruitment of PMNs and
337 bacterial clearance compared to a PIA-defective isogenic mutant (Ferreirinha et al. 2016). These
338 results support older experiments that reported an increased phagocytosis and an increased
339 superoxide production by PMNs where they are challenged by a slime-producing strains of *S.*
340 *epidermidis* compared to a slime non-producing strains (Heinzelmann et al. 1997). Finally, as it was
341 observed for *S. aureus*, *S. epidermidis* biofilm (especially GroEL) is able to induce the formation of
342 NET by PMNs and the release of MRP-14 (Dapunt et al. 2016). So even if *S. epidermidis* in biofilm
343 seems less impacted by PMNs, it is not totally protected from their activity and can activate the
344 release of cytokines.

345

346 4.2. Macrophages

347 Classically, planktonic staphylococci normally induce a proinflammatory microbicidal phenotype in
348 macrophages. It implies the phagocytosis of bacteria, the production of bactericidal components and
349 the release of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6 or TNF- α (Flannagan, Heit, et
350 Heinrichs 2015). However, biofilm phenotype has been reported to protect *S. epidermidis* from
351 phagocytosis and to limit the production of pro-inflammatory cytokines by macrophages, regardless
352 of the morphotype (PIA, Embp or Aap) (Christner et al 2010; Shiau et Wu 1998; Schommer et al.

Biofilm and prosthesis loosening

2011). This inflammatory activation has been reported to be proportional to the level of dormant bacteria inside biofilm (Cerca et al. 2011). Spiliopoulou *et al* reported that biofilm-associated bacteria can persist longer intracellularly after being phagocytosed by macrophages compared to planktonic staphylococci (Spiliopoulou et al 2012). Concerning *S. aureus* biofilms, *in vitro* studies demonstrated that macrophages can invade biofilms but display limited phagocytosis (Thurlow et al. 2011). A down-regulation of the inducible nitric oxide synthase (iNOS), a major microbicidal mechanism, happens when macrophages are co-cultured with *S. aureus* biofilm whereas an increase of arginase-1 (Arg-1) expression, an enzyme that uses arginine to produce proline, a precursor for collagen, is observed. Indeed, when exposed to *S. aureus* biofilm, macrophages can shift from pro-inflammatory microbicidal phenotype (sometimes called M1) to an alternative phenotype, displaying anti-inflammatory and pro-fibrotic properties and limited phagocytosis (sometimes called M2) (Hanke, Angle, et Kielian 2012). Using conditioned medium from *in vitro* biofilm culture, Scherr et al reported that specific toxins, alpha-toxin (Hla) and leukocidin AB (LukAB), released by *S. aureus* biofilm act synergistically to inhibit macrophage phagocytosis and induce cytotoxicity, promoting macrophage dysfunction and thus facilitating *S. aureus* biofilm development (Scherr et al. 2015). Moreover, *S. aureus* biofilms release c-di-AMP, an important bacterial second messenger, *via* bacterial cell lysis to induce macrophage type I interferon production. This favors the intracellular survival of phagocytosed *S. aureus* and promotes macrophage anti-inflammatory activity (Gries et al. 2016). In accordance with the previous findings, Alboslemy *et al* recently reported that biofilm-conditioned medium can attenuates the activation of NF- κ B in murine macrophages, a transcription factor involved in pro-inflammatory response, whereas it increases the expression of Kruppel-like factor (KLF2), a transcription regulator (Alboslemy et al. 2019). The authors suggest that secreted factors can hijack KLF2-dependent regulatory pathway to favor an anti-inflammatory responses in *S. aureus* biofilm-associated infections.

However, these previous findings have to be interpreted with precaution. Indeed, few macrophages are observed in histological samples from PJI (Morawietz et al. 2006). Even if the quantity of PMNs infiltrates is lower in low grade infections, no clinical data concerning an increase of macrophages in periprosthetic tissues, with pro or anti-inflammatory properties, has been reported during PJI.

381

4.3. Myeloid-Derived Suppressor Cells

Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) are a heterogeneous population of immature monocytes and granulocytes with immunosuppressive properties, especially T lymphocyte inhibition. MDSCs can be divided in two groups: granulocytic or granulocytic MDSCs (G-MDSCs or PMN-MDSCs)

Biofilm and prosthesis loosening

386 and monocytic MDSCs (M-MDSCs), regarding their phenotypical and morphological similarities
387 with PMNs or monocytes respectively (Veglia et al. 2018). In the recent years, MDSCs have been
388 described as critical players in the regulation of inflammatory processes. In 2015, Tebartz *et al*
389 reported that *S. aureus* chronic infections are associated with immunosuppressive mechanisms. These
390 latter are not driven by regulatory T lymphocytes but mostly by MDSCs (Tebartz et al. 2015). In a
391 murine model of *S. aureus* biofilm infection, Heim *et al* reported the presence of MDSCs
392 surrounding biofilm. MDSCs are also able to attenuate macrophage pro-inflammatory activity and
393 favor biofilm persistence (Heim et al. 2014). The recruitment of MDSCs is related to the release of
394 IL-12 in infected tissues whereas the anti-inflammatory properties of MDSCs are orchestrated by the
395 release of IL-10 (Heim, Vidlak, et Kielian 2015; Heim et al. 2015). Interestingly, Peng et al reported
396 that the *in vitro* co-culture of bone marrow cells with *S. aureus* biofilm promotes the expansion of M-
397 MDSCs but not G-MDSCs. Moreover, *S. aureus* biofilm is capable of stimulating the conversion of
398 monocytic MDSCs into macrophages with anti-inflammatory properties *in vitro* and *in vivo* (Peng et
399 al. 2017). However, MDSC infiltrates observed in PJI *in vivo* seems to be mostly granulocytic (Heim
400 et al. 2018a). The granulocytic character of MDSCs has been confirmed in clinical samples from PJI
401 patients. G-MDSCs could be used as infection markers as they were observed in samples associated
402 to PJI but not to aseptic loosening (Heim et al. 2018b).

403

404 4.4. T lymphocytes in staphylococcal biofilm-associated PJI

405 Only few papers reported findings about the interaction between T lymphocytes and staphylococcal
406 biofilm in PJI. However, lymphocyte infiltrates have been observed in interface membrane
407 surrounding infected prosthesis (Morawietz et al. 2006). In 2011, Prabhakara *et al* developed a
408 chronic model of PJI in C57BL/6 mice, mimicking human biofilm-associated PJI as the infection was
409 recalcitrant to clearance by the host immune response and antibiotics. They observed early Th1 and
410 Th17 inflammatory responses whereas Th2 and Treg responses were down-regulated in the same
411 time. The authors suggest “*that staphylococcal biofilm infection resulted in the skewing of the host*
412 *immune response toward proinflammatory Th1 and Th17 responses, which fail to clear the infection*”
413 (Prabhakara et al. 2011a). Few months later, Prabhakara *et al* published another study using a similar
414 model in BALB/C mice. In this model, biofilm is naturally cleared and higher levels of IL-4 and IL-
415 10 (Th2 cytokines) are observed as well as regulatory T lymphocytes. The authors suggested that Th2
416 response has a protective role against biofilm-associated infections and that inflammatory immune
417 response is detrimental for the clearance of bacteria (Prabhakara et al. 2011b). In the same period,
418 Leech et al. demonstrated a janus-face role of IL-10 and T lymphocytes in systemic peritonitis

Biofilm and prosthesis loosening

419 infection or localized skin infection (Leech et al. 2011). In the localized infection, which could
420 potentially related to biofilm, IL-10 production by MDSCs and macrophages inhibited the activation
421 of T lymphocytes. This leads to the persistence of the infection, as observed in a murine PJI model by
422 Heim et al (Heim et al. 2015). These opposite results revealed that the role of T lymphocytes in
423 biofilm-associated infections is still not clear and depend of the studied model or the site of infection.
424 However, these last results have not been obtained in an experimental PJI model.

425

426 4.5. Osteoclasts

427 Several studies reported that *S. aureus* or its components can favor bone resorption through direct
428 interaction with the osteoclast cell lineage. Surface associated material (SAM) from *S. aureus*,
429 notably lipoproteins, were reported to stimulate osteoclast formation and bone resorption *in vitro*.
430 (Meghji et al. 1998; Kim et al. 2013). *et al.* has notably showed that RANKL does not play a major
431 role in osteoclast formation in the presence of *S. aureus* SAM and that *S. aureus* SAM contains a
432 soluble factor that promotes osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism (Lau et al.
433 2006). It could potentially be the peptidoglycans from *S. aureus* which were reported to activate
434 osteoclastogenesis through TLR 6/2 and NF-kB/NF κ T1 signaling pathway (Cao et al. 2017). A
435 similar *in vitro* observation was done with *S. aureus* protein A (spA), provoking osteoclast
436 differentiation and bone resorption (Ren et al. 2017). As it is known that spA activates the NF-kB
437 signaling pathway in osteoblasts after linking to TNFR-1 (Claro et al. 2013), it seems logical to
438 suggest that spA activation of bone resorption relies on its binding to TNFR-1 at the osteoclast
439 surface. SpA was also reported to activate osteoclastogenesis through MAPK signalling (Wang et al.
440 2017). Trouillet-Assant *et al.* reported *in vitro* experiments that infection of osteoclast precursors by
441 live planktonic *S. aureus* inhibits osteoclastogenesis but induces their differentiation into activated
442 macrophages that actively secrete pro-inflammatory cytokines. These cytokines enhanced the bone
443 resorption capacity of uninfected mature osteoclasts and promoted osteoclastogenesis of the
444 uninfected precursors at the site of infection. The authors also reported that the infection of mature
445 osteoclasts by *S. aureus* directly enhanced bone resorption by promoting cellular fusion (Trouillet-
446 Assant et al. 2015). Toxins produced by *S. aureus* can also directly affect osteoclasts. Using
447 recombinant toxins, Flammier et al. reported that osteoclasts displayed similar toxin susceptibility
448 profiles compared to macrophages. Interestingly, Toxic Shock Syndrome Toxin 1 (TSST-1), mostly
449 known for its role in menstrual toxic shock syndrome, was not cytotoxic but enhanced the bone
450 resorption activity of osteoclasts (Flammier et al. 2016). However, all these results were obtained
451 using *S. aureus* in its planktonic phenotype. Still, a direct effect of biofilm on bone was also observed

Biofilm and prosthesis loosening

452 and reported to directly resorb bone *in vitro* (Junka et al. 2017). As bone substrates used in this study
453 were decellularized, the bone resorption cannot be related to osteoclastic activity. The authors
454 suggest that the production of bacterial proteases can consequently be involved in a direct bone
455 resorption. If this mechanism is confirmed, this ability to directly resorb bone tissue combined with
456 the capacity to migrate into canaliculi and to form biofilm in osteocyte lacunae (de Mesy Bentley et
457 al. 2017) could explain the ability of biofilm to induce periprosthetic osteolysis.

458

459 4.6. Osteoblasts

460 Periprosthetic osteolysis could also be provoked by the impact of staphylococci on osteoblasts.
461 Indeed, several studies have reported that planktonic *S. aureus* could interact with osteoblasts and
462 inhibit bone formation by 3 major mechanisms: i) decreasing osteoblast activity; ii) inducing
463 osteoblast death; or iii) inducing RANKL production to enhance osteoclast activities. These different
464 aspects are reviewed here (Josse, Velard, et Gangloff 2015). Focusing especially on interaction
465 between biofilm and osteoblasts, *Sanchez et al.* have reported that biofilm-conditioned medium from
466 clinical *S. aureus* isolates reduced osteoblast viability and increased apoptosis. Osteoblastic
467 differentiation and bone mineralization were also significantly inhibited when osteoblasts were
468 treated with biofilm supernatant. The authors also showed that the exposure of osteoblasts to biofilm-
469 conditioned medium resulted in an up-regulated expression of RANK-L and increase in the RANK-
470 L/OPG ratio, potentially leading to the formation and activation of osteoclasts (Sanchez et al. 2013).
471 Recently, Reffuveille et al reported *in vitro* that soluble factors produced by osteoblasts directly
472 influence *S. aureus* adhesion and could contribute to biofilm formation, suggesting an impact of the
473 bone environment on biofilm formation (Reffuveille et al. 2018).

474

475 Conclusion

476 Histological analysis of periprosthetic tissues from staphylococcal PJI, especially interface
477 membrane, reported the presence of infiltrates of PMNs and lymphocytes. However, the infiltration
478 of PMNs is limited in low-grade infections and mostly seen in acute infections. The presence of
479 PMNs seems to be associated to the development of an inflammatory environment that activates bone
480 resorption by osteoclasts, leading to periprosthetic osteolysis. Colocalization of PMNs and
481 osteoclasts at bone resorption sites during PJI supports this hypothesis. The presence of G-MDSCs
482 has also been reported in chronic PJI as a favorable factor for staphylococcal biofilm persistence. The
483 co-existence of inflammatory PMNs leading to osteolysis and anti-inflammatory G-MDSCs leading
484 to biofilm persistence seems conflicting to explain the mechanism of biofilm-associated

Biofilm and prosthesis loosening

485 periprosthetic osteolysis. Moreover, biofilm from *S. aureus* or *S. epidermidis* have different
486 behaviors when interacting with PMNs. The chronology of events may be the key to explain the roles
487 of PMNs and G-MDSCs in septic loosening. First, the interaction between staphylococcal biofilm
488 and PMNs could bring to the development of inflammation. Then, G-MDSCs would be recruited in
489 response to the inflammation, inducing an anti-inflammatory environment that favors the biofilm
490 persistence. Finally, the recruited G-MDSCs would turn to PMNs that induce osteoclast activation
491 and bone resorption. The ability for biofilm to modulate PMNs / G-MDSCs populations could be the
492 key to explain the prosthetic loosening in PJI.

493

494 **Conflict of Interest**

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

497

498 **Author Contributions**

499 JJ, FV, YM and AD prepared the draft of the paper. CB, TF and FL revised the version of the text.

500

501 **References**

- 502 Abu-Amer, Y., and Tondravi, M. M. (1997). NF-kappaB and bone: the breaking point. *Nat. Med.* 3,
503 1189–1190.
- 504 Adamopoulos, I. E., and Mellins, E. D. (2015). Alternative pathways of osteoclastogenesis in
505 inflammatory arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 11, 189–194. doi:[10.1038/nrrheum.2014.198](https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.198).
- 506 Alboslemy, T., Yu, B., Rogers, T., and Kim, M.-H. (2019). Staphylococcus aureus Biofilm-
507 Conditioned Medium Impairs Macrophage-Mediated Antibiofilm Immune Response by Upregulating
508 KLF2 Expression. *Infect. Immun.* 87. doi:[10.1128/IAI.00643-18](https://doi.org/10.1128/IAI.00643-18).
- 509 Albrektsson, T., and Albrektsson, B. (1987). Osseointegration of bone implants. A review of an
510 alternative mode of fixation. *Acta Orthop Scand* 58, 567–577.
- 511 Albrektsson, T., Chrcanovic, B., Jacobsson, M., Wennerberg, A. (2017). Osseointegration of
512 Implants – A Biological and Clinical Overview. *JSM Dent Surg* 2(3): 1022.
- 513 Anderson, J. M., Rodriguez, A., and Chang, D. T. (2008). Foreign body reaction to biomaterials.
514 *Semin. Immunol.* 20, 86–100. doi:[10.1016/j.smim.2007.11.004](https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.11.004).
- 515 Askar, M., Bloch, B., and Bayston, R. (2018). Small-colony variant of Staphylococcus lugdunensis in
516 prosthetic joint infection. *Arthroplast Today* 4, 257–260. doi:[10.1016/j.artd.2018.06.003](https://doi.org/10.1016/j.artd.2018.06.003).
- 517 Batoon, L., Millard, S. M., Raggatt, L. J., and Pettit, A. R. (2017). Osteomacs and Bone
518 Regeneration. *Curr Osteoporos Rep* 15, 385–395. doi:[10.1007/s11914-017-0384-x](https://doi.org/10.1007/s11914-017-0384-x).

Biofilm and prosthesis loosening

- 519 Bhattacharya, M., Berends, E. T. M., Chan, R., Schwab, E., Roy, S., Sen, C. K., et al. (2018).
520 Staphylococcus aureus biofilms release leukocidins to elicit extracellular trap formation and evade
521 neutrophil-mediated killing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, 7416–7421.
522 doi:[10.1073/pnas.1721949115](https://doi.org/10.1073/pnas.1721949115).
- 523 Blair, H. C., Larrouture, Q. C., Li, Y., Lin, H., Beer-Stoltz, D., Liu, L., et al. (2017). Osteoblast
524 Differentiation and Bone Matrix Formation In Vivo and In Vitro. *Tissue Eng Part B Rev* 23, 268–
525 280. doi:[10.1089/ten.TEB.2016.0454](https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2016.0454).
- 526 Bori, G., McNally, M. A., and Athanasou, N. (2018). Histopathology in Periprosthetic Joint
527 Infection: When Will the Morphomolecular Diagnosis Be a Reality? *Biomed Res Int* 2018, 1412701.
528 doi:[10.1155/2018/1412701](https://doi.org/10.1155/2018/1412701).
- 529 Bori, G., Muñoz-Mahamud, E., Garcia, S., Mallofre, C., Gallart, X., Bosch, J., et al. (2011). Interface
530 membrane is the best sample for histological study to diagnose prosthetic joint infection. *Mod.*
531 *Pathol.* 24, 579–584. doi:[10.1038/modpathol.2010.219](https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.219).
- 532 Boyce, B. F., and Xing, L. (2008). Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and
533 remodeling. *Arch. Biochem. Biophys.* 473, 139–146. doi:[10.1016/j.abb.2008.03.018](https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.03.018).
- 534 Brånemark, P. I., Adell, R., Breine, U., Hansson, B. O., Lindström, J., and Ohlsson, A. (1969). Intra-
535 osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg* 3, 81–
536 100.
- 537 Buxton, T. B., Horner, J., Hinton, A., and Rissing, J. P. (1987). In vivo glycocalyx expression by
538 Staphylococcus aureus phage type 52/52A/80 in S. aureus osteomyelitis. *J. Infect. Dis.* 156, 942–946.
- 539 Campoccia, D., Testoni, F., Ravaioli, S., Cangini, I., Maso, A., Speziale, P., et al. (2016). Orthopedic
540 implant infections: Incompetence of Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus lugdunensis, and
541 Enterococcus faecalis to invade osteoblasts. *J Biomed Mater Res A* 104, 788–801.
542 doi:[10.1002/jbm.a.35564](https://doi.org/10.1002/jbm.a.35564).
- 543 Cao, F., Zhou, W., Liu, G., Xia, T., Liu, M., Mi, B., et al. (2017). Staphylococcus aureus
544 peptidoglycan promotes osteoclastogenesis via TLR2-mediated activation of the NF-κB/NFATc1
545 signaling pathway. *Am J Transl Res* 9, 5022–5030.
- 546 Cerca, F., Andrade, F., França, Â., Andrade, E. B., Ribeiro, A., Almeida, A. A., et al. (2011).
547 Staphylococcus epidermidis biofilms with higher proportions of dormant bacteria induce a lower
548 activation of murine macrophages. *J. Med. Microbiol.* 60, 1717–1724. doi:[10.1099/jmm.0.031922-0](https://doi.org/10.1099/jmm.0.031922-0).
- 549 Cerca, N., Jefferson, K. K., Oliveira, R., Pier, G. B., and Azeredo, J. (2006). Comparative antibody-
550 mediated phagocytosis of Staphylococcus epidermidis cells grown in a biofilm or in the planktonic
551 state. *Infect. Immun.* 74, 4849–4855. doi:[10.1128/IAI.00230-06](https://doi.org/10.1128/IAI.00230-06).
- 552 Chakravarti, A., Raquil, M.-A., Tessier, P., and Poubelle, P. E. (2009). Surface RANKL of Toll-like
553 receptor 4-stimulated human neutrophils activates osteoclastic bone resorption. *Blood* 114, 1633–
554 1644. doi:[10.1182/blood-2008-09-178301](https://doi.org/10.1182/blood-2008-09-178301).
- 555 Christner, M., Franke, G. C., Schommer, N. N., Wendt, U., Wegert, K., Pehle, P., et al. (2010). The
556 giant extracellular matrix-binding protein of Staphylococcus epidermidis mediates biofilm

Biofilm and prosthesis loosening

- 557 accumulation and attachment to fibronectin. *Mol. Microbiol.* 75, 187–207. doi:[10.1111/j.1365-2958.2009.06981.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06981.x).
- 558
- 559 Christner, M., Heinze, C., Busch, M., Franke, G., Hentschke, M., Bayard Dühning, S., et al. (2012).
560 sarA negatively regulates Staphylococcus epidermidis biofilm formation by modulating expression of
561 1MDa extracellular matrix binding protein and autolysis-dependent release of eDNA. *Mol.*
562 *Microbiol.* 86, 394–410. doi:[10.1111/j.1365-2958.2012.08203.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08203.x).
- 563 Claro, T., Widaa, A., McDonnell, C., Foster, T. J., O'Brien, F. J., and Kerrigan, S. W. (2013).
564 Staphylococcus aureus protein A binding to osteoblast tumour necrosis factor receptor 1 results in
565 activation of nuclear factor kappa B and release of interleukin-6 in bone infection. *Microbiology*
566 (*Reading, Engl.*) 159, 147–154. doi:[10.1099/mic.0.063016-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.063016-0).
- 567 Costerton, J. W., Stewart, P. S., and Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of
568 persistent infections. *Science* 284, 1318–1322.
- 569 Dapunt, U., Gaida, M. M., Meyle, E., Prior, B., and Hänsch, G. M. (2016a). Activation of phagocytic
570 cells by Staphylococcus epidermidis biofilms: effects of extracellular matrix proteins and the
571 bacterial stress protein GroEL on netosis and MRP-14 release. *Pathog Dis* 74.
572 doi:[10.1093/femspd/ftw035](https://doi.org/10.1093/femspd/ftw035).
- 573 Dapunt, U., Hänsch, G. M., and Arciola, C. R. (2016b). Innate Immune Response in Implant-
574 Associated Infections: Neutrophils against Biofilms. *Materials (Basel)* 9. doi:[10.3390/ma9050387](https://doi.org/10.3390/ma9050387).
- 575 Darlow, C. A., Paidakakos, N., Sikander, M., and Atkins, B. (2017). A spinal infection with
576 Staphylococcus pseudintermedius. *BMJ Case Rep* 2017. doi:[10.1136/bcr-2017-221260](https://doi.org/10.1136/bcr-2017-221260).
- 577 Dastgheyb, S. S., Hammoud, S., Ketonis, C., Liu, A. Y., Fitzgerald, K., Parvizi, J., et al. (2015).
578 Staphylococcal persistence due to biofilm formation in synovial fluid containing prophylactic
579 cefazolin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 2122–2128. doi:[10.1128/AAC.04579-14](https://doi.org/10.1128/AAC.04579-14).
- 580 de Mesy Bentley, K. L., Trombetta, R., Nishitani, K., Bello-Irizarry, S. N., Ninomiya, M., Zhang, L.,
581 et al. (2017). Evidence of Staphylococcus Aureus Deformation, Proliferation, and Migration in
582 Canaliculi of Live Cortical Bone in Murine Models of Osteomyelitis. *J. Bone Miner. Res.* 32, 985–
583 990. doi:[10.1002/jbmr.3055](https://doi.org/10.1002/jbmr.3055).
- 584 Dengler, V., Foulston, L., DeFrancesco, A. S., and Losick, R. (2015). An Electrostatic Net Model for
585 the Role of Extracellular DNA in Biofilm Formation by Staphylococcus aureus. *J. Bacteriol.* 197,
586 3779–3787. doi:[10.1128/JB.00726-15](https://doi.org/10.1128/JB.00726-15).
- 587 Douiri, N., Hansmann, Y., Lefebvre, N., Riegel, P., Martin, M., Baldeyrou, M., et al. (2016).
588 Staphylococcus lugdunensis: a virulent pathogen causing bone and joint infections. *Clin. Microbiol.*
589 *Infect.* 22, 747–748. doi:[10.1016/j.cmi.2016.05.031](https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.05.031).
- 590 Ferreirinha, P., Pérez-Cabezas, B., Correia, A., Miyazawa, B., França, A., Carvalhais, V., et al.
591 (2016). Poly-N-Acetylglucosamine Production by Staphylococcus epidermidis Cells Increases Their
592 In Vivo Proinflammatory Effect. *Infect. Immun.* 84, 2933–2943. doi:[10.1128/IAI.00290-16](https://doi.org/10.1128/IAI.00290-16).

Biofilm and prosthesis loosening

- 593 Flammier, S., Rasigade, J.-P., Badiou, C., Henry, T., Vandenesch, F., Laurent, F., et al. (2016).
594 Human Monocyte-Derived Osteoclasts Are Targeted by Staphylococcal Pore-Forming Toxins and
595 Superantigens. *PLoS ONE* 11, e0150693. doi:[10.1371/journal.pone.0150693](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150693).
- 596 Flannagan, R. S., Heit, B., and Heinrichs, D. E. (2015). Antimicrobial Mechanisms of Macrophages
597 and the Immune Evasion Strategies of *Staphylococcus aureus*. *Pathogens* 4, 826–868.
598 doi:[10.3390/pathogens4040826](https://doi.org/10.3390/pathogens4040826).
- 599 Foulston, L., Elsholz, A. K. W., DeFrancesco, A. S., and Losick, R. (2014). The extracellular matrix
600 of *Staphylococcus aureus* biofilms comprises cytoplasmic proteins that associate with the cell surface
601 in response to decreasing pH. *MBio* 5, e01667-01614. doi:[10.1128/mBio.01667-14](https://doi.org/10.1128/mBio.01667-14).
- 602 Frank, K. L., and Patel, R. (2007). Poly-N-acetylglucosamine is not a major component of the
603 extracellular matrix in biofilms formed by icaADBC-positive *Staphylococcus lugdunensis* isolates.
604 *Infect. Immun.* 75, 4728–4742. doi:[10.1128/IAI.00640-07](https://doi.org/10.1128/IAI.00640-07).
- 605 Goldring, S. R., Schiller, A. L., Roelke, M., Rourke, C. M., O’Neil, D. A., and Harris, W. H. (1983).
606 The synovial-like membrane at the bone-cement interface in loose total hip replacements and its
607 proposed role in bone lysis. *J Bone Joint Surg Am* 65, 575–584.
- 608 Goodman, S. (2005). Wear particulate and osteolysis. *Orthop. Clin. North Am.* 36, 41–48, vi.
609 doi:[10.1016/j.ocl.2004.06.015](https://doi.org/10.1016/j.ocl.2004.06.015).
- 610 Goodman, S. B., Lind, M., Song, Y., and Smith, R. L. (1998). In vitro, in vivo, and tissue retrieval
611 studies on particulate debris. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 25–34.
- 612 Graf, A. C., Leonard, A., Schäuble, M., Rieckmann, L. M., Hoyer, J., Maaß, S., et al. (2019).
613 Virulence factors produced by *Staphylococcus aureus* biofilms have a moonlighting function
614 contributing to biofilm integrity. *Mol. Cell Proteomics*. doi:[10.1074/mcp.RA118.001120](https://doi.org/10.1074/mcp.RA118.001120).
- 615 Gries, C. M., Bruger, E. L., Moormeier, D. E., Scherr, T. D., Waters, C. M., and Kielian, T. (2016).
616 Cyclic di-AMP Released from *Staphylococcus aureus* Biofilm Induces a Macrophage Type I
617 Interferon Response. *Infect. Immun.* 84, 3564–3574. doi:[10.1128/IAI.00447-16](https://doi.org/10.1128/IAI.00447-16).
- 618 Guenther, F., Stroh, P., Wagner, C., Obst, U., and Hänsch, G. M. (2009). Phagocytosis of
619 staphylococci biofilms by polymorphonuclear neutrophils: *S. aureus* and *S. epidermidis* differ with
620 regard to their susceptibility towards the host defense. *Int J Artif Organs* 32, 565–573.
- 621 Günther, F., Wabnitz, G. H., Stroh, P., Prior, B., Obst, U., Samstag, Y., et al. (2009). Host defence
622 against *Staphylococcus aureus* biofilms infection: phagocytosis of biofilms by polymorphonuclear
623 neutrophils (PMN). *Mol. Immunol.* 46, 1805–1813. doi:[10.1016/j.molimm.2009.01.020](https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.01.020).
- 624 Hanke, M. L., Angle, A., and Kielian, T. (2012). MyD88-dependent signaling influences fibrosis and
625 alternative macrophage activation during *Staphylococcus aureus* biofilm infection. *PLoS ONE* 7,
626 e42476. doi:[10.1371/journal.pone.0042476](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042476).
- 627 He, L., Le, K. Y., Khan, B. A., Nguyen, T. H., Hunt, R. L., Bae, J. S., et al. (2019). Resistance to
628 leukocytes ties benefits of quorum sensing dysfunctionality to biofilm infection. *Nat Microbiol.*
629 doi:[10.1038/s41564-019-0413-x](https://doi.org/10.1038/s41564-019-0413-x).

