



**HAL**  
open science

# Contribution à la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la virulence de *Staphylococcus lugdunensis*.

Sandrine Dahyot

► **To cite this version:**

Sandrine Dahyot. Contribution à la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la virulence de *Staphylococcus lugdunensis*.. Sciences agricoles. Normandie Université, 2019. Français. NNT : 2019NORMR046 . tel-02325654

**HAL Id: tel-02325654**

**<https://theses.hal.science/tel-02325654>**

Submitted on 22 Oct 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.



Normandie Université

## THÈSE

**Pour obtenir le diplôme de doctorat**

**Spécialité Sciences de la vie et de la santé**

**Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie**

### **Contribution à la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la virulence de *Staphylococcus lugdunensis***

**Présentée et soutenue par**

**Sandrine DAHYOT**

**Thèse soutenue publiquement le 18 Juillet 2019  
devant le jury composé de**

Monsieur Frédéric LAURENT	Professeur, Université Claude Bernard Lyon 1	Rapporteur
Monsieur Dominique Stéphane BLANC	MER Privat-Doctent, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois	Rapporteur
Madame Estelle JUMAS-BILAK	Professeur, Université de Montpellier	Examineur
Monsieur Vincent CATTOIR	Professeur, Université de Rennes 1	Examineur
Madame Martine PESTEL-CARON	Professeur, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

**Thèse dirigée par le Professeur Martine PESTEL-CARON  
Laboratoire EA2656 Groupe de Recherche sur l'Adaptation Microbienne**





## Remerciements

*A Monsieur le Professeur Frédéric Laurent et Monsieur Dominique Stéphane Blanc,*

Vous me faites l'honneur d'être rapporteurs de ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de mon entière reconnaissance.

*A Madame le Professeur Estelle Jumas-Bilak,*

Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de prendre part à ce jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

*A Monsieur le Professeur Vincent Cattoir,*

C'est un grand honneur que tu acceptes de participer à ce jury de thèse. Travailler à tes côtés a été une expérience des plus enrichissantes, qui m'a grandement motivée à continuer dans la voie de la recherche. C'est toi qui m'as parlé il y a quelques années de ce poste à Rouen...encore mille fois merci !

*A Mme le Professeur Martine Pestel-Caron,*

Au moment d'écrire ces lignes, les mots me manquent pour exprimer toute ma gratitude envers vous, Martine. Cette thèse aura en effet duré un petit peu plus longtemps que prévu ! Malgré vos nombreuses responsabilités, vous avez toujours su vous rendre disponible et à l'écoute. Merci de m'avoir fait partager votre savoir et votre rigueur scientifique, et (!) surtout merci pour votre gentillesse, votre patience et votre investissement, qui m'ont été extrêmement précieux pour mener à bien cette thèse.

*A Mr le Pr François Caron,* directeur de notre équipe de recherche au cours d'une grande partie de ce travail. Votre savoir et votre compétence sont pour moi une source de profond respect et d'admiration.

*Aux Dr Gilles Prévost et Xavier Argémi* de l'Université de Strasbourg, merci de nous avoir fait confiance en nous envoyant vos souches. Notre collaboration et nos nombreux échanges ont été des plus enrichissants.

*Au Dr Patrice François* de l'Université de Genève, merci pour votre précieuse contribution à ce travail.

*Au Pr Olivier Lesouhaitier et au Dr Thomas Clamens* du laboratoire LMSM d'Evreux. Je vous remercie pour votre importante contribution, et pour le temps que vous avez consacré à ce projet. Et ce, toujours dans la bonne humeur, malgré les nombreuses péripéties dues au fait de travailler avec du vivant!

*Au Dr Virginie Oxaran,* que je n'ai jamais eu encore l'honneur de rencontrer, mais avec qui nous avons beaucoup échangé ces derniers temps. Merci pour la précieuse aide que tu nous as apportée à la rédaction de l'article, malgré le court délai imposé.

*A toute l'équipe des « Gramys »,* actuels ou anciens, qui ont fait que ces années de thèse sont associées à de très bons moments!

A Stéphanie, notre « chef du bonheur » (à quand la prochaine « réunion de labo » en terrasse ?). Merci pour ta gentillesse, ta présence tout au long de ces années et ton amitié. Et en passant, embrasse Poupette de ma part!

A mes colocataires de bureau successifs. A Julien, alias le Patron, à que merci pour la bonne ambiance que tu as instauré dans l'équipe, pour tes craquages à base de musique zen ou de bruits étranges de tortue, et surtout pour avoir initié l'esprit Johnny / Francky, que nous saurons perpétuer !

A Jérémie, ou Jérôme, ou NP, mon binôme lugdu de choc au cours de cette thèse, sans qui tout cela n'aurait pas eu la même saveur! Merci pour tous ces échanges scientifiques et ateliers d'écriture d'article

menés dans la bonne humeur. Et surtout, merci pour ces bon souvenirs partagés au cours de nos escapades, que ce soit dans les bars Stuttgartois ou (tentatives de) soirée au Viper Room!

A Marie, ma nouvelle super coloc', dont la gentillesse à toute épreuve n'a d'égale que son grain de folie en soirée fanfreluche (le look ExtraRasta a mis la barre haut!). Merci pour ta présence et ton soutien. Promis, on se le fait bientôt ce cours de yoga! (Un petit boujou au passage à Clément, notre Gramys' coach karaoké, qui a encore beaucoup de travail^^)

A Agnès, notre petite stagiaire bientôt Dr ! Des échanges casse-tête autour du Pyo aux soirées toit-terrasse Madrilène à base de Protos, une collègue devenue bien plus désormais. Merci pour ta prévenance et ton sourire constant. Et pour la dernière année de thèse qu'il te reste, n'oublie pas... force et honneur !

Aux stagiaires, et en particulier aux actuels, Nicolas et Laurie, des « pious-pious » au top que nous serons très contents de garder 3 ans de plus !

*A mes collègues biologistes et techniciens du CHU*, qui rendent le travail hospitalier si agréable. A Noëlle, Sophie et Soumaya, merci pour votre gentillesse, votre écoute et pour ces pauses café où il est tellement bon d'échanger! A Ludo, pour toutes ces discussions enrichissantes, malgré le quotidien chargé. A Anaïs, qui est bien placée pour comprendre ce que représente l'aboutissement de ce travail, courage, bientôt la fin !

*A tous ceux dont j'ai croisé le chemin au cours de mes années d'internat*, et qui m'ont donné le goût pour cette merveilleuse science qu'est la Bactériologie. Et plus particulièrement, au Pr Eddi Mammeri, qui m'a initié à cette discipline et a su me communiquer sa passion de la recherche, au Dr François Guérin, dont l'engagement, le savoir et la gentillesse m'ont beaucoup appris, à Zouzou, une personne profondément humaine avec qui travailler a été un réel plaisir.

*A mes ex co-internes*, et en particulier à Stéphanie et Christine, deux personnes merveilleuses que je n'arrive pas à voir aussi souvent que je voudrais, pourtant la Basse Normandie n'est pas si loin ! *A mes copines de fac*, Clémence, Sophie, Hélène et Aurélie. Toujours là malgré les années qui passent et les kilomètres entre nous qui s'allongent. *Aux belles rencontres faites à Rouen*. A Nadia, ou Didine, une grande sœur d'adoption, merci pour tous ces moments merveilleux que l'on passe ensemble. A Schruppy, pour nos soirées mémorables à basse de fléchettes, ou autres ! A Mathilde, pour nos petites escapades extra-fac si appréciables. A Julien, merci pour ces pauses improvisées de fin de thèse !

*Et enfin à ma famille*. Une pensée très émue pour mes grands-mères qui, de par leur gentillesse et leur amour, ont su chacune à leur façon nous transmettre des valeurs essentielles. A mon grand-père, Papy, à quelques semaines près, j'aurai pu te le dire que ça y est, je l'ai enfin terminée cette thèse... Merci pour toute l'attention que tu nous as toujours portée. Ton humour et ta spontanéité vont beaucoup nous manquer !

A mes parents, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Merci d'avoir toujours été là, de m'avoir soutenue dans mes choix au cours de ces longues études, et de m'avoir chouchoutée dans les moments d'écriture en Bretagne ! Malgré les épreuves, nous restons toujours unis, et c'est notre force. Je vous aime plus que tout.

A ma sœur. Je ne saurai jamais assez te remercier d'avoir été si présente, en particulier ces derniers temps, d'avoir supporté mes moments de stress et de m'avoir toujours encouragée. Sans toi, nos sorties, notre complicité, tout cela n'aurait probablement pas existé. Le meilleur reste à venir !

# Sommaire

Liste des figures .....	3
Liste des tableaux .....	7
Liste des abréviations .....	9
Introduction générale.....	11
<b>Partie 1 : <i>Staphylococcus lugdunensis</i> .....</b>	<b>13</b>
<b>1. Caractères généraux.....</b>	<b>13</b>
1.1. Principaux caractères microbiologiques.....	13
1.2. Identification au rang d'espèce.....	14
1.3. Habitat .....	17
1.4. Données génomiques.....	18
1.5. Sensibilité aux antibiotiques.....	20
<b>2. Infections à <i>S. lugdunensis</i> .....</b>	<b>23</b>
2.1. Données générales.....	23
2.2. Infections de la peau et des tissus mous .....	25
2.3. Infections ostéo-articulaires.....	26
2.4. Bactériémies et endocardites infectieuses .....	28
2.5. Autres infections.....	30
<b>3. Facteurs de virulence .....</b>	<b>31</b>
3.1. Protéines d'adhésion.....	31
3.2. Systèmes de capture du fer.....	42
3.3. Formation de biofilm.....	45
3.4. Toxines et exoenzymes.....	55
3.5. La lugdunine.....	57
3.6. Autres facteurs de virulence .....	59
<b>Partie 2 : Systèmes à deux composants et régulation de la virulence chez <i>Staphylococcus</i> .....</b>	<b>61</b>
<b>1. Généralités sur les systèmes à deux composants (TCS) .....</b>	<b>61</b>
1.1. Structure et fonctionnement des TCS.....	61
1.2. Rôles des TCS .....	62
<b>2. Implication des TCS dans la virulence chez <i>Staphylococcus</i> .....</b>	<b>63</b>

2.1.	Régulateurs globaux de l'expression de la virulence .....	65
2.2.	Respiration et fermentation .....	79
2.3.	Métabolisme de la paroi cellulaire, autolyse et mort cellulaire .....	83
<b>3.</b>	<b>Travail personnel : rôle du système à deux composants LytSR dans la pathogénèse et la formation de biofilm chez <i>S. lugdunensis</i> .....</b>	<b>97</b>
3.1.	Introduction .....	97
3.2.	Publication n°1 : rôle du système à deux composants LytSR dans la formation de biofilm et la pathogénèse de <i>S. lugdunensis</i> .....	101
3.3.	Discussion et perspectives.....	103
<b>Partie 3 : Epidémiologie moléculaire au sein du genre <i>Staphylococcus</i>.....</b>		<b>111</b>
<b>1.</b>	<b>Généralités .....</b>	<b>111</b>
1.1.	Objectifs du typage bactérien .....	111
1.2.	Validation d'une méthode de typage.....	113
1.3.	Applications phylogénétiques des méthodes de génotypage.....	115
<b>2.</b>	<b>Méthodes de génotypage développées au sein du genre <i>Staphylococcus</i> .....</b>	<b>121</b>
2.1.	<i>Multilocus sequence typing</i> (MLST).....	121
2.2.	<i>Multi-virulence locus sequence typing</i> (MVLST).....	134
2.3.	<i>Multiple-locus variable number tandem repeats analysis</i> (MLVA) .....	137
2.4.	<i>Single locus sequence typing</i> (SLST).....	151
2.5.	<i>Next generation sequencing</i> (NGS).....	160
<b>3.</b>	<b>Travail personnel : développement de méthodes de génotypage à visée épidémiologique chez <i>S. lugdunensis</i> .....</b>	<b>163</b>
3.1.	Publication n°2 : apport des méthodes MLVA et TRST dans le génotypage de <i>S. lugdunensis</i> .....	163
3.2.	Publication n°3 : <i>fbl-typing</i> , un outil de première ligne pour l'épidémiologie des infections à <i>S. lugdunensis</i> , mais non prédictif de la capacité de liaison des souches au fibrinogène.....	169
3.3.	Discussion et perspectives.....	177
<b>Conclusion générale .....</b>		<b>193</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>		<b>195</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Aspect morphologique de deux cultures de <i>S. lugdunensis</i> sur gélose au sang .....	14
<b>Figure 2.</b> <i>Neighbor-joining tree</i> basé sur les séquences internes du gène <i>gap</i> et de l'ADNr 16S, montrant les relations phylogénétiques au sein du genre <i>Staphylococcus</i> .....	16
<b>Figure 3.</b> Relations phylogénétiques entre les 26 génomes des souches de <i>S. lugdunensis</i> publiés sur NCBI au 01 Mai 2019.....	19
<b>Figure 4.</b> Activité bactéricide comparative des glycopeptides après six et 24 heures d'exposition à dix fois la CMI vis-à-vis d'isolats de staphylocoques à coagulase négative (SCN).....	21
<b>Figure 5.</b> Classification des staphylocoques en fonction des données cliniques et épidémiologiques.....	23
<b>Figure 6.</b> Recrutement de patients ayant des échantillons positifs à <i>S. lugdunensis</i> au cours de l'étude prospective menée à l'hôpital de Strasbourg.....	24
<b>Figure 7.</b> Infections de la peau et des tissus mous liées à <i>S. lugdunensis</i> .....	25
<b>Figure 8.</b> Photographie d'une endophtalmie à <i>S. lugdunensis</i> avec hypopion.....	30
<b>Figure 9.</b> Classification des protéines staphylococciques ancrées à la paroi en quatre groupes sur la base des motifs structuraux.....	32
<b>Figure 10.</b> Domaines protéiques de la protéine de liaison au facteur von Willebrand vWbl de <i>S. lugdunensis</i> ...	33
<b>Figure 11.</b> Rôles de la liaison au facteur von Willebrand (vWf) dans la virulence <i>in vivo</i> de <i>S. lugdunensis</i> .....	35
<b>Figure 12.</b> Domaines des protéines de liaison au fibrinogène Fbl ( <i>S. lugdunensis</i> ) et ClfA ( <i>S. aureus</i> ).....	37
<b>Figure 13.</b> Adhésion de souches de <i>S. lugdunensis</i> au fibrinogène immobilisé .....	38
<b>Figure 14.</b> Représentation des protéines de surface putatives <i>S. lugdunensis surface proteins</i> (SlS).....	39
<b>Figure 15.</b> Représentation de l'autolysine AtlL de <i>S. lugdunensis</i> et d'autolysines staphylococciques homologues .....	40
<b>Figure 16.</b> Rôles de l'autolysine AtlL de <i>S. lugdunensis</i> dans la formation de biofilm et dans la virulence dans le modèle <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	41
<b>Figure 17.</b> Composants du système Isd de <i>S. aureus</i> impliqué dans le transport de l'hème et la libération du fer .....	42
<b>Figure 18.</b> Comparaison des <i>loci isd</i> de <i>S. aureus</i> et <i>S. lugdunensis</i> .....	43
<b>Figure 19.</b> Modèle de contribution de l'autolysine IsdP à l'acquisition de l'hème chez <i>S. lugdunensis</i> .....	44
<b>Figure 20.</b> Phases du développement du biofilm staphylococcique .....	45
<b>Figure 21.</b> Composants principaux de la matrice des biofilms staphylococciques.....	48
<b>Figure 22.</b> Réseau complexe d'interactions régissant la formation et la dispersion du biofilm chez <i>S. aureus</i> ...	50
<b>Figure 23.</b> Organisation génomique du <i>locus icaADBC</i> de <i>S. lugdunensis</i> comparativement à d'autres espèces de staphylocoques .....	52
<b>Figure 24.</b> Évaluation de la matrice extracellulaire de biofilms de <i>S. lugdunensis</i> et <i>S. epidermidis</i> par microscopie confocale à balayage laser (CLSM) .....	53
<b>Figure 25.</b> Activité hémolytique synergique de <i>S. lugdunensis</i> révélée par <i>CAMP-test</i> .....	56
<b>Figure 26.</b> Groupe de gènes, voie de biosynthèse proposée et structure chimique de la lugdunine de <i>S. lugdunensis</i> .....	58



<b>Figure 27.</b> Rôles avérés et/ou putatifs des principaux facteurs de virulence dans la physiopathologie des infections à <i>S. lugdunensis</i> .....	60
<b>Figure 28.</b> Représentation schématique du fonctionnement d'un système à deux composants (TCS).....	62
<b>Figure 29.</b> Organisation moléculaire, biosynthèse du signal senseur et cascade de transduction du système de <i>quorum sensing agr</i> de <i>S. aureus</i> .....	66
<b>Figure 30.</b> Rôle du système de <i>quorum sensing agr</i> dans la régulation de la production de facteurs de virulence chez <i>S. aureus</i> .....	68
<b>Figure 31.</b> Implication du système <i>agr</i> dans la pathogénicité de <i>S. aureus</i> .....	69
<b>Figure 32.</b> <i>Locus agrBDCA</i> et groupes des peptides autoinducteurs (AIP) associés chez <i>S. aureus</i> .....	69
<b>Figure 33.</b> Organisation génétique du <i>locus agr</i> de <i>S. epidermidis</i> .....	70
<b>Figure 34.</b> Structure et interaction des peptides autoinducteurs (AIP) I à III codés par le <i>locus agr</i> de <i>S. epidermidis</i> .....	71
<b>Figure 35.</b> Organisation génétique comparative du <i>locus agr</i> chez <i>S. aureus</i> et <i>S. lugdunensis</i> .....	72
<b>Figure 36.</b> Organisation moléculaire et transduction du signal du système à deux composants SaeRS de <i>S. aureus</i> .....	76
<b>Figure 37.</b> Comparaison des séquences nucléotidiques et protéiques du système à deux composants Sae de <i>S. aureus</i> et <i>S. epidermidis</i> .....	78
<b>Figure 38.</b> Modélisation du fonctionnement du système à deux composants SrrAB de <i>S. aureus</i> en fonction de la présence ou non d'oxygène dans le milieu.....	80
<b>Figure 39.</b> Modèle de la régulation par <i>srrAB</i> proposé chez <i>S. epidermidis</i> .....	82
<b>Figure 40.</b> Organisation génétique de l'opéron <i>walRK</i> chez <i>S. aureus</i> .....	83
<b>Figure 41.</b> Impact du système à deux composants (TCS) WalRK dans la virulence de <i>S. aureus</i> .....	85
<b>Figure 42.</b> Modélisation des interactions du système à deux composants ArlSR de <i>S. aureus</i> avec d'autres régulateurs et avec des gènes codant des facteurs de virulence. ....	87
<b>Figure 43.</b> Modèle du contrôle de la formation d'agglutinats (A) et de la formation de biofilm (B) par la cascade de régulation ArlSR-MgrA chez <i>S. aureus</i> .....	88
<b>Figure 44.</b> Système de régulation Cid/Lrg impliqué dans le contrôle de la mort cellulaire et de la lyse chez <i>S. aureus</i> .....	91
<b>Figure 45.</b> Représentation schématique du <i>locus lytSR</i> de <i>S. epidermidis</i> .....	94
<b>Figure 46.</b> Représentation des réseaux d'interaction des principaux régulateurs globaux de la virulence chez <i>S. aureus</i> .....	95
<b>Figure 47.</b> Modèle d'interactions cellulaires au sein du biofilm de <i>S. aureus</i> . ....	103
<b>Figure 48.</b> Voies de régulation du système à deux composants LytSR chez <i>Bacillus subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus mutans</i> et <i>S. epidermidis</i> .....	108
<b>Figure 49.</b> Dendrogrammes montrant les relations génétiques de 72 isolats de <i>Clostridium difficile</i> basés sur les séquences alléliques des six <i>loci</i> individuels utilisés pour le développement d'un schéma <i>multilocus sequence typing</i> (MLST) .....	117
<b>Figure 50.</b> Représentation des différentes structures de population bactérienne.....	118
<b>Figure 51.</b> Principe général de la technique de typage <i>multilocus sequence typing</i> (MLST).....	122

<b>Figure 52.</b> Représentation de la population de <i>S. aureus</i> définie par analyse <i>multilocus sequence typing</i> (MLST) sous la forme d'un diagramme eBURST .....	123
<b>Figure 53.</b> Diversité génétique définie par <i>multilocus sequence typing</i> de la population mondiale des souches de <i>S. aureus</i> résistantes à la pénicilline (MRSA).....	127
<b>Figure 54.</b> Application de l'algorithme eBURST aux données de <i>multilocus sequence typing</i> (MLST) de 217 isolats de <i>S. epidermidis</i> .....	128
<b>Figure 55.</b> Dendrogramme montrant les relations génétiques de 87 isolats de <i>S. lugdunensis</i> basé sur l'analyse <i>multiLocus sequence typing</i> (MLST) .....	131
<b>Figure 56.</b> Analyse eBURST de la population de <i>S. lugdunensis</i> .....	133
<b>Figure 57.</b> Localisation des <i>loci</i> de <i>multi-virulence locus sequence typing</i> (MVLST) dans le génome de la souche <i>S. lugdunensis</i> N920143.....	134
<b>Figure 58.</b> Dendrogramme montrant les relations génétiques de 93 isolats de <i>S. lugdunensis</i> basé sur l'analyse <i>multi-virulence locus sequence typing</i> (MVLST) .....	136
<b>Figure 59.</b> Représentation des différents types de tandem-repeats (TR).....	137
<b>Figure 60.</b> Variabilité du nombre de <i>tandem-repeats</i> (TR) par mécanisme de glissement de l'ADN polymérase lors de la réplication.....	138
<b>Figure 61.</b> Variabilité du nombre de <i>tandem-repeats</i> (TR) par mécanisme de recombinaison .....	139
<b>Figure 62.</b> Mécanisme de variation de phase entraîné par la variation du nombre de <i>tandem-repeats</i> (TR) .....	141
<b>Figure 63.</b> Représentation de l'organisation d'un <i>locus</i> de VNTR. ....	141
<b>Figure 64.</b> Variation du nombre de répétitions en tandem dans huit <i>loci</i> de <i>variable number of tandem repeats</i> (VNTRs) afin de caractériser deux souches différentes. ....	142
<b>Figure 65.</b> Profils de bandes de <i>multiple-locus variable number tandem repeats analysis</i> (MLVA) de 34 isolats de <i>S. aureus</i> caractérisés en parallèle par <i>pulsed-field gel electrophoresis</i> (PFGE) .....	145
<b>Figure 66.</b> <i>Minimum spanning tree</i> des 1681 isolats de <i>S. aureus</i> typés par <i>multiple-locus variable number tandem repeats analysis</i> (MLVA) .....	148
<b>Figure 67.</b> Analyse des <i>clusters</i> obtenus par typage <i>multiple-locus variable number tandem repeats analysis</i> (MLVA) de 31 souches de <i>S. epidermidis</i> .....	150
<b>Figure 68.</b> Domaines composant le gène <i>spa</i> codant la protéine A de <i>S. aureus</i> .....	152
<b>Figure 69.</b> Comparaison des deux systèmes de nomenclature utilisés pour le <i>spa typing</i> de <i>S. aureus</i> .....	153
<b>Figure 70.</b> Résultats de typage obtenus par électrophorèse en champ pulsé (PFGE), <i>multilocus sequence typing</i> (MLST/eBURST) et <i>spa typing</i> (BURP). ....	154
<b>Figure 71.</b> Organisation structurale de la protéine ClfB.....	157
<b>Figure 72.</b> Apports de la comparaison des génomes de <i>S. aureus</i> .....	161
<b>Figure 73.</b> Démarche de sélection des <i>loci</i> de <i>variable number of tandem repeats</i> (VNTRs) chez <i>S. lugdunensis</i> . .....	164
<b>Figure 74.</b> Liste et composition en acides aminés des 92 <i>fbl-types</i> identifiés chez <i>S. lugdunensis</i> . ....	172
<b>Figure 75.</b> Page d'accueil du <i>fbl-typing Server</i> disponible à l'adresse <a href="http://fbl-typing.univ-rouen.fr/">http://fbl-typing.univ-rouen.fr/</a> .....	173
<b>Figure 76.</b> Localisation des <i>loci</i> de <i>variable number of tandem repeats</i> (VNTRs) utilisés dans le schéma <i>multiple-locus VNTR analysis</i> (MLVA) dans le génome de la souche <i>S. lugdunensis</i> N920143. ....	179

**Figure 77.** Représentations de la structure de population définie par analyse *multilocus sequence typing* (MLST) chez *N. meningitidis* et chez *S. aureus* ..... 186

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Répartition des sites de portage de <i>S. lugdunensis</i> et <i>S. aureus</i> chez des sujets en bonne santé .....	18
<b>Tableau 2.</b> Comparaison des données cliniques et microbiologiques de patients atteints d'infections ostéo-articulaires sur prothèse à <i>S. lugdunensis</i> , <i>S. aureus</i> et <i>S. epidermidis</i> .....	27
<b>Tableau 3.</b> Taux de chirurgie et mortalité selon l'espèce de staphylocoque identifiée parmi les cas d'endocardites diagnostiqués durant une étude prospective menée dans deux centres hospitaliers espagnols (1990-2003).....	29
<b>Tableau 4.</b> Systèmes à deux composants (TCS) décrits chez <i>S. aureus</i> . .....	64
<b>Tableau 5.</b> Régulateurs ayant un impact, positif ou négatif, sur la fonction du système <i>agr</i> . .....	67
<b>Tableau 6.</b> Structure des peptides autoinducteurs (AIP) des espèces <i>S. aureus</i> (quatre groupes d'AIP), <i>S. epidermidis</i> (trois groupes d'AIP) et <i>S. lugdunensis</i> (deux groupes d'AIP). .....	73
<b>Tableau 7.</b> Comparaison des performances de différentes méthodes de génotypage.....	120
<b>Tableau 8.</b> Distribution des <i>spa types</i> les plus prévalents selon les continents. ....	156
<b>Tableau 9.</b> Critères des méthodes de typage basées sur les <i>variable number of tandem repeats</i> (VNTRs) développées chez <i>S. lugdunensis</i> d'après ceux de van Belkum et al.....	184