Biofilm and prosthesis loosening

- 630 Heim, C. E., Vidlak, D., and Kielian, T. (2015a). Interleukin-10 production by myeloid-derived
631 suppressor cells contributes to bacterial persistence during *Staphylococcus aureus* orthopedic biofilm
632 infection. *J. Leukoc. Biol.* 98, 1003–1013. doi:[10.1189/jlb.4VMA0315-125RR](https://doi.org/10.1189/jlb.4VMA0315-125RR).
- 633 Heim, C. E., Vidlak, D., Odvody, J., Hartman, C. W., Garvin, K. L., and Kielian, T. (2018a). Human
634 prosthetic joint infections are associated with myeloid-derived suppressor cells (MDSCs):
635 Implications for infection persistence. *J. Orthop. Res.* 36, 1605–1613. doi:[10.1002/jor.23806](https://doi.org/10.1002/jor.23806).
- 636 Heim, C. E., Vidlak, D., Scherr, T. D., Hartman, C. W., Garvin, K. L., and Kielian, T. (2015b). IL-12
637 promotes myeloid-derived suppressor cell recruitment and bacterial persistence during
638 *Staphylococcus aureus* orthopedic implant infection. *J. Immunol.* 194, 3861–3872.
639 doi:[10.4049/jimmunol.1402689](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402689).
- 640 Heim, C. E., Vidlak, D., Scherr, T. D., Kozel, J. A., Holzapfel, M., Muirhead, D. E., et al. (2014).
641 Myeloid-derived suppressor cells contribute to *Staphylococcus aureus* orthopedic biofilm infection.
642 *J. Immunol.* 192, 3778–3792. doi:[10.4049/jimmunol.1303408](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303408).
- 643 Heim, C. E., West, S. C., Ali, H., and Kielian, T. (2018b). Heterogeneity of Ly6G⁺ Ly6C⁺ Myeloid-
644 Derived Suppressor Cell Infiltrates during *Staphylococcus aureus* Biofilm Infection. *Infect. Immun.*
645 86. doi:[10.1128/IAI.00684-18](https://doi.org/10.1128/IAI.00684-18).
- 646 Heinzelmann, M., Herzig, D. O., Swain, B., Mercer-Jones, M. A., Bergamini, T. M., and Polk, H. C.
647 (1997). Phagocytosis and oxidative-burst response of planktonic *Staphylococcus epidermidis* RP62A
648 and its non-slime-producing variant in human neutrophils. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 4, 705–710.
- 649 Hoenders, C. S. M., Harmsen, M. C., and van Luyn, M. J. A. (2008). The local inflammatory
650 environment and microorganisms in “aseptic” loosening of hip prostheses. *J. Biomed. Mater. Res.*
651 *Part B Appl. Biomater.* 86, 291–301. doi:[10.1002/jbm.b.30992](https://doi.org/10.1002/jbm.b.30992).
- 652 Hussain, M., Steinbacher, T., Peters, G., Heilmann, C., and Becker, K. (2015). The adhesive
653 properties of the *Staphylococcus lugdunensis* multifunctional autolysin AtlL and its role in biofilm
654 formation and internalization. *Int. J. Med. Microbiol.* 305, 129–139. doi:[10.1016/j.ijmm.2014.11.010](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.11.010).
- 655 Josse, J., Velard, F., and Gangloff, S. C. (2015). *Staphylococcus aureus* vs. Osteoblast: Relationship
656 and Consequences in Osteomyelitis. *Front Cell Infect Microbiol* 5, 85.
657 doi:[10.3389/fcimb.2015.00085](https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00085).
- 658 Junka, A., Szymczyk, P., Ziółkowski, G., Karuga-Kuzniewska, E., Smutnicka, D., Bil-Lula, I., et al.
659 (2017). Bad to the Bone: On In Vitro and Ex Vivo Microbial Biofilm Ability to Directly Destroy
660 Colonized Bone Surfaces without Participation of Host Immunity or Osteoclastogenesis. *PLoS ONE*
661 12, e0169565. doi:[10.1371/journal.pone.0169565](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169565).
- 662 Kim, J., Yang, J., Park, O.-J., Kang, S.-S., Kim, W.-S., Kurokawa, K., et al. (2013). Lipoproteins are
663 an important bacterial component responsible for bone destruction through the induction of osteoclast
664 differentiation and activation. *J. Bone Miner. Res.* 28, 2381–2391. doi:[10.1002/jbmr.1973](https://doi.org/10.1002/jbmr.1973).
- 665 Krenn, V., and Perino, G. (2017). *Histological Diagnosis of Implant-associated Pathologies*. Berlin
666 Heidelberg: Springer-Verlag Available at: <https://www.springer.com/gp/book/9783662542033>
667 [Accessed May 9, 2019].

Biofilm and prosthesis loosening

- 668 Krismer, M., Stöckl, B., Fischer, M., Bauer, R., Mayrhofer, P., and Ogon, M. (1996). Early migration
669 predicts late aseptic failure of hip sockets. *J Bone Joint Surg Br* 78, 422–426.
- 670 Kristian, S. A., Birkenstock, T. A., Sauder, U., Mack, D., Götz, F., and Landmann, R. (2008).
671 Biofilm formation induces C3a release and protects *Staphylococcus epidermidis* from IgG and
672 complement deposition and from neutrophil-dependent killing. *J. Infect. Dis.* 197, 1028–1035.
673 doi:[10.1086/528992](https://doi.org/10.1086/528992).
- 674 Kwan Tat, S., Padrines, M., Théoleyre, S., Heymann, D., and Fortun, Y. (2004). IL-6, RANKL,
675 TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15,
676 49–60.
- 677 Lau, Y. S., Wang, W., Sabokbar, A., Simpson, H., Nair, S., Henderson, B., et al. (2006).
678 *Staphylococcus aureus* capsular material promotes osteoclast formation. *Injury* 37 Suppl 2, S41-48.
679 doi:[10.1016/j.injury.2006.04.008](https://doi.org/10.1016/j.injury.2006.04.008).
- 680 Le, K. Y., Villaruz, A. E., Zheng, Y., He, L., Fisher, E. L., Nguyen, T. H., et al. (2019). Role of
681 Phenol-Soluble Modulins in *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Formation and Infection of
682 Indwelling Medical Devices. *J. Mol. Biol.* doi:[10.1016/j.jmb.2019.03.030](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.03.030).
- 683 Leech, J. M., Lacey, K. A., Mulcahy, M. E., Medina, E., and McLoughlin, R. M. (2017). IL-10 Plays
684 Opposing Roles during *Staphylococcus aureus* Systemic and Localized Infections. *J. Immunol.* 198,
685 2352–2365. doi:[10.4049/jimmunol.1601018](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601018).
- 686 López, D., Vlamakis, H., and Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2,
687 a000398. doi:[10.1101/cshperspect.a000398](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000398).
- 688 Lourtet-Hascoët, J., Bicart-See, A., Félicé, M. P., Giordano, G., and Bonnet, E. (2016).
689 *Staphylococcus lugdunensis*, a serious pathogen in periprosthetic joint infections: comparison to
690 *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Int. J. Infect. Dis.* 51, 56–61.
691 doi:[10.1016/j.ijid.2016.08.007](https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.08.007).
- 692 Maali, Y., Martins-Simões, P., Valour, F., Bouvard, D., Rasigade, J.-P., Bes, M., et al. (2016).
693 Pathophysiological Mechanisms of *Staphylococcus Non-aureus* Bone and Joint Infection:
694 Interspecies Homogeneity and Specific Behavior of *S. pseudintermedius*. *Front Microbiol* 7, 1063.
695 doi:[10.3389/fmicb.2016.01063](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01063).
- 696 Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H., et al. (1996). The
697 intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-
698 1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J. Bacteriol.* 178, 175–183.
699 doi:[10.1128/jb.178.1.175-183.1996](https://doi.org/10.1128/jb.178.1.175-183.1996).
- 700 Mack, D., Nedelmann, M., Krokotsch, A., Schwarzkopf, A., Heesemann, J., and Laufs, R. (1994).
701 Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in
702 the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing
703 polysaccharide intercellular adhesin. *Infect. Immun.* 62, 3244–3253.
- 704 Mann, E. E., Rice, K. C., Boles, B. R., Endres, J. L., Ranjit, D., Chandramohan, L., et al. (2009).
705 Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation.
706 *PLoS ONE* 4, e5822. doi:[10.1371/journal.pone.0005822](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005822).

Biofilm and prosthesis loosening

- 707 McGuinness, W. A., Kobayashi, S. D., and DeLeo, F. R. (2016). Evasion of Neutrophil Killing by
708 *Staphylococcus aureus*. *Pathogens* 5. doi:[10.3390/pathogens5010032](https://doi.org/10.3390/pathogens5010032).
- 709 Meghji, S., Crean, S. J., Hill, P. A., Sheikh, M., Nair, S. P., Heron, K., et al. (1998). Surface-
710 associated protein from *Staphylococcus aureus* stimulates osteoclastogenesis: possible role in *S.*
711 *aureus*-induced bone pathology. *Br. J. Rheumatol.* 37, 1095–1101.
- 712 Meyle, E., Brenner-Weiss, G., Obst, U., Prior, B., and Hänsch, G. M. (2012). Immune defense
713 against *S. epidermidis* biofilms: components of the extracellular polymeric substance activate distinct
714 bactericidal mechanisms of phagocytic cells. *Int J Artif Organs* 35, 700–712.
715 doi:[10.5301/ijao.5000151](https://doi.org/10.5301/ijao.5000151).
- 716 Meyle, E., Stroh, P., Günther, F., Hoppy-Tichy, T., Wagner, C., and Hänsch, G. M. (2010).
717 Destruction of bacterial biofilms by polymorphonuclear neutrophils: relative contribution of
718 phagocytosis, DNA release, and degranulation. *Int J Artif Organs* 33, 608–620.
- 719 Morawietz, L., Classen, R.-A., Schröder, J. H., Dynybil, C., Perka, C., Skwara, A., et al. (2006).
720 Proposal for a histopathological consensus classification of the periprosthetic interface membrane. *J.*
721 *Clin. Pathol.* 59, 591–597. doi:[10.1136/jcp.2005.027458](https://doi.org/10.1136/jcp.2005.027458).
- 722 Nelson, C. L., McLaren, A. C., McLaren, S. G., Johnson, J. W., and Smeltzer, M. S. (2005). Is
723 aseptic loosening truly aseptic? *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 25–30.
- 724 Ochsner, P. E., Borens, O., Bodler, P.-M., and Schweizerische Gesellschaft für Orthopädie und
725 Traumatologie (2014). *Infections of the musculoskeletal system: basic principles, prevention,*
726 *diagnosis and treatment.*
- 727 O’Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Humphreys, H., Robinson, D. A., Loughman, A., et al. (2008). A
728 novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins,
729 FnBPA and FnBPB. *J. Bacteriol.* 190, 3835–3850. doi:[10.1128/JB.00167-08](https://doi.org/10.1128/JB.00167-08).
- 730 Paharik, A. E., and Horswill, A. R. (2016). The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and
731 Host Response. *Microbiol Spectr* 4. doi:[10.1128/microbiolspec.VMBF-0022-2015](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0022-2015).
- 732 Pajarinen, J., Jamsen, E., Konttinen, Y. T., and Goodman, S. B. (2014). Innate immune reactions in
733 septic and aseptic osteolysis around hip implants. *J Long Term Eff Med Implants* 24, 283–296.
- 734 Perez, K., and Patel, R. (2018). Survival of *Staphylococcus epidermidis* in Fibroblasts and
735 Osteoblasts. *Infect. Immun.* 86. doi:[10.1128/IAI.00237-18](https://doi.org/10.1128/IAI.00237-18).
- 736 Periasamy, S., Joo, H.-S., Duong, A. C., Bach, T.-H. L., Tan, V. Y., Chatterjee, S. S., et al. (2012).
737 How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
738 *U.S.A.* 109, 1281–1286. doi:[10.1073/pnas.1115006109](https://doi.org/10.1073/pnas.1115006109).
- 739 Prabhakara, R., Harro, J. M., Leid, J. G., Harris, M., and Shirtliff, M. E. (2011a). Murine immune
740 response to a chronic *Staphylococcus aureus* biofilm infection. *Infect. Immun.* 79, 1789–1796.
741 doi:[10.1128/IAI.01386-10](https://doi.org/10.1128/IAI.01386-10).
- 742 Prabhakara, R., Harro, J. M., Leid, J. G., Keegan, A. D., Prior, M. L., and Shirtliff, M. E. (2011b).
743 Suppression of the inflammatory immune response prevents the development of chronic biofilm

Biofilm and prosthesis loosening

- 744 infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 79, 5010–5018.
745 doi:[10.1128/IAI.05571-11](https://doi.org/10.1128/IAI.05571-11).
- 746 Proctor, R. A., Balwit, J. M., and Vesga, O. (1994). Variant subpopulations of *Staphylococcus aureus*
747 as cause of persistent and recurrent infections. *Infect Agents Dis* 3, 302–312.
- 748 Proctor, R. A., Kriegeskorte, A., Kahl, B. C., Becker, K., Löffler, B., and Peters, G. (2014).
749 *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs): a road map for the metabolic pathways
750 involved in persistent infections. *Front Cell Infect Microbiol* 4, 99. doi:[10.3389/fcimb.2014.00099](https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00099).
- 751 Rajendran, N. B., Eikmeier, J., Becker, K., Hussain, M., Peters, G., and Heilmann, C. (2015).
752 Important contribution of the novel locus comEB to extracellular DNA-dependent *Staphylococcus*
753 *lugdunensis* biofilm formation. *Infect. Immun.* 83, 4682–4692. doi:[10.1128/IAI.00775-15](https://doi.org/10.1128/IAI.00775-15).
- 754 Reffuveille, F., Josse, J., Velard, F., Lamret, F., Varin-Simon, J., Dubus, M., et al. (2018). Bone
755 Environment Influences Irreversible Adhesion of a Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*
756 Strain. *Front Microbiol* 9, 2865. doi:[10.3389/fmicb.2018.02865](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02865).
- 757 Ren, L.-R., Wang, H., He, X.-Q., Song, M.-G., Chen, X.-Q., and Xu, Y.-Q. (2017).
758 *Staphylococcus aureus* Protein A induces osteoclastogenesis via the NF- κ B signaling pathway. *Mol*
759 *Med Rep* 16, 6020–6028. doi:[10.3892/mmr.2017.7316](https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7316).
- 760 Rice, K. C., Mann, E. E., Endres, J. L., Weiss, E. C., Cassat, J. E., Smeltzer, M. S., et al. (2007). The
761 cidA murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in
762 *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 8113–8118.
763 doi:[10.1073/pnas.0610226104](https://doi.org/10.1073/pnas.0610226104).
- 764 Richards, G. K., Gagnon, R. F., and Prentis, J. (1991). Comparative rates of antibiotic action against
765 *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *ASAIO Trans* 37, M160-162.
- 766 Rohde, H., Burdelski, C., Bartscht, K., Hussain, M., Buck, F., Horstkotte, M. A., et al. (2005).
767 Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the
768 accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol. Microbiol.* 55, 1883–
769 1895. doi:[10.1111/j.1365-2958.2005.04515.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04515.x).
- 770 Sabokbar, A., Fujikawa, Y., Neale, S., Murray, D. W., and Athanasou, N. A. (1997). Human
771 arthroplasty derived macrophages differentiate into osteoclastic bone resorbing cells. *Ann. Rheum.*
772 *Dis.* 56, 414–420. doi:[10.1136/ard.56.7.414](https://doi.org/10.1136/ard.56.7.414).
- 773 Sabokbar, A., Itonaga, I., Sun, S. G., Kudo, O., and Athanasou, N. A. (2005). Arthroplasty
774 membrane-derived fibroblasts directly induce osteoclast formation and osteolysis in aseptic
775 loosening. *J. Orthop. Res.* 23, 511–519. doi:[10.1016/j.orthres.2004.10.006](https://doi.org/10.1016/j.orthres.2004.10.006).
- 776 Sanchez, C. J., Ward, C. L., Romano, D. R., Hurtgen, B. J., Hardy, S. K., Woodbury, R. L., et al.
777 (2013). *Staphylococcus aureus* biofilms decrease osteoblast viability, inhibits osteogenic
778 differentiation, and increases bone resorption in vitro. *BMC Musculoskelet Disord* 14, 187.
779 doi:[10.1186/1471-2474-14-187](https://doi.org/10.1186/1471-2474-14-187).

Biofilm and prosthesis loosening

- 780 Scherr, T. D., Hanke, M. L., Huang, O., James, D. B. A., Horswill, A. R., Bayles, K. W., et al.
781 (2015). Staphylococcus aureus Biofilms Induce Macrophage Dysfunction Through Leukocidin AB
782 and Alpha-Toxin. *MBio* 6. doi:[10.1128/mBio.01021-15](https://doi.org/10.1128/mBio.01021-15).
- 783 Schommer, N. N., Christner, M., Hentschke, M., Ruckdeschel, K., Aepfelbacher, M., and Rohde, H.
784 (2011). Staphylococcus epidermidis uses distinct mechanisms of biofilm formation to interfere with
785 phagocytosis and activation of mouse macrophage-like cells 774A.1. *Infect. Immun.* 79, 2267–2276.
786 doi:[10.1128/IAI.01142-10](https://doi.org/10.1128/IAI.01142-10).
- 787 Schwartz, K., Syed, A. K., Stephenson, R. E., Rickard, A. H., and Boles, B. R. (2012). Functional
788 amyloids composed of phenol soluble modulins stabilize Staphylococcus aureus biofilms. *PLoS*
789 *Pathog.* 8, e1002744. doi:[10.1371/journal.ppat.1002744](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002744).
- 790 Shiau, A. L., and Wu, C. L. (1998). The inhibitory effect of Staphylococcus epidermidis slime on the
791 phagocytosis of murine peritoneal macrophages is interferon-independent. *Microbiol. Immunol.* 42,
792 33–40.
- 793 Sloan, M., Premkumar, A., and Sheth, N. P. (2018). Projected Volume of Primary Total Joint
794 Arthroplasty in the U.S., 2014 to 2030. *J Bone Joint Surg Am* 100, 1455–1460.
795 doi:[10.2106/JBJS.17.01617](https://doi.org/10.2106/JBJS.17.01617).
- 796 Spiliopoulou, A. I., Kolonitsiou, F., Krevvata, M. I., Leontsinidis, M., Wilkinson, T. S., Mack, D., et
797 al. (2012a). Bacterial adhesion, intracellular survival and cytokine induction upon stimulation of
798 mononuclear cells with planktonic or biofilm phase Staphylococcus epidermidis. *FEMS Microbiol.*
799 *Lett.* 330, 56–65. doi:[10.1111/j.1574-6968.2012.02533.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02533.x).
- 800 Spiliopoulou, A. I., Krevvata, M. I., Kolonitsiou, F., Harris, L. G., Wilkinson, T. S., Davies, A. P., et
801 al. (2012b). An extracellular Staphylococcus epidermidis polysaccharide: relation to Polysaccharide
802 Intercellular Adhesin and its implication in phagocytosis. *BMC Microbiol.* 12, 76. doi:[10.1186/1471-
803 2180-12-76](https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-76).
- 804 Stewart, P. S. (2015). Antimicrobial Tolerance in Biofilms. *Microbiol Spectr* 3.
805 doi:[10.1128/microbiolspec.MB-0010-2014](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0010-2014).
- 806 Stoodley, P., Nistico, L., Johnson, S., Lasko, L.-A., Baratz, M., Gahlot, V., et al. (2008). Direct
807 demonstration of viable Staphylococcus aureus biofilms in an infected total joint arthroplasty. A case
808 report. *J Bone Joint Surg Am* 90, 1751–1758. doi:[10.2106/JBJS.G.00838](https://doi.org/10.2106/JBJS.G.00838).
- 809 Stroh, P., Günther, F., Meyle, E., Prior, B., Wagner, C., and Hänsch, G. M. (2011). Host defence
810 against Staphylococcus aureus biofilms by polymorphonuclear neutrophils: oxygen radical
811 production but not phagocytosis depends on opsonisation with immunoglobulin G. *Immunobiology*
812 216, 351–357. doi:[10.1016/j.imbio.2010.07.009](https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.07.009).
- 813 Sugimoto, S., Sato, F., Miyakawa, R., Chiba, A., Onodera, S., Hori, S., et al. (2018). Broad impact of
814 extracellular DNA on biofilm formation by clinically isolated Methicillin-resistant and -sensitive
815 strains of Staphylococcus aureus. *Sci Rep* 8, 2254. doi:[10.1038/s41598-018-20485-z](https://doi.org/10.1038/s41598-018-20485-z).
- 816 Tebartz, C., Horst, S. A., Sparwasser, T., Huehn, J., Beineke, A., Peters, G., et al. (2015). A major
817 role for myeloid-derived suppressor cells and a minor role for regulatory T cells in

Biofilm and prosthesis loosening

- 818 immunosuppression during *Staphylococcus aureus* infection. *J. Immunol.* 194, 1100–1111.
819 doi:[10.4049/jimmunol.1400196](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400196).
- 820 ten Harkel, B., Schoenmaker, T., Picavet, D. I., Davison, N. L., de Vries, T. J., and Everts, V. (2015).
821 The Foreign Body Giant Cell Cannot Resorb Bone, But Dissolves Hydroxyapatite Like Osteoclasts.
822 *PLoS ONE* 10, e0139564. doi:[10.1371/journal.pone.0139564](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139564).
- 823 Thammavongsa, V., Kim, H. K., Missiakas, D., and Schneewind, O. (2015). Staphylococcal
824 manipulation of host immune responses. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 529–543.
825 doi:[10.1038/nrmicro3521](https://doi.org/10.1038/nrmicro3521).
- 826 Thurlow, L. R., Hanke, M. L., Fritz, T., Angle, A., Aldrich, A., Williams, S. H., et al. (2011).
827 *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation in
828 vivo. *J. Immunol.* 186, 6585–6596. doi:[10.4049/jimmunol.1002794](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002794).
- 829 Triffault-Fillit, C., Ferry, T., Laurent, F., Pradat, P., Dupieux, C., Conrad, A., et al. (2019).
830 Microbiologic epidemiology depending on time to occurrence of prosthetic joint infection: a
831 prospective cohort study. *Clin. Microbiol. Infect.* 25, 353–358. doi:[10.1016/j.cmi.2018.04.035](https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.04.035).
- 832 Trindade, R., Albrektsson, T., Tengvall, P., and Wennerberg, A. (2016). Foreign Body Reaction to
833 Biomaterials: On Mechanisms for Buildup and Breakdown of Osseointegration. *Clin Implant Dent*
834 *Relat Res* 18, 192–203. doi:[10.1111/cid.12274](https://doi.org/10.1111/cid.12274).
- 835 Trouillet-Assant, S., Gallet, M., Nauroy, P., Rasigade, J.-P., Flammier, S., Parroche, P., et al. (2015).
836 Dual impact of live *Staphylococcus aureus* on the osteoclast lineage, leading to increased bone
837 resorption. *J. Infect. Dis.* 211, 571–581. doi:[10.1093/infdis/jiu386](https://doi.org/10.1093/infdis/jiu386).
- 838 Valour, F., Trouillet-Assant, S., Rasigade, J.-P., Lustig, S., Chanard, E., Meugnier, H., et al. (2013).
839 *Staphylococcus epidermidis* in orthopedic device infections: the role of bacterial internalization in
840 human osteoblasts and biofilm formation. *PLoS ONE* 8, e67240. doi:[10.1371/journal.pone.0067240](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067240).
- 841 Veglia, F., Perego, M., and Gabrilovich, D. (2018). Myeloid-derived suppressor cells coming of age.
842 *Nat. Immunol.* 19, 108–119. doi:[10.1038/s41590-017-0022-x](https://doi.org/10.1038/s41590-017-0022-x).
- 843 von Eiff, C., Vaudaux, P., Kahl, B. C., Lew, D., Emler, S., Schmidt, A., et al. (1999). Bloodstream
844 infections caused by small-colony variants of coagulase-negative staphylococci following pacemaker
845 implantation. *Clin. Infect. Dis.* 29, 932–934. doi:[10.1086/520462](https://doi.org/10.1086/520462).
- 846 Vuong, C., Voyich, J. M., Fischer, E. R., Braughton, K. R., Whitney, A. R., DeLeo, F. R., et al.
847 (2004). Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major
848 components of the human innate immune system. *Cell. Microbiol.* 6, 269–275.
- 849 Wang, R., Khan, B. A., Cheung, G. Y. C., Bach, T.-H. L., Jameson-Lee, M., Kong, K.-F., et al.
850 (2011). *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and
851 dissemination of biofilm-associated infection in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 238–248.
852 doi:[10.1172/JCI42520](https://doi.org/10.1172/JCI42520).
- 853 Wang, Y., Liu, X., Dou, C., Cao, Z., Liu, C., Dong, S., et al. (2017). Staphylococcal protein A
854 promotes osteoclastogenesis through MAPK signaling during bone infection. *J. Cell. Physiol.* 232,
855 2396–2406. doi:[10.1002/jcp.25774](https://doi.org/10.1002/jcp.25774).

Biofilm and prosthesis loosening

856 Waters, E. M., Rowe, S. E., O’Gara, J. P., and Conlon, B. P. (2016). Convergence of *Staphylococcus*
857 *aureus* Persister and Biofilm Research: Can Biofilms Be Defined as Communities of Adherent
858 Persister Cells? *PLoS Pathog.* 12, e1006012. doi:[10.1371/journal.ppat.1006012](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006012).

859 Workgroup Convened by the Musculoskeletal Infection Society (2011). New definition for
860 periprosthetic joint infection. *J Arthroplasty* 26, 1136–1138. doi:[10.1016/j.arth.2011.09.026](https://doi.org/10.1016/j.arth.2011.09.026).