## Liste des abréviations

<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>ADNe</b>	ADN extracellulaire
<b>AIP</b>	Peptide AutoInducteur
<b>ARN</b>	Acide RiboNucléique
<b>BURP</b>	<i>Based Upon Repeat Pattern</i>
<b>CA-MRSA</b>	<i>Community-Acquired/Associated MRSA</i>
<b>CC</b>	Complexe Clonal
<b>CifA/CifB</b>	<i>Clumping Factor A et B</i>
<b>CLSM</b>	Microscopie Confocale à balayage Laser
<b>DI</b>	Indice de Diversité de Simpson
<b>DLV</b>	<i>Double Locus Variant</i>
<b>EI</b>	Endocardite Infectieuse
<b>Fbl</b>	<i>Fibrinogen Binding protein of S. lugdunensis</i>
<b>FnBPA/FnBPB</b>	<i>Fibrinogen/fibronectin-Binding Proteins</i>
<b>HA-MRSA</b>	<i>Hospital-Acquired/Associated MRSA</i>
<b>HK</b>	Histidine Kinase
<b>HPG</b>	Hydrolase du Peptidoglycane
<b>I<sub>a</sub></b>	Index d'Association
<b>IAS</b>	Infection Associée aux Soins
<b>Ica</b>	<i>InterCellular Adhesion</i>
<b>Ig</b>	ImmunoGlobuline
<b>IOA</b>	Infection Ostéo-Articulaire
<b>IPTM</b>	Infection de la Peau et des Tissus Mous
<b>Isd</b>	<i>Iron-regulated Surface Determinant</i>
<b>LA-MRSA</b>	<i>Livestock-Associated MRSA</i>
<b>LDH</b>	Lactate DeHydrogenase
<b>MC</b>	<i>MLVA Complex</i>
<b>MLEE</b>	<i>MultiLocus Enzyme Electrophoresis</i>
<b>MLST</b>	<i>MultiLocus Sequence Typing</i>
<b>MLVA</b>	<i>Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis</i>
<b>MRSA</b>	<i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
<b>MSCRAMMs</b>	<i>Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules</i>
<b>MSSA</b>	<i>Methicillin-Sensible Staphylococcus aureus</i>
<b>MT</b>	<i>MLVA Type</i>
<b>MVLST</b>	<i>Multi-Virulence Locus Sequence Typing</i>
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>NGS</b>	<i>Next Generation Sequencing</i>
<b>Pb</b>	Paire de bases
<b>PFGE</b>	<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i> (électrophorèse en champ pulsé)
<b>PG</b>	Peptidoglycane
<b>PIA</b>	<i>Polysaccharide Intercellular Adhesin</i>

---

<b>PNAG</b>	Poly- <i>N</i> -AcétylGlucosamine
<b>PSM</b>	<i>Phenol-Soluble Modulin</i>
<b>PVL</b>	Leucocidine de Panton-Valentine
<b>RR</b>	Régulateur de Réponse
<b>Sar</b>	<i>Staphylococcal accessory regulator</i>
<b>SCC<i>mec</i></b>	<i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i>
<b>SCN</b>	Staphylocoque à Coagulase Négative
<b>SCV</b>	<i>Small Colony Variant</i>
<b>Sdr</b>	<i>SD repeats</i>
<b>SERAM</b>	<i>Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecule</i>
<b>Sls</b>	<i>S. lugdunensis Surface proteins</i>
<b>SLST</b>	<i>Single Locus Sequence Typing</i>
<b>SLV</b>	<i>Single Locus Variant</i>
<b>SNP</b>	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
<b>SSM</b>	<i>Strand-Slippage Mismatching</i>
<b>ST</b>	<i>Sequence Type</i>
<b>TCS</b>	<i>Two-Component regulatory Systems</i> (systèmes à deux composants)
<b>TR</b>	<i>Tandem-Repeats</i>
<b>TRST</b>	<i>Tandem Repeats Sequence Typing</i>
<b>TRT</b>	TRST Type
<b>UPGMA</b>	<i>Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic averages</i>
<b>VNTR</b>	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>
<b>VT</b>	<i>Virulence Type</i>
<b>vWbl</b>	<i>von Willebrand factor-Binding protein of S. Lugdunensis</i>
<b>vWf</b>	facteur von Willebrand

## Introduction générale

Ce travail de thèse s'inscrit dans les thématiques de recherche développées ces dernières années par le Groupe de Recherche sur l'Adaptation Microbienne (GRAM EA2656). La politique scientifique du groupe est centrée sur l'adaptation microbienne. Une des thématiques porte sur une espèce de staphylocoque à coagulase négative particulièrement pathogène, *Staphylococcus lugdunensis* ; elle a pour objectifs de mieux comprendre ses mécanismes d'adaptation, de colonisation et d'infection. Ainsi, l'équipe de recherche s'attache à caractériser cette espèce sur le plan phylogénétique (recherche de lignées hypervirulentes ou associées aux infections invasives), et à explorer les mécanismes moléculaires qui sous-tendent cette virulence particulière en cherchant à identifier de nouveaux facteurs de virulence et de potentiels systèmes régulateurs.

Ce mémoire de Doctorat présente les travaux que nous avons réalisés dans ce contexte, avec pour objectifs :

- la caractérisation du système régulateur à deux composants LytSR potentiellement impliqué dans la virulence,
- la recherche de marqueurs phylogénétiques associés à la virulence.

Dans une **première partie**, nous présenterons une analyse des données bibliographiques de la littérature concernant l'espèce *S. lugdunensis*.

Une **deuxième partie** sera consacrée à l'état des connaissances concernant les systèmes à deux composants et leur implication dans la virulence chez les staphylocoques, puis nous exposerons notre travail expérimental portant sur l'étude du rôle du système à deux composants LytSR dans la pathogenèse de *S. lugdunensis*.

Enfin, la **troisième partie** s'intéressera aux méthodes de génotypage existant chez les staphylocoques, puis nous présenterons nos travaux expérimentaux ayant porté sur le développement de nouveaux outils de génotypage à des fins épidémiologiques chez *S. lugdunensis*.





# Partie 1 : *Staphylococcus lugdunensis*

*Staphylococcus lugdunensis* est une espèce de staphylocoque à coagulase négative (SCN) commensale de la flore cutanée humaine (Bieber and Kahlmeter, 2010), mais dont le pouvoir pathogène s'apparente plus à celui de l'espèce virulente *Staphylococcus aureus* qu'à celui des autres SCN (Frank et al., 2008).

## 1. Caractères généraux

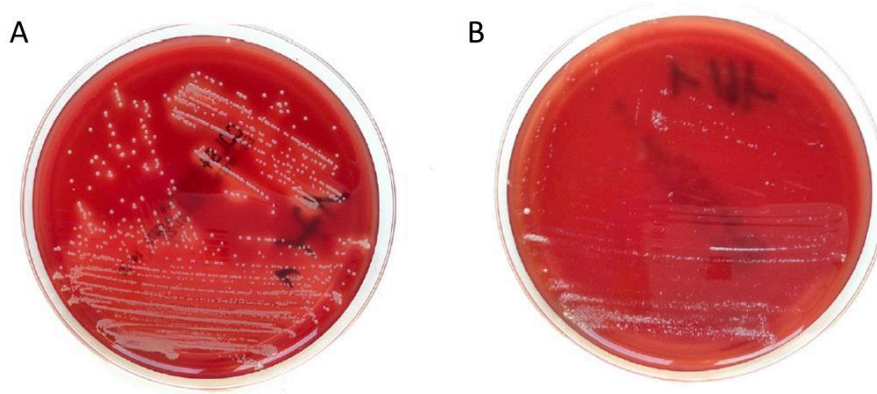
### 1.1. Principaux caractères microbiologiques

*S. lugdunensis* a été initialement décrit en 1988 à Lyon (du latin *Lugdunum*, d'où son nom) à partir d'un prélèvement de ganglion axillaire (souche de référence N860297<sup>T</sup>, ATCC® 43809<sup>TM</sup>, DSM 4804) (Freney et al., 1988). Il est classé dans le groupe des SCN. Les SCN sont ainsi nommés du fait de leur incapacité à coaguler du plasma de l'Homme ou de lapin en raison de l'absence de sécrétion de la coagulase libre (ou staphylocoagulase), et ce à la différence de *S. aureus*.

*S. lugdunensis* se présente sous forme de *cocci* à Gram positif, disposés isolément, par paires ou en amas. Les cellules ont un diamètre de 0,8 à 1,0 µm et sont immobiles et non sporulées. Comme tous les staphylocoques, il produit une catalase (Freney et al., 1988).

C'est une bactérie aérobie-anaérobie facultative, non exigeante, qui cultive facilement sur des milieux ordinaires à des températures comprises entre 30 et 45°C. De par son appartenance au genre *Staphylococcus*, il est capable de croître en milieu hypersalé (caractère halotolérant) renfermant jusqu'à 15% de chlorure de sodium.

La morphologie des colonies et la pigmentation varient selon les souches, le milieu de culture et le temps d'incubation (**Figure 1**) (Fleurette et al., 1989; Freney et al., 1988). La plupart sont lisses et brillantes, à bords réguliers, de couleur crème ou pigmentées en jaune, alors que certaines colonies présentent au contraire un phénotype rugueux, mat avec des bords irréguliers (Freney et al., 1988; Pereira et al., 2012). Une dissociation de colonies peut être observée (Leung et al., 1998). Des variants à petites colonies (*small colony variants* [SCVs]) non pigmentés et non hémolytiques, à croissance lente, ont également été identifiés à partir de prélèvements cliniques (**Figure 1**) (Argemi et al., 2017a; Frank et al., 2008).



**Figure 1. Aspect morphologique de deux cultures de *S. lugdunensis* sur gélose au sang** (Argemi et al., 2017a). Les souches ont été isolées à partir de prélèvements osseux chez une même patiente à des dates différentes. **(A)** Souche isolée en Mai 2012, d’aspect lisse et brillant avec une zone d’hémolyse totale, après 12 heures d’incubation. **(B)** Souche isolée en Octobre 2013, de phénotype *small colony variant* non hémolytique, après 72 heures d’incubation.

La plupart des souches de *S. lugdunensis* présentent une hémolyse totale (hémolyse  $\beta$ ) lors de la culture sur géloses au sang de lapin, de mouton ou de cheval ; elle est visible essentiellement après 48 heures d’incubation (Frank et al., 2008; Szabados et al., 2011a; Tan et al., 2008). De plus, une activité hémolytique synergistique, semblable à l’activité de la  $\delta$ -hémolysine de *S. aureus*, peut être observée pour un grand nombre de souches de *S. lugdunensis* (de 73 à 95% en fonction des études) (cf paragraphe 3.4) (Frank et al., 2008; Hébert, 1990; Vandenesch et al., 1991; Yeh et al., 2016).

## 1.2. Identification au rang d’espèce

L’implication de *S. lugdunensis* en pathologie humaine a longtemps été sous-estimée du fait de problèmes d’identification (Argemi et al., 2015; Elamin et al., 2015; Frank et al., 2008). En effet, avant les années 2010, la différenciation en routine entre *S. aureus* et SCN s’effectuait par la réalisation de tests rapides dit « tests au latex ». Ces tests d’agglutination, désignés pour l’identification rapide de *S. aureus*, contiennent des particules de latex sensibilisées par du fibrinogène et des immunoglobulines G (IgG) afin de détecter respectivement la coagulase liée (*clumping factor A* [ClfA]) et la protéine A, et pour certains, des anticorps monoclonaux spécifiques dirigés contre les polysaccharides capsulaires cinq et huit de *S. aureus*.

*S. lugdunensis* ne possède pas de protéine A mais produit une protéine de liaison au fibrinogène (*fibrinogen binding protein of S. lugdunensis* [Fbl]) qui peut être à l’origine de faux positifs lors

de la réalisation des tests d'agglutination ; il peut être ainsi confondu avec *S. aureus* (Marlinghaus et al., 2012). Par ailleurs, si par ce test *S. lugdunensis* était bien classé en SCN, son identification au rang d'espèce en routine n'était alors que peu fréquemment effectuée, les SCN contaminant régulièrement les prélèvements du fait de leur réservoir naturel cutané et les méthodes conventionnelles d'identification étant complexes (techniques biochimiques).

### **1.2.1. Méthodes biochimiques**

D'un point de vue biochimique, les souches de *S. lugdunensis* se distinguent des autres SCN par la production d'ornithine décarboxylase (**ODC**) et de pyrrolidonyl arylamidase (**PYR**), ainsi que par la fermentation du **mannose** (Schnitzler et al., 1998).

L'identification peut également s'effectuer *via* des galeries d'identification destinées aux espèces du genre *Staphylococcus sp.* qui permettent l'exploration d'un plus grand nombre de caractères biochimiques, telles que les galeries manuelles API® ou automatisées VITEK® (bioMérieux). Cependant, des erreurs d'identification à l'espèce variant de 5,9%, à 29,4% peuvent survenir selon les systèmes utilisés (Mateo et al., 2005).

### **1.2.2. Spectrométrie de masse MALDI-TOF**

L'identification en routine de *S. lugdunensis* a été révolutionnée par l'implantation de la technique d'identification de type spectrométrie de masse MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight*) dans de nombreux laboratoires de Bactériologie dans les années 2010 (Patel, 2013). Cette méthode fiable, rapide et peu coûteuse, a conduit à l'identification exhaustive au rang d'espèce des SCN isolés dans les prélèvements cliniques, entraînant ainsi une augmentation de la fréquence d'identification de *S. lugdunensis* (Argemi et al., 2015; Elamin et al., 2015).

### **1.2.3. Méthodes de biologie moléculaire**

La première approche d'identification consiste en l'amplification et le séquençage d'un fragment interne (~ 931 nucléotides) du gène *gap* (codant la glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), présent chez tous les staphylocoques mais possédant une région variable selon les espèces. Une étude a proposé le séquençage de ce gène comme outil moléculaire alternatif au séquençage de l'ADN ribosomal 16S (ADNr 16S) pour l'analyse taxonomique des espèces du genre *Staphylococcus* et pour limiter les erreurs d'identification (Ghebremedhin et al., 2008).

Les analyses phylogénétiques effectuées à partir des séquences du gène *gap* ont montré que *S. lugdunensis* appartenait au même groupe que *Staphylococcus hominis* subsp. *hominis* (Figure 2).