861 Yokota, K., Sato, K., Miyazaki, T., Kitaura, H., Kayama, H., Miyoshi, F., et al. (2014). Combination
862 of tumor necrosis factor α and interleukin-6 induces mouse osteoclast-like cells with bone resorption
863 activity both in vitro and in vivo. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 66, 121–129.
864 doi:[10.1002/art.38218](https://doi.org/10.1002/art.38218).

865 Zapotoczna, M., McCarthy, H., Rudkin, J. K., O’Gara, J. P., and O’Neill, E. (2015). An Essential
866 Role for Coagulase in *Staphylococcus aureus* Biofilm Development Reveals New Therapeutic
867 Possibilities for Device-Related Infections. *J. Infect. Dis.* 212, 1883–1893. doi:[10.1093/infdis/jiv319](https://doi.org/10.1093/infdis/jiv319).

868 Zheng, Y., Joo, H.-S., Nair, V., Le, K. Y., and Otto, M. (2018). Do amyloid structures formed by
869 *Staphylococcus aureus* phenol-soluble modulins have a biological function? *Int. J. Med. Microbiol.*
870 308, 675–682. doi:[10.1016/j.ijmm.2017.08.010](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.08.010).

871

872

873

874

875

876

877

878

879

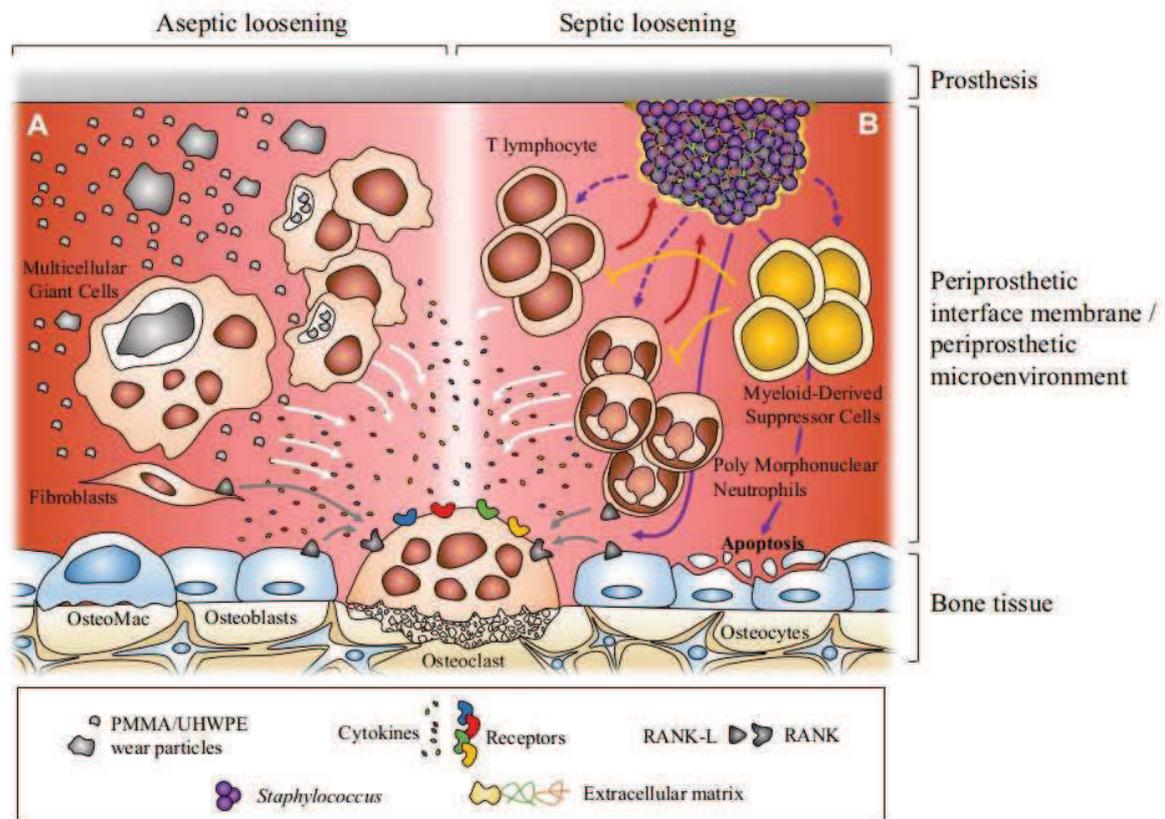
880

881

882

883

Biofilm and prosthesis loosening



884

885

886 **Figure 1:** Dual representation of the major cellular mechanisms during aseptic and septic loosening
 887 at the interface between prosthesis and bone. In aseptic loosening, small wear debris from the
 888 prosthesis are phagocytosed by macrophages and bigger particles are phagocytosed by multicellular
 889 giant cells. Frustrated phagocytosis leads to the production of pro-inflammatory cytokines. Activated
 890 fibroblasts in the interfacial membrane can also produce RANKL (A). In septic loosening, biofilm
 891 attached to the prosthesis can interact with polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and T
 892 lymphocytes which leads to the production of pro-inflammatory cytokines. Myeloid-derived
 893 suppressor cells (MDSCs) are recruited during biofilm-associated PJI. They can regulate immune
 894 response, notably inhibiting T lymphocyte proliferation. In PJI, recruited PMNs can express
 895 RANKL. Staphylococcal biofilm can also induce osteoblast apoptosis (B). In both situations, pro-
 896 inflammatory cytokines and RANKL can trigger the formation and activation of osteoclasts which
 897 leads to bone resorption and prosthesis loosening.

DISCUSSION – PERSPECTIVES

Nos travaux de recherche ont visé à explorer les mécanismes bactériens impliqués dans la physiopathologie des IOA liées aux *Staphylococcus non-aureus*. Au terme de notre revue bibliographique, plusieurs mécanismes ont pu être mis en lumière, incluant notamment l'internalisation par les ostéoblastes pouvant conduire vers un phénotype cytotoxique ou à un phénotype de persistance et la formation de biofilm en présence ou non de matériel ostéo-articulaire. L'amélioration des connaissances concernant ces infections à SNA est essentielle pour optimiser la prise en charge chirurgicale, médicale, ou thérapeutique des patients et pour définir, à long terme, de nouvelles cibles thérapeutiques.

Les travaux de recherche menés pendant cette thèse sont le fruit d'une interaction multidisciplinaire réussie entre l'équipe « Pathogénie des staphylocoques » (CIRI-INSERM U1111), l'Institut des Agents Infectieux, les services de maladies infectieuses et de chirurgie orthopédique dans le cadre du CRIOAC des Hospices Civils de Lyon. Cette collaboration nous a donné l'opportunité rare de corréler résultats bactériologiques fondamentaux et observations cliniques.

A. Interaction ostéoblastes - *Staphylococcus non-aureus*

Nos travaux ont permis de répondre à certaines interrogations sur les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la genèse des IOA liées aux SNA. En premier lieu, nous avons porté notre étude sur un mécanisme clairement identifié dans la physiopathologie des IOA à *S. aureus*: l'internalisation dans les cellules osseuses (357). Une fois internalisé, deux stratégies de survie intracellulaire peuvent être employées par *S. aureus*. La première consiste après internalisation à se maintenir dans les cellules et à persister ce qui conduit à l'apparition de bactéries sanctuarisées. A l'abri de l'action du système immunitaire et des antibiotiques, les bactéries intracellulaires constituent des réservoirs bactériens pouvant expliquer la chronicité et les rechutes des IOA observées cliniquement. La deuxième stratégie de survie orchestrée par *S. aureus* après internalisation consiste à proliférer et à produire des toxines dans le cytosol des cellules, attaquant les membranes plasmiques et entraînant la lyse cellulaire et l'altération des tissus (358, 359).

Concernant les SNA, peu de données et en majorité contradictoire, étaient disponibles sur les capacités d'internalisations dans les cellules hôtes non professionnelles (236, 258, 278, 279). Très récemment, une étude américaine rapportée par Patel *et al.* atteste de la persistance intracellulaire de *S. epidermidis* dans des fibroblastes humains et des ostéoblastes humains et murins (360). Cependant, aucune information n'est apportée concernant la concentration des inoculas testées ou le nombre de cellules utilisées dans le modèle, qui sont pourtant des paramètres clef pour évaluer concrètement le phénotype d'internalisation (361). Des niveaux d'internalisation largement inférieurs à celles des témoins négatifs ont également été constatés dans l'étude de Campoccia *et al.* et dans celle de Valour *et al.* se traduisant par un taux d'internalisation résiduelle nulle voire minime des cellules phagocytaires non professionnelles. Toutefois, ces résultats posent la question de savoir à partir de quelle fraction bactérienne intracellulaire, (i) peut-on considérer cette fraction comme significative, (ii) peut-on établir une corrélation avec le mécanisme d'invasion cellulaire responsable de la persistance et de la chronicité de certaines formes d'infections ?

A l'aide d'une approche *in vitro* conduite dans un modèle d'invasion d'ostéoblastes humain dans un premier temps, puis *in silico* par BlastX à partir des génomes séquencés des souches appartenant au genre *Staphylococcus*, nos travaux ont mis en évidence une capacité d'internalisation et de persistance pour les espèces *S. pseudintermedius* et *S. delphini*. De façon similaire à *S. aureus*, la mécanistique d'invasion intracellulaire pour ces espèces s'opère à l'aide d'un pontage FnBP-like/Fibronectine/ $\alpha_5\beta_1$ (269). Bien qu'appartenant au même groupe phylogénétique, en l'occurrence le *Staphylococcus Intermedius Group* (dénommé SIG), l'espèce *S. intermedius* ne partage pas cette aptitude à être internalisée par les cellules phagocytaires non professionnelles. Néanmoins, nos études *in silico* révèlent la présence d'une protéine présentant l'ensemble des motifs spécifiques des protéines de type FnBP-like, à l'exception du signal de sécrétion N-terminal. L'absence de ce signal de sécrétion, empêche probablement la reconnaissance et le transport de la protéine à travers les membranes plasmiques par la machinerie de sécrétion spécifique (362, 363). En l'absence d'expression sur la surface de la bactérie, aucune interaction avec la fibronectine n'est possible et donc aucune internalisation n'est observée. Cette observation soulève de nouvelles interrogations visant à mieux

comprendre ces événements de gain et de perte des peptides signal au cours de l'évolution des staphylocoques. Cette dynamique évolutive des peptides signal au sein des séquences protéiques bactériennes représente un mécanisme puissant de diversification fonctionnelle (364).

Une fois internalisées dans les cellules hôtes, les bactéries intracellulaires peuvent présenter différentes stratégies de survie dans le compartiment cytosolique eucaryote. Les stratégies de survie décrites pour *S. aureus* sont presque aussi diverses que les souches ou les types de cellules hôtes utilisés. Ainsi, *S. aureus* est capable de subvertir l'autophagie, induisant des mécanismes de mort cellulaire tels que l'apoptose et la pyronécrose (365). *S. aureus* peut également se répliquer dans le phagosome ou librement dans le cytoplasme de ses cellules hôtes après la sécrétion de toxines (PSM α) altérant la membrane des phagosomes, ce qui permet l'échappement de la bactérie dans le cytosol (303).

B. Rôle majeur des « pore forming toxins » dans la cytotoxicité

Un autre point essentiel de nos travaux est la mise en évidence du phénotype hautement cytotoxique de l'espèce *S. pseudintermedius* après internalisation dans les cellules hôtes. Ces observations nous ont amenés par la suite à chercher à comprendre et identifier les facteurs de virulence responsable de ce phénotype cytotoxique. Les études *in silico* et *in vitro* basées sur des modèles cellulaires (THP-1, MG63 et ostéoblastes primaires), des toxines recombinantes ou synthétiques, de surnageants bactériens ont permis de montrer l'implication de deux types de "Pore forming toxins" (PFTs) dans la cytotoxicité de *S. pseudintermedius* : (i) la leucocidine Luk-I et (ii) les PSMs que sont la δ -toxine et le PSM ϵ . Comme la leucocidine Luk-ED de *S. aureus*, nous avons montré que Luk-I présente un tropisme pour les cellules immunes exprimant le récepteur CXCR2 (récepteurs à l'interleukine 8) mais sans affinité pour le récepteur C5a1 (récepteur du composant 5 du complément). Ces deux leucocidines présentent des sous-unités LukS et LukF hautement homologues. Ainsi, il serait intéressant d'étudier le tropisme de Luk-I pour d'autres récepteurs cellulaires et leur cellules respectives ayant été décrites comme cible de LukED,

notamment CXCR1, CCR5 et le récepteur DARC (Duffy antigen/chemokine receptor) des hématies (366-368).

En ce qui concerne les PSMs de *S. pseudintermedius*, ces peptides agissent à la fois dans les compartiments extracellulaires et intracellulaires de la lignée myéloïde et des cellules non professionnelles. Etant donné que les PSMs sont actifs également dans le compartiment extracellulaire, l'internalisation bactérienne dans les cellules n'est pas indispensable pour exercer leurs pouvoirs cytolytiques. Dans les perspectives, il serait intéressant d'évaluer la contribution des PSMs des autres espèces SNA dans la genèse des IOA, spécifiquement comme mécanisme toxique impliqué dans la destruction des tissus.

Si la prévalence des IOA humaines à *S. pseudintermedius* est faible et les documentations cliniques peu nombreuses rendant difficile l'établissement d'un lien direct entre nos résultats et la physiopathologie des IOA à *S. pseudintermedius*, cette espèce est en revanche extrêmement prévalente dans les dermo-epidermites canines et associée à des formes purulentes nécrotiques qui font sens avec les données observées (internalisation et cytotoxicité) dans nos travaux (369, 370). Malgré la prévalence élevée du portage (80%) et de l'infection à *S. pseudintermedius* chez le chien et malgré la proximité et les échanges étroits entre chiens et Hommes, la faible prévalence des infections à *S. pseudintermedius* chez l'Homme interroge sur la forte spécificité d'hôte de cette espèce. Des études supplémentaires méritent d'être menées pour explorer cette capacité différentielle et pour identifier les mécanismes de cette spécificité d'hôte. La capacité d'adhésion au cornéocytes pourrait être la clef pour expliquer cette spécificité d'hôte. Dans ce sens, en utilisant des souches de *S. pseudintermedius* isolées chez le chien et des souches isolées chez l'Homme, Latronico *et al.* ont montré que les souches canines adhèrent plus efficacement au cornéocytes canins qu'au cornéocytes humains. De plus, les souches d'origine humaine adhéraient tout aussi bien aux cornéocytes canins et humains, suggérant une adaptation aux surfaces de la peau humaine pour ces isolats (371).

Enfin, seules deux espèces SNA se sont révélées en mesure d'être internalisées dans les cellules osseuses dans les travaux de cette étude. Par conséquent, d'autres mécanismes bactériens impliqués dans les IOA ont été explorés, notamment la formation du biofilm.

C. Biofilm hétérogène au sein des SNA

Les six espèces SNA les plus prévalentes dans les IOA (*S. epidermidis*, *S. lugdunensis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. caprae*, *S. capitis*) ont été étudiées en sélectionnant exclusivement des souches cliniques issues d'IMOA mono-microbiennes. Les constituants des matériels ostéo-articulaires infectés diffèrent par leurs compositions, leurs natures et leurs structures. Dans ce contexte, nous avons été amenés à développer spécifiquement pour notre projet une méthode d'étude du biofilm sur les biomatériaux les plus utilisés en chirurgie orthopédique: l'acier inoxydable, le titane et le polyéthylène (collaboration avec Groupe Lépine®). Cette approche novatrice permet de disposer de données plus proches des conditions réelles de formation du biofilm in vivo chez l'Homme. Nos résultats indiquent que certaines espèces sont plus en mesure de former un biofilm sur un biomatériau que d'autres, comme *S. capitis* et *S. lugdunensis*. N'ayant pas les mêmes mécanismes physiopathologiques, les SNA ne doivent pas être considérés comme une entité clinique unique. Bien qu'il existe une différence de comportement global entre les différentes espèces SNA, nous observons également une différence de comportement au niveau de la souche. De façon similaire à notre étude, Oliveira *et al.* ont montré sur un modèle d'étude du biofilm en microplaque, des différences de capacité de formation de biofilm jusqu'à 10 fois plus importantes au sein de la même espèce. Selon les auteurs, cette hétérogénéité intra-espèce s'explique principalement par la composition de la matrice du biofilm. En effet, à l'aide d'un test de dégradation du biofilm, visant à étudier la composition du biofilm après traitement à la DNase I, protéinase K et au periodate de sodium (NaIO₄), les auteurs ont observé de fortes différences de composition matricielles du biofilm entre des souches de la même espèce, en l'occurrence *S. epidermidis* (333). Cette variabilité pour la formation de biofilm est clairement reconnue dans la littérature et s'explique par le grand nombre de gènes/protéines régulateurs ayant une action inhibitrice ou activatrice sur l'expression des gènes impliqués dans la synthèse du biofilm (372).

L'utilisation de différents biomatériaux a permis de montrer dans notre modèle que la composition des biomatériaux orthopédiques n'a pas d'incidence sur la formation de biofilm tardif quelle que soit l'espèce, à l'exception de *S. epidermidis* mais qui représente 60% des

souches de SNA responsable d'IOA (173). En effet, pour cette espèce, une plus grande propension à former du biofilm a été observée sur polyéthylène par rapport aux autres biomatériaux. Nos résultats sont en phase avec les études *in vivo* réalisées sur modèles canins et murins, visant à évaluer l'effet des biomatériaux sur la survenue d'infections à *S. epidermidis*. Ces études indiquent un tropisme plus important de *S. epidermidis* pour les polymères, constituant un risque d'infection plus élevé que les métaux pour lesquels ni différence de biofilm ni différence de susceptibilité à induire une infection n'a été constatée sur titane et acier inoxydable (340, 373). Nos résultats sont importants en terme cliniques, en particulier dans la gestion de l'infection articulaire péri-prothétique après arthroplastie totale du genou. En effet, la plupart des experts recommandent un échange de l'insert de polyéthylène entre les deux cotyles lors du débridement sans retrait de prothèse en cas d'infection précoce (374). Les données apportées dans ce travail, encouragent fortement le changement des inserts en polyéthylène afin de réduire considérablement la charge bactérienne, en particulier en cas d'infection à *S. epidermidis*.

Nos travaux confortent l'idée que le biofilm se présente comme un mécanisme multifactoriel. Bien que nous ayons pris en compte deux facteurs dans notre modèle : (i) la bactérie et (ii) la surface, un troisième paramètre représenté par l'hôte notamment des protéines interagissant avec les surfaces au niveau local et de l'action de son système immunitaire. Ce troisième paramètre mérite d'être étudié pour mieux comprendre le rôle de ce mécanisme de virulence au sein des IOA liées aux SNA. Afin de prendre en compte l'ensemble de ces 3 facteurs, il est capital de développer des modèles d'infection *in vivo* sur lapin et/ou souris, tenant compte des facteurs biotiques et abiotiques afin de se rapprocher des conditions physiopathologiques réelles. La mise en place de tels modèles nécessitera une optimisation, tenant compte de l'animal, de l'implant (localisation, pré-colonisation), de la charge bactérienne et du type d'inoculation (375, 376).

Enfin, ces travaux soulignent la nécessité d'études centrées sur d'autres mécanismes physiopathologiques pour les espèces telle que *S. haemolyticus* et *S. warneri*, pour lesquelles la genèse et/ou la chronicisation semble indépendante de la capacité à être internalisé dans les cellules hôtes et de former un biofilm.

D. Autres mécanismes physiopathologiques

Au cours de notre introduction bibliographique, nous avons souligné l'importance de l'adhésion bactérienne, principalement orchestré par les protéines de la famille MSCRAMMs, dans la colonisation et la persistance des tissus de l'hôte. Dans le contexte des IOA, il est donc indispensable d'étudier les interactions entre les bactéries pathogènes d'une part et les tissus affectés d'autre part, en l'occurrence le tissu osseux.

Le tissu osseux est un tissu conjonctif dans lequel sont associées une phase minérale (60%) et une matrice organique (35%), composé de cellules spécifiques (5%) nécessaires à son remodelage que sont les ostéoblastes, les ostéoclastes et les ostéocytes. Près de 85% de la matrice organique dans l'os est composée de collagène de type I. Produite par les ostéoblastes, cette protéine fibreuse organisée en triple hélice α , forme des lamelles qui s'interconnectent conférant ainsi à l'os sa résistance à l'étirement et à la pression. Tenant compte du rôle joué par cette protéine constituant une véritable clef de voûte au sein du tissu osseux, plusieurs études se sont intéressées aux interactions entre *S. aureus* et le collagène. Après avoir mis en évidence la capacité de *S. aureus* à adhérer au collagène, Patti *et al.* sont parvenus à identifier et caractériser la protéine Collagen binding proteins (Cna) de *S. aureus*, une des principales protéines responsables de ce phénotype (224, 377, 378). Dans le contexte des IOA, des études *in vivo* sur souris réalisées à l'aide des souches sauvages et des mutants isogéniques délétés sur le gène *cna*, ont permis de démontrer l'implication de la protéine Cna dans la virulence de *S. aureus* (379). A titre d'exemple, dans un modèle d'ostéomyélite sur souris, une ostéomyélite s'est développée chez 14 souris sur 20 (70%) infectées par la souche sauvage alors que seulement 1 souris sur 20 (5%) infectées par la souche délétée sur le gène *cna* a développé une ostéomyélite (380). Concernant les SNA, de rares études portées essentiellement sur *S. epidermidis*, ont permis d'identifier les adhésines SdrF et GehD comme responsables de l'adhésion au collagène chez certaines souches de cette espèce (227, 228). Toutefois, aucune étude n'a exploré le lien entre cette capacité d'adhésion et un rôle physiopathologique dans les IOA. Dans ce contexte, nous avons développé un projet visant à étudier l'adhésion bactérienne des SNA sur le constituant principal de la matrice organique : le collagène de type I (Annexe 1).

Les tests d'adhésion au collagène de type I réalisés sur notre collection de souches cliniques issues d'IOA ont permis de montrer que, parmi les six espèces de SNA étudiées, *S. capitis* et *S. haemolyticus* présentaient une adhérence significative au collagène de type I. Les résultats obtenus pour l'espèce *S. haemolyticus*, montrant une adhérence significative pour 100% des isolats nous ont amenées à étendre notre analyse à dix souches supplémentaires issues de portages. Aucune différence n'a été constatée entre les taux d'adhésion des souches cliniques et ceux des souches de portage. Cela suggère que ce phénotype n'est pas une spécificité des souches cliniques issues d'IOA, mais un caractère conservé au sein de l'espèce *S. haemolyticus* quelle que soit l'origine étiologique.

D'autre part, la matrice organique est aussi faite de protéines non collagéniques spécifiques du tissu osseux comme l'ostéopontine, l'ostéonectine et l'ostéocalcine (381, 382). En plus d'étudier l'adhésion des SNA à ces protéines, il serait pertinent d'étudier l'influence des SNA sur l'expression de ces gènes responsables de la minéralisation, de la prolifération et de la calcification du tissu osseux.

En ce qui concerne la phase minérale osseuse, celle-ci est essentiellement constituée de cristaux d'hydroxyapatite, un phosphate de calcium, qui est à l'origine de la rigidité du tissu osseux. Les dépôts de cristaux d'hydroxyapatite sont synthétisés et déposés par les ostéoblastes au cours de la minéralisation. Il faut noter que les biomatériaux orthopédiques sont de plus en plus souvent revêtus d'une couche d'hydroxyapatite dans le but d'obtenir une ostéointégration plus rapide et un ancrage plus résistant. Ainsi, dans des travaux futurs, il serait intéressant d'étudier l'interaction entre les SNA et ce composant principal de la matrice minérale.

En conclusion, ce travail de thèse a permis de répondre à plusieurs interrogations portant sur la physiopathologie des IOA liées aux SNA. Nous rapportons ici, pour la première fois que d'autres espèces en dehors de *S. aureus*, en l'occurrence *S. pseudintermedius* et *S. delphini*, sont capables de s'internaliser et de persister dans les cellules osseuses via une voie FnBP-like/Fibronectine/intégrine $\alpha_5\beta_1$. Nos travaux ont également contribué à mieux comprendre le caractère hypervirulent de l'espèce *S. pseudintermedius*, principalement médié par la sécrétion des PFTs. De façon intéressante, les 3 seules espèces présentant une capacité d'internalisation,

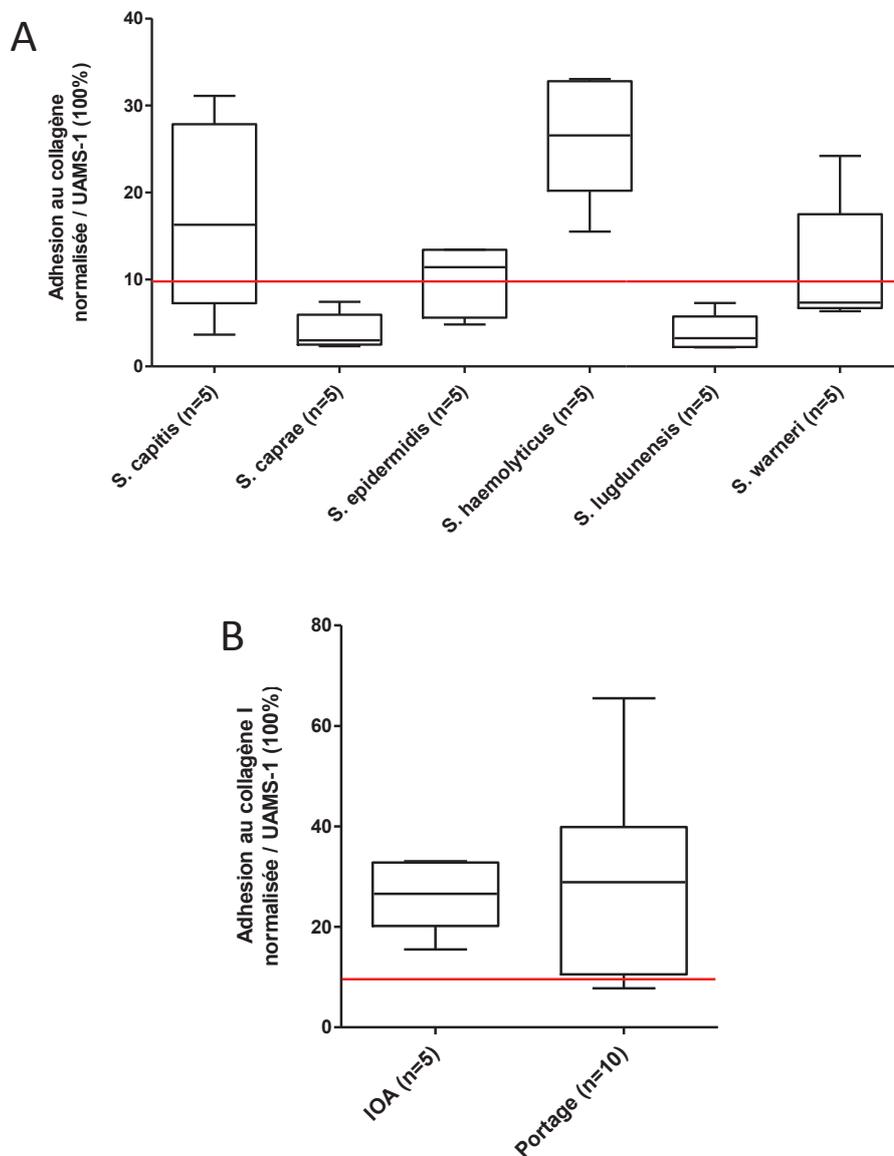
appartiennent au groupe des staphylocoques à coagulase-positif (SCoP), ce qui soulève la question d'une relation co-évolutive entre la présence d'une coagulase libre et les FnBP-like. L'autre question est de savoir si d'autres SNA, appartenant à certains des autres groupes phylogénétiques au sein des 51 espèces du genre *Staphylococcus*, sont capables de s'internaliser au sein des cellules phagocytaires non professionnelles.

Compte tenu des résultats présentés ici, ce travail souligne l'importance de prendre en considération l'implication des mécanismes physiopathologiques dans les choix thérapeutiques. En effet, il devient dès lors important s'intéresser à l'action intra-cellulaire des anti-staphylococciques en tenant compte de plusieurs paramètres pouvant influencer cette activité : la diffusion de la molécule utilisée vers le milieu intra-cellulaire, l'existence d'un potentiel efflux, sa répartition au sein des compartiments cellulaires, sa métabolisation par les enzymes cellulaires, et l'impact de l'environnement cellulaire (et notamment du pH) sur son efficacité.

L'observation d'un biofilm mature sur les biomatériaux utilisés en chirurgie orthopédiques pour les espèces *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* et *S. capitis* doit également nous amener à tenir compte de l'implication de ce mécanisme physiopathologique dans les choix thérapeutiques. Il est ainsi clairement établi que la rifampicine en association, généralement avec une quinolone (ciprofloxacine, lévofloxacine) est particulièrement efficace contre les bactéries en biofilm au sein des IOA. Cela nous interroge sur la pertinence de ce type de traitement en cas d'IOA liées aux autres espèces. La mise au point de modèles *ex vivo* et *in vivo* visant à identifier ou évaluer de nouvelles molécules « anti-biofilm » et/ou « anti-persisters » devrait dans le futur permettre de modifier en profondeur la thérapeutique utilisée en l'adaptant sur la base de l'espèce, de la souche et des mécanismes physiopathologiques associés.

ANNEXES

Annexe 1: Adhésion au collagène de type I des *Staphylococcus non-aureus*



Adhésion des SNA au collagène de type I. **A)** Des tests d'adhésion au collagène de type I ($50\mu\text{g.mL}^{-1}$) ont été réalisés sur notre collection de souches cliniques issues d'IOA. Trois expériences ont été réalisées en quadruplicat. Les résultats sont normalisés en fonction du témoin positif *S. aureus* UAMS-1. Les résultats obtenus pour le témoin négatif *S. aureus* Newman, sont représentés par la barre rouge. Les résultats sont exprimés en box plot (5-95 percentile) ; **B)** Comparaison des capacités d'adhésion au collagène de type I des souches issues d'IOA et de portage de l'espèce *S. haemolyticus*.

Annexe 2: High intraspecific genetic diversity of *Nocardia brasiliensis*, a pathogen responsible for cutaneous nocardiosis found in France: phylogenetic relationships by using *sod* and *hsp65* Genes.

Cette étude a porté sur la caractérisation génétique et les relations phylogénétiques de l'espèce *Nocardia brasiliensis* en se focalisant sur les gènes de ménage *rrs*, *hsp65* et *sodA*. *N. brasiliensis* est responsable à elle seule de 80% des actinomycétomes, une forme de nocardiose cutanée qui survient principalement dans les régions tropicales atteignant des patients immunocompétents dans lesquels la maladie peut conduire à une amputation et à la mort dans les cas les plus sévères. Trente-six cas autochtones de *N. brasiliensis* survenus en France ont été analysés dans cette étude. L'analyse phylogénétique ciblant le gène *rrs* n'a montré aucune robustesse au niveau des nœuds phylogénétiques. Cependant, l'analyse par concaténation des gènes *hsp65* et *sodA* a montré que les souches testées se classaient de manière surprenante dans 3 génotypes bien définis. Les génotypes 2 et 3 étaient phylogénétiquement plus proches l'un de l'autre et les deux divergeaient du génotype 1, soutenus par un bootstrap élevé de 81%. Ce dernier génotype héberge tous les cas de formes pulmonaires (3), l'unique forme cérébrale, et presque tous les cas de patients immunodéprimés (3 sur 4). La diversité haplotypique (Hd) des gènes *hsp65* (0,927) et *sodA* (0,885) était supérieure à celle des gènes *rrs* (0,824). En effet, 16 sites polymorphiques ont été retrouvés chez *rrs*, alors que pour les gènes *hsp65* et *sodA*, 27 et 29 ont été identifiés, respectivement. Cette étude révèle que ces deux gènes ont un pouvoir discriminatoire génétique important pour l'évaluation de la variabilité génétique intraspécifique de *N. brasiliensis* et qu'ils peuvent être utiles à des fins d'identification au niveau de l'espèce. Cette étude révèle également l'existence possible d'une nouvelle espèce hébergée par le génotype 1. Mon expertise dans ce travail a été de réaliser les alignements concaténés des séquences *hsp65* et *sodA* de l'ensemble des souches de la collection à l'aide du logiciel SeaView (Version 4.6.3; PRABI, Lyon, France). Ce travail a été publié dans le journal « BioMed Research International » (IF = 2.6, Rang C).

Research Article

High Intraspecific Genetic Diversity of *Nocardia brasiliensis*, a Pathogen Responsible for Cutaneous Nocardiosis Found in France: Phylogenetic Relationships by Using *sod* and *hsp65* Genes

D. Kosova-Maali,¹ E. Bergeron,¹ Y. Maali,² T. Durand,³ J. Gonzalez,⁴ D. Mounié,¹
H. Sandoval Trujillo,⁴ P. Boiron,¹ M.-C. Salinas-Carmona,⁵ and V. Rodriguez-Nava ^{1,3}

¹Research Group on “Bacterial Opportunistic Pathogens and Environment”, UMR Ecologie Microbienne, CNRS 5557, INRA 1418, UCBL, Université de Lyon, VetAgro Sup, Faculté de Pharmacie, 8 avenue Rockefeller, Lyon, France

²Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS de Lyon, Team “Pathogenesis of Staphylococcal Infections”, Université de Lyon 1, Lyon, France

³Laboratoire de Bactériologie, Institut des Agents Infectieux, Centre de Biologie et Pathologie Nord, 103 grande rue de la Croix-Rousse, 69004 Lyon, France

⁴Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, 04960 Ciudad de México, Mexico

⁵Facultad de Medicina, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Monterrey, NL, Mexico

Correspondence should be addressed to V. Rodriguez-Nava; veronica.rodriguez-nava@univ-lyon1.fr

Received 9 February 2018; Accepted 31 March 2018; Published 20 May 2018

Academic Editor: Charles Spencer

Copyright © 2018 D. Kosova-Maali et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

This study aims at genetic characterization and phylogenetic relationships of *Nocardia brasiliensis* focusing by using housekeeping *rrs*, *hsp65*, and *sodA* genes. *N. brasiliensis* is the species responsible for 80% of cases of actinomycetoma, one form of cutaneous nocardiosis which occurs mainly in tropical regions reaching immunocompetent patients in which the disease can lead to amputation. We analyze 36 indigenous cases of *N. brasiliensis* that happened in France. Phylogenetic analysis targeting *rrs* gene showed no robustness at phylogenetic nodes level. However, the use of a concatenation of *hsp65* and *sodA* genes showed that the tested strains surprisingly ranked in 3 well-defined genotypes. Genotypes 2 and 3 were phylogenetically closer to each other and both diverged from genotype 1 sustained by a high bootstrap of 81%. This last genotype hosts all the cases of pulmonary forms (3), the sole cerebral form, and almost all the cases of immunocompromised patients (3 out of 4). Moreover, excepting one of them, all the strains belonging to this group present a susceptibility to imipenem which is not the case in the other genotypes that rarely count among them strains being susceptible to this drug. The haplotype diversity (Hd) of *hsp65* (0.927) and *sodA* (0.885) genes was higher than that of *rrs* (0.824). For this gene, we obtained 16 polymorphic sites whereas, for *hsp65* and *sodA* genes, up to 27 and 29 were identified, respectively. This study reveals that these two genes have an important genetic discriminatory power for the evaluation of the intraspecies genetic variability of *N. brasiliensis* and they may be useful for identification purposes at species level. This study also reveals the possible existence of a new species harbored by genotype 1.

1. Introduction

Nocardia is a genus belonging to the aerobic actinomycetes group of bacteria which are Gram-positive bacilli and showing branching filamentous forms [1]. They are

saprophytic ubiquitous bacteria which can be found in several environments such as fresh water and saltwater, soil, dust, decaying vegetation, and decaying fecal deposits from animals [1]. Nevertheless, these environmental bacteria can be opportunistic pathogens and lead to human

infectious diseases called “nocardiosis” [2]. Nocardiosis can be discriminated into two groups: invasive infection, mainly caused by *N. asteroides*, presenting commonly as pneumonia in patients who are immunocompromised, have underlying chronic lung disease, and are with a possible dissemination to other organs [3], and cutaneous infection via a cut or abraded skin, which can be manifest clinically as (i) abscess and cellulitis, (ii) lymphangitis, (iii) skin infection secondary to dissemination, and (iv) actinomycetoma. This latter group is the most amazing infection due to their severity characterized by the presence of tumefaction, subcutaneous nodules, destructive granulomata, fistulas, and pus [2, 4].

N. brasiliensis is the species isolated from the majority (approximately 80%) of cases of cutaneous nocardiosis, especially in actinomycetoma [2]. This species is more commonly isolated in areas with tropical or subtropical climates such as South America, Asia, and Africa. Due to false diagnosis, rural lifestyles, and poor access to care in these countries, *N. brasiliensis* nocardiosis constitutes a real public health problem that can lead, in the absence of treatment, to amputations and death in young populations. On the basis of epidemiological surveys conducted in France, the number of cases of nocardiosis between 2000 and 2007 according to the French Nocardiosis Observatory (OFN) was 607 with *N. farcinica* and *N. nova* being the most frequent species [5]. However, no data currently exists on the phylogenetic relationships between the indigenous *N. brasiliensis* strains of tropical origin and native strains isolated in France. Routine genus/species identification of *Nocardia* was based on macroscopic, microscopic, and biochemical characteristics. The methods described by Boiron et al. [6] were used to determine the decomposition of adenine, casein, hypoxanthine, tyrosine, and xanthine. In addition to the phenotype-based methods, species-level identification is mainly genetically based, nowadays. Classically, 16S rRNA (*rrs*) gene sequencing is generally used for the species-level identification [7, 8], but it fails to discriminate among some species of *Nocardia* because it does not have enough polymorphism to differentiate them at the species level. Multilocus sequence analysis (MLSA) using concatenated sequences of several housekeeping genes such as superoxide dismutase A (*sodA*) and heat shock protein 65 (*hsp65*) has been increasingly used to provide higher accuracy and discriminatory power in the molecular identification of *Nocardia* spp. [9, 10]. Indeed, a recent study seeking to identify new molecular targets shows that the polymorphism observed in the *sodA* gene sequence contains variable regions that allow the discrimination of closely related *Nocardia* species [9].

The aim of the present study was to perform a genetic characterization and assess the phylogenetic relationships of *Nocardia brasiliensis* focusing on using housekeeping *rrs*, *hsp65*, and *sodA* genes, for 36 autochthonous *N. brasiliensis* strains isolated in France and analyzed by the OFN between 2002 and 2012. Phenotypic characterization was also conducted by assessing antimicrobial resistance profiles, metabolic profiles, and culture condition.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial Strains and Culture Media. A collection of 36 human clinical strains of *N. brasiliensis* was studied (Table 1). All strains were identified as such, at species level by the French Nocardiosis Observatory (OFN) by genetic approach. Moreover, six *Nocardia* reference strains belonging to *N. brasiliensis* clade [9] were also used: *N. brasiliensis* ATCC 19296^T (unknown), *N. altamirensis* DSM 44997^T (karstic cave), *N. boironii* DSM 101696^T (pus sample), *N. iowensis* DSM 45197^T (garden soil), *N. tenerifensis* DSM 44704^T (rhizosphere), and *N. vulneris* DSM 45737^T (human leg wound). Prior to the assays, strains were cultured 72 hours in Bennett medium (made in the laboratory) aerobically at 37°C.

2.2. Growth Test on Culture Media. From 0.5 McF bacterial suspension, bacterial growth was evaluated on three culture media: (i) bromocresol purple (BCP) (Biomérieux, Marcy l'Étoile), (ii) Bennett (made in the laboratory), and (iii) Middlebrook (Biomérieux, Marcy l'Étoile). One hundred microliters from bacterial suspension standardized was inoculated on the different plate of culture media. The plates were incubated at 37°C and the observations were performed at 48, 72, and 96 hours.

2.3. Antimicrobial Susceptibility. The susceptibility of the isolates to different antimicrobials was determined by disk diffusion method with a panel of 31 antibiotics (Biorad, Marnes-la-Coquette France) on Muller Hinton E medium (Biomérieux, Marcy l'Étoile, France). Susceptibility testing was done with amikacin 30 µg, gentamycin 15 µg, tobramycin 10 µg, ciprofloxacin 5 µg, levofloxacin 5 µg, moxifloxacin 5 µg, minocycline 30 µg, doxycycline 30 µg, tigecycline 15 µg, cefotaxime 30 µg, ceftriaxone 30 µg, cefepime 30 µg, cefuroxime 30 µg, amoxicillin 25 µg, amoxicillin + clavulanic acid 20/10 µg, ampicillin 10 µg, ertapenem 10 µg, meropenem 10 µg, imipenem 10 µg, vancomycin 30 µg, pristinamycin 15 µg, erythromycin 15 µg, trimethoprim + sulfamethoxazole 1.25/23.75 µg, rifampicin 30 µg, and linezolid 30 µg.

From visible colonies, bacterial suspension was done in sterile water, using a cotton swab to obtain a concentration of 0.5 McFarland according to the Clinical and Laboratory Standards Institute standard M24-A2 [11]. Seeding was done according to the swab method. In this latter, the bacterial inoculum was spread on the agar using a sterile cotton swab in three different directions. The disks were dispensed with a dispenser and the plates were incubated at 37°C for 72 hours and read manually according to the thresholds defined in the recommendations of the SFM 2013 [12].

2.4. Substrate Degradation. The methods of Boiron et al. [6], Goodfellow et al. [13, 14], and Goodfellow and Lechevalier [15] were used to determine the decomposition of adenine, casein, and uric acid [9]. Clinical strains of *N. brasiliensis* and the strains of species belonging to the *N. brasiliensis* clade (*N. brasiliensis*, *N. altamirensis*, *N. iowensis*, *N. tenerifensis*, *N. boironii*, and *N. vulneris*) were tested [9]. Strains *N. boironii*

TABLE 1: Table of clinical strains including the type of tropism observed in host, their corresponding *sodA/isp65* genotypes, and drug phenotypes.

Sample date	Nature of sampling	Patient record	Immunosuppressed	Genotype <i>sodA/isp65</i>	Tropism	Pristinamycin	Imipenem	Amikacin	Trimethoprim + sulfamethoxazole
04/2002	Intraoperative tissue	02.56	No	G3	Cutaneous	R	R	S	S
12/2003	Pus from cutaneous thigh abscess	04.21	Yes	G1	Cutaneous	R	S	S	S
2004	Pus from cutaneous abscess	04.101	No	G3	Cutaneous	R	R	S	S
07/2005	Expectoration then LBA	05.64	Yes	G1	Lung	R	S	S	S
01/2005	Skin biopsy	05.12	No	G1	Cutaneous	R	S	S	S
07/2005	Phalanx biopsy	05.63	No	G3	Cutaneous	R	R	S	S
2005	CSF	05.77	No	G1	Brain	R	R	S	S
11/2005	-	3247	No	G3	Unknown	R	S	S	S
2007	Cutaneous abscess	07.168	No	G3	Cutaneous	R	R	S	S
10/2008	Wound of forehead	08.178	No	G3	Cutaneous	R	S	S	S
11/2008	Subcutaneous abscess	08.188	No	G3	Subcutaneous	R	R	S	S
10/2008	Elbow abscess	2985	No	G3	Cutaneous	R	R	S	S
03/2008	-	9044	No	G2	Unknown	R	R	S	S
03/2009	Pus of leg abscess	09.71	No	G2	Cutaneous	R	S	S	S
04/2009	Bronchial aspiration	09.106	No	G1	Lung	R	S	S	S
10/2009	Bronchial aspiration	09.244	Yes	G1	Lung	R	S	S	S
12/2009	Finger skin	09.280	No	G3	Cutaneous	R	R	S	S
10/2009	Pus from the lip	10.16	No	G3	Cutaneous	R	R	S	S
02/2010	Finger abscess	10.35	No	G2	Cutaneous	R	R	S	S
05/2010	Hand abscess	10.82	No	G3	Cutaneous	R	R	S	S
05/2010	Toe abscess	10.93	Yes	G3	Cutaneous	R	R	S	S
09/2010	Leg wound	10.146	No	G3	Cutaneous	R	R	S	S
11/2010	Pus finger	10.180	No	G3	Cutaneous	R	R	S	S
11/2010	Leg wound	12786	No	G2	Cutaneous	R	R	S	S
04/2010	-	14229	No	G2	Unknown	R	S	S	S
07/2010	Sepsis hand	45762	No	G3	Cutaneous	R	R	S	S
2011	Pus	11.44	No	G2	Cutaneous	R	R	S	S
05/2011	Cutaneous abscess	11.73	No	G1	Cutaneous	R	S	S	S
05/2011	Hand wound	11.80	No	G1	Cutaneous	R	S	S	S
08/2011	Cutaneous	11.116	No	G2	Cutaneous	R	R	S	S
2011	Thigh abscess	11.140	No	G2	Cutaneous	R	R	S	S
09/2011	Knee wound	11.151	No	G3	Cutaneous	R	R	S	S
2011	Hand wound	11.172	No	G3	Cutaneous	R	R	S	S
12/2011	Cutaneous abscess	11.189	No	G3	Cutaneous	R	R	S	S
2012	-	12.08	No	G1	Unknown	R	S	S	S
02/2012	Cutaneous abscess	12.28	No	G3	Cutaneous	R	R	S	S

DSM 101696^T, *N. brasiliensis* ATCC 19296^T, and *N. vulneris* DSM 45737^T were incubated at 37°C, and *N. altamirensis* DSM 44997^T, *N. tenerifensis* DSM 44704^T, and *N. iowensis* DSM 45197^T were incubated at 28°C [9]. The readings were performed at 3, 7, 10, 14, 17, and 21 days.

2.5. Methods of DNA Extraction. DNA extraction from *Nocardia* strains was performed with achromopeptidase according to the method reported by Rodríguez-Nava et al. [10]. Colonies were picked off with a loop, and one loopful was suspended in 200 µL of sterile water containing a dozen glass beads and vortexed for 5 minutes. The mixture was then incubated for 15 minutes at 70°C. The suspension supplemented with 3.4 µL of achromopeptidase (Sigma, Steinheim, Germany) at 10 U/mL was incubated at 55°C for 15 minutes. The suspensions were then centrifuged for 5 minutes at 13,000 rpm. The supernatants were stored at -20°C until use.

2.6. Amplification and Sequencing

Gene *rrs*. A 606-bp fragment of the *rrs* gene was amplified with primers Noc1, 5'-GCTTAACACATGCAAGTCG-3', and Noc2, 5'-GAATTCAGTCTCCCCTG-3', and PCR program and reaction mixture were carried out according to the recommendations of Rodríguez-Nava et al. [10].

Gene *hsp65*. A 441-bp fragment of the *hsp65* gene encoding the 65-kDa heat shock protein was amplified with primers described by Telenti et al. (TB11: 5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3' and TB12: 5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT-3') [16]. PCR program and reaction mixture were carried out according to the recommendations of Sánchez-Herrera et al. [17].

Gene *sodA*. A 440-bp fragment of the *sodA* gene was amplified and sequenced with primers SodV1 (5'-CAC CAY WSC AAG CAC CA-3') and SodV2 (5'-CCT TAG CGT TCT GGT ACT G-3') where Y = C or T, W = A or T, and S = C or G. The amplification was also done according to the recommendations of Sánchez-Herrera et al. [17].

All resulting PCR products were sequenced and verified (Biofidal, Lyon, France).

The breakpoints for identification based in *sodA* and *hsp65* genes are 99% for each one [17, 18]. For the *rrs* gene, a higher breakpoint of 99.6% is used, according to CLSI [19].

2.7. Phylogenetic Analysis. The *rrs* gene sequences which we obtained for the 36 clinical isolates of *N. brasiliensis* and the reference strains were aligned manually for the comparative phylogenetic analysis using the Seaview program.

MLSA was performed using *hsp65* and *sodA* sequences of the strains collection. The trimmed aligned sequences were concatenated in the order *sodA-hsp65* to generate an 846 bp sequence using the Seaview program. The Seaview program was also used to infer the evolutionary trees according to the neighbour-joining method [20] and Kimura's two-parameter model [21]. The robustness of the tree was performed with a bootstrap of 1000 replicates.

Taking into account the breakpoints for identification at species level of *sodA* and *hsp65* genes individually, the breakpoint for concatenated sequence has been also fixed at 99%.

2.8. DNA Polymorphism of *rrs*, *hsp65*, and *sodA* Genes. The number of haplotypes, the haplotype diversity (Hd), the number of polymorphic sites, and other variables were obtained with DnaSP software [22].

3. Results

3.1. Growth on Culture Medium. The three culture media allowed the growth of clinical strains of *N. brasiliensis*. The Bennett medium showed abundant and rapid growth (48 hours). Middlebrook medium showed strong growth but also it was slightly slower (72 hours). The BCP medium presented interesting results with good rapid growth at 48 hours. *N. brasiliensis* clade tested type strains showed similar patterns to the clinical strains, except that *N. boironii* had a difficult growth on BCP and no growth on Middlebrook; this seems a peculiarity of this species.

3.2. Antimicrobial Susceptibilities. Eight out of 31 antibiotic molecules tested were active on all the strains' collection: linezolid, tigecycline, trimethoprim + sulfamethoxazole, moxifloxacin, amikacin, amoxicillin + clavulanic acid, tobramycin, and gentamycin. Regarding the imipenem and pristinamycin molecules, resistance was observed on the majority of clinical isolates of *N. brasiliensis* (Table 1).

3.3. Degradation of Substrate. The assimilation test of adenine and uric acid proved negative for all the strains tested of the *N. brasiliensis* clade including clinical and reference ones. The casein degradation test showed that all clinical strains are able to metabolize casein except the clinical strain 12.28. In addition our result showed that some types of strains such as *N. vulneris*, *N. tenerifensis*, *N. boironii*, and *N. iowensis* are also able to degrade casein in the same way as *N. brasiliensis* except *N. altamirensis*. Casein is ultimately a marker that can be used for the phenotypic identification of the *N. brasiliensis* clade and not the *N. brasiliensis* species as it has been believed for many years.

3.4. Phylogeny. Primers Noc1 and Noc2 amplified the expected 606-bp fragment of the *rrs* gene for all the collection strains. Phylogenetic trees (Figure 1) based upon *rrs* showed homogeneity within clinical strains of *N. brasiliensis*. For this, the *rrs* gene is not relevant to show intraspecies diversity.

In addition, based upon the concatenation of *sodA* and *hsp65* housekeeping genes, the phylogenetic tree generated (Figure 2) had several distinct genotypes: (i) genotype 1 containing clinical strains, (ii) genotype 2 harboring some clinical strains, and (iii) genotype 3 harboring some clinical strains and *N. brasiliensis* ATCC 19296^T. For the tropical *N. brasiliensis* HJEG01 strain, it is observed that it does not belong to any of the 3 genotypes and is positioned alone

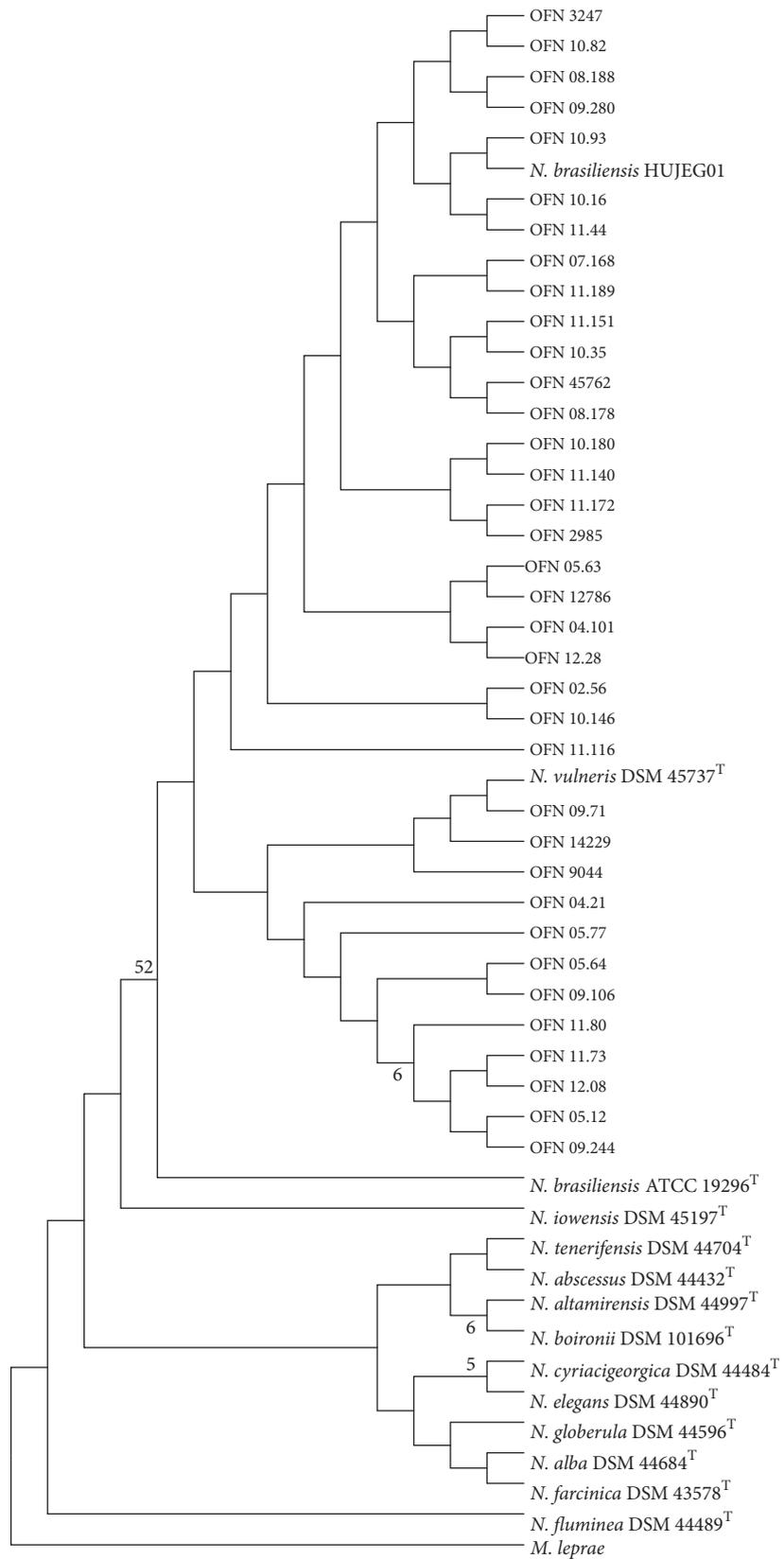


FIGURE 1: Phylogenetic distribution of *rrs* gene of 36 *N. brasiliensis* clinical strains analyzed in this study using neighbour-joining method, Kimura's two-parameter model, and bootstrap of 1000. Only values of bootstrap significance greater than 50% (Seaview) were reported.