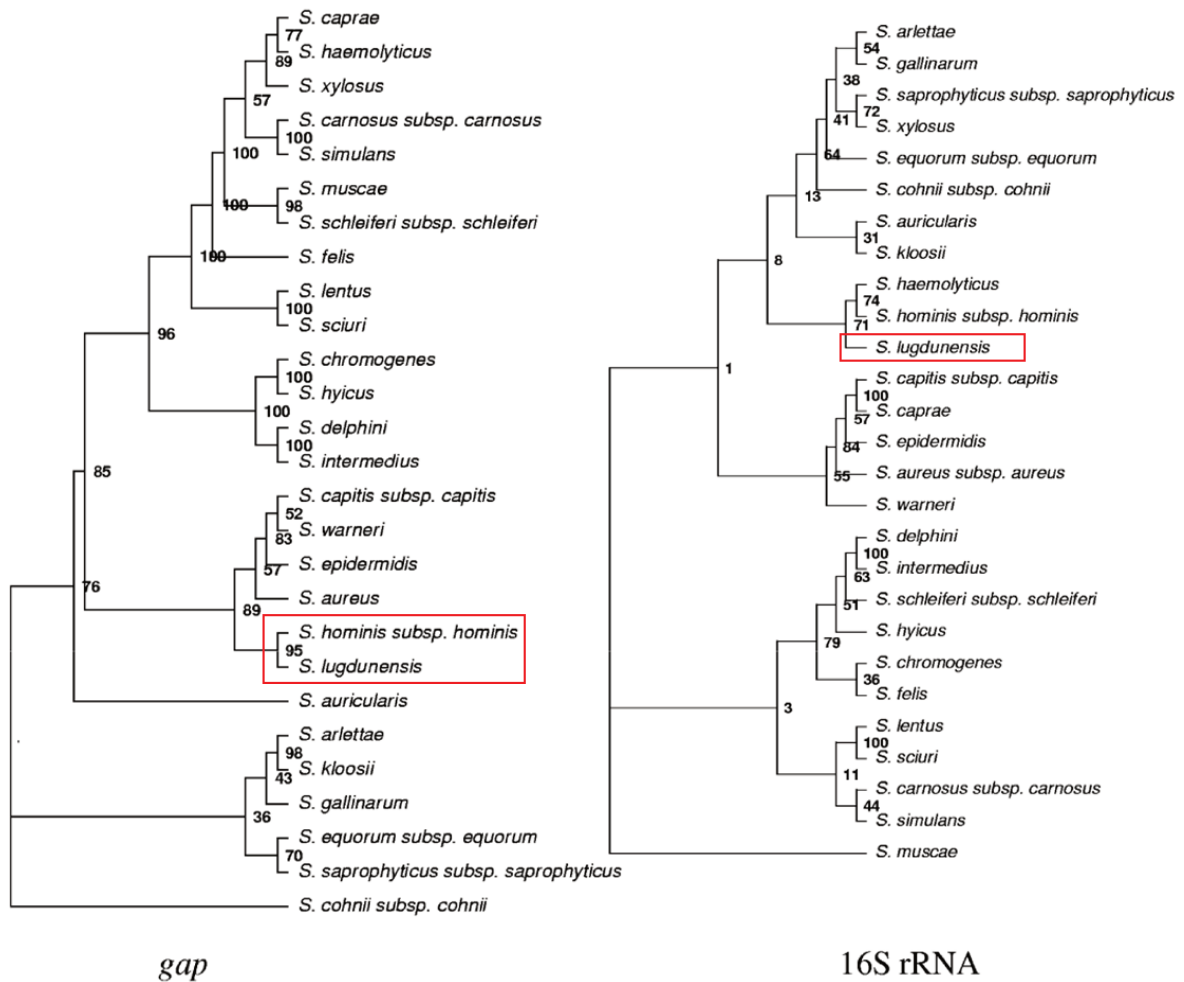


Figure 2. Neighbor-joining tree basé sur les séquences internes du gène *gap* et de l'ADNr 16S, montrant les relations phylogénétiques au sein du genre *Staphylococcus* (Ghebremedhin et al., 2008).

Des cibles moléculaires spécifiques à l'espèce *S. lugdunensis* ont ensuite été identifiées, permettant une identification rapide et fiable par une étape unique de PCR. Les gènes *fbl*, codant la protéine Fbl (Chatzigeorgiou et al., 2010; Pereira et al., 2010), et *tanA*, codant une tannase (Noguchi et al., 2010), peuvent ainsi être utilisés.

### 1.3. Habitat

#### *Chez l'homme*

*S. lugdunensis* est un constituant normal de la flore cutanée humaine. Il colonise préférentiellement certaines régions, comme les plis inguinaux, la région périnéale et les extrémités des membres inférieurs (Bieber and Kahlmeter, 2010; Frank et al., 2008; Ho et al., 2015; van der Mee-Marquet et al., 2003). Aucune donnée ne permet cependant de dire si *S. lugdunensis* colonise ces zones de manière permanente ou transitoire.

Une étude a évalué sur une période de trois mois la prévalence du portage cutané de *S. lugdunensis* par écouvillonnage des plis inguinaux gauche et droit chez 140 patients consécutifs consultant aux urgences d'un centre hospitalier à Tours (van der Mee-Marquet et al., 2003). Au total, **22%** des patients étaient porteurs de *S. lugdunensis* dans cette zone. Le portage au niveau des deux plis inguinaux était fréquent (68% des porteurs). La fréquence de portage ne différait pas en fonction du sexe (23% de femmes et 19% d'hommes), de l'âge ni de l'indice de masse corporelle.

Une seconde étude, menée dans le comté de Kronoberg en Suède, a analysé la flore cutanée de 75 sujets en bonne santé à partir de prélèvements effectués au niveau des fosses nasales, des aisselles, du périnée, de l'aîne, des plis sous les seins, des orteils et du lit de l'ongle du premier orteil ; 525 écouvillons ont ainsi été obtenus (Bieber and Kahlmeter, 2010). Le portage de *S. lugdunensis* a été identifié chez 50 des 75 sujets (**66,7%**), de façon significativement supérieure à celui de *S. aureus* identifié chez 16 sujets (21,3%). De façon intéressante, les niches de ces deux espèces étaient nettement différentes. *S. aureus* était principalement retrouvé en portage nasal (18,7% des sujets contre 9,3% pour *S. lugdunensis*), alors que *S. lugdunensis* colonisait préférentiellement les régions inguinales, axillaires et les membres inférieurs, en particulier le lit de l'ongle du premier orteil (**Tableau 1**).

Comme suggéré par Böcher et al., *S. lugdunensis* pourrait être un commensal des zones possédant des glandes sudoripares apocrines, à savoir les aisselles, la région ano-génitale, les conduits auditifs, les paupières et les aréoles mammaires (Böcher et al., 2009). Ces niches privilégiées pourraient expliquer pourquoi ces zones apparaissent parmi les sites les plus fréquents d'infection à *S. lugdunensis*, alors que cette espèce est, au contraire des autres SCN, un contaminant peu commun des hémocultures (Bieber and Kahlmeter, 2010).

Location <sup>a</sup>	<i>S. lugdunensis</i> Males (n = 33)	Females (n = 42)	Total (%)	<i>S. aureus</i> Males (n = 33)	Females (n = 42)	Total (%)
Nose	6	1	7 (9.3)	8	6	14 (18.7)
Axilla	9	6	15 (20)	1	1	2 (2.7)
Perineum	9	2	11 (14.7)	0	1	1 (1.3)
Groin	13	11	24 (32)	0	0	0 (0)
Breast	3	1	4 (5.3)	1	1	2 (2.7)
Toe	1	3	4 (5.3)	0	0	0 (0)
Nail 1st toe	10	8	18 (24)	0	1	1 (1.3)
Unspecified	6	5	11 (14.7)	1	0	1 (1.3)
Total	57	37	94	11	10	21

<sup>a</sup>One swab per location from each of the 75 subjects.

**Tableau 1. Répartition des sites de portage de *S. lugdunensis* et *S. aureus* chez des sujets en bonne santé (Bieber and Kahlmeter, 2010).**

### *Chez l'animal*

Même si peu de données existent chez l'animal, *S. lugdunensis* a été isolé en situation de portage chez le chien et chez les ovins et caprins (Beck et al., 2012; Davis et al., 2013; Kasprovicz et al., 2011). Il a également été décrit comme responsable d'infections chez les animaux de compagnie (principalement les chiens, mais aussi les chats et les oiseaux), telles des infections des voies respiratoires ou d'autres tissus profonds (Rook et al., 2012). Comme *S. aureus*, *S. lugdunensis* a été isolé dans du lait de chèvre dans un contexte de mammite (Deinhofer and Pernthaner, 1995).

### 1.4. Données génomiques

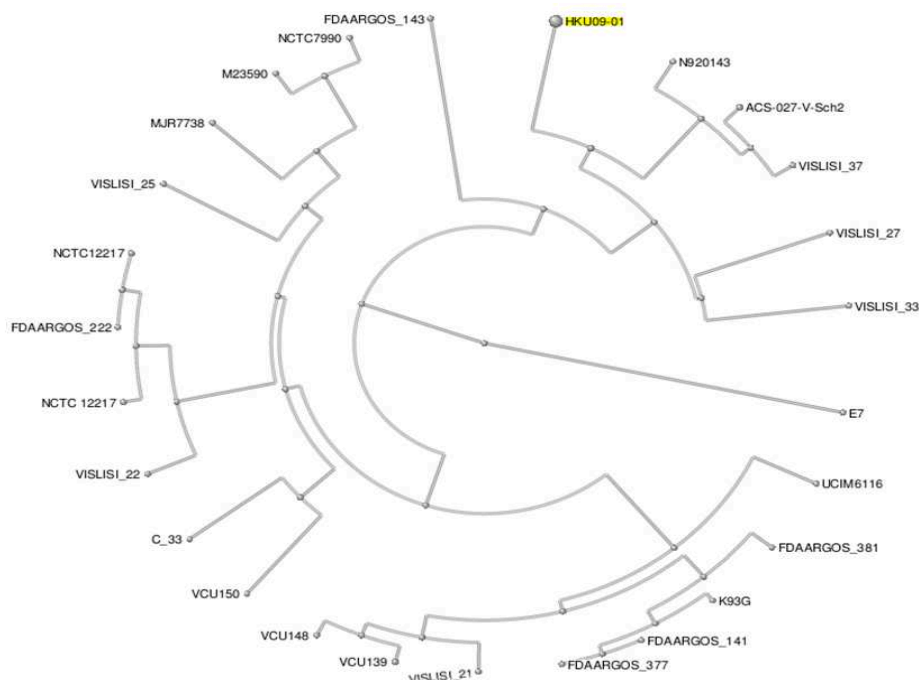
Le séquençage complet du génome de *S. lugdunensis* a été effectué pour la première fois en 2010 pour la souche **HKU09-01** isolée d'un prélèvement de pus obtenu par écouvillonnage (Tse et al., 2010). Une deuxième équipe a ensuite séquencé le génome de la souche *S. lugdunensis* **N920143** isolée d'un abcès de sein, et identifié des gènes codant putativement des facteurs de colonisation et de virulence (Heilbronner et al., 2011). En 2017, sept nouveaux génomes ont été séquencés, pour des souches de *S. lugdunensis* isolées d'un contexte infectieux ( $n = 6$ ) et de portage ( $n = 1$ ) (Argemi et al., 2017b).

Une étude récente portant sur l'analyse comparative des 15 génomes de *S. lugdunensis* présents dans la base de données NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) a montré que la taille du génome varie de 2,5 à 2,7 Méga paires de bases (Mpb) avec un pourcentage de GC allant de 33,7% à 33,9% (Argemi et al., 2018). Les génomes contenaient entre 2397 et 2584 séquences codantes.

*S. lugdunensis* possède un *pan-genome* (ensemble des gènes décrits chez l'espèce) fermé, atteignant 3000 gènes après l'inclusion des 15 génomes ; en cela il est différent des espèces *S. aureus* et *Staphylococcus epidermidis* qui possèdent un *pan-genome* ouvert d'environ 3800 gènes après analyse d'un nombre comparable de génomes. Le *core-genome* (ensemble des gènes communs à toutes les souches de l'espèce) est quant à lui similaire entre les espèces, se limitant à environ 2000 gènes. Le *core-genome* de *S. lugdunensis* représente environ 70% du *pan-genome*, et a la particularité d'être très conservé, avec une identité nucléotidique moyenne entre les souches de 99,5 à 99,9% (Argemi et al., 2018). Une comparaison des séquences codantes de la souche *S. lugdunensis* N920143 avec celles d'autres espèces staphylococciques a mis en évidence qu'elle présentait le plus d'identité avec *Staphylococcus haemolyticus* (78,3%), puis avec *S. aureus* (77,8%) et *S. epidermidis* (74,7%) (Heilbronner et al., 2011).

L'identification de plusieurs systèmes de barrière au transfert horizontal de gènes pourrait expliquer le *pan-genome* fermé de *S. lugdunensis*, comme des systèmes CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)/Cas, de toxine/antitoxine et de restriction-modification. Malgré la présence de ces systèmes, des éléments génétiques mobiles ont été mis en évidence, cinq souches possédant des plasmides et six des prophages (Argemi et al., 2018).

Il existe à ce jour sur la base de données NCBI seulement 26 séquences génomiques de *S. lugdunensis*, dont 17 correspondent à des génomes complets circularisés (Figure 3).



**Figure 3. Relations phylogénétiques entre les 26 génomes des souches de *S. lugdunensis* publiés sur NCBI au 01 Mai 2019.** Dendrogramme réalisé à partir d'un BLAST génomique (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=staphylococcus+lugdunensis>).



## 1.5. Sensibilité aux antibiotiques

*S. lugdunensis* est généralement considéré comme étant très sensible aux antibiotiques, à la différence des autres SCN. En effet, au cours des décennies précédentes, une diminution continue de la sensibilité envers la plupart des antibiotiques disponibles a été enregistrée pour les SCN, notamment pour les principales espèces impliquées en pathologie humaine comme *S. epidermidis* ou *S. haemolyticus*, liée à la pression de sélection des antibiotiques dans l'environnement hospitalier (Becker et al., 2014). Le pourcentage de résistance de ces espèces concerne actuellement plus de 90% des isolats pour la pénicilline G, environ 80% pour la méticilline, et de façon variable plus de 50% pour les autres classes thérapeutiques comme les fluoroquinolones, les macrolides-lincosamides, et les aminosides (Becker et al., 2014).