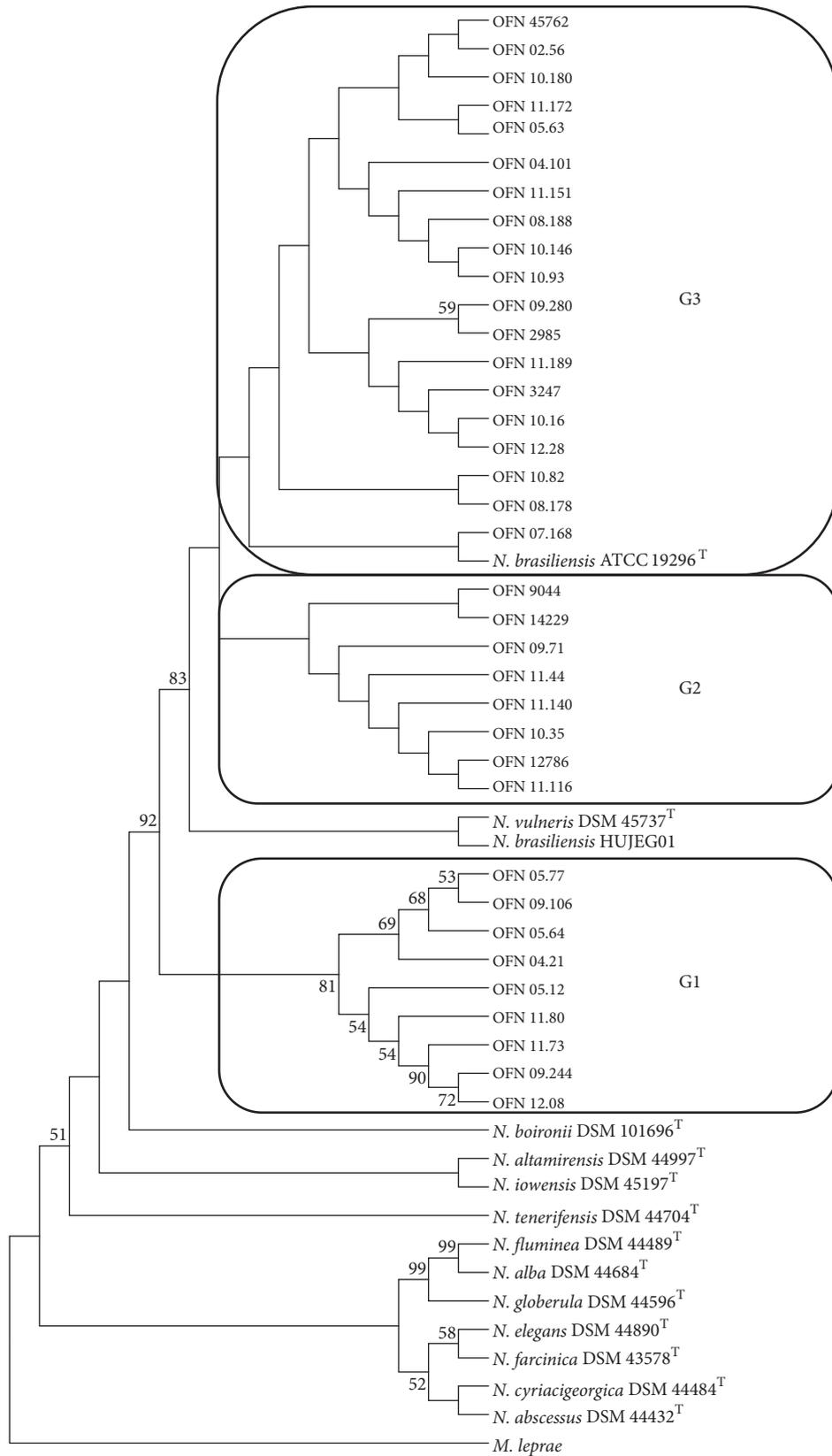


FIGURE 2: Phylogenetic distribution of concatenation *sodA-hsp65* genes of 36 *N. brasiliensis* clinical strains analyzed in this study using neighbour-joining method, Kimura's two-parameter model, and bootstrap of 1000. Only values of bootstrap significance greater than 50% were reported.

in the tree between genotypes 1 and 2. This distribution of clinical strains of *N. brasiliensis* in 3 different genotypes shows an intraspecies diversity rather important. To better understand the polymorphism showed by phylogenetic trees, we studied the percentages of the similarities between the sequences. The average percentages of similarities based on the *rrs* gene (Table 2) range from 99.39% to 99.57% between the clinical strains and the 2 reference strains of *N. brasiliensis* (type and tropical strains). According to the CLSI, the similarity percentage needed for identification at species level must be greater than or equal to a threshold of 99.6% [19]. The clinical strains that showed a similarity percentage lower than this threshold for both reference strains of *N. brasiliensis* were anyway considered as belonging to this species because no higher similarity percentage was obtained for any other species. In the same way, the *N. vulneris* type strain was also revealed to be close to clinical strains according to the average of percentage of similarity (98.77%). Between the 2 reference strains of *N. brasiliensis* the percentage of similarity is higher, up to 99.82%. The percentages of similarities based on the concatenation of the *sodA-hsp65* genes (Table 2) decrease and range now from 97.99% to 99.19% between the clinical strains and the 2 reference strains of *N. brasiliensis*. Between the type and reference strains of *N. brasiliensis* the percentage of similarity does not reach 99% this time. The comparison of the 3 genotypes between them (based on the representation of each genotype by 3 clinical strains) by using *sodA-hsp65* genes shows that genotypes 2 and 3 are closer to each other (98.97% of similarity). The average of the percentages of similarity between genotypes 1 and 2 were 97.97%. and 98.28% between genotypes 1 and 3. Finally this value goes up to 98.97% between genotypes 2 and 3. This means that the more distant genotypes between them are 1 and 2 and the closer ones are 2 and 3.

In parallel, an epidemiological study based on the clinical files was carried out, and the data were presented in Table 1. In order to know the link between the genetic diversity and the tropism of the clinical strains, a superposition of data was made between the phylogenetic tree obtained by the concatenation of *sodA* and *hsp65* and the tropism of the clinical strains (Figure 2). Thus, we can see that in genotypes 2 and 3 we have almost all the clinical strains that have a cutaneous tropism except the 08.188 strain which has a subcutaneous tropism. Regarding genotype 1 it is more heterogeneous with various tropism: (i) pulmonary, (ii) cerebral, and (iii) cutaneous. Regarding the immunocompetence of patients, we have only 4 patients who have immunodepression factors, whose strains are in genotype 1 except the 10.93 strain which is in genotype 3.

3.5. Analysis of *rrs*, *hsp65*, and *sodA* Genes Polymorphism. The 36 clinical strains and 2 reference strains of *N. brasiliensis* studied showed (i) for *rrs* gene 16 polymorphic sites sharing 16 haplotypes and showing a Hd of 0.824; (ii) for *hsp65* gene, 27 polymorphic sites and up to 22 different haplotypes with a Hd of 0.927; and, (iii) for *sodA* gene, up to 29 polymorphic sites sharing 14 haplotypes having a Hd of 0.885 (Table 3).

4. Discussion

Nocardia spp. are common soil-inhabiting bacteria that frequently infect humans through traumatic injuries or inhalation routes and cause infections, such as actinomycetoma and nocardiosis, respectively. *N. brasiliensis* is the main aetiological agent of actinomycetoma in various countries [23]. The input data used in this study highlight the existence of indigenous cases of cutaneous and subcutaneous (such as actinomycetoma) nocardiosis caused by *N. brasiliensis* in France. Moreover, we can observe that *N. brasiliensis* is also responsible for severe cases of disseminated nocardiosis in immunocompromised patients (pulmonary and cerebral cases).

To determine whether there is an association between clinical tropism of strains and their genetic profile we performed genetic characterization of 36 indigenous cases of *N. brasiliensis* that happened in France.

The three culture media allow the growth of clinical strains of *N. brasiliensis*. However, on Bennett's medium more abundant and fast growth (48 hours) was observed. But the downside of this medium is its inaccessibility in the hospital because it is not marketable. Middlebrook medium shows strong growth but also it was slightly slower (72 hours). This medium is very expensive and not accessible to all budgets. However, it is an interesting alternative in isolating *Nocardia* from a complex sample. It is a selective medium of Mycobacteria, which promotes the growth of some *Nocardia* to the detriment of other external bacteria or commensal flora that may be in the biological sample analyzed. The BCP medium, used routinely in hospitals for Gram-negative bacteria, has interesting results with good fast growth (48 hours). It would therefore be advisable to use it as isolation medium for urgent cases, by the speed of growth.

Antibiograms results show resistance of most of the clinical strains to imipenem. This can pose therapeutic problems since it is part of molecules proposed during a phase of a general treatment for nocardiosis [24]. However, all clinical strains of *N. brasiliensis* were sensible to SXT and would be an effective molecule during treatments. The sensibility of *N. brasiliensis* type strain to this antibiotic has already been observed by Gilquin et al. [9].

Our study confirms that all clinical strains of *N. brasiliensis* are capable of degrading casein except 12.28 clinical strain. As shown by Seol et al. the *N. brasiliensis* type strain is able to degrade casein as well [25]. However, the test on the reference strains reveals that *N. vulneris*, *N. tenerifensis*, *N. boironii*, and *N. iowensis* are also capable of degrading casein in the same way as *N. brasiliensis*, as also shown by Gilquin et al. [9]. This type of test is used in some countries without the necessary molecular biology tools to identify *N. brasiliensis*. But, now, they must be aware that with this test we target several species of clade *N. brasiliensis*. So, it is no longer a criterion of identification proper to *N. brasiliensis*.

Phylogenetic tree based on the *rrs* gene sequence of our collection showed a low genetic diversity resulting in low polymorphism sequence. In addition, we can note that *N. vulneris* DSM 45737^T, identified as a new species by Lasker et al., present a genetic sequence very close to *N. brasiliensis*

TABLE 2: Percentage of similarity expressed in interval and mean for *sodA-hsp65* and *rrs* genes.

	<i>N. brasiliensis</i> HUJEG01		<i>N. brasiliensis</i> ATCC 19296 ^T		<i>N. vulnneris</i> DSM 45737 ^T	
	<i>sodA-hsp65</i>	<i>rrs</i>	<i>sodA-hsp65</i>	<i>rrs</i>	<i>sodA-hsp65</i>	<i>rrs</i>
<i>N. brasiliensis</i> ATCC 19296 ^T	98.51	99.82	-	-	-	-
<i>N. vulnneris</i> DSM 45737 ^T	98.38	98.73	98.51	98.55	-	-
<i>N. altamirensis</i> DSM 44997 ^T	95.91	98.24	95.41	98.07	95.91	97.47
<i>N. boitronii</i> DSM 101696 ^T	96.53	98.07	96.28	97.89	96.15	97.29
<i>N. iowensis</i> DSM 45197 ^T	94.91	97.89	95.29	97.71	94.54	97.64
<i>N. tenerifensis</i> DSM 44704 ^T	96.28	96.67	96.03	96.49	95.91	96.03
Genotype 1	(97.77–98.38)	-	(97.77–98.26)	-	(97.52–98.14)	-
Similarity average (%)	98.01	-	97.99	-	97.67	-
Genotype 2	(98.39–98.88)	-	(98.88–99.38)	-	(98.63–98.88)	-
Similarity average (%)	98.73	-	99.19	-	98.80	-
Genotype 3	(98.14–98.88)	-	(98.26–99.00)	-	(98.01–98.76)	-
Similarity average (%)	98.63	-	98.76	-	98.50	-
All clinical strains	-	(98.57–100)	-	(98.38–99.82)	-	(98.01–99.09)
Similarity average (%)	-	99.57	-	99.39	-	98.77

TABLE 3: DNA polymorphism of *rrs*, *hsp65*, and *sodA* genes from clinical *N. brasiliensis* strains isolated in France.

<i>Nocardia</i> species	Genes (bp) ^a	Number of haplotypes (Hd, S ² , SD) ^b	Number of polymorphic sites
<i>N. brasiliensis</i> (N = 38: 36 clinical strains and 2 reference strains)	<i>rrs</i> (569)	16 (0.824, 0.00300, 0.055)	16
	<i>hsp65</i> (401)	22 (0.927, 0.00087, 0.029)	27
	<i>sodA</i> (406)	14 (0.885, 0.00080, 0.028)	29

^aResulting fragment size without the primers sequences; ^bHd: haplotype (gene) diversity, S²: variance of haplotype diversity, and SD: standard deviation of haplotype diversity.

strains [26] with percentages of similarities on average greater than 98%.

Analysis of the phylogenetic tree (Figure 2) based on the MLSA by the concatenation of *sodA* and *hsp65* housekeeping genes showed that the isolates are surprisingly classified according to 3 genotypes. These groups were formed upon similarity percentages and existing phylogenetic distances between the sequences of the strains studied. Genotype 1 concerns a well-defined cluster containing 9 clinical strains only which is sustained by a bootstrap of 81%. This genotype hosts all the cases of pulmonary forms (3), the sole cerebral form, and almost all the cases of immunocompromised patients (3 out of 4). Moreover, eight out of twelve strains susceptible to imipenem can be found in this group. There is just one remaining strain in this group not presenting this kind of susceptibility. The reason may be an acquired resistance to this drug due to a previous treatment. This well-defined genotype evokes the possible existence of another species or a strong variability in this case. This may have been caused by environmental pressures in the ecosystem of these isolates which may have resulted in the selection of strains that may have acquired, by mutations or genetic transfer with other microorganisms, new virulence characters different from that of the strain type *N. brasiliensis*. Regarding genotypes 2 and 3, they include clinical strains and *N. brasiliensis* ATCC 19296^T type strain. However, the discrimination between these 2 genotypes is less clear than that with genotype 1 because of being in weak bootstrap that is less than 50. The genetic differences do not allow distinguishing them properly and their phenotypic behavior remains similar. Then, it would be interesting to study on another gene capable of generating more divergences, for example, *gyrB* and *rpoB* genes, which have already successfully been used for studying the polymorphism of some other *Nocardia* species [27, 28].

Concerning the percentage of similarity between the type and tropical strain of *N. brasiliensis*, it is 99.82% according to the *rrs* and goes down to 98.51% with the concatenation of *sodA* and *hsp65*. The fact of highlighting a greater dissimilarity with the concatenation between the type and tropical *N. brasiliensis* strain shows the advantage of the use of 2 markers like *sodA* and *hsp65* vis-à-vis the *rrs*. The discriminatory power of these two genes may be explained by the presence of more polymorphic sites (*hsp65*: 27; *sodA*: 29) than in the case of *rrs* gene (16) and also by having Hd values higher than that of *rrs* gene (*hsp65*: 0.927; *sodA*: 0.885; *rrs*: 0.824).

It would be interesting to identify the genes involved in the virulence of different genotypes, including those of actinomycetoma. Interesting leads can be considered: (i) as

identification of virulence genes expressed using the RNAseq method or (ii) to identify noncoding RNAs [23]. In addition, to genomically distinguish *N. brasiliensis* and *N. vulneris* a specific PCR to *N. vulneris*, using a specific gene of the species, should be developed.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

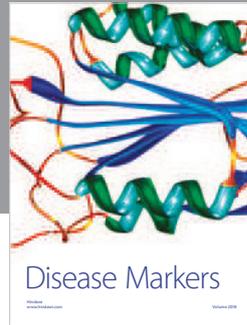
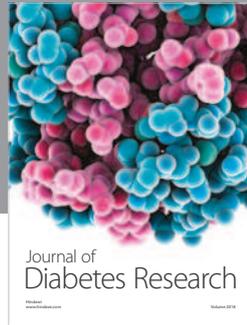
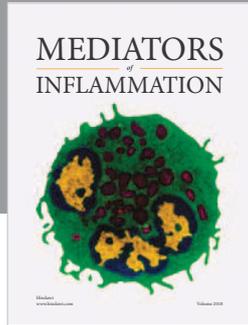
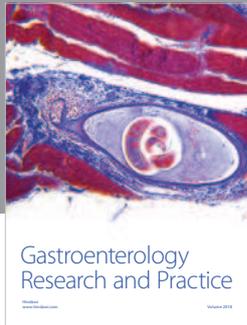
Acknowledgments

The authors thank Audrey Dubost for her technical support in bioinformatics analysis.

References

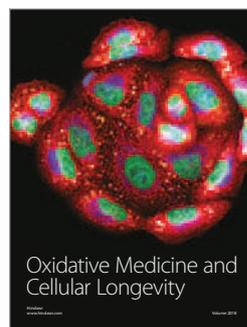
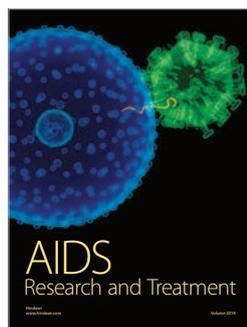
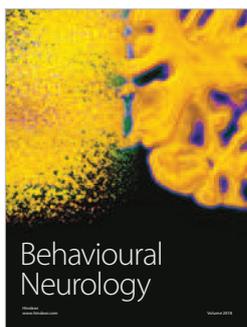
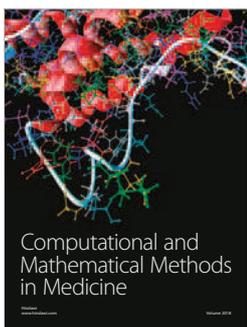
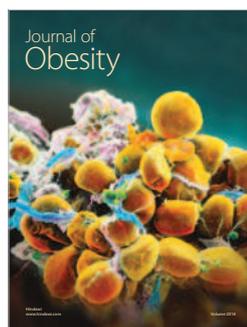
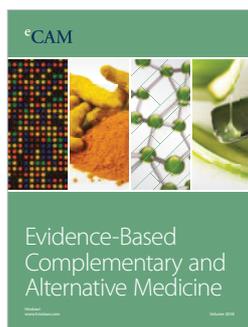
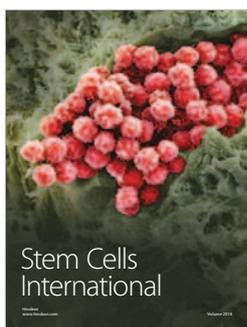
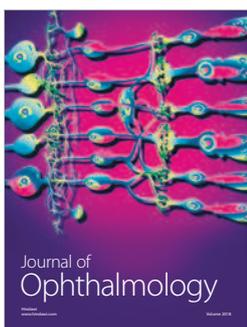
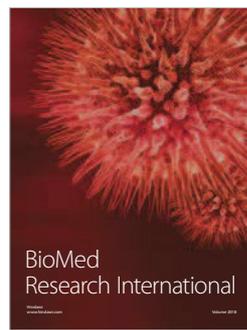
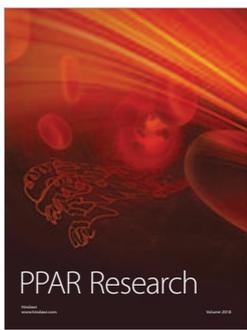
- [1] V. Kandi, "Human Nocardia Infections: A Review of Pulmonary Nocardiosis., Human Nocardia Infections: A Review of Pulmonary Nocardiosis," *Cureus Cureus*, vol. 7, no. 8, pp. e304–e304, 2015.
- [2] S. Maraki, S. Chochlidakis, E. Nioti, and Y. Tselentis, "Primary lymphocutaneous nocardiosis in an immunocompetent patient," *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, vol. 3, article no. 24, 2004.
- [3] M. A. Saubolle and D. Sussland, "Nocardiosis: review of clinical and laboratory experience," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 41, no. 10, pp. 4497–4501, 2003.
- [4] B. A. Brown-Elliott, J. M. Brown, P. S. Conville, and R. J. Wallace Jr., "Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 19, no. 2, pp. 259–282, 2006.
- [5] V. Rodriguez-Nava, D. Lebeaux, O. Lortholary, P. Boiron, and Nocardia., "Nocardia. Précis de Bactériologie Clinique," *Nocardia*, no. 2, 2007.
- [6] P. Boiron, F. Provost, and B. Dupont, "Technical protocols," In *Methodes de laboratoire pour le diagnostic de la nocardiose*, Institut Pasteur, Paris, France, 1993, 107-126.
- [7] A. Betrán, M. C. Villuendas, A. Rezusta, J. Pereira, M. J. Revillo, and V. Rodríguez-Nava, "Clinical significance, antimicrobial susceptibility and molecular identification of *Nocardia* species isolated from children with cystic fibrosis," *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 47, no. 3, pp. 531–535, 2016.
- [8] A. Ramírez-Radilla, V. Rodríguez-Nava, H. V. Silva-Rojas, M. Hernández-Tellez, H. Sandoval, and N. Ramírez-Durán, "Phylogenetic identification of *Nocardia brasiliensis* strains isolated from actinomycetoma in Mexico State using species-specific primers," *Journal de Mycologie Médicale*, vol. 21, no. 2, pp. 113–117, 2011.

- [9] J. M. Gilquin, B. Riviere, V. Jurado et al., "First Case of Actinomycetoma in France Due to a Novel," *mSphere*, vol. 1, no. 6, p. e00309-16, 2016.
- [10] V. Rodríguez-Nava, A. Couble, G. Devulder, J.-P. Flandrois, P. Boiron, and F. Laurent, "Use of PCR-restriction enzyme pattern analysis and sequencing database for hsp65 gene-based identification of *Nocardia* species," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 44, no. 2, pp. 536–546, 2006.
- [11] *Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic actinomycetes, Approved Standard*, vol. 56, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2011, M24-A2.
- [12] "CA-SFM, "Les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie," *Paris: Société Française de Microbiologie*, 2013.
- [13] M. Goodfellow, "The genus *Nocardia* Trevisan," in *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections*, A. Balows and B. I. Duerden, Eds., pp. 464–489, Edward Arnold, London, UK, 2 edition, 1998.
- [14] M. Goodfellow, *The family Nocardiaceae*, The prokaryotes, Springer, New York, NY, USA, 2 edition, 1992, 1188–1213.
- [15] M. Goodfellow and M. P. Lechevalier, "Genus *Nocardia* Trevisan," in *Bergey's manual of systematic bacteriology*, S. T. Williams, M. E. Sharpe, and J. G. Holt, Eds., vol. 4, pp. 2350–2361, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA, 1989.
- [16] A. Telenti, F. Marchesi, M. Balz, F. Bally, E. C. Böttger, and T. Bodmer, "Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 31, no. 2, pp. 175–178, 1993.
- [17] K. Sánchez-Herrera, H. Sandoval, D. Mouniee et al., "Molecular identification of *Nocardia* species using the *sodA* gene: Identificación molecular de especies de *Nocardia* utilizando el gen *sodA*," *New Microbes and New Infections*, vol. 19, pp. 96–116, 2017.
- [18] C. Y. Turenne, M. Semret, D. V. Cousins, D. M. Collins, and M. A. Behr, "Sequencing of *hsp65* distinguishes among subsets of the *Mycobacterium avium* complex," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 44, no. 2, pp. 433–440, 2006.
- [19] CLSI, "Interpretive Criteria for Identification of Bacteria and Fungi by DNA Target Sequencing," in *Approved Guideline. CLSI document MM18- A*, Wayne, PA, vol. CLSI document MM18- A, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2008.
- [20] J. A. Soddell, F. M. Stainsby, K. L. Eales, R. M. Kroppenstedt, R. J. Seviour, and M. Goodfellow, "Millisia gen. nov., sp. nov., an actinomycete isolated from activated sludge foam," *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 56, no. 4, pp. 739–744, 2006.
- [21] V. A. Steingrube, R. W. Wilson, B. A. Brown et al., "Rapid identification of clinically significant species and taxa of aerobic actinomycetes, including *Actinomadura*, *Gordona*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, and *Tsukamurella* isolates, by DNA amplification and restriction endonuclease analysis," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 35, no. 4, pp. 817–822, 1997.
- [22] J. Rozas, A. Ferrer-Mata, J. C. Sánchez-DelBarrio et al., "DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 34, no. 12, pp. 3299–3302, 2017.
- [23] J. S. Cruz-Rabadán, J. Miranda-Ríos, G. Espín-Ocampo, L. J. Méndez-Tovar, H. R. Maya-Pineda, and F. Hernández-Hernández, "Non-coding RNAs are differentially expressed by *Nocardia brasiliensis* in vitro and in experimental actinomycetoma," *The Open Microbiology Journal*, vol. 11, pp. 112–125, 2017.
- [24] S. Valdezate, N. Garrido, G. Carrasco et al., "Epidemiology and susceptibility to antimicrobial agents of the main *Nocardia* species in Spain," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 72, no. 3, pp. 754–761, 2017.
- [25] C.-A. Seol, H. Sung, D.-H. Kim, M. Ji, Y.-P. Chong, and M.-N. Kim, "The first Korean case of disseminated mycetoma caused by *Nocardia pseudobrasiliensis* in a patient on long-term corticosteroid therapy for the treatment of microscopic polyangiitis," *Annals of Laboratory Medicine*, vol. 33, no. 3, pp. 203–207, 2013.
- [26] B. A. Lasker, M. Bell, H.-P. Klenk, C. Spröer, P. Schumann, and J. M. Brown, "*Nocardia vulneris* sp. nov., isolated from wounds of human patients in North America," *Antonie van Leeuwenhoek-Journal of Microbiology*, vol. 106, no. 3, pp. 543–553, 2014.
- [27] L. R. McTaggart, S. E. Richardson, M. Witkowska, and S. X. Zhang, "Phylogeny and identification of *Nocardia* species on the basis of multilocus sequence analysis," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 48, no. 12, pp. 4525–4533, 2010.
- [28] G. Carrasco, S. Valdezate, N. Garrido, P. Villalón, M. J. Medina-Pascual, and J. A. Sáez-Nieto, "Identification, typing, and phylogenetic relationships of the main clinical *Nocardia* species in Spain according to their *gyrB* and *rpoB* genes," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 51, no. 11, pp. 3602–3608, 2013.



Hindawi

Submit your manuscripts at
www.hindawi.com



Annexe 3 : Liste des communications orales et affichées en congrès nationaux et internationaux

PRESENTATIONS SCIENTIFIQUES ORALES

Y. Maali, A. Monteix, PA. Clerc, J. Tasse, F. Valour, T. Ferry, J. Josse, S. Trouillet-Assant, F. Laurent. Biomatériaux orthopédiques et biofilm chez les staphylocoques à coagulase négative. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti Infectieuse (RICAI), 2018 (Paris, France).

Y. Maali, C. Badiou, P. Martins Simoes, E. Hodille, M. Bes, F. Vandenesch, G. Lina, A. Diot, F. Laurent, S. Trouillet-Assant. Understanding the virulence of *Staphylococcus pseudintermedius*: major role of pore forming toxins. ECCMID, 2018 (Madrid, Espagne)

Y. Maali, C. Badiou, P. Martins-Simoes, E. Hodille, D. Bouvard, M. Bes, F. Laurent, S. Trouillet-Assant. Interaction ostéoblastes-staphylocoques dans le cadre des infections ostéo-articulaires : Pouvoir cytotoxique de l'espèce *Staphylococcus pseudintermedius*. Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM), 2017, (Lyon, France).

Y. Maali, L. D'Anthouard, P. Martins-Simões, A. Monteix, F. Valour, F. Vandenesch, T. Ferry, F. Laurent, S. Trouillet-Assant. Pathophysiological mechanisms of bone and joint infections of coagulase negative Staphylococci: specific behavior of *S. lugdunensis*. ECCMID, 2017 (Vienne, Autriche).

Y. Maali, L. d'Anthouard, P. Martins-Simões, A. Jammot, A. Monteix, F. Valour, F. Vandenesch, T. Ferry, F. Laurent, S. Trouillet-Assant. Physiopathologies des infections ostéo-articulaires liées aux staphylocoques à coagulase-négative : spécificité de l'espèce *S. lugdunensis*. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti Infectieuse (RICAI), 2016 (Paris, France).

Y. Maali, C. Badiou, P. Martins-Simoes, E. Hodille, M. Bes, T. Ferry, F. Vandenesch, G. Lina, F. Laurent, S. Trouillet-Assant. *Staphylococcus intermedius* group: Hétérogénéité du comportement physiopathologique. SYMPOSTAPH 2016 (Lyon, France)

Y. Maali, F. Valour, D. Bouvard, F. Vandenesch, T. Ferry, F. Laurent, S. Trouillet-Assant. *Staphylococcus non-aureus* et mécanismes physiopathologiques des infections ostéo-articulaires: spécificité de l'espèce *S. pseudintermedius*. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti Infectieuse (RICAI), 2015 (Paris, France).

PRESENTATIONS SCIENTIFIQUES AFFICHEES

Y. Maali, C. Badiou, P. Martins-Simoes, E. Hodille, M. Bes, G. Lina, F. Valour, F. Laurent, S. Trouillet-Assant. Caractérisation des facteurs de virulence impliqués dans la cytotoxicité de *S. pseudintermedius*. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti Infectieuse (RICAI), 2017 (Paris, France).

Y. Maali, P. Martins-Simões, F. Valour, D. Bouvard, T. Ferry, F. Laurent, S. Trouillet-Assant. *Staphylococcus non-aureus* and pathophysiological mechanisms of bone and joint infections: interspecies heterogeneity and specific behaviour of the species *S. pseudintermedius*. ECCMID, 2016 (Amsterdam, Pays-Bas).

Y. Maali, P. Martins Simões, F. Valour, D. Bouvard, M. Bes, T. Ferry, F. Laurent, S. Trouillet-Assant. Investigation of the ability to be internalized in osteoblasts as a pathophysiological mechanism involved in *Staphylococcus non-aureus* bone and joint infection. EBJIS, 2016 (Oxford, Royaume-Uni).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Zhorne D, Bradford KK, Jhaveri R. Review of Pediatric Osteoarticular Infections. *Rev Recent Clin Trials*. 2017;12(4):260-8.
2. Graeber A, Cecava ND. Osteomyelitis, Vertebral. 2018 Jan.
3. Momodu, II, Savaliya V. Osteomyelitis. 2018 Jan.
4. Ross JJ. Septic Arthritis of Native Joints. *Infect Dis Clin North Am*. 2017 Jun;31(2):203-18.
5. Panteli M, Giannoudis PV. Chronic osteomyelitis: what the surgeon needs to know. *EFORT Open Rev*. 2016 May;1(5):128-35.
6. Akiyama T, Chikuda H, Yasunaga H, Horiguchi H, Fushimi K, Saita K. Incidence and risk factors for mortality of vertebral osteomyelitis: a retrospective analysis using the Japanese diagnosis procedure combination database. *BMJ Open*. 2013 Mar 25;3(3).
7. Grammatico-Guillon L, Baron S, Gettner S, Lecuyer AI, Gaborit C, Rosset P, et al. Bone and joint infections in hospitalized patients in France, 2008: clinical and economic outcomes. *J Hosp Infect*. 2012 Sep;82(1):40-8.
8. Laurent E, Gras G, Druon J, Rosset P, Baron S, Le-Louarn A, et al. Key features of bone and joint infections following the implementation of reference centers in France. *Med Mal Infect*. 2018 Jun;48(4):256-62.
9. Pandey R, Berendt AR, Athanasou NA. Histological and microbiological findings in non-infected and infected revision arthroplasty tissues. The OSIRIS Collaborative Study Group. Oxford Skeletal Infection Research and Intervention Service. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2000;120(10):570-4.
10. Sharma D, Douglas J, Coulter C, Weinrauch P, Crawford R. Microbiology of infected arthroplasty: implications for empiric peri-operative antibiotics. *J Orthop Surg (Hong Kong)*. 2008 Dec;16(3):339-42.
11. Uckay I, Pittet D, Vaudaux P, Sax H, Lew D, Waldvogel F. Foreign body infections due to *Staphylococcus epidermidis*. *Ann Med*. 2009;41(2):109-19.
12. Ogston A. Report upon Micro-Organisms in Surgical Diseases. *Br Med J*. 1881 Mar 12;1(1054):369 b2-75.
13. Bernatova S, Samek O, Pilat Z, Sery M, Jezek J, Jakl P, et al. Following the mechanisms of bacteriostatic versus bactericidal action using Raman spectroscopy. *Molecules*. 2013 Oct 24;18(11):13188-99.
14. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*. 2005 Dec;5(12):751-62.
15. Sollid JU, Furberg AS, Hanssen AM, Johannessen M. *Staphylococcus aureus*: determinants of human carriage. *Infect Genet Evol*. 2014 Jan;21:531-41.
16. Kleinschmidt S, Huygens F, Faoagali J, Rathnayake IU, Hafner LM. *Staphylococcus epidermidis* as a cause of bacteremia. *Future Microbiol*. 2015;10(11):1859-79.
17. Bannoehr J, Guardabassi L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Vet Dermatol*. 2012 Aug;23(4):253-66, e51-2.
18. Schleifer KH, Geyer U, Kilpper-Balz R, Devriese LA. Elevation of *Staphylococcus sciuri* subsp. *lentus* (Kloos et al.) to Species Status: *Staphylococcus lentus* (Kloos et al.) comb. nov. *Syst Appl Microbiol*. 1983;4(3):382-7.
19. Grice EA, Kong HH, Conlan S, Deming CB, Davis J, Young AC, et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science*. 2009 May 29;324(5931):1190-2.
20. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JL, Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*. 2009 Dec 18;326(5960):1694-7.
21. Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*. 2011 Apr;9(4):244-53.
22. Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA. The human skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*. 2018 Mar;16(3):143-55.

23. Trouillet-Assant S, Flammier S, Sapin A, Dupieux C, Dumitrescu O, Tristan A, et al. Mupirocin Resistance in Isolates of *Staphylococcus* spp. from Nasal Swabs in a Tertiary Hospital in France. *J Clin Microbiol.* 2015 Aug;53(8):2713-5.
24. Knox J, Uhlemann AC, Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections: transmission within households and the community. *Trends Microbiol.* 2015 Jul;23(7):437-44.
25. Pelz A, Wieland KP, Putzbach K, Hentschel P, Albert K, Gotz F. Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem.* 2005 Sep 16;280(37):32493-8.
26. Rossello-Mora R, Amann R. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev.* 2001 Jan;25(1):39-67.
27. Gevers D, Dawyndt P, Vandamme P, Willems A, Vancanneyt M, Swings J, et al. Stepping stones towards a new prokaryotic taxonomy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006 Nov 29;361(1475):1911-6.
28. Rossello-Mora R, Amann R. Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. *Syst Appl Microbiol.* 2015 Jun;38(4):209-16.
29. Wayne LG. International Committee on Systematic Bacteriology: announcement of the report of the ad hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A.* 1988 Jun;268(4):433-4.
30. Freney J, Kloos WE, Hajek V, Webster JA, Bes M, Brun Y, et al. Recommended minimal standards for description of new staphylococcal species. Subcommittee on the taxonomy of staphylococci and streptococci of the International Committee on Systematic Bacteriology. *Int J Syst Bacteriol.* 1999 Apr;49 Pt 2:489-502.
31. Takahashi T, Satoh I, Kikuchi N. Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol.* 1999 Apr;49 Pt 2:725-8.
32. Takahashi T, Kaneko M, Mori Y, Tsuji M, Kikuchi N, Hiramune T. Phylogenetic analyses of *Staphylococcus* based on the 16S rDNA sequence and assignment of clinical isolates from animals. *J Vet Med Sci.* 1997 Sep;59(9):775-83.
33. Trulzsch K, Rinder H, Trcek J, Bader L, Wilhelm U, Heesemann J. "*Staphylococcus pettenkoferi*," a novel staphylococcal species isolated from clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002 Jul;43(3):175-82.
34. Becker K, Harmsen D, Mellmann A, Meier C, Schumann P, Peters G, et al. Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol.* 2004 Nov;42(11):4988-95.
35. De Buyser ML, Morvan A, Aubert S, Dilasser F, el Solh N. Evaluation of a ribosomal RNA gene probe for the identification of species and subspecies within the genus *Staphylococcus*. *J Gen Microbiol.* 1992 May;138(5):889-99.
36. Taponen S, Simojoki H, Haveri M, Larsen HD, Pyorala S. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. *Vet Microbiol.* 2006 Jun 15;115(1-3):199-207.
37. Kwok AY, Su SC, Reynolds RP, Bay SJ, Av-Gay Y, Dovichi NJ, et al. Species identification and phylogenetic relationships based on partial HSP60 gene sequences within the genus *Staphylococcus*. *Int J Syst Bacteriol.* 1999 Jul;49 Pt 3:1181-92.
38. Poyart C, Quesne G, Boumaila C, Trieu-Cuot P. Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative staphylococci by using the *sodA* gene as a target. *J Clin Microbiol.* 2001 Dec;39(12):4296-301.
39. Drancourt M, Raoult D. *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol.* 2002 Apr;40(4):1333-8.
40. Martineau F, Picard FJ, Ke D, Paradis S, Roy PH, Ouellette M, et al. Development of a PCR assay for identification of staphylococci at genus and species levels. *J Clin Microbiol.* 2001 Jul;39(7):2541-7.

41. Ghebremedhin B, Layer F, Konig W, Konig B. Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial gap, 16S rRNA, hsp60, rpoB, sodA, and tuf gene sequences. *J Clin Microbiol.* 2008 Mar;46(3):1019-25.
42. Lamers RP, Muthukrishnan G, Castoe TA, Tafur S, Cole AM, Parkinson CL. Phylogenetic relationships among *Staphylococcus* species and refinement of cluster groups based on multilocus data. *BMC Evol Biol.* 2012 Sep 6;12:171.
43. von Eiff C, Arciola CR, Montanaro L, Becker K, Campoccia D. Emerging *Staphylococcus* species as new pathogens in implant infections. *Int J Artif Organs.* 2006 Apr;29(4):360-7.
44. Spaulding AR, Salgado-Pabon W, Kohler PL, Horswill AR, Leung DY, Schlievert PM. Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. *Clin Microbiol Rev.* 2013 Jul;26(3):422-47.
45. Faulkner L, Cooper A, Fantino C, Altmann DM, Sriskandan S. The mechanism of superantigen-mediated toxic shock: not a simple Th1 cytokine storm. *J Immunol.* 2005 Nov 15;175(10):6870-7.
46. Silversides JA, Lappin E, Ferguson AJ. Staphylococcal toxic shock syndrome: mechanisms and management. *Curr Infect Dis Rep.* 2010 Sep;12(5):392-400.
47. Xu SX, McCormick JK. Staphylococcal superantigens in colonization and disease. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2:52.
48. Fluor FS. [Staphylococcal toxin of toxic shock syndrome]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 2007 Sep-Oct(5):106-14.
49. Tuffs SW, Haeryfar SMM, McCormick JK. Manipulation of Innate and Adaptive Immunity by Staphylococcal Superantigens. *Pathogens.* 2018 May 29;7(2).
50. Chau TA, McCully ML, Brintnell W, An G, Kasper KJ, Vines ED, et al. Toll-like receptor 2 ligands on the staphylococcal cell wall downregulate superantigen-induced T cell activation and prevent toxic shock syndrome. *Nat Med.* 2009 Jun;15(6):641-8.
51. Fraser JD, Proft T. The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunol Rev.* 2008 Oct;225:226-43.
52. Crass BA, Bergdoll MS. Involvement of coagulase-negative staphylococci in toxic shock syndrome. *J Clin Microbiol.* 1986 Jan;23(1):43-5.
53. Parsonnet J, Harrison AE, Spencer SE, Reading A, Parsonnet KC, Kass EH. Nonproduction of toxic shock syndrome toxin 1 by coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol.* 1987 Aug;25(8):1370-2.
54. Kreiswirth BN, Schlievert PM, Novick RP. Evaluation of coagulase-negative staphylococci for ability to produce toxic shock syndrome toxin 1. *J Clin Microbiol.* 1987 Oct;25(10):2028-9.
55. Stach CS, Vu BG, Schlievert PM. Determining the Presence of Superantigens in Coagulase Negative Staphylococci from Humans. *PLoS One.* 2015;10(11):e0143341.
56. Lina G, Fleer A, Etienne J, Greenland TB, Vandenesch F. Coagulase-negative staphylococci isolated from two cases of toxic shock syndrome lack superantigenic activity, but induce cytokine production. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1996 Jan;13(1):81-6.
57. Argemi X, Nanoukon C, Affolabi D, Keller D, Hansmann Y, Riegel P, et al. Comparative Genomics and Identification of an Enterotoxin-Bearing Pathogenicity Island, SEPI-1/SECI-1, in *Staphylococcus epidermidis* Pathogenic Strains. *Toxins (Basel).* 2018 Feb 25;10(3).
58. Madhusoodanan J, Seo KS, Remortel B, Park JY, Hwang SY, Fox LK, et al. An Enterotoxin-Bearing Pathogenicity Island in *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol.* 2011 Apr;193(8):1854-62.
59. Park JY, Fox LK, Seo KS, McGuire MA, Park YH, Rurangirwa FR, et al. Detection of classical and newly described staphylococcal superantigen genes in coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. *Vet Microbiol.* 2011 Jan 10;147(1-2):149-54.
60. da Cunha Mde L, Calsolari RA, Junior JP. Detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase-negative staphylococci. *Microbiol Immunol.* 2007;51(4):381-90.

61. Zell C, Resch M, Rosenstein R, Albrecht T, Hertel C, Gotz F. Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. *Int J Food Microbiol.* 2008 Oct 31;127(3):246-51.
62. Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol Rev.* 2012 Jul;36(4):815-36.
63. Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res.* 2003 Mar 31;2(1):63-76.
64. Argudin MA, Mendoza MC, Rodicio MR. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins (Basel).* 2010 Jul;2(7):1751-73.
65. Alexandra Fetsch SJ. *Staphylococcus aureus* as a Foodborne Pathogen. *Current Clinical Microbiology Reports.* 2018;5(2):88–96.
66. Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *Biomed Res Int.* 2014;2014:827965.
67. Breckinridge JC, Bergdoll MS. Outbreak of food-borne gastroenteritis due to a coagulase-negative enterotoxin-producing staphylococcus. *N Engl J Med.* 1971 Mar 11;284(10):541-3.
68. Khambaty FM, Bennett RW, Shah DB. Application of pulsed-field gel electrophoresis to the epidemiological characterization of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food-related outbreak. *Epidemiol Infect.* 1994 Aug;113(1):75-81.
69. Bergdoll MS. Importance of staphylococci that produce nanogram quantities of enterotoxin. *Zentralbl Bakteriol.* 1995 Jan;282(1):1-6.
70. Veras JF, do Carmo LS, Tong LC, Shupp JW, Cummings C, Dos Santos DA, et al. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *Int J Infect Dis.* 2008 Jul;12(4):410-5.
71. Soares Casaes Nunes R, Mere Del Aguila E, Paschoalin VM. Safety Evaluation of the Coagulase-Negative Staphylococci Microbiota of Salami: Superantigenic Toxin Production and Antimicrobial Resistance. *Biomed Res Int.* 2015;2015:483548.
72. Hirooka EY, Muller EE, Freitas JC, Vicente E, Yoshimoto Y, Bergdoll MS. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus intermedius* of canine origin. *Int J Food Microbiol.* 1988 Dec;7(3):185-91.
73. Irlinger F. Safety assessment of dairy microorganisms: coagulase-negative staphylococci. *Int J Food Microbiol.* 2008 Sep 1;126(3):302-10.
74. Bukowski M, Wladyka B, Dubin G. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins (Basel).* 2010 May;2(5):1148-65.
75. Mishra AK, Yadav P, Mishra A. A Systemic Review on Staphylococcal Scalded Skin Syndrome (SSSS): A Rare and Critical Disease of Neonates. *Open Microbiol J.* 2016;10:150-9.
76. Hanakawa Y, Schechter NM, Lin C, Garza L, Li H, Yamaguchi T, et al. Molecular mechanisms of blister formation in bullous impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome. *J Clin Invest.* 2002 Jul;110(1):53-60.
77. Murray RJ. Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. *Intern Med J.* 2005 Dec;35 Suppl 2:S106-19.
78. Etienne J, Dumitrescu O. Panton-Valentine leucocidin associated *Staphylococcus aureus* infections. *BMJ.* 2009 Oct 16;339:b4083.
79. Kreienbuehl L, Charbonney E, Eggimann P. Community-acquired necrotizing pneumonia due to methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* secreting Panton-Valentine leukocidin: a review of case reports. *Ann Intensive Care.* 2011 Dec 22;1(1):52.
80. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, Bes M, et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet.* 2002 Mar 2;359(9308):753-9.

81. Spaan AN, Henry T, van Rooijen WJM, Perret M, Badiou C, Aerts PC, et al. The staphylococcal toxin Panton-Valentine Leukocidin targets human C5a receptors. *Cell Host Microbe*. 2013 May 15;13(5):584-94.
82. Tromp AT, Van Gent M, Abrial P, Martin A, Jansen JP, De Haas CJC, et al. Human CD45 is an F-component-specific receptor for the staphylococcal toxin Panton-Valentine leukocidin. *Nat Microbiol*. 2018 Jun;3(6):708-17.
83. Sawicki GS, Lu FL, Valim C, Cleveland RH, Colin AA. Necrotising pneumonia is an increasingly detected complication of pneumonia in children. *Eur Respir J*. 2008 Jun;31(6):1285-91.
84. Masters IB, Isles AF, Grimwood K. Necrotizing pneumonia: an emerging problem in children? *Pneumonia (Nathan)*. 2017;9:11.
85. Lee B, Bubeck Wardenburg J. A common approach to toxin specificity. *Nat Microbiol*. 2018 Jun;3(6):644-5.
86. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG, Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*. 2015 Jul;28(3):603-61.
87. McCaig LF, McDonald LC, Mandal S, Jernigan DB. *Staphylococcus aureus*-associated skin and soft tissue infections in ambulatory care. *Emerg Infect Dis*. 2006 Nov;12(11):1715-23.
88. Akiyama H, Kanzaki H, Tada J, Arata J. Coagulase-negative staphylococci isolated from various skin lesions. *J Dermatol*. 1998 Sep;25(9):563-8.
89. Shields BE, Tschetter AJ, Wanat KA. *Staphylococcus simulans*: An emerging cutaneous pathogen. *JAAD Case Rep*. 2016 Nov;2(6):428-9.
90. Natsis NE, Cohen PR. Coagulase-Negative *Staphylococcus* Skin and Soft Tissue Infections. *Am J Clin Dermatol*. 2018 Oct;19(5):671-7.
91. Rajan S. Skin and soft-tissue infections: classifying and treating a spectrum. *Cleve Clin J Med*. 2012 Jan;79(1):57-66.
92. Rich M. Staphylococci in animals: prevalence, identification and antimicrobial susceptibility, with an emphasis on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Br J Biomed Sci*. 2005;62(2):98-105.
93. Foster AP. Staphylococcal skin disease in livestock. *Vet Dermatol*. 2012 Aug;23(4):342-51, e63.
94. Sears PM, McCarthy KK. Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2003 Mar;19(1):171-85, vii.
95. Pyorala S, Taponen S. Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. *Vet Microbiol*. 2009 Feb 16;134(1-2):3-8.
96. Santos OC, Barros EM, Brito MA, Bastos Mdo C, Dos Santos KR, Giambiagi-Demarval M. Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis using RFLP-PCR of the groEL gene. *Vet Microbiol*. 2008 Jul 27;130(1-2):134-40.
97. Kudinha T, Simango C. Prevalence of coagulase-negative staphylococci in bovine mastitis in Zimbabwe. *J S Afr Vet Assoc*. 2002 Jun;73(2):62-5.
98. Ruscher C, Lubke-Becker A, Wleklinski CG, Soba A, Wieler LH, Walther B. Prevalence of Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from clinical samples of companion animals and equidae. *Vet Microbiol*. 2009 Apr 14;136(1-2):197-201.
99. Penna B, Vargas R, Medeiros L, Martins GM, Martins RR, Lilenbaum W. Species distribution and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine otitis externa. *Vet Dermatol*. 2010 Jun;21(3):292-6.
100. Breathnach RM, Baker KP, Quinn PJ, McGeady TA, Aherne CM, Jones BR. Clinical, immunological and histopathological findings in a subpopulation of dogs with pododermatitis. *Vet Dermatol*. 2005 Dec;16(6):364-72.
101. Park JH, Kang JH, Hyun JE, Hwang CY. Low prevalence of mupirocin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from canine pyoderma in Korea. *Vet Dermatol*. 2018 Apr;29(2):95-e37.

102. Weese JS, Faires M, Brisson BA, Slavic D. Infection with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* masquerading as cefoxitin susceptible in a dog. *J Am Vet Med Assoc.* 2009 Nov 1;235(9):1064-6.
103. Perreten V, Kadlec K, Schwarz S, Gronlund Andersson U, Finn M, Greko C, et al. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Jun;65(6):1145-54.
104. Haenni M, de Moraes NA, Chatre P, Medaille C, Moodley A, Madec JY. Characterisation of clinical canine methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* in France. *J Glob Antimicrob Resist.* 2014 Jun;2(2):119-23.
105. Alabi A, Kazimoto T, Lebughe M, Vubil D, Phaku P, Mandomando I, et al. Management of superficial and deep-seated *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections in sub-Saharan Africa: a post hoc analysis of the StaphNet cohort. *Infection.* 2018 Jun;46(3):395-404.
106. Thomer L, Schneewind O, Missiakas D. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections. *Annu Rev Pathol.* 2016 May 23;11:343-64.
107. Richard JL, Sotto A, Lavigne JP. New insights in diabetic foot infection. *World J Diabetes.* 2011 Feb 15;2(2):24-32.
108. Spanu T, Sanguinetti M, Ciccaglione D, D'Inzeo T, Romano L, Leone F, et al. Use of the VITEK 2 system for rapid identification of clinical isolates of Staphylococci from bloodstream infections. *J Clin Microbiol.* 2003 Sep;41(9):4259-63.
109. Huang CR, Lu CH, Wu JJ, Chang HW, Chien CC, Lei CB, et al. Coagulase-negative staphylococcal meningitis in adults: clinical characteristics and therapeutic outcomes. *Infection.* 2005 Apr;33(2):56-60.
110. Shin JH, Kim SH, Jeong HS, Oh SH, Kim HR, Lee JN, et al. Identification of coagulase-negative staphylococci isolated from continuous ambulatory peritoneal dialysis fluid using 16S ribosomal RNA, *tuf*, and *SodA* gene sequencing. *Perit Dial Int.* 2011 May-Jun;31(3):340-6.
111. Natsis NE, Cohen PR. Coagulase-Negative *Staphylococcus* Skin and Soft Tissue Infections. *Am J Clin Dermatol.* 2018 Jun 7.
112. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 2014 Oct;27(4):870-926.
113. Hugonnet S, Sax H, Eggimann P, Chevrolet JC, Pittet D. Nosocomial bloodstream infection and clinical sepsis. *Emerg Infect Dis.* 2004 Jan;10(1):76-81.
114. Petti CA, Simmon KE, Miro JM, Hoen B, Marco F, Chu VH, et al. Genotypic diversity of coagulase-negative staphylococci causing endocarditis: a global perspective. *J Clin Microbiol.* 2008 May;46(5):1780-4.
115. Bjorkqvist M, Liljedahl M, Zimmermann J, Schollin J, Soderquist B. Colonization pattern of coagulase-negative staphylococci in preterm neonates and the relation to bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010 Sep;29(9):1085-93.
116. Vandenesch F, Etienne J, Reverdy ME, Eykyn SJ. Endocarditis due to *Staphylococcus lugdunensis*: report of 11 cases and review. *Clin Infect Dis.* 1993 Nov;17(5):871-6.
117. Sampathkumar P, Osmon DR, Cockerill FR, 3rd. Prosthetic joint infection due to *Staphylococcus lugdunensis*. *Mayo Clin Proc.* 2000 May;75(5):511-2.
118. Choi SH, Chung JW, Lee EJ, Kim TH, Lee MS, Kang JM, et al. Incidence, characteristics, and outcomes of *Staphylococcus lugdunensis* bacteremia. *J Clin Microbiol.* 2010 Sep;48(9):3346-9.
119. Zinkernagel AS, Zinkernagel MS, Elzi MV, Genoni M, Gubler J, Zbinden R, et al. Significance of *Staphylococcus lugdunensis* bacteremia: report of 28 cases and review of the literature. *Infection.* 2008 Aug;36(4):314-21.
120. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol.* 2015 May;13(5):269-84.