### *β*-lactamines

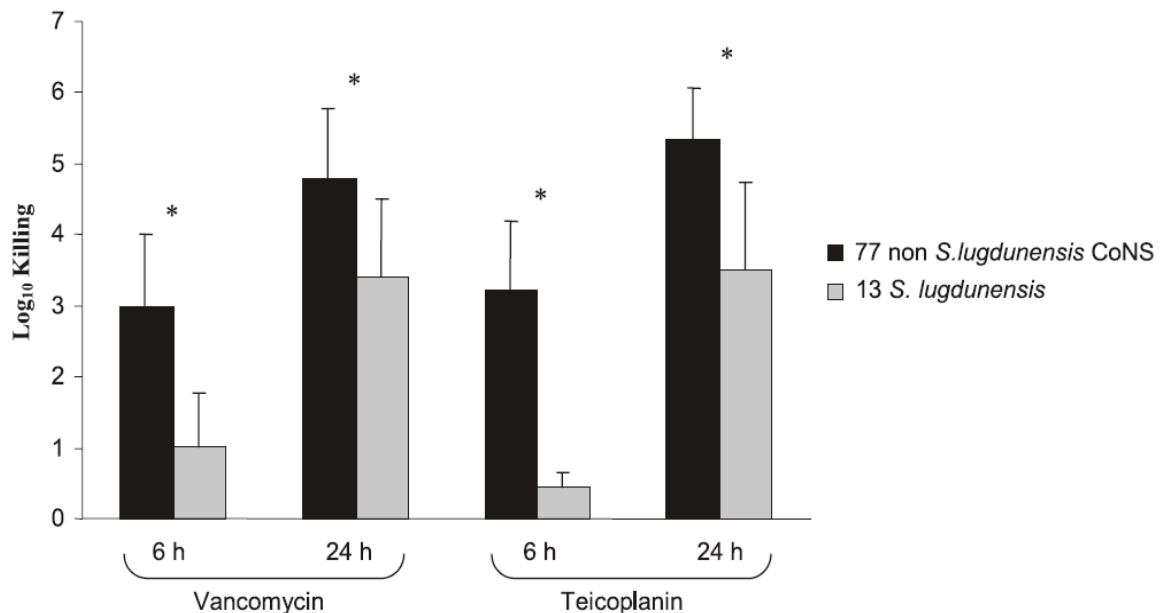
Le taux de résistance de *S. lugdunensis* à la **pénicilline G** liée à l'acquisition d'une pénicillinase plasmidique (gène *blaZ*) varie considérablement selon les études publiées. Deux études rétrospectives récentes ont mis en évidence un taux de résistance de 48% (476/993 isolats) aux Etats-Unis (McHardy et al., 2017) et de 69% (33/48 isolats) à Taiwan (Lin et al., 2015). Outre une différence d'écologie locale, ces discordances sont probablement liées à des problèmes méthodologiques de détection de pénicillinase (discordances entre les méthodes de diffusion en milieu gélosé et les méthodes automatisées en milieu liquide) (McHardy et al., 2017).

Le deuxième mécanisme de résistance aux *β*-lactamines est l'acquisition d'un élément génétique mobile nommé *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*). Cette cassette contient notamment le gène *mecA* codant la protéine de liaison aux pénicillines (PLP) 2a de faible affinité pour les *β*-lactamines. Ce mécanisme de résistance est particulièrement redouté en clinique puisqu'il confère une résistance à presque l'ensemble des antibiotiques de la famille des *β*-lactamines, dont la **méticilline**. Quatre types de cassettes ont été décrites chez *S. lugdunensis* (SCC*mec* types II, IV, V et V<sub>t</sub>) (Cheng et al., 2015; Yeh et al., 2016). De façon étonnante, le taux de résistance à la méticilline est particulièrement peu élevé chez *S. lugdunensis*. Dans une étude internationale, seuls huit % des isolats de *S. lugdunensis* étaient catégorisés comme résistants à la méticilline (22 isolats sur les 280 testés), taux le plus bas observé parmi l'ensemble des SCN analysés (Sader and Jones, 2012). Cependant, des études asiatiques récentes ont décrit l'émergence de souches résistantes à la méticilline : 21% (10/48) selon Lin et al. (Lin et al., 2015) et 32% (26/81) des souches isolées dans un contexte d'infections associées aux soins selon Yeh et al. (Yeh et al., 2016).

### Glycopeptides

Aucune résistance acquise aux glycopeptides n'a été décrite à ce jour chez *S. lugdunensis*. Cependant, un phénomène de **tolérance** aux glycopeptides a été mis en évidence pour un grand nombre de souches de l'espèce. Il s'agit d'un défaut de l'activité bactéricide alors que l'activité bactériostatique est conservée (Frank et al., 2008). Dans une première étude, ce phénomène concernait 93% des 15 souches de *S. lugdunensis* étudiées, la tolérance à la vancomycine étant définie par un rapport concentration minimale bactéricide (CMB) / concentration minimale inhibitrice (CMI)  $\geq 32$  (Frank et al., 2007).

Bourgeois et al. ont rapporté des résultats similaires lorsque l'activité bactéricide de la vancomycine et de la teicoplanine était évaluée par dénombrement des bactéries survivantes après six heures et 24 heures d'exposition (Bourgeois et al., 2007). Parmi les 13 isolats de *S. lugdunensis* étudiés, six étaient tolérants à la vancomycine ou à la teicoplanine, présentant une réduction du compte bactérien par rapport à l'*inoculum* initial inférieure à trois unités logarithmiques après 24 heures d'exposition. Pour les sept autres, une bactéricidie faible et retardée des glycopeptides était observée par rapport aux autres espèces de SCN (Figure 4).



**Figure 4. Activité bactéricide comparative des glycopeptides après six et 24 heures d'exposition à dix fois la CMI vis-à-vis d'isolats de staphylocoques à coagulase négative (SCN) (Bourgeois et al., 2007).** L'activité bactéricide est significativement diminuée vis-à-vis des 13 isolats de *S. lugdunensis* comparativement aux autres espèces de SCN ( $P < 0,05$ ).

Les mécanismes à l'origine de cette perte de bactéricide des glycopeptides chez *S. lugdunensis* restent non élucidés. Des travaux menés pour d'autres espèces bactériennes ont suggéré l'implication d'une altération des systèmes régulateurs de l'autolyse ou des modifications de la composition de la paroi cellulaire dans la tolérance aux antibiotiques (Bourgeois et al., 2007). Chez les entérocoques, la tolérance à la vancomycine peut être liée à l'activité de la superoxyde dismutase, phénomène qui dépend de la source d'énergie et du catabolisme de l'arginine (Ladjouzi et al., 2015).

Bien que le recours aux glycopeptides reste rare dans le traitement des infections à *S. lugdunensis*, ce phénomène est préoccupant du fait de l'émergence de clones résistants à la méticilline ; son impact clinique mériterait d'être évalué *in vivo* dans des modèles animaux.

#### ***Autres familles d'antibiotiques***

L'acquisition de résistances à d'autres familles d'antibiotiques a également été rapportée. Seule la résistance à la fosfomycine semble relativement prévalente (43% des souches selon une étude), alors que la résistance à d'autres molécules est sporadique, comme l'érythromycine (de sept à 33% selon les études), l'acide fusidique, le co-trimoxazole et les fluoroquinolones dans moins de cinq % des cas (Argemi et al., 2017c; Lin et al., 2015; Tan et al., 2008; Wu et al., 2011).

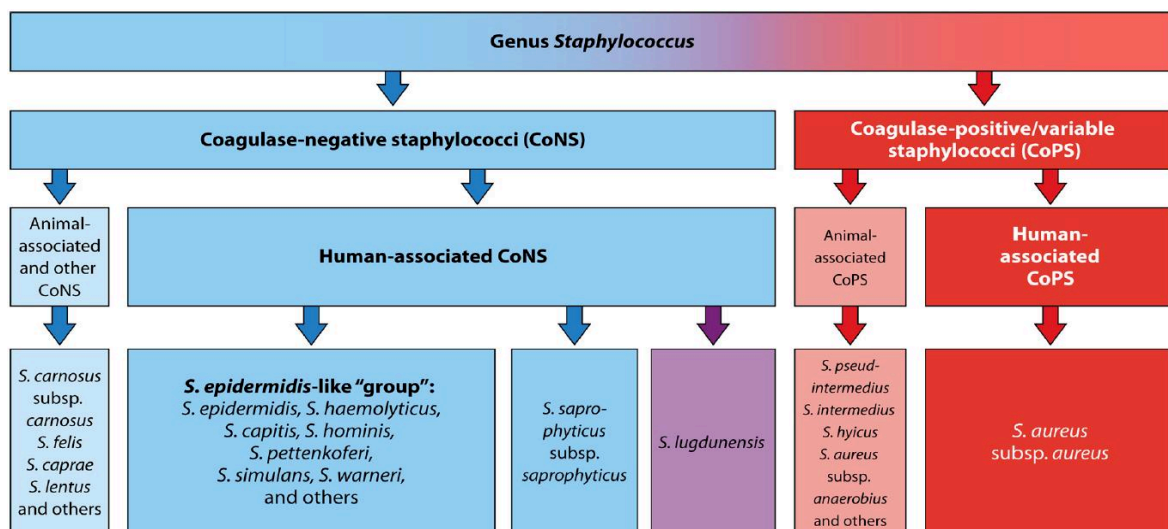
## 2. Infections à *S. lugdunensis*

### 2.1. Données générales

#### 2.1.1. Une place particulière au sein du genre *Staphylococcus*

Au sein du genre *Staphylococcus sp.*, *S. aureus* est un composant facultatif de la flore cutanéomuqueuse normale, alors que les SCN sont des composants obligatoires de la flore cutanée. *S. aureus* est à l'origine d'infections humaines pouvant être très sévères, y compris chez le sujet sain (Rosenstein and Götz, 2013; Tong et al., 2015). Au contraire, les SCN sont classiquement réputés beaucoup moins pathogènes, sauf en contexte particulier : terrains fragilisés (nouveau-nés, neutropénie, grands brûlés...) ou présence de matériel étranger (cathéters, prothèses...) (Becker et al., 2014; Rosenstein and Götz, 2013).

Rapidement après sa description en 1988 (Freney et al., 1988), plusieurs observations cliniques ont mis en évidence le pouvoir pathogène particulier de *S. lugdunensis*, plus proche de celui de *S. aureus* que de celui des autres SCN en termes d'agressivité tissulaire et d'évolution clinique (Frank et al., 2008). De plus, la signification clinique de son isolement en culture a été montrée élevée, variant de 86% (Kleiner et al., 2010) à 91% (Tan et al., 2006) dans des études rétrospectives, et ce de façon très supérieure aux autres espèces de SCN (par exemple, 52% et 21 % pour *S. epidermidis* et *Staphylococcus capitis* respectivement) (Tan et al., 2006). Une étude récente a cependant pondéré cette implication, avec un taux de significativité de 37,2%, probablement en lien avec le caractère prospectif de l'étude (Argemi et al., 2017c). Il a ainsi été proposé une classification lui conférant un statut unique au sein des SCN, dans une position intermédiaire entre *S. aureus* et le groupe *S. epidermidis* (Figure 5) (Becker et al., 2014).

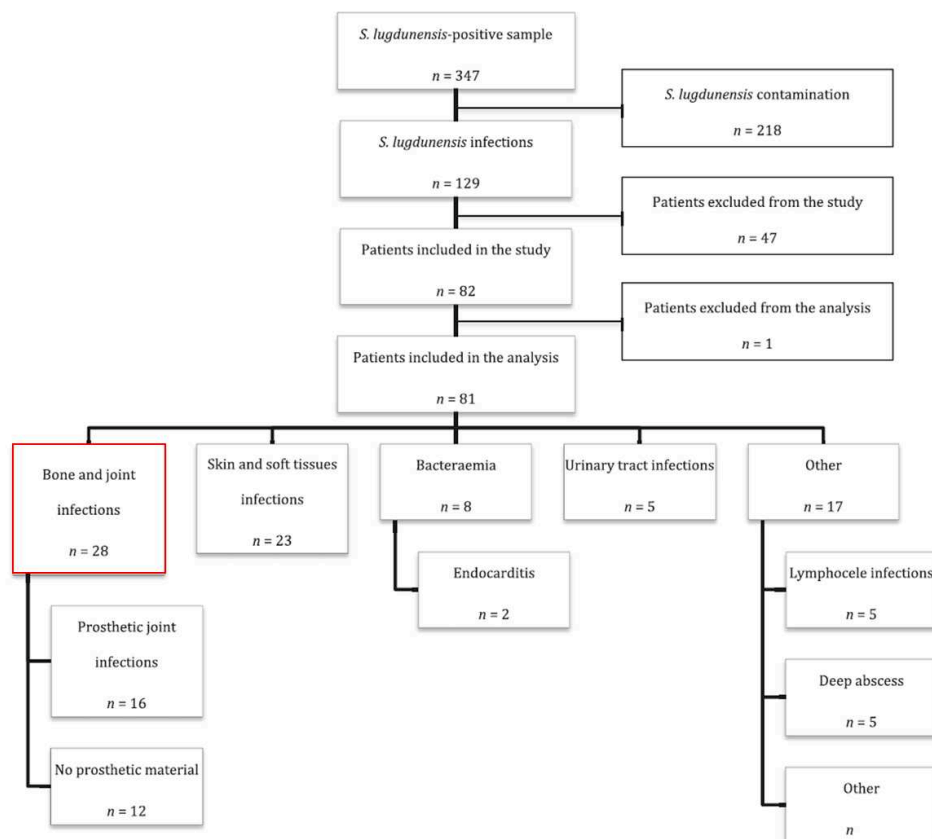


**Figure 5. Classification des staphylocoques en fonction des données cliniques et épidémiologiques** (Becker et al., 2014). La coagulase libre est à la base de cette classification, en tant que facteur de virulence majeur.

### 2.1.2. Des données essentiellement rétrospectives

L'implication de *S. lugdunensis* en infectiologie est surtout connue à travers la description de cas cliniques, témoignant du caractère agressif et destructeur de la bactérie dans certaines infections comme des endocardites infectieuses (EI) (Ishiekwene et al., 2017; Vandenesch et al., 1993a), ou à partir d'études à plus large échelle mais essentiellement rétrospectives et monocentriques (Lourtet-Hascoët et al., 2016; McHardy et al., 2017; Nesher et al., 2017; Non and Santos, 2017; Yeh et al., 2016). Ces études ont montré que *S. lugdunensis* est principalement responsable d'infections de la peau et des tissus mous (IPTM).

Une seule étude prospective a été menée (nommée VISLISI), réalisée sur une période de trois ans à l'hôpital universitaire de Strasbourg (Argemi et al., 2017c). A la différence des études rétrospectives publiées, cette étude monocentrique a mis en évidence un taux élevé d'infections ostéo-articulaires (IOA) (35%), comparativement aux IPTM (28%) (Figure 6).



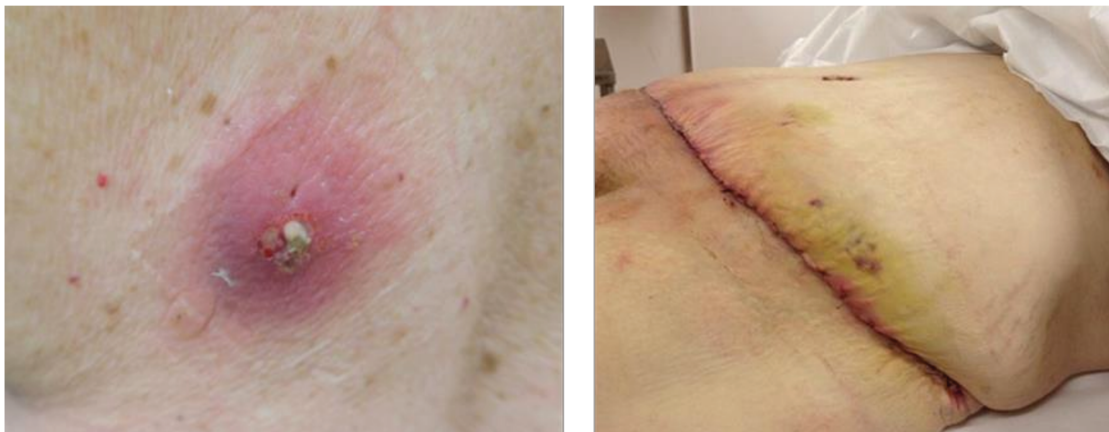
**Figure 6. Recrutement de patients ayant des échantillons positifs à *S. lugdunensis* au cours de l'étude prospective menée à l'hôpital de Strasbourg (Argemi et al., 2017c).** Cette étude a mis en évidence un fort taux d'infections ostéo-articulaires liées à cette espèce.

Ainsi, les principales infections causées par *S. lugdunensis* sont des IPTM, des IOA et des bactériémies fréquemment associées à des EI.

## 2.2. Infections de la peau et des tissus mous

Les IPTM figurent au premier rang des infections causées par *S. lugdunensis*. Dans une étude rétrospective menée aux Etats-Unis, 55% des 143 patients inclus présentaient une IPTM (Herchline and Ayers, 1991). De même à Taiwan, Wu et al. ont rapporté plus récemment que sur 49 isolats de *S. lugdunensis* de patients hospitalisés, 44 correspondaient à des IPTM (Wu et al., 2011). La majorité de ces infections sont d'acquisition communautaire (Arias et al., 2010; Böcher et al., 2009; Wu et al., 2011).

Les présentations cliniques incluent majoritairement des abcès cutanés, des infections de plaies, des cellulites ainsi que des paronychies, et sont cliniquement indiscernables des infections liées à *S. aureus* (Figure 7) (Böcher et al., 2009; Papapetropoulos et al., 2013). La capacité de *S. lugdunensis* à causer des abcès a par ailleurs été décrite dans des modèles murins (Lambe et al., 1990).



**Figure 7. Infections de la peau et des tissus mous liées à *S. lugdunensis*.** A gauche, lésion dorsale kystique entourée d'une cellulite post-morsure d'insecte chez une patiente de 70 ans (Heldt Manica and Cohen, 2017). A droite, nécrose dermohypodermique à J3 d'une dermolipectomie abdominale chez une patiente de 39 ans (Delaunay et al., 2014).

Dans une étude portant sur 20 cas d'IPTM, l'infection était secondaire à un traumatisme, une chirurgie ou une maladie de la peau dans 75% des cas (Arias et al., 2010).

Ces IPTM peuvent survenir chez des patients sains ou présentant des comorbidités (diabète, immunodépression...), l'âge médian variant de 48 à 70 ans selon les études (Böcher et al., 2009; Heldt Manica and Cohen, 2017; Papapetropoulos et al., 2013). Il a de plus été décrit que *S. lugdunensis* était souvent associé aux nodules et abcès de patients atteints de la maladie de Verneuil, suggérant son rôle dans l'aggravation de cette maladie (Guet-Revillet et al., 2014; Zaaroura et al., 2018).

Les IPTM liées à *S. lugdunensis* sont majoritairement localisées au niveau de la ceinture pelvienne, des seins et des membres inférieurs (particulièrement les orteils), en lien avec son habitat naturel (Arias et al., 2010; Bellamy and Barkham, 2002; Böcher et al., 2009). La distinction entre colonisation et infection n'est ainsi pas toujours évidente, d'autant que *S. lugdunensis* n'est retrouvé en culture pure que dans environ la moitié des prélèvements (Böcher et al., 2009; Herchline and Ayers, 1991).

La plupart de ces IPTM ne sont pas sévères et ont une évolution favorable. Le traitement repose sur une antibiothérapie à laquelle doit cependant souvent être associée une mise à plat des abcès par drainage ou incision chirurgicale (Arias et al., 2010; Heldt Manica and Cohen, 2017). Certains cas d'infections invasives ont malgré tout été rapportés, comme des fasciites nécrosantes nécessitant un débridement chirurgical et une antibiothérapie en urgence (**Figure 7**) (Böcher et al., 2009; Delaunay et al., 2014; Hung et al., 2012).

### **2.3. Infections ostéo-articulaires**

L'implication de *S. lugdunensis* dans les IOA a tout d'abord été évoquée par la description de cas d'ostéomyélites (Herchline and Ayers, 1991; Murdoch et al., 1996), d'arthrites septiques (Mei-Dan et al., 2008) et d'infections sur matériel (Herchline and Ayers, 1991; Shah et al., 2010; Weightman et al., 2000). Des études plus récentes prospectives (Argemi et al., 2017c) et rétrospectives (Douiri et al., 2016; Lourtet-Hascoët et al., 2016; Seng et al., 2017) ont souligné le rôle important de *S. lugdunensis* dans ces IOA, en particulier dans les infections sur matériel.

Une étude a comparé les caractéristiques cliniques et bactériologiques de 25 cas consécutifs d'**IOA sur prothèses** (principalement de genoux [PTG] et de hanche [PTH]) à *S. lugdunensis*, *S. aureus* et *S. epidermidis* (Lourtet-Hascoët et al., 2016). *S. lugdunensis* était responsable de plus d'infections sur PTG (57%) que sur PTH (36%), comme suggéré précédemment par Shah et al. (Shah et al., 2010). De façon intéressante, les caractéristiques cliniques des infections du groupe *S. lugdunensis* étaient plus proches de celles de *S. aureus* que de celles du groupe *S. epidermidis*. Notamment, significativement plus de signes cliniques (douleur, fièvre et signes d'inflammation locale) étaient observés dans les groupes *S. lugdunensis* et *S. aureus*, le délai d'apparition des symptômes post-chirurgicaux était plus précoce (12 semaines en moyenne pour *S. lugdunensis*, 44 semaines pour *S. aureus* et 84 semaines pour *S. epidermidis*), et le taux de rechute plus élevé (11% et 17% pour *S. lugdunensis* et *S. aureus* respectivement, contre trois % pour *S. epidermidis*) (**Tableau 2**) (Lourtet-Hascoët et al., 2016).

	<i>S. lugdunensis</i> (n=28)	<i>S. aureus</i> (n=30)	<i>S. epidermidis</i> (n=30)	p-Value
Age (years)	67.5 (58–78)	60.5 (44–75)	67 (61–77)	0.34
Number of males	13 (46.4%)	20 (66.7%)	20 (66.7%)	0.196
Prosthesis site				
Knee	16 (57%)	18 (60%)	11 (36.7%)	0.145
Hip	10 (36%)	9 (30%)	16 (53%)	0.158
Other	2 (7%)	3 (10%)	3 (10%)	
Clinical signs				
Fever	15 (53.6%)	9 (30%)	4 (13.3%)	0.004
Local signs of inflammation	13 (46.4%)	7 (23.3%)	4 (13.3%)	0.015
Surgery type				
Irrigation and debridement	11 (39.3%)	10 (33.3%)	5 (16.7%)	0.144
One-stage surgery	6 (21.4%)	12 (40%)	16 (53.3%)	0.044
Two-stage revision	11 (39.3%)	8 (26.7%)	9 (30%)	0.568
Delay from surgery to infection (weeks)	12 (3–56)	44 (12–144)	84 (44–192)	0.0449
Samples				
Number of positive samples	3.5 (1.5–5)	4 (3–5)	4 (3–5)	0.449
Total number of samples	5 (2–6)	4 (3–5)	5 (4–6)	0.413
Treatment duration (weeks)	7	7	7	
Outcome positive	89%	83%	97%	0.233

<sup>a</sup> Data are displayed as the median (interquartile range), or as the number (percentage).

**Tableau 2. Comparaison des données cliniques et microbiologiques de patients atteints d'infections ostéo-articulaires sur prothèse à *S. lugdunensis*, *S. aureus* et *S. epidermidis* (Lourtet-Hascoët et al., 2016).**

L'implication de *S. lugdunensis* dans les IOA semble liée à la capacité des souches à former du **biofilm**. En effet, l'ensemble des 28 souches responsables d'IOA de l'étude prospective VISLISI dont la capacité à produire du biofilm a été évaluée par la technique de Biofilm Ring Test<sup>®</sup> produisaient du biofilm dès six heures, avec une immobilisation complète des billes magnétiques pour 89% d'entre elles (Argemi et al., 2017d). Ces résultats impactent ainsi directement la prise en charge de ces infections, justifiant l'utilisation immédiate d'antibiotiques lors d'un remplacement de prothèse en un temps.

D'autre part, a été rapportée une récurrence d'infection sur PTG à *S. lugdunensis* chez une femme de 70 ans (Argemi et al., 2017a). Le premier épisode, lié à une souche de *S. lugdunensis* multi-sensible, a été traité avec succès par débridement associé à une antibiothérapie de trois mois comprenant de l'ofloxacine et de la rifampicine. Dix-sept mois plus tard, la patiente a présenté les signes cliniques d'une seconde infection. Les prélèvements réalisés ont permis d'isoler une souche de *S. lugdunensis* de phénotype **SCV (Figure 1)**, devenu résistante à certains antibiotiques (fluoroquinolones et amikacine). Le typage effectué sur les isolats des deux épisodes par *MultiLocus Sequence Typing* a identifié un même génotype, illustrant la capacité de *S. lugdunensis* à « switcher » d'un état métabolique normal à ralenti sous pression antibiotique (Argemi et al., 2017a).



## **2.4. Bactériémies et endocardites infectieuses**

Depuis sa description comme agent causal de bactériémies et d'EI en 1989 (Etienne et al., 1989; Fleurette et al., 1989), de nombreux rapports de cas ont confirmé un comportement particulièrement agressif et destructeur de *S. lugdunensis* en cas d'EI, fait inhabituel pour un SCN (Anguera et al., 2005; Liang et al., 2012; Vandenesch et al., 1993a).

### ***Bactériémies***

*S. lugdunensis* est un agent infectieux rarement responsable de bactériémie. Une étude prospective multicentrique japonaise a rapporté un taux de bactériémies liées à *S. lugdunensis* de 0,28%, soit 2,49% des bactériémies à SCN (Ainoda et al., 2017). Il représente la 7<sup>ème</sup> espèce de SCN isolée de bactériémies dans une étude mondiale menée en 1997 (0,3% des bactériémies à SCN), loin derrière *S. epidermidis* (30,3%) (Pfaller et al., 1999). L'incidence des bactériémies à *S. lugdunensis* a par ailleurs été évaluée à 5,6 cas pour 100 000 admissions (soit 0,26% des bactériémies à SCN) dans une étude rétrospective menée sur dix ans en Corée du Sud (Choi et al., 2010). Une étude plus récente menée rétrospectivement sur une période de neuf ans dans un hôpital de Washington a rapporté, quant à elle, une incidence trois fois plus élevée, sûrement du fait des caractéristiques de cohortes et de méthodologies différentes (Non and Santos, 2017). Les cathéters veineux ou autres dispositifs implantés sont les portes d'entrée les plus fréquemment identifiées lors de bactériémies à *S. lugdunensis* (Choi et al., 2010; Zinkernagel et al., 2008).

### ***Endocardites infectieuses***

La particularité des bactériémies à *S. lugdunensis* est la fréquence importante des endocardites qui y sont associées. Ce taux varie cependant grandement en fonction des études, probablement du fait que les critères retenus pour diagnostiquer une EI (certaine ou possible) ne sont pas toujours les mêmes. Parmi les études rétrospectives menées, ce taux était de 9,8% (quatre EI sur 41 bactériémies) dans un établissement à Taiwan (Lin et al., 2015), 27% (trois EI sur 11 bactériémies) dans un établissement néo-zélandais (Liang et al., 2012) et 46% (13 EI sur 28 bactériémies) dans trois centres hospitaliers en Suisse (Zinkernagel et al., 2008). Cette proportion semble être similaire à celle des EI survenant chez des patients bactériémiques à *S. aureus*, et bien supérieure à celle liée aux autres SCN (Non and Santos, 2017). Dans une étude rétrospective menée sur 20 ans à la *Mayo Clinic*, *S. lugdunensis* représentait d'ailleurs 18% des SCN responsables d'EI, et 44% des SCN en cas d'EI sur valve native (Patel et al., 2000).

Des revues de la littérature ont confirmé la particularité de *S. lugdunensis* à causer des endocardites sur **valves natives** (de 77% à 81% des cas), taux très supérieur aux autres SCN (Anguera et al., 2005; Liu et al., 2010). Celles-ci impliquent surtout la valve mitrale, et sont associées à des complications fréquentes, telles qu'une insuffisance cardiaque, la formation d'abcès et des embolies. En comparaison, les EI sur valve prothétique ou *pacemaker* sont moins fréquentes, et associées à une atteinte de la valve aortique et à une mortalité plus élevée (Anguera et al., 2005).

Certaines études ont mis en évidence la prédominance de l'acquisition communautaire de ces EI à *S. lugdunensis*, à la différence des autres SCN. Par exemple, 67% des 67 cas étaient d'origine communautaire dans la méta-analyse de Liu et al. (Liu et al., 2010), comme dans les études de Choi et al. (trois cas sur cinq) et Zinkernagel et al. (13 cas sur 13) (Choi et al., 2010; Zinkernagel et al., 2008).

Les EI à *S. lugdunensis* se caractérisent par une évolution souvent destructrice (Ishiekwene et al., 2017; Sabe et al., 2014) associée à une mortalité lourde, évaluée selon les études à 39% (26 sur 67) (Liu et al., 2010), 42% (29 sur 69) voir 50% (cinq sur dix) (Tableau 3) (Anguera et al., 2005). Ce taux de mortalité est significativement supérieur à celui des endocardites à *S. aureus*, qui varie selon les études de 7,1% (Anguera et al., 2005) à 20% (Miro et al., 2005), et à celui des endocardites à *S. epidermidis* évalué à 20% (Tableau 3) (Anguera et al., 2005).

Le recours à la chirurgie est souvent nécessaire, s'élevant à 70% pour les infections à *S. lugdunensis* versus 20% pour les infections à *S. aureus* (Tableau 3) (Anguera et al., 2005). Le traitement antibiotique seul est ainsi rarement efficace dans ce type d'infection, consistant même en un facteur de risque indépendant de mortalité (Liu et al., 2010).

	Total	Surgery	Mortality
<i>Staphylococcus aureus</i>	310	63 (20.3%)	22 (7.1%)
Injected drug users	172	12 (7.0%)	2 (1.1%)
General population	138	51 (36.9%)	20 (14.5%)
Coagulase negative staphylococci	98	53 (54.0%)	23 (23.5%)
<i>S. epidermidis</i>	75	45 (60.0%)	15 (20.0%)
<i>S. lugdunensis</i>	10	7 (70.0%)*	5 (50.0%)†
<i>S. hominis</i>	6	1 (16.6%)	1 (16.6%)
Other species	7	2 (40.0%)	1 (14.2%)

\*p<0.04 versus *S. aureus* in the general population and not significant versus *S. epidermidis*; †p<0.01 versus *S. aureus* in the general population and p<0.04 versus *S. epidermidis*.

**Tableau 3. Taux de chirurgie et mortalité selon l'espèce de staphylocoque identifiée parmi les cas d'endocardites diagnostiqués durant une étude prospective menée dans deux centres hospitaliers espagnols (1990-2003) (Anguera et al., 2005).**

## 2.5. Autres infections

*S. lugdunensis* est également responsable d'autres d'infections diverses, mais de façon plus sporadique. Il a ainsi été décrit comme impliqué dans :

- Des infections du **système nerveux central**, comme des méningites liées à des infections de dérivations ventriculo-péritonéales ou survenant après une ventriculostomie endoscopique (Elliott et al., 2001; Kaabia et al., 2002; Sandoe and Longshaw, 2001), et des abcès cérébraux (Fleurette et al., 1989; Matas et al., 2015).
- Des **infections urinaires** : une étude prospective américaine a tout d'abord identifié *S. lugdunensis* comme représentant six % des SCN isolés d'urocultures, mais jamais en culture pure ; ce qui rend difficile son imputabilité en tant qu'uropathogène (Haile et al., 2002). Deux cas d'infections urinaires avérées ont ensuite été rapportés, mais survenant sur des terrains particuliers (cystocèle et reflux vésico-urétéral) (Casanova-Roman et al., 2004; Perez et al., 2015).
- Des **infections oculaires**, à type d'endophtalmies (**Figure 8**) (Bannerman et al., 1997; Garoon et al., 2018) et de kératites suppuratives (Pinna et al., 1999).
- D'autres **infections profondes**, telles des péritonites (notamment chez des patients sous dialyse péritonéale) (Ludlam and Phillips, 1989; Schnitzler et al., 1998) ou des abcès profonds (pulmonaires, ostéo-articulaires, abdominaux...) (Argemi et al., 2017c; Chou and Lee, 2017).



**Figure 8. Photographie d'une endophtalmie à *S. lugdunensis* avec hypopion** (Garoon et al., 2018). Le patient a présenté cette infection dix jours après une chirurgie de la cataracte.

*S. lugdunensis* est donc à la fois un commensal cutané et un agent pathogène responsable d'infections nosocomiales et communautaires. Décrit comme un "loup déguisé en agneau" (Davis et al., 2013), *S. lugdunensis* se comporte à bien des égards d'avantage comme *S. aureus* que comme les autres SCN, en présentant un degré de virulence élevé. Il est responsable majoritairement d'IPTM ; sa responsabilité dans les IOA est apparue plus récemment dans la littérature. Les EI liées à cette espèce sont rares mais particulièrement destructrices et létales. Le traitement de ces infections repose sur une antibiothérapie, fréquemment associée à un geste chirurgical. Même si la résistance aux antibiotiques ne pose aujourd'hui pas de problème en clinique, l'émergence de clones résistants à la méticilline en Asie est préoccupante.

### **3. Facteurs de virulence**

Quelques équipes se sont attachées à identifier les mécanismes qui sous-tendent la pathogénicité particulière de *S. lugdunensis*. Un certain nombre de facteurs de virulence ont ainsi été décrits, certains avérés et caractérisés d'un point de vue fonctionnel, alors que d'autres identifiés d'un point de vue moléculaire et/ou protéique restent putatifs.

Sont rapportés ci-après les principaux facteurs de virulence décrits, en fonction de leur(s) rôle(s) avéré(s) ou putatif(s) dans la virulence de *S. lugdunensis*.

#### **3.1. Protéines d'adhésion**

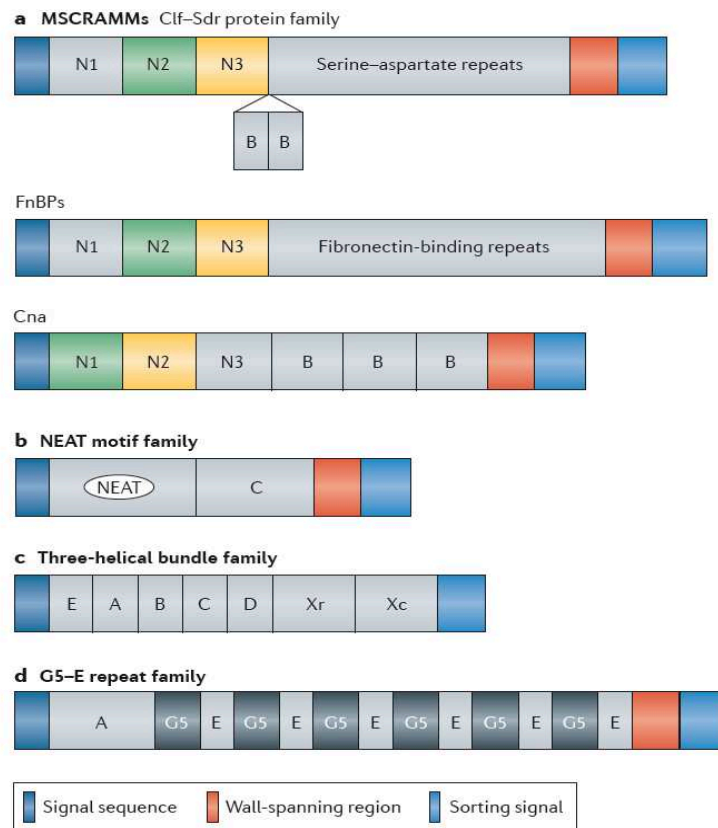
L'adhésion initiale des bactéries aux tissus de l'hôte constitue dans la plupart des processus infectieux une étape cruciale, une condition préalable à la formation de biofilm et/ou à l'invasion cellulaire (Foster et al., 2014; Josse et al., 2017). Cette aptitude est médiée par des protéines de surface nommées **adhésines**, capables de se lier aux protéines plasmatiques, à des récepteurs présents à la surface des cellules hôtes ou à des molécules de la matrice extracellulaire. Cette dernière est un réseau complexe composé de nombreux composants tels que les collagènes, les protéoglycanes, les laminines ou encore la fibronectine (Mouw et al., 2014).

La plupart des adhésines staphylococciques sont des protéines ancrées de manière covalente à la paroi cellulaire. D'un point de vue structural, elles contiennent plusieurs domaines protéiques essentiels (Figure 9) (Foster et al., 2014; Yu et al., 2018):

- en région N-terminale, un peptide signal qui contient un motif de type YSIRK/GXXS d'adressage au système de sécrétion Sec, permettant la translocation de la protéine du cytoplasme à la paroi,
- un ou plusieurs domaines de liaison aux composants-cibles,
- en région C-terminale, un signal de sortie qui comprend un motif de clivage par les sortases A (LPXTG) ou B (NPQTN), suivi par un domaine hydrophobe et une queue chargée positivement ; les deux derniers sous-domaines retiennent la protéine dans la membrane lors de la sécrétion permettant à la sortase d'exercer sa fonction de transpeptidase et d'ancrer la protéine de façon covalente au peptidoglycane (PG).

Les adhésines sont divisées en quatre groupes sur la base de motifs définis par des analyses structurales et fonctionnelles (Figure 9) (Foster et al., 2014). Le groupe le plus prévalent est celui des *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMMs), défini par la présence de domaines de type IgG-like reliés en tandem médiant l'attachement aux

composants de la matrice extra-cellulaire (Foster et al., 2014). D'après les analyses génomiques, *S. aureus* possède environ 20 MSCRAMMs et *S. epidermidis* environ 12 (Otto, 2018).



**Figure 9. Classification des protéines staphylococciques ancrées à la paroi en quatre groupes sur la base des motifs structuraux (Foster et al., 2014).** Les protéines contiennent toutes un peptide signal en région N-terminale, une région encastrée dans la paroi et un signal de sortie en région C-terminale.

La capacité de *S. lugdunensis* à provoquer des EI et des infections sur matériel suggère sa capacité à adhérer aux tissus et aux protéines de l'hôte. Cette capacité a été confirmée par l'étude de Paulsson et al. rapportant que la plupart des souches de *S. lugdunensis* se lient *in vitro* aux collagènes et aux IgG, et dans une moindre mesure au fibrinogène, à la fibronectine, à la vitronectine et à la laminine (Paulsson et al., 1993). Cependant, contrairement aux connaissances étendues sur les adhésines de *S. aureus*, on sait peu de choses sur leurs homologues chez *S. lugdunensis*. L'analyse du génome de la souche *S. lugdunensis* N920143 a révélé que celle-ci possédait les gènes codant les sortases A et B, qui pourraient ancrer de manière covalente respectivement 11 protéines ayant un motif LPXTG et deux protéines ayant un motif NPQTN (Heilbronner et al., 2011). Seules deux de ces protéines, appartenant à la famille des MSCRAMMs, ont été caractérisées à ce jour. Il s'agit de la protéine de liaison au fibrinogène Fbl (Mitchell et al., 2004; Nilsson et al., 2004a) et de la protéine de liaison au facteur von Willebrand vWbl (Nilsson et al., 2004b).

### 3.1.1. La protéine de liaison au facteur von Willebrand (vWbl)

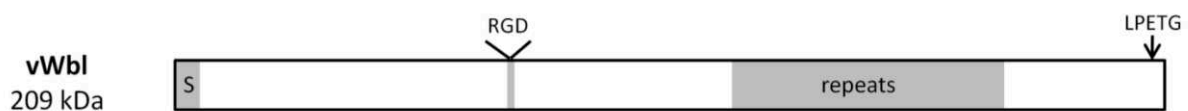
Le facteur von Willebrand (vWf) est une glycoprotéine volumineuse présente dans le plasma et dans les granules des plaquettes et des cellules endothéliales. Il joue un double rôle essentiel dans l'hémostase. Tout d'abord, en cas de lésions vasculaires, il se lie au collagène exposé du sous-endothélium et favorise l'adhésion et l'agrégation des plaquettes. D'autre part, il se lie et stabilise le facteur VIII de la coagulation (Nilsson et al., 2004b).

La protéine de liaison au vWf de *S. lugdunensis*, appelée **vWbl** (*von Willebrand factor-binding protein of S. lugdunensis*), a été découverte en 2004. Elle est codée par le gène *vwbl* (Nilsson et al., 2004b). Ce gène a été initialement identifié chez l'ensemble des 12 souches de *S. lugdunensis* analysées (Nilsson et al., 2004b), puis une étude ne l'a identifié que chez 81,6% des 38 souches testées (Giormezis et al., 2015).

#### *Organisation protéique de vWbl*

La protéine vWbl est une protéine de surface de 2060 acides aminés, qui n'a d'homologie structurale avec aucune des MSCRAMMs de *S. aureus*. Elle a cependant une organisation typique des protéines de surface, à savoir (**Figure 10**) (Nilsson et al., 2004b):

- un peptide signal en région N-terminale (contenant un motif YSIRK),
- une région A contenant un motif RGD (arginine-glycine-aspartate), motif présent chez de nombreuses protéines de surface et de liaison aux intégrines,
- une région R comprenant dix motifs répétés de 67 acides aminés chacun (mais qui peut varier en longueur en fonction des souches), et contenant un domaine de liaison minimal putatif au vWf de 24 acides aminés,
- un motif d'ancrage à la paroi (LPETG) en région C-terminale.



**Figure 10. Domaines protéiques de la protéine de liaison au facteur von Willebrand vWbl de *S. lugdunensis*** (Heilbronner et al., 2013). La protéine comporte un peptide signal (S), une région contenant un motif RGD (arginine-glycine-aspartate), un domaine de liaison au facteur von Willebrand composé de motifs répétés, et un motif de sortie LPETG.

### ***Rôle de la liaison au vWf dans la virulence in vitro***

Nilsson et al. ont montré qu'une protéine recombinante de la protéine de surface vWbl de *S. lugdunensis* médie la liaison au vWf soluble et immobilisé, et que des anticorps anti-vWbl ou anti-vWf inhibent cette liaison (Nilsson et al., 2004b).

Le rôle de cette protéine dans la liaison au vWf est cependant remis en cause par une étude récente, puisque des mutants de la souche *S. lugdunensis* N920143 délétée des gènes *vwbl* ou de sortase A (*srtA*) ne présentent pas de différence dans la liaison *in vitro* au vWf par rapport à la souche sauvage (Liesenborghs et al., 2016). Ainsi, selon les auteurs, soit vWbl ne représente pas une protéine fonctionnelle liant le vWf, soit la protéine n'était pas exprimée dans leurs conditions expérimentales ; dans les deux cas, l'adhésion au vWf dans leur étude était influencée par un facteur qui reste inconnu.

L'interaction de *S. lugdunensis* avec le vWf pourrait jouer un rôle essentiel dans l'attachement bactérien à des lésions vasculaires ; cette liaison pourrait être l'une des étapes initiales essentielles au développement des endocardites. Cependant, pour que la liaison à l'endothélium vasculaire soit efficace, les bactéries ont besoin de résister aux forces de cisaillement du sang, et particulièrement au niveau des valves cardiaques qui sont exposées à des forces de cisaillement considérables (Yoganathan et al., 2004).

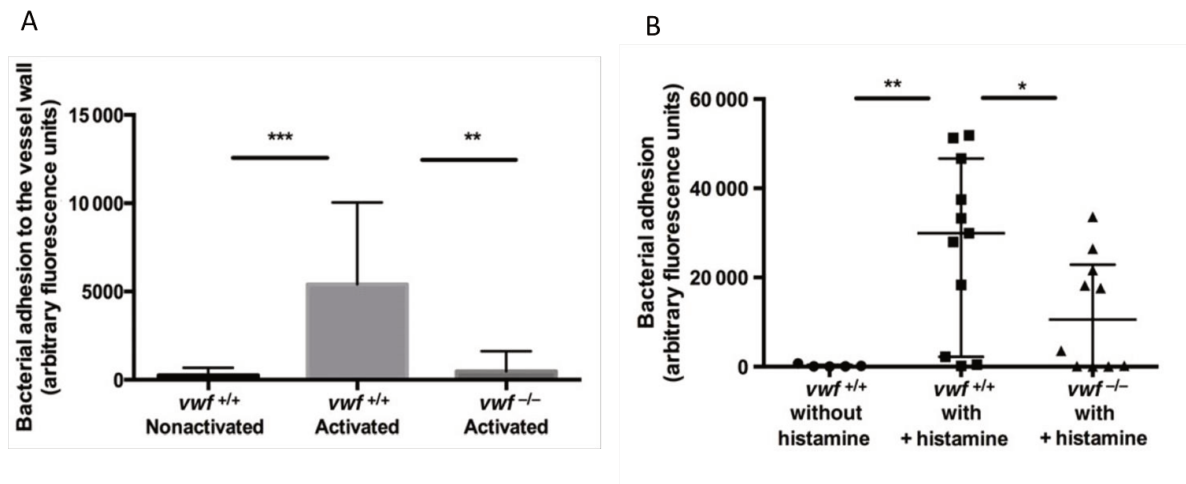
Pour surmonter ces forces, la plupart des agents pathogènes responsables d'endocardites se lient et activent les plaquettes. En plus d'activer les plaquettes, *S. aureus* interagit directement avec le vWf de manière dépendante du cisaillement *via* une protéine de liaison sécrétée de type *secretable expanded repertoire adhesive molecule* (SERAM) (Claes et al., 2014).

Grâce à l'utilisation d'un modèle *in vitro* de chambre à circulation parallèle, il a été montré que *S. lugdunensis* se lie directement au vWf, permettant son adhésion à la matrice sous-endothéliale et à l'endothélium vasculaire enflammé, occasionnant une résistance aux forces de cisaillement (Liesenborghs et al., 2016). *S. lugdunensis* est cependant incapable de se lier et d'activer les plaquettes, à la différence de *S. aureus*.

**Rôle de la liaison au vWf dans la virulence *in vivo***

Le rôle de la liaison au vWf dans la pathogénicité de *S. lugdunensis* a été établi dans deux modèles murins (Figure 11) (Liesenborghs et al., 2016).

Dans un premier modèle de perfusion mésentérique, l'adhérence de *S. lugdunensis* à la paroi des vaisseaux a été visualisée au niveau de la microvascularisation intestinale de souris. *S. lugdunensis* adhère aux parois des vaisseaux uniquement si ceux-ci sont enflammés, via le vWf (Figure 11A). Dans un modèle murin d'endocardite provoquée par une inflammation locale (mimant les processus de l'inflammation rencontrés chez l'Homme à l'origine d'endocardites sur valves natives), la libération de vWf résultante permet à *S. lugdunensis* de se lier et de coloniser les valves cardiaques (Figure 11B) (Liesenborghs et al., 2016).



**Figure 11. Rôles de la liaison au facteur von Willebrand (vWf) dans la virulence *in vivo* de *S. lugdunensis*** (Liesenborghs et al., 2016). (A) Modèle murin de perfusion mésentérique. L'adhésion de *S. lugdunensis* à l'endothélium vasculaire activé *in vivo* est médiée par le vWf. (B) Modèle murin d'endocardite provoquée par une inflammation locale (injection locale d'histamine). La libération de vWf entraîne une adhésion de *S. lugdunensis* aux valves et leur colonisation. *vwf*<sup>+/+</sup>, souris sauvage ; *vwf*<sup>-/-</sup>, souris *knock-out* pour le vWf ; \*  $P < 0,05$  \*\*  $P < 0,01$  et \*\*\*  $P < 0,001$ .

De façon intéressante, la liaison au vWF sous flux est une caractéristique unique de *S. aureus* et *S. lugdunensis*, les autres SCN en étant incapables. Ce mécanisme pourrait donc expliquer pourquoi *S. lugdunensis* provoque des infections plus agressives que les autres SCN, en particulier des endocardites (Liesenborghs et al., 2016). Le ligand bactérien impliqué dans cette liaison *in vivo* ne semble pas être vWbl, et reste à identifier.



### 3.1.2. La protéine de liaison au fibrinogène (Fbl)

Le fibrinogène est composé de trois paires de polypeptides (chaînes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ). Il constitue une protéine majeure du plasma ainsi qu'un composant de la matrice extracellulaire. Il intervient dans la coagulation par la formation de caillots de fibrine, mais fait également partie des mécanismes de défense de l'hôte contre les micro-organismes (le clivage en fibrine entraîne la libération de fibrinopeptides immunostimulants) (Nilsson et al., 2004a).

Deux études simultanées ont décrit et caractérisé la protéine de liaison au fibrinogène de *S. lugdunensis*, appelée **Fbl** (*fibrinogen-binding protein of S. lugdunensis*) (Mitchell et al., 2004; Nilsson et al., 2004a). Cette protéine est codée par le gène *fbl*, qui est présent chez toutes les souches de *S. lugdunensis* étudiées et constitue à ce titre un marqueur moléculaire d'identification de l'espèce (Chatzigeorgiou et al., 2010; Giormezis et al., 2015; Pereira et al., 2010).

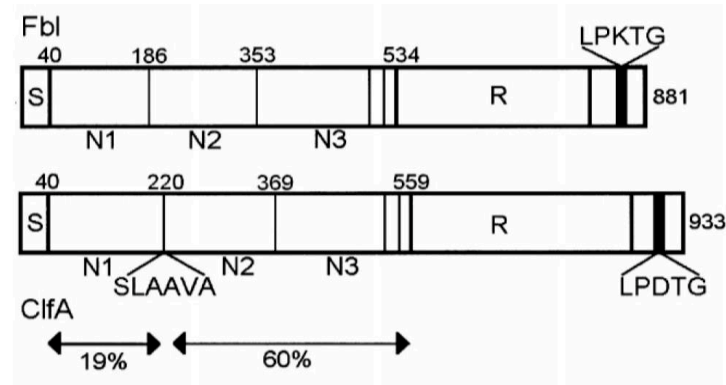
#### *Organisation protéique de Fbl*

La protéine Fbl est composée d'environ 881 acides aminés (~ 90 kDa). Cette protéine présente une homologie d'organisation et de séquence protéique de 58% avec le *clumping factor A* (ClfA) de *S. aureus*, protéine de surface liant le fibrinogène et la fibronectine qui appartient également à la famille des MSCRAMMs (Geoghegan et al., 2010a).

La protéine Fbl est organisée en plusieurs domaines (**Figure 12**) (Mitchell et al., 2004):

- un peptide signal en région N-terminale (contenant un motif YSIRK),
- une région contenant les domaines N1, N2 et N3, où une zone très conservée entre les domaines N2 et N3 constitue la poche hydrophobe de liaison au fibrinogène,
- un domaine R constitué du motif répété « SDSDSA » (S, sérine ; D, aspartate; A, alanine), classant Fbl dans la famille des protéines Sdr (*SD repeats*) (Foster and Höök, 1998). Ce domaine, codé par des séquences répétées de 18 pb présentes en nombre variable, traverserait la paroi pour permettre l'exposition à la surface cellulaire du domaine de liaison au fibrinogène (Hartford et al., 1997).
- la partie C-terminale contenant le motif d'ancrage à la paroi cellulaire (LPKTG).

Il est à noter que le motif de clivage par des métalloprotéases SLAAVA présent chez la protéine ClfA de *S. aureus* n'est pas retrouvé chez Fbl.



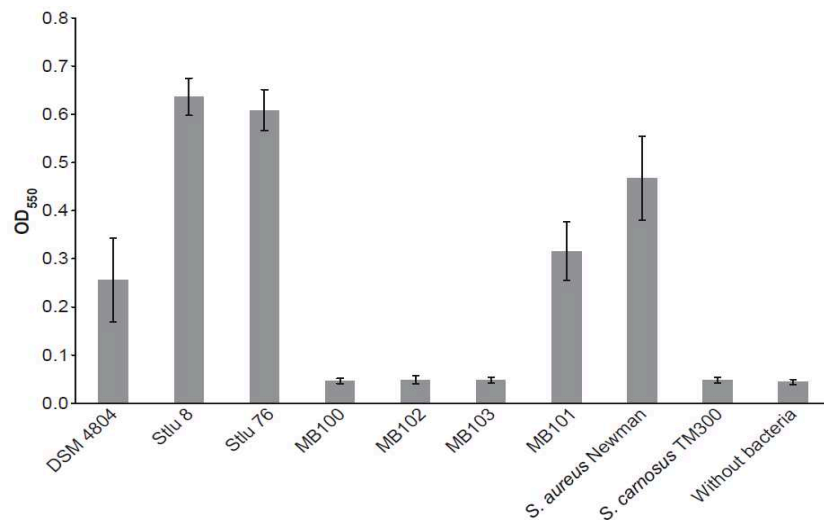
**Figure 12. Domaines des protéines de liaison au fibrinogène Fbl (*S. lugdunensis*) et ClfA (*S. aureus*)** (Mitchell et al., 2004). Ces protéines comportent un domaine de liaison au fibrinogène divisé en domaines N1 (19% de similarité) et N2-N3 (60% de similarité), un domaine R composé des régions répétées de type SD pour ClfA et SDSDSA pour Fbl, et un motif de sortie LPXTG.

### Rôles de Fbl dans la virulence *in vitro*

L'expression de la protéine Fbl à la surface de *Lactococcus lactis* promeut l'adhésion au fibrinogène immobilisé et soluble. Cette interaction est inhibée par des anticorps anti-Fbl comme anti-ClfA, confirmant le degré élevé de similitude entre ClfA et Fbl (Mitchell et al., 2004). En outre, Fbl et ClfA interagissent avec la même région du fibrinogène (chaîne  $\gamma$ ), bien que ClfA se lie au fibrinogène avec une affinité dix fois supérieure à celle de Fbl (Mitchell et al., 2004). De plus, des mutants délétés du gène *fbl* obtenus pour trois souches cliniques de *S. lugdunensis* ont présenté une abolition totale de la liaison au fibrinogène, montrant, qu'au moins pour ces souches, la liaison au fibrinogène était assurée exclusivement par Fbl (Figure 13) (Marlinghaus et al., 2012).

Bien que le gène *fbl* soit ubiquitaire, la capacité de liaison au fibrinogène immobilisé testée *in vitro* pour différentes souches cliniques de *S. lugdunensis* varie grandement (Marlinghaus et al., 2012; Mitchell et al., 2004; Szabados et al., 2011b, 2011a). Notamment, au sein d'une collection de 104 souches cliniques de *S. lugdunensis*, seulement 28% liaient le fibrinogène. Ce faible pourcentage pourrait s'expliquer par une expression différente de la protéine Fbl, ou par la production d'une matrice extracellulaire comme une capsule qui pourrait masquer l'accessibilité à la protéine de surface