121. Wallmark G, Arremark I, Telander B. *Staphylococcus saprophyticus*: a frequent cause of acute urinary tract infection among female outpatients. *J Infect Dis*. 1978 Dec;138(6):791-7.
122. Gupta K, Hooton TM, Wobbe CL, Stamm WE. The prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in young women. *Int J Antimicrob Agents*. 1999 May;11(3-4):305-8.
123. Zetola N, Francis JS, Nuermberger EL, Bishai WR. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect Dis*. 2005 May;5(5):275-86.
124. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis*. 2003 Aug;9(8):978-84.
125. Mediavilla JR, Chen L, Mathema B, Kreiswirth BN. Global epidemiology of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Curr Opin Microbiol*. 2012 Oct;15(5):588-95.
126. DeLeo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 2010 May 1;375(9725):1557-68.
127. Martins Simoes P, Rasigade JP, Lemriss H, Butin M, Ginevra C, Lemriss S, et al. Characterization of a novel composite staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec-SCCcad/ars/cop) in the neonatal sepsis-associated *Staphylococcus capitis* pulsotype NRCS-A. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Dec;57(12):6354-7.
128. Butin M, Martins-Simoes P, Picaud JC, Kearns A, Claris O, Vandenesch F, et al. Adaptation to vancomycin pressure of multiresistant *Staphylococcus capitis* NRCS-A involved in neonatal sepsis. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Nov;70(11):3027-31.
129. Butin M, Martins-Simoes P, Rasigade JP, Picaud JC, Laurent F. Worldwide Endemicity of a Multidrug-Resistant *Staphylococcus capitis* Clone Involved in Neonatal Sepsis. *Emerg Infect Dis*. 2017 Mar;23(3):538-9.
130. Lee JYH, Monk IR, Goncalves da Silva A, Seemann T, Chua KYL, Kearns A, et al. Global spread of three multidrug-resistant lineages of *Staphylococcus epidermidis*. *Nat Microbiol*. 2018 Oct;3(10):1175-85.
131. Fritz JM, McDonald JR. Osteomyelitis: approach to diagnosis and treatment. *Phys Sportsmed*. 2008 Dec;36(1):nihpa116823.
132. Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. *Lancet*. 2004 Jul 24-30;364(9431):369-79.
133. Kherani RB, Shojania K. Septic arthritis in patients with pre-existing inflammatory arthritis. *CMAJ*. 2007 May 22;176(11):1605-8.
134. Peltola H, Paakkonen M. Acute osteomyelitis in children. *N Engl J Med*. 2014 Jan 23;370(4):352-60.
135. Blyth MJ, Kincaid R, Craigen MA, Bennet GC. The changing epidemiology of acute and subacute haematogenous osteomyelitis in children. *J Bone Joint Surg Br*. 2001 Jan;83(1):99-102.
136. Jaramillo D, Dormans JP, Delgado J, Laor T, St Geme JW, 3rd. Hematogenous Osteomyelitis in Infants and Children: Imaging of a Changing Disease. *Radiology*. 2017 Jun;283(3):629-43.
137. Adrien Lemaignan RB, Jérôme Druon, Pascale Bémer, Guillaume Gras, Cédric Arvieux, Philippe Rosset, Louis Bernard. INFECTIONS OSTÉOARTICULAIRES (IOA) DE L'ENFANT ET DE L'ADULTE. *La Revue du praticien*. 2015;65.
138. Gustilo RB, Mendoza RM, Williams DN. Problems in the management of type III (severe) open fractures: a new classification of type III open fractures. *J Trauma*. 1984 Aug;24(8):742-6.
139. Gustilo RB, Anderson JT. Prevention of infection in the treatment of one thousand and twenty-five open fractures of long bones: retrospective and prospective analyses. *J Bone Joint Surg Am*. 1976 Jun;58(4):453-8.
140. Pendsey SP. Understanding diabetic foot. *Int J Diabetes Dev Ctries*. 2010 Apr;30(2):75-9.
141. Colavite PM, Sartori A. Septic arthritis: immunopathogenesis, experimental models and therapy. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2014;20:19.

142. Balato G, Di Donato SL, Ascione T, D'Addona A, Smeraglia F, Di Vico G, et al. Knee Septic Arthritis after Arthroscopy: Incidence, Risk Factors, Functional Outcome, and Infection Eradication Rate. *Joints*. 2017 Jun;5(2):107-13.
143. Boff D, Crijns H, Teixeira MM, Amaral FA, Proost P. Neutrophils: Beneficial and Harmful Cells in Septic Arthritis. *Int J Mol Sci*. 2018 Feb 5;19(2).
144. Kavanagh N, Ryan EJ, Widaa A, Sexton G, Fennell J, O'Rourke S, et al. Staphylococcal Osteomyelitis: Disease Progression, Treatment Challenges, and Future Directions. *Clin Microbiol Rev*. 2018 Apr;31(2).
145. Clinical guidelines for the antimicrobial treatment of bone and joint infections in Korea. *Infect Chemother*. 2014 Jun;46(2):125-38.
146. Mylona E, Samarkos M, Kakalou E, Fanourgiakis P, Skoutelis A. Pyogenic vertebral osteomyelitis: a systematic review of clinical characteristics. *Semin Arthritis Rheum*. 2009 Aug;39(1):10-7.
147. Kwon JW, Hyun SJ, Han SH, Kim KJ, Jahng TA. Pyogenic Vertebral Osteomyelitis: Clinical Features, Diagnosis, and Treatment. *Korean J Spine*. 2017 Jun;14(2):27-34.
148. Zimmerli W. Clinical presentation and treatment of orthopaedic implant-associated infection. *J Intern Med*. 2014 Aug;276(2):111-9.
149. Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM, et al. Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2013 Jan;56(1):e1-e25.
150. [Clinical practice recommendations. Osteoarticular infections on materials (prosthesis, implant, osteosynthesis]. *Med Mal Infect*. 2009 Nov;39(11):815-63.
151. Trampuz A, Zimmerli W. Diagnosis and treatment of implant-associated septic arthritis and osteomyelitis. *Curr Infect Dis Rep*. 2008 Sep;10(5):394-403.
152. Anagnostakos K, Schmid NV, Kelm J, Grun U, Jung J. Classification of hip joint infections. *Int J Med Sci*. 2009 Sep 1;6(5):227-33.
153. Tande AJ, Patel R. Prosthetic joint infection. *Clin Microbiol Rev*. 2014 Apr;27(2):302-45.
154. McPherson EJ, Tontz W, Jr., Patzakis M, Woodsome C, Holtom P, Norris L, et al. Outcome of infected total knee utilizing a staging system for prosthetic joint infection. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*. 1999 Mar;28(3):161-5.
155. McPherson EJ, Woodson C, Holtom P, Roidis N, Shufelt C, Patzakis M. Periprosthetic total hip infection: outcomes using a staging system. *Clin Orthop Relat Res*. 2002 Oct(403):8-15.
156. Vrgoc G, Japjec M, Gulan G, Ravlic-Gulan J, Marinovic M, Bandalovic A. Periprosthetic infections after total hip and knee arthroplasty--a review. *Coll Antropol*. 2014 Dec;38(4):1259-64.
157. Li C, Renz N, Trampuz A. Management of Periprosthetic Joint Infection. *Hip Pelvis*. 2018 Sep;30(3):138-46.
158. Kremers HM, Nwojo ME, Ransom JE, Wood-Wentz CM, Melton LJ, 3rd, Huddleston PM, 3rd. Trends in the epidemiology of osteomyelitis: a population-based study, 1969 to 2009. *J Bone Joint Surg Am*. 2015 May 20;97(10):837-45.
159. Wang X, Yu S, Sun D, Fu J, Wang S, Huang K, et al. Current data on extremities chronic osteomyelitis in southwest China: epidemiology, microbiology and therapeutic consequences. *Sci Rep*. 2017 Nov 24;7(1):16251.
160. Kurtz S, Ong K, Lau E, Mowat F, Halpern M. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *J Bone Joint Surg Am*. 2007 Apr;89(4):780-5.
161. Wilson N, Broatch J, Jehn M, Davis C, 3rd. National projections of time, cost and failure in implantable device identification: Consideration of unique device identification use. *Healthc (Amst)*. 2015 Dec;3(4):196-201.

162. Wengler A, Nimptsch U, Mansky T. Hip and knee replacement in Germany and the USA: analysis of individual inpatient data from German and US hospitals for the years 2005 to 2011. *Dtsch Arztebl Int.* 2014 Jun 9;111(23-24):407-16.
163. Park KH, Chong YP, Kim SH, Lee SO, Choi SH, Lee MS, et al. Clinical characteristics and therapeutic outcomes of hematogenous vertebral osteomyelitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect.* 2013 Dec;67(6):556-64.
164. Park KH, Cho OH, Lee JH, Park JS, Ryu KN, Park SY, et al. Optimal Duration of Antibiotic Therapy in Patients With Hematogenous Vertebral Osteomyelitis at Low Risk and High Risk of Recurrence. *Clin Infect Dis.* 2016 May 15;62(10):1262-9.
165. Roblot F, Besnier JM, Juhel L, Vidal C, Ragot S, Bastides F, et al. Optimal duration of antibiotic therapy in vertebral osteomyelitis. *Semin Arthritis Rheum.* 2007 Apr;36(5):269-77.
166. Bozic KJ, Ries MD. The impact of infection after total hip arthroplasty on hospital and surgeon resource utilization. *J Bone Joint Surg Am.* 2005 Aug;87(8):1746-51.
167. Parvizi J, Pawasarat IM, Azzam KA, Joshi A, Hansen EN, Bozic KJ. Periprosthetic joint infection: the economic impact of methicillin-resistant infections. *J Arthroplasty.* 2010 Sep;25(6 Suppl):103-7.
168. Kurtz SM, Lau E, Watson H, Schmier JK, Parvizi J. Economic burden of periprosthetic joint infection in the United States. *J Arthroplasty.* 2012 Sep;27(8 Suppl):61-5 e1.
169. Titecat M, Senneville E, Wallet F, Dezeque H, Migaud H, Courcol RJ, et al. Bacterial epidemiology of osteoarticular infections in a referent center: 10-year study. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2013 Oct;99(6):653-8.
170. Corvec S, Portillo ME, Pasticci BM, Borens O, Trampuz A. Epidemiology and new developments in the diagnosis of prosthetic joint infection. *Int J Artif Organs.* 2012 Oct;35(10):923-34.
171. Dubost JJ, Soubrier M, De Champs C, Ristori JM, Bussiere JL, Sauvezie B. No changes in the distribution of organisms responsible for septic arthritis over a 20 year period. *Ann Rheum Dis.* 2002 Mar;61(3):267-9.
172. Teterycz D, Ferry T, Lew D, Stern R, Assal M, Hoffmeyer P, et al. Outcome of orthopedic implant infections due to different staphylococci. *Int J Infect Dis.* 2010 Oct;14(10):e913-8.
173. Lourtet-Hascoet J, Felice MP, Bicart-See A, Bouige A, Giordano G, Bonnet E. Species and antimicrobial susceptibility testing of coagulase-negative staphylococci in periprosthetic joint infections. *Epidemiol Infect.* 2018 Jun 8:1-6.
174. Darlow CA, Paidakakos N, Sikander M, Atkins B. A spinal infection with *Staphylococcus pseudintermedius*. *BMJ Case Rep.* 2017 Aug 07;2017.
175. Somayaji R, Priyantha MA, Rubin JE, Church D. Human infections due to *Staphylococcus pseudintermedius*, an emerging zoonosis of canine origin: report of 24 cases. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016 Aug;85(4):471-6.
176. Ceroni D, Kampouroglou G, Valaikaite R, Anderson della Llana R, Salvo D. Osteoarticular infections in young children: what has changed over the last years? *Swiss Med Wkly.* 2014;144:w13971.
177. Basmaci R, Ilharrebordé B, Bidet P, Doit C, Lorrot M, Mazda K, et al. Isolation of *Kingella kingae* in the oropharynx during *K. kingae* arthritis in children. *Clin Microbiol Infect.* 2012 May;18(5):E134-6.
178. Yagupsky P. *Kingella kingae*: from medical rarity to an emerging paediatric pathogen. *Lancet Infect Dis.* 2004 Jun;4(6):358-67.
179. Otto M. *Staphylococcus* colonization of the skin and antimicrobial peptides. *Expert Rev Dermatol.* 2010 Apr;5(2):183-95.
180. Coates R, Moran J, Horsburgh MJ. Staphylococci: colonizers and pathogens of human skin. *Future Microbiol.* 2014;9(1):75-91.
181. Kloos WE, Musselwhite MS. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. *Appl Microbiol.* 1975 Sep;30(3):381-5.

182. Kuehnert MJ, Kruszon-Moran D, Hill HA, McQuillan G, McAllister SK, Fosheim G, et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001-2002. *J Infect Dis.* 2006 Jan 15;193(2):172-9.
183. Chen YE, Fischbach MA, Belkaid Y. Skin microbiota-host interactions. *Nature.* 2018 Jan 24;553(7689):427-36.
184. Skramm I, Fossum Moen AE, Aroen A, Bukholm G. Surgical Site Infections in Orthopaedic Surgery Demonstrate Clones Similar to Those in Orthopaedic *Staphylococcus aureus* Nasal Carriers. *J Bone Joint Surg Am.* 2014 Jun 4;96(11):882-8.
185. Simor AE. Staphylococcal decolonisation: an effective strategy for prevention of infection? *Lancet Infect Dis.* 2011 Dec;11(12):952-62.
186. Septimus EJ, Schweizer ML. Decolonization in Prevention of Health Care-Associated Infections. *Clin Microbiol Rev.* 2016 Apr;29(2):201-22.
187. Tacconelli E, Johnson AP. National guidelines for decolonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriers: the implications of recent experience in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Oct;66(10):2195-8.
188. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, et al. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clin Infect Dis.* 2011 Feb 1;52(3):e18-55.
189. Yano K, Minoda Y, Sakawa A, Kuwano Y, Kondo K, Fukushima W, et al. Positive nasal culture of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a risk factor for surgical site infection in orthopedics. *Acta Orthop.* 2009 Aug;80(4):486-90.
190. Kalmeijer MD, Coertjens H, van Nieuwland-Bollen PM, Bogaers-Hofman D, de Baere GA, Stuurman A, et al. Surgical site infections in orthopedic surgery: the effect of mupirocin nasal ointment in a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Clin Infect Dis.* 2002 Aug 15;35(4):353-8.
191. Massey RC, Horsburgh MJ, Lina G, Hook M, Recker M. The evolution and maintenance of virulence in *Staphylococcus aureus*: a role for host-to-host transmission? *Nat Rev Microbiol.* 2006 Dec;4(12):953-8.
192. Rohde H, Kalitzky M, Kroger N, Scherpe S, Horstkotte MA, Knobloch JK, et al. Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *J Clin Microbiol.* 2004 Dec;42(12):5614-9.
193. Otto M. *Staphylococcus epidermidis*--the 'accidental' pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 2009 Aug;7(8):555-67.
194. Valour F, Trouillet-Assant S, Rasigade JP, Lustig S, Chanard E, Meugnier H, et al. *Staphylococcus epidermidis* in orthopedic device infections: the role of bacterial internalization in human osteoblasts and biofilm formation. *PLoS One.* 2013;8(6):e67240.
195. Lourtet-Hascoet J, Felice MP, Bicart-See A, Bouige A, Giordano G, Bonnet E. Species and antimicrobial susceptibility testing of coagulase-negative staphylococci in periprosthetic joint infections. *Epidemiol Infect.* 2018 Oct;146(14):1771-6.
196. Otto M. Physical stress and bacterial colonization. *FEMS Microbiol Rev.* 2014 Nov;38(6):1250-70.
197. Christensen GJ, Bruggemann H. Bacterial skin commensals and their role as host guardians. *Benef Microbes.* 2014 Jun 1;5(2):201-15.
198. Ingham E, Holland KT, Gowland G, Cunliffe WJ. Partial purification and characterization of lipase (EC 3.1.1.3) from *Propionibacterium acnes*. *J Gen Microbiol.* 1981 Jun;124(2):393-401.
199. Schwan WR, Wetzel KJ. Osmolyte transport in *Staphylococcus aureus* and the role in pathogenesis. *World J Clin Infect Dis.* 2016;6(2):22-7.
200. Amin US, Lash TD, Wilkinson BJ. Proline betaine is a highly effective osmoprotectant for *Staphylococcus aureus*. *Arch Microbiol.* 1995 Feb;163(2):138-42.

201. Vermassen A, Dordet-Frisoni E, de La Foye A, Micheau P, Laroute V, Leroy S, et al. Adaptation of *Staphylococcus xylosus* to Nutrients and Osmotic Stress in a Salted Meat Model. *Front Microbiol.* 2016;7:87.
202. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003 Sep;3(9):710-20.
203. Senyurek I, Paulmann M, Sinnberg T, Kalbacher H, Deeg M, Gutschmann T, et al. Dermcidin-derived peptides show a different mode of action than the cathelicidin LL-37 against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Jun;53(6):2499-509.
204. Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J Leukoc Biol.* 2004 Jan;75(1):39-48.
205. Ogawa H, Miyazaki H, Kimura M. Isolation and characterization of human skin lysozyme. *J Invest Dermatol.* 1971 Aug;57(2):111-6.
206. Bera A, Biswas R, Herbert S, Gotz F. The presence of peptidoglycan O-acetyltransferase in various staphylococcal species correlates with lysozyme resistance and pathogenicity. *Infect Immun.* 2006 Aug;74(8):4598-604.
207. Lai Y, Villaruz AE, Li M, Cha DJ, Sturdevant DE, Otto M. The human anionic antimicrobial peptide dermcidin induces proteolytic defence mechanisms in staphylococci. *Mol Microbiol.* 2007 Jan;63(2):497-506.
208. Sieprawska-Lupa M, Mydel P, Krawczyk K, Wojcik K, Puklo M, Lupa B, et al. Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Dec;48(12):4673-9.
209. Jin T, Bokarewa M, Foster T, Mitchell J, Higgins J, Tarkowski A. *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *J Immunol.* 2004 Jan 15;172(2):1169-76.
210. Zeman M, Maslanova I, Indrakova A, Siborova M, Mikulasek K, Bendickova K, et al. *Staphylococcus sciuri* bacteriophages double-convert for staphylokinase and phospholipase, mediate interspecies plasmid transduction, and package mecA gene. *Sci Rep.* 2017 Apr 13;7:46319.
211. Wieckowska-Szakiel M, Sadowska B, Rozalska B. Staphylokinase production by clinical *Staphylococcus aureus* strains. *Pol J Microbiol.* 2007;56(2):97-102.
212. Sawicka-Grzelak A, Szymanowska A, Mlynarczyk A, Mlynarczyk G. [Production of staphylokinase and hemolysin by coagulase-negative staphylococcus]. *Med Dosw Mikrobiol.* 1993;45(1):7-10.
213. Li M, Cha DJ, Lai Y, Villaruz AE, Sturdevant DE, Otto M. The antimicrobial peptide-sensing system aps of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 2007 Dec;66(5):1136-47.
214. Bera A, Herbert S, Jakob A, Vollmer W, Gotz F. Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 2005 Feb;55(3):778-87.
215. Pushkaran AC, Nataraj N, Nair N, Gotz F, Biswas R, Mohan CG. Understanding the Structure-Function Relationship of Lysozyme Resistance in *Staphylococcus aureus* by Peptidoglycan O-Acetylation Using Molecular Docking, Dynamics, and Lysis Assay. *J Chem Inf Model.* 2015 Apr 27;55(4):760-70.
216. Mazmanian SK, Ton-That H, Schneewind O. Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 2001 Jun;40(5):1049-57.
217. Schneewind O, Mihaylova-Petkov D, Model P. Cell wall sorting signals in surface proteins of gram-positive bacteria. *EMBO J.* 1993 Dec;12(12):4803-11.
218. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Hook M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol.* 2014 Jan;12(1):49-62.
219. Ghasemian A, Najar Peerayeh S, Bakhshi B, Mirzaee M. The Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMMs) Genes among Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* from Hospitalized Children. *Iran J Pathol.* 2015 Fall;10(4):258-64.

220. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Hook M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol.* 1994;48:585-617.
221. Ajayi C, Aberg E, Askarian F, Sollid JUE, Johannessen M, Hanssen AM. Genetic variability in the *sdrD* gene in *Staphylococcus aureus* from healthy nasal carriers. *BMC Microbiol.* 2018 Apr 16;18(1):34.
222. Brooker BE, Fuller R. The adhesion of coagulase negative staphylococci to human skin and its relevance to the bacterial flora of milk. *J Appl Bacteriol.* 1984 Oct;57(2):325-32.
223. Paharik AE, Horswill AR. The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response. *Microbiol Spectr.* 2016 Apr;4(2).
224. Patti JM, Boles JO, Hook M. Identification and biochemical characterization of the ligand binding domain of the collagen adhesin from *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry.* 1993 Oct 26;32(42):11428-35.
225. Hansen U, Hussain M, Villone D, Herrmann M, Robenek H, Peters G, et al. The anchorless adhesin Eap (extracellular adherence protein) from *Staphylococcus aureus* selectively recognizes extracellular matrix aggregates but binds promiscuously to monomeric matrix macromolecules. *Matrix Biol.* 2006 May;25(4):252-60.
226. Hussain M, Becker K, von Eiff C, Schrenzel J, Peters G, Herrmann M. Identification and characterization of a novel 38.5-kilodalton cell surface protein of *Staphylococcus aureus* with extended-spectrum binding activity for extracellular matrix and plasma proteins. *J Bacteriol.* 2001 Dec;183(23):6778-86.
227. Bowden MG, Visai L, Longshaw CM, Holland KT, Speziale P, Hook M. Is the GehD lipase from *Staphylococcus epidermidis* a collagen binding adhesin? *J Biol Chem.* 2002 Nov 8;277(45):43017-23.
228. Arrecubieta C, Lee MH, Macey A, Foster TJ, Lowy FD. SdrF, a *Staphylococcus epidermidis* surface protein, binds type I collagen. *J Biol Chem.* 2007 Jun 29;282(26):18767-76.
229. Sakinc T, Kleine B, Gatermann SG. SdrI, a serine-aspartate repeat protein identified in *Staphylococcus saprophyticus* strain 7108, is a collagen-binding protein. *Infect Immun.* 2006 Aug;74(8):4615-23.
230. O'Brien LM, Walsh EJ, Massey RC, Peacock SJ, Foster TJ. *Staphylococcus aureus* clumping factor B (ClfB) promotes adherence to human type I cytokeratin 10: implications for nasal colonization. *Cell Microbiol.* 2002 Nov;4(11):759-70.
231. Clarke SR, Andre G, Walsh EJ, Dufrene YF, Foster TJ, Foster SJ. Iron-regulated surface determinant protein A mediates adhesion of *Staphylococcus aureus* to human corneocyte envelope proteins. *Infect Immun.* 2009 Jun;77(6):2408-16.
232. Heilmann C, Hartleib J, Hussain MS, Peters G. The multifunctional *Staphylococcus aureus* autolysin aaa mediates adherence to immobilized fibrinogen and fibronectin. *Infect Immun.* 2005 Aug;73(8):4793-802.
233. Hirschhausen N, Schlesier T, Schmidt MA, Gotz F, Peters G, Heilmann C. A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin Atl and heat shock cognate protein Hsc70 as host cell receptor. *Cell Microbiol.* 2010 Dec;12(12):1746-64.
234. McDevitt D, Francois P, Vaudaux P, Foster TJ. Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 1994 Jan;11(2):237-48.
235. Ni Eidhin D, Perkins S, Francois P, Vaudaux P, Hook M, Foster TJ. Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 1998 Oct;30(2):245-57.
236. Hussain M, Steinbacher T, Peters G, Heilmann C, Becker K. The adhesive properties of the *Staphylococcus lugdunensis* multifunctional autolysin Atl and its role in biofilm formation and internalization. *Int J Med Microbiol.* 2015 Jan;305(1):129-39.
237. Hartford O, O'Brien L, Schofield K, Wells J, Foster TJ. The Fbe (SdrG) protein of *Staphylococcus epidermidis* HB promotes bacterial adherence to fibrinogen. *Microbiology.* 2001 Sep;147(Pt 9):2545-52.

238. Nilsson M, Bjerketorp J, Guss B, Frykberg L. A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus lugdunensis*. FEMS Microbiol Lett. 2004 Dec 1;241(1):87-93.
239. Mitchell J, Tristan A, Foster TJ. Characterization of the fibrinogen-binding surface protein Fbl of *Staphylococcus lugdunensis*. Microbiology. 2004 Nov;150(Pt 11):3831-41.
240. Jonsson K, Signas C, Muller HP, Lindberg M. Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*. The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. Eur J Biochem. 1991 Dec 18;202(3):1041-8.
241. Clarke SR, Wiltshire MD, Foster SJ. IsdA of *Staphylococcus aureus* is a broad spectrum, iron-regulated adhesin. Mol Microbiol. 2004 Mar;51(5):1509-19.
242. Bannoehr J, Ben Zakour NL, Reglinski M, Inglis NF, Prabhakaran S, Fossum E, et al. Genomic and surface proteomic analysis of the canine pathogen *Staphylococcus pseudintermedius* reveals proteins that mediate adherence to the extracellular matrix. Infect Immun. 2011 Aug;79(8):3074-86.
243. King NP, Beatson SA, Totsika M, Ulett GC, Alm RA, Manning PA, et al. UafB is a serine-rich repeat adhesin of *Staphylococcus saprophyticus* that mediates binding to fibronectin, fibrinogen and human uroepithelial cells. Microbiology. 2011 Apr;157(Pt 4):1161-75.
244. Heilmann C, Thumm G, Chhatwal GS, Hartleib J, Uekotter A, Peters G. Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. Microbiology. 2003 Oct;149(Pt 10):2769-78.
245. Hell W, Meyer HG, Gatermann SG. Cloning of aas, a gene encoding a *Staphylococcus saprophyticus* surface protein with adhesive and autolytic properties. Mol Microbiol. 1998 Aug;29(3):871-81.
246. Allignet J, England P, Old I, El Solh N. Several regions of the repeat domain of the *Staphylococcus caprae* autolysin, AtIC, are involved in fibronectin binding. FEMS Microbiol Lett. 2002 Aug 6;213(2):193-7.
247. Williams RJ, Henderson B, Sharp LJ, Nair SP. Identification of a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. Infect Immun. 2002 Dec;70(12):6805-10.
248. Pei L, Palma M, Nilsson M, Guss B, Flock JI. Functional studies of a fibrinogen binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. Infect Immun. 1999 Sep;67(9):4525-30.
249. Nilsson M, Frykberg L, Flock JI, Pei L, Lindberg M, Guss B. A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. Infect Immun. 1998 Jun;66(6):2666-73.
250. Sakinc T, Kleine B, Michalski N, Kaase M, Gatermann SG. Sdrl of *Staphylococcus saprophyticus* is a multifunctional protein: localization of the fibronectin-binding site. FEMS Microbiol Lett. 2009 Nov;301(1):28-34.
251. Huesca M, Peralta R, Sauder DN, Simor AE, McGavin MJ. 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. 2002 May 1;185(9):1285-96.
252. Mulcahy ME, Geoghegan JA, Monk IR, O'Keefe KM, Walsh EJ, Foster TJ, et al. Nasal colonisation by *Staphylococcus aureus* depends upon clumping factor B binding to the squamous epithelial cell envelope protein loricrin. PLoS Pathog. 2012 Dec;8(12):e1003092.
253. Heilmann C, Hussain M, Peters G, Gotz F. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. Mol Microbiol. 1997 Jun;24(5):1013-24.
254. Pereyra EA, Picech F, Renna MS, Baravalle C, Andreotti CS, Russi R, et al. Detection of *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm-producing genes and their expression during internalization in bovine mammary epithelial cells. Vet Microbiol. 2016 Feb 1;183:69-77.
255. Park WB, Kim SH, Kang CI, Cho JH, Bang JW, Park KW, et al. *In vitro* ability of *Staphylococcus aureus* isolates from bacteraemic patients with and without metastatic complications to invade vascular endothelial cells. J Med Microbiol. 2007 Oct;56(Pt 10):1290-5.

256. Oviedo-Boyso J, Cortes-Vieyra R, Huante-Mendoza A, Yu HB, Valdez-Alarcon JJ, Bravo-Patino A, et al. The phosphoinositide-3-kinase-Akt signaling pathway is important for *Staphylococcus aureus* internalization by endothelial cells. *Infect Immun*. 2011 Nov;79(11):4569-77.
257. Bur S, Preissner KT, Herrmann M, Bischoff M. The *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein promotes bacterial internalization by keratinocytes independent of fibronectin-binding proteins. *J Invest Dermatol*. 2013 Aug;133(8):2004-12.
258. Khalil H, Williams RJ, Stenbeck G, Henderson B, Meghji S, Nair SP. Invasion of bone cells by *Staphylococcus epidermidis*. *Microbes Infect*. 2007 Apr;9(4):460-5.
259. Baude J, Bastien S, Gillet Y, Leblanc P, Itzek A, Tristan A, et al. Necrotizing Soft Tissue Infections *S.aureus* - but not *S.pyogenes*- isolates display high rate of internalization and cytotoxicity toward human myoblasts. *J Infect Dis*. 2019 Apr 19.
260. Hanssen AM, Kindlund B, Stenklev NC, Furberg AS, Fismen S, Olsen RS, et al. Localization of *Staphylococcus aureus* in tissue from the nasal vestibule in healthy carriers. *BMC Microbiol*. 2017 Apr 5;17(1):89.
261. Jevon M, Guo C, Ma B, Mordan N, Nair SP, Harris M, et al. Mechanisms of internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured human osteoblasts. *Infect Immun*. 1999 May;67(5):2677-81.
262. Ellington JK, Reilly SS, Ramp WK, Smeltzer MS, Kellam JF, Hudson MC. Mechanisms of *Staphylococcus aureus* invasion of cultured osteoblasts. *Microb Pathog*. 1999 Jun;26(6):317-23.
263. Oviedo-Boyso J, Cardoso-Correa BI, Cajero-Juarez M, Bravo-Patino A, Valdez-Alarcon JJ, Baizabal-Aguirre VM. The capacity of bovine endothelial cells to eliminate intracellular *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* is increased by the proinflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1beta. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008 Oct;54(1):53-9.
264. Reilly SS, Hudson MC, Kellam JF, Ramp WK. In vivo internalization of *Staphylococcus aureus* by embryonic chick osteoblasts. *Bone*. 2000 Jan;26(1):63-70.
265. Ellington JK, Harris M, Hudson MC, Vishin S, Webb LX, Sherertz R. Intracellular *Staphylococcus aureus* and antibiotic resistance: implications for treatment of staphylococcal osteomyelitis. *J Orthop Res*. 2006 Jan;24(1):87-93.
266. Ahmed S, Meghji S, Williams RJ, Henderson B, Brock JH, Nair SP. *Staphylococcus aureus* fibronectin binding proteins are essential for internalization by osteoblasts but do not account for differences in intracellular levels of bacteria. *Infect Immun*. 2001 May;69(5):2872-7.
267. Henderson B, Nair S, Pallas J, Williams MA. Fibronectin: a multidomain host adhesin targeted by bacterial fibronectin-binding proteins. *FEMS Microbiol Rev*. 2011 Jan;35(1):147-200.
268. Bingham RJ, Rudino-Pinera E, Meenan NA, Schwarz-Linek U, Turkenburg JP, Hook M, et al. Crystal structures of fibronectin-binding sites from *Staphylococcus aureus* FnBPA in complex with fibronectin domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Aug 26;105(34):12254-8.
269. Sinha B, Francois PP, Nusse O, Foti M, Hartford OM, Vaudaux P, et al. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1. *Cell Microbiol*. 1999 Sep;1(2):101-17.
270. Harraghy N, Hussain M, Hagggar A, Chavakis T, Sinha B, Herrmann M, et al. The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional *Staphylococcus aureus* protein Eap. *Microbiology*. 2003 Oct;149(Pt 10):2701-7.
271. Palma M, Hagggar A, Flock JI. Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *J Bacteriol*. 1999 May;181(9):2840-5.
272. Hussain M, Hagggar A, Heilmann C, Peters G, Flock JI, Herrmann M. Insertional inactivation of Eap in *Staphylococcus aureus* strain Newman confers reduced staphylococcal binding to fibroblasts. *Infect Immun*. 2002 Jun;70(6):2933-40.

273. Hagggar A, Hussain M, Lonnie H, Herrmann M, Norrby-Teglund A, Flock JI. Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells. *Infect Immun*. 2003 May;71(5):2310-7.
274. Athanasopoulos AN, Economopoulou M, Orlova VV, Sobke A, Schneider D, Weber H, et al. The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* inhibits wound healing by interfering with host defense and repair mechanisms. *Blood*. 2006 Apr 1;107(7):2720-7.
275. Chavakis T, Hussain M, Kanse SM, Peters G, Bretzel RG, Flock JI, et al. *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat Med*. 2002 Jul;8(7):687-93.
276. Testoni F, Montanaro L, Poggi A, Visai L, Campoccia D, Arciola CR. Internalization by osteoblasts of two *Staphylococcus aureus* clinical isolates differing in their adhesin gene pattern. *Int J Artif Organs*. 2011 Sep;34(9):789-98.
277. Kintarak S, Whawell SA, Speight PM, Packer S, Nair SP. Internalization of *Staphylococcus aureus* by human keratinocytes. *Infect Immun*. 2004 Oct;72(10):5668-75.
278. Valour F, Trouillet-Assant S, Rasigade JP, Lustig S, Chanard E, Meugnier H, et al. *Staphylococcus epidermidis* in orthopedic device infections: the role of bacterial internalization in human osteoblasts and biofilm formation. *PLoS One*. 2013;8(6):e67240.
279. Campoccia D, Testoni F, Ravaioli S, Cangini I, Maso A, Speziale P, et al. Orthopedic implant infections: Incompetence of *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis*, and *Enterococcus faecalis* to invade osteoblasts. *J Biomed Mater Res A*. 2016 Mar;104(3):788-801.
280. Gemmell CG, Goutcher SC, Reid R, Sturrock RD. Role of certain virulence factors in a murine model of *Staphylococcus aureus* arthritis. *J Med Microbiol*. 1997 Mar;46(3):208-13.
281. Nilsson IM, Hartford O, Foster T, Tarkowski A. Alpha-toxin and gamma-toxin jointly promote *Staphylococcus aureus* virulence in murine septic arthritis. *Infect Immun*. 1999 Mar;67(3):1045-9.
282. Prevost G, Mourey L, Colin DA, Menestrina G. Staphylococcal pore-forming toxins. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2001;257:53-83.
283. Otto M. *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr Opin Microbiol*. 2014 Feb;17:32-7.
284. Sheikh HQ, Aqil A, Kirby A, Hossain FS. Panton-Valentine leukocidin osteomyelitis in children: a growing threat. *Br J Hosp Med (Lond)*. 2015 Jan;76(1):18-24.
285. Hall MJ, Steer JA, Keenan J. Panton-Valentine leukocidin *Staphylococcus aureus* osteomyelitis of the adult tibia--a case report. *Ann R Coll Surg Engl*. 2010 Mar;92(2):W17-9.
286. Elledge RO, Dasari KK, Roy S. Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* osteomyelitis of the tibia in a 10-year-old child. *J Pediatr Orthop B*. 2014 Jul;23(4):358-63.
287. Dohin B, Gillet Y, Kohler R, Lina G, Vandenesch F, Vanhems P, et al. Pediatric bone and joint infections caused by Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus*. *Pediatr Infect Dis J*. 2007 Nov;26(11):1042-8.
288. Cremieux AC, Dumitrescu O, Lina G, Vallee C, Cote JF, Muffat-Joly M, et al. Panton-valentine leukocidin enhances the severity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* rabbit osteomyelitis. *PLoS One*. 2009 Sep 25;4(9):e7204.
289. Spaan AN, van Strijp JAG, Torres VJ. Leukocidins: staphylococcal bi-component pore-forming toxins find their receptors. *Nat Rev Microbiol*. 2017 Jul;15(7):435-47.
290. Prevost G, Bouakham T, Piemont Y, Monteil H. Characterisation of a synergohymenotropic toxin produced by *Staphylococcus intermedius*. *FEBS Lett*. 1995 Dec 4;376(3):135-40.
291. Vuong C, Gerke C, Somerville GA, Fischer ER, Otto M. Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis*. 2003 Sep 1;188(5):706-18.
292. Mehlin C, Headley CM, Klebanoff SJ. An inflammatory polypeptide complex from *Staphylococcus epidermidis*: isolation and characterization. *J Exp Med*. 1999 Mar 15;189(6):907-18.

293. Cheung GY, Rigby K, Wang R, Queck SY, Braughton KR, Whitney AR, et al. *Staphylococcus epidermidis* strategies to avoid killing by human neutrophils. PLoS Pathog. 2010 Oct 7;6(10):e1001133.
294. McKeivitt AI, Bjornson GL, Mauracher CA, Scheifele DW. Amino acid sequence of a deltalike toxin from *Staphylococcus epidermidis*. Infect Immun. 1990 May;58(5):1473-5.
295. Queck SY, Khan BA, Wang R, Bach TH, Kretschmer D, Chen L, et al. Mobile genetic element-encoded cytolysin connects virulence to methicillin resistance in MRSA. PLoS Pathog. 2009 Jul;5(7):e1000533.
296. Qin L, McCausland JW, Cheung GY, Otto M. PSM-Mec-A Virulence Determinant that Connects Transcriptional Regulation, Virulence, and Antibiotic Resistance in Staphylococci. Front Microbiol. 2016;7:1293.
297. Cheung GY, Joo HS, Chatterjee SS, Otto M. Phenol-soluble modulins--critical determinants of staphylococcal virulence. FEMS Microbiol Rev. 2014 Jul;38(4):698-719.
298. Loffler B, Hussain M, Grundmeier M, Bruck M, Holzinger D, Varga G, et al. *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. PLoS Pathog. 2010 Jan 8;6(1):e1000715.
299. Cheung GY, Duong AC, Otto M. Direct and synergistic hemolysis caused by *Staphylococcus* phenol-soluble modulins: implications for diagnosis and pathogenesis. Microbes Infect. 2012 Apr;14(4):380-6.
300. Scheifele DW, Bjornson GL, Dyer RA, Dimmick JE. Delta-like toxin produced by coagulase-negative staphylococci is associated with neonatal necrotizing enterocolitis. Infect Immun. 1987 Sep;55(9):2268-73.
301. Rautenberg M, Joo HS, Otto M, Peschel A. Neutrophil responses to staphylococcal pathogens and commensals via the formyl peptide receptor 2 relates to phenol-soluble modulin release and virulence. FASEB J. 2011 Apr;25(4):1254-63.
302. Da F, Joo HS, Cheung GYC, Villaruz AE, Rohde H, Luo X, et al. Phenol-Soluble Modulin Toxins of *Staphylococcus haemolyticus*. Front Cell Infect Microbiol. 2017;7:206.
303. Grosz M, Kolter J, Paprotka K, Winkler AC, Schafer D, Chatterjee SS, et al. Cytoplasmic replication of *Staphylococcus aureus* upon phagosomal escape triggered by phenol-soluble modulin alpha. Cell Microbiol. 2014 Apr;16(4):451-65.
304. Rasigade JP, Trouillet-Assant S, Ferry T, Diep BA, Sapin A, Lhoste Y, et al. PSMs of hypervirulent *Staphylococcus aureus* act as intracellular toxins that kill infected osteoblasts. PLoS One. 2013;8(5):e63176.
305. Kretschmer D, Gleske AK, Rautenberg M, Wang R, Koberle M, Bohn E, et al. Human formyl peptide receptor 2 senses highly pathogenic *Staphylococcus aureus*. Cell Host Microbe. 2010 Jun 25;7(6):463-73.
306. Cogen AL, Yamasaki K, Sanchez KM, Dorschner RA, Lai Y, MacLeod DT, et al. Selective antimicrobial action is provided by phenol-soluble modulins derived from *Staphylococcus epidermidis*, a normal resident of the skin. J Invest Dermatol. 2010 Jan;130(1):192-200.
307. Otto M. Phenol-soluble modulins. Int J Med Microbiol. 2014 Mar;304(2):164-9.
308. Peschel A, Otto M. Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. Nat Rev Microbiol. 2013 Oct;11(10):667-73.
309. McDougald D, Rice SA, Barraud N, Steinberg PD, Kjelleberg S. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. Nat Rev Microbiol. 2011 Nov 28;10(1):39-50.
310. Wojtyczka RD, Orlewska K, Kepa M, Idzik D, Dziedzic A, Mularz T, et al. Biofilm formation and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* strains from a hospital environment. Int J Environ Res Public Health. 2014 Apr 25;11(5):4619-33.
311. Otto M. Staphylococcal Biofilms. Microbiol Spectr. 2018 Aug;6(4).

312. Vacheethasane K, Temenoff JS, Higashi JM, Gary A, Anderson JM, Bayston R, et al. Bacterial surface properties of clinically isolated *Staphylococcus epidermidis* strains determine adhesion on polyethylene. *J Biomed Mater Res*. 1998 Dec 5;42(3):425-32.
313. Houston P, Rowe SE, Pozzi C, Waters EM, O'Gara JP. Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype. *Infect Immun*. 2011 Mar;79(3):1153-65.
314. Rupp ME, Fey PD, Heilmann C, Gotz F. Characterization of the importance of *Staphylococcus epidermidis* autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *J Infect Dis*. 2001 Apr 1;183(7):1038-42.
315. Albrecht T, Raue S, Rosenstein R, Nieselt K, Gotz F. Phylogeny of the staphylococcal major autolysin and its use in genus and species typing. *J Bacteriol*. 2012 May;194(10):2630-6.
316. Allignet J, Aubert S, Dyke KG, El Solh N. *Staphylococcus caprae* strains carry determinants known to be involved in pathogenicity: a gene encoding an autolysin-binding fibronectin and the ica operon involved in biofilm formation. *Infect Immun*. 2001 Feb;69(2):712-8.
317. Bourgeois I, Camiade E, Biswas R, Courtin P, Gibert L, Gotz F, et al. Characterization of AtlL, a bifunctional autolysin of *Staphylococcus lugdunensis* with N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activities. *FEMS Microbiol Lett*. 2009 Jan;290(1):105-13.
318. Yokoi KJ, Sugahara K, Iguchi A, Nishitani G, Ikeda M, Shimada T, et al. Molecular properties of the putative autolysin Atl(WM) encoded by *Staphylococcus warneri* M: mutational and biochemical analyses of the amidase and glucosaminidase domains. *Gene*. 2008 Jun 15;416(1-2):66-76.
319. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penades JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol*. 2001 May;183(9):2888-96.
320. Sellman BR, Timofeyeva Y, Nanra J, Scott A, Fulginiti JP, Matsuka YV, et al. Expression of *Staphylococcus epidermidis* SdrG increases following exposure to an in vivo environment. *Infect Immun*. 2008 Jul;76(7):2950-7.
321. Pei L, Flock JI. Lack of fbe, the gene for a fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*, reduces its adherence to fibrinogen coated surfaces. *Microb Pathog*. 2001 Oct;31(4):185-93.
322. Arrecubieta C, Toba FA, von Bayern M, Akashi H, Deng MC, Naka Y, et al. SdrF, a *Staphylococcus epidermidis* surface protein, contributes to the initiation of ventricular assist device driveline-related infections. *PLoS Pathog*. 2009 May;5(5):e1000411.
323. Christner M, Franke GC, Schommer NN, Wendt U, Wegert K, Pehle P, et al. The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. *Mol Microbiol*. 2010 Jan;75(1):187-207.
324. Clarke SR, Harris LG, Richards RG, Foster SJ. Analysis of Ebh, a 1.1-megadalton cell wall-associated fibronectin-binding protein of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 2002 Dec;70(12):6680-7.
325. Rupp ME, Ulphani JS, Fey PD, Mack D. Characterization of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *Infect Immun*. 1999 May;67(5):2656-9.
326. Mack D, Fischer W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, Egge H, et al. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol*. 1996 Jan;178(1):175-83.
327. Brooks JL, Jefferson KK. Phase variation of poly-N-acetylglucosamine expression in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog*. 2014 Jul;10(7):e1004292.
328. Banner MA, Cunniffe JG, Macintosh RL, Foster TJ, Rohde H, Mack D, et al. Localized tufts of fibrils on *Staphylococcus epidermidis* NCTC 11047 are comprised of the accumulation-associated protein. *J Bacteriol*. 2007 Apr;189(7):2793-804.
329. Geoghegan JA, Corrigan RM, Gruszka DT, Speziale P, O'Gara JP, Potts JR, et al. Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2010 Nov;192(21):5663-73.

330. Frank KL, Patel R. Poly-N-acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by icaADBC-positive *Staphylococcus lugdunensis* isolates. *Infect Immun*. 2007 Oct;75(10):4728-42.
331. Holland LM, Conlon B, O'Gara JP. Mutation of tagO reveals an essential role for wall teichoic acids in *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. *Microbiology*. 2011 Feb;157(Pt 2):408-18.
332. Rajendran NB, Eikmeier J, Becker K, Hussain M, Peters G, Heilmann C. Important contribution of the novel locus comEB to extracellular DNA-dependent *Staphylococcus lugdunensis* biofilm formation. *Infect Immun*. 2015 Dec;83(12):4682-92.
333. Oliveira F, Lima CA, Bras S, Franca A, Cerca N. Evidence for inter- and intraspecies biofilm formation variability among a small group of coagulase-negative staphylococci. *FEMS Microbiol Lett*. 2015 Oct;362(20).
334. Vuong C, Kocianova S, Yao Y, Carmody AB, Otto M. Increased colonization of indwelling medical devices by quorum-sensing mutants of *Staphylococcus epidermidis* *in vivo*. *J Infect Dis*. 2004 Oct 15;190(8):1498-505.
335. Boles BR, Horswill AR. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog*. 2008 Apr 25;4(4):e1000052.
336. Song Z, Borgwardt L, Hoiby N, Wu H, Sorensen TS, Borgwardt A. Prosthesis infections after orthopedic joint replacement: the possible role of bacterial biofilms. *Orthop Rev (Pavia)*. 2013 Jun 7;5(2):65-71.
337. Babu KP, Keerthi VN, Madathody D, Prasanna AL, Gopinath V, Kumar MS, et al. Evaluating the Surface Characteristics of Stainless Steel, TMA, Timolium, and Titanium-niobium Wires: An *in vivo* Scanning Electron Microscope Study. *J Contemp Dent Pract*. 2016 May 1;17(5):372-6.
338. Hu X, Neoh KG, Zhang J, Kang ET. Bacterial and osteoblast behavior on titanium, cobalt-chromium alloy and stainless steel treated with alkali and heat: a comparative study for potential orthopedic applications. *J Colloid Interface Sci*. 2014 Mar 1;417:410-9.
339. Kinnari TJ, Esteban J, Zamora N, Fernandez R, Lopez-Santos C, Yubero F, et al. Effect of surface roughness and sterilization on bacterial adherence to ultra-high molecular weight polyethylene. *Clin Microbiol Infect*. 2010 Jul;16(7):1036-41.
340. Hudetz D, Ursic Hudetz S, Harris LG, Luginbuhl R, Friederich NF, Landmann R. Weak effect of metal type and ica genes on staphylococcal infection of titanium and stainless steel implants. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Dec;14(12):1135-45.
341. Patel JD, Colton E, Ebert M, Anderson JM. Gene expression during *S. epidermidis* biofilm formation on biomaterials. *J Biomed Mater Res A*. 2012 Nov;100(11):2863-9.
342. Chew SC, Kundukad B, Seviour T, van der Maarel JR, Yang L, Rice SA, et al. Dynamic remodeling of microbial biofilms by functionally distinct exopolysaccharides. *MBio*. 2014 Aug 5;5(4):e01536-14.
343. Besemer K, Singer G, Limberger R, Chlup AK, Hochedlinger G, Hodl I, et al. Biophysical controls on community succession in stream biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2007 Aug;73(15):4966-74.
344. Mader JT, Calhoun J. Bone, Joint, and Necrotizing Soft Tissue Infections. 1996.
345. Trueta J. [The 3 types of acute hematogenous osteomyelitis]. *Schweiz Med Wochenschr*. 1963 Feb 16;93:306-12.
346. Evans RP, Nelson CL, Bowen WR, Kleve MG, Hickmon SG. Visualization of bacterial glycocalyx with a scanning electron microscope. *Clin Orthop Relat Res*. 1998 Feb(347):243-9.
347. Brady RA, Leid JG, Calhoun JH, Costerton JW, Shirtliff ME. Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008 Jan;52(1):13-22.
348. Sanchez CJ, Jr., Mende K, Beckius ML, Akers KS, Romano DR, Wenke JC, et al. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infect Dis*. 2013 Jan 29;13:47.

349. Tremblay YD, Caron V, Blondeau A, Messier S, Jacques M. Biofilm formation by coagulase-negative staphylococci: impact on the efficacy of antimicrobials and disinfectants commonly used on dairy farms. *Vet Microbiol.* 2014 Aug 27;172(3-4):511-8.
350. Stewart PS. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996 Nov;40(11):2517-22.
351. Singh R, Ray P, Das A, Sharma M. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Sep;65(9):1955-8.
352. Singh R, Sahore S, Kaur P, Rani A, Ray P. Penetration barrier contributes to bacterial biofilm-associated resistance against only select antibiotics, and exhibits genus-, strain- and antibiotic-specific differences. *Pathog Dis.* 2016 Aug;74(6).
353. Stewart PS, Franklin MJ. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol.* 2008 Mar;6(3):199-210.
354. Urish KL, DeMuth PW, Kwan BW, Craft DW, Ma D, Haider H, et al. Antibiotic-tolerant *Staphylococcus aureus* Biofilm Persists on Arthroplasty Materials. *Clin Orthop Relat Res.* 2016 Jul;474(7):1649-56.
355. Yang S, Hay ID, Cameron DR, Speir M, Cui B, Su F, et al. Antibiotic regimen based on population analysis of residing persister cells eradicates *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Sci Rep.* 2015 Dec 21;5:18578.
356. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999 May 21;284(5418):1318-22.
357. Josse J, Velard F, Gangloff SC. *Staphylococcus aureus* vs. Osteoblast: Relationship and Consequences in Osteomyelitis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015;5:85.
358. Rollin G, Tan X, Tros F, Dupuis M, Nassif X, Charbit A, et al. Intracellular Survival of *Staphylococcus aureus* in Endothelial Cells: A Matter of Growth or Persistence. *Front Microbiol.* 2017;8:1354.
359. Mohamed W, Sommer U, Sethi S, Domann E, Thormann U, Schutz I, et al. Intracellular proliferation of *S. aureus* in osteoblasts and effects of rifampicin and gentamicin on *S. aureus* intracellular proliferation and survival. *Eur Cell Mater.* 2014 Oct 23;28:258-68.
360. Perez K, Patel R. Survival of *Staphylococcus epidermidis* in Fibroblasts and Osteoblasts. *Infect Immun.* 2018 Oct;86(10).
361. Campoccia D, Montanaro L, Ravaioli S, Cangini I, Testoni F, Visai L, et al. New Parameters to Quantitatively Express the Invasiveness of Bacterial Strains from Implant-Related Orthopaedic Infections into Osteoblast Cells. *Materials (Basel).* 2018 Apr 3;11(4).
362. Prabudiansyah I, Driessen AJM. The Canonical and Accessory Sec System of Gram-positive Bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2017;404:45-67.
363. Siboo IR, Chaffin DO, Rubens CE, Sullam PM. Characterization of the accessory Sec system of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2008 Sep;190(18):6188-96.
364. Honigschmid P, Bykova N, Schneider R, Ivankov D, Frishman D. Evolutionary Interplay between Symbiotic Relationships and Patterns of Signal Peptide Gain and Loss. *Genome Biol Evol.* 2018 Mar 1;10(3):928-38.
365. Fraunholz M, Sinha B. Intracellular *Staphylococcus aureus*: live-in and let die. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2:43.
366. Reyes-Robles T, Alonzo F, 3rd, Kozhaya L, Lacy DB, Unutmaz D, Torres VJ. *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED targets the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 to kill leukocytes and promote infection. *Cell Host Microbe.* 2013 Oct 16;14(4):453-9.
367. Alonzo F, 3rd, Kozhaya L, Rawlings SA, Reyes-Robles T, DuMont AL, Myszka DG, et al. CCR5 is a receptor for *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED. *Nature.* 2013 Jan 3;493(7430):51-5.

368. Spaan AN, Reyes-Robles T, Badiou C, Cochet S, Boguslawski KM, Yoong P, et al. *Staphylococcus aureus* Targets the Duffy Antigen Receptor for Chemokines (DARC) to Lyse Erythrocytes. *Cell Host Microbe*. 2015 Sep 9;18(3):363-70.
369. Weese JS, Poma R, James F, Buenviaje G, Foster R, Slavic D. *Staphylococcus pseudintermedius* necrotizing fasciitis in a dog. *Can Vet J*. 2009 Jun;50(6):655-6.
370. Miedzobrodzki J, Kasprowicz A, Bialecka A, Jaworska O, Polakowska K, Wladyka B, et al. The first case of a *Staphylococcus pseudintermedius* infection after joint prosthesis implantation in a dog. *Pol J Microbiol*. 2010;59(2):133-5.
371. Latronico F, Moodley A, Nielsen SS, Guardabassi L. Enhanced adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* sequence type 71 to canine and human corneocytes. *Vet Res*. 2014 Jun 24;45:70.
372. Seng R, Kittit T, Thummeepak R, Kongthai P, Leungtongkam U, Wannalerdsakun S, et al. Biofilm formation of methicillin-resistant coagulase negative staphylococci (MR-CoNS) isolated from community and hospital environments. *PLoS One*. 2017;12(8):e0184172.
373. Petty W, Spanier S, Shuster JJ, Silverthorne C. The influence of skeletal implants on incidence of infection. Experiments in a canine model. *J Bone Joint Surg Am*. 1985 Oct;67(8):1236-44.
374. Pang HN, Bin Abd Razak HR, Petis S, Naudie DDR, MacDonald SJ. The role of isolated polyethylene exchange in total knee arthroplasty. *EFORT Open Rev*. 2017 Mar;2(3):66-71.
375. Carli AV, Bhimani S, Yang X, Shirley MB, de Mesy Bentley KL, Ross FP, et al. Quantification of Peri-Implant Bacterial Load and in Vivo Biofilm Formation in an Innovative, Clinically Representative Mouse Model of Periprosthetic Joint Infection. *J Bone Joint Surg Am*. 2017 Mar 15;99(6):e25.
376. Glage S, Paret S, Winkel A, Stiesch M, Bleich A, Krauss JK, et al. A new model for biofilm formation and inflammatory tissue reaction: intraoperative infection of a cranial implant with *Staphylococcus aureus* in rats. *Acta Neurochir (Wien)*. 2017 Sep;159(9):1747-56.
377. Madani A, Garakani K, Mofrad MRK. Molecular mechanics of *Staphylococcus aureus* adhesion, CNA, and the inhibition of bacterial adhesion by stretching collagen. *PLoS One*. 2017;12(6):e0179601.
378. Herman-Bausier P, Valotteau C, Pietrocola G, Rindi S, Alsteens D, Foster TJ, et al. Mechanical Strength and Inhibition of the *Staphylococcus aureus* Collagen-Binding Protein Cna. *MBio*. 2016 Oct 25;7(5).
379. Patti JM, Bremell T, Krajewska-Pietrasik D, Abdelnour A, Tarkowski A, Ryden C, et al. The *Staphylococcus aureus* collagen adhesion is a virulence determinant in experimental septic arthritis. *Infect Immun*. 1994 Jan;62(1):152-61.
380. Elasri MO, Thomas JR, Skinner RA, Blevins JS, Beenken KE, Nelson CL, et al. *Staphylococcus aureus* collagen adhesion contributes to the pathogenesis of osteomyelitis. *Bone*. 2002 Jan;30(1):275-80.
381. Giudicelli J SJ-C. Le remodelage osseux et l'exploration de l'ostéoporose. . *Revue de l'ACOMEN*. 1998;4.
382. Alford AI, Kozloff KM, Hankenson KD. Extracellular matrix networks in bone remodeling. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015 Aug;65:20-31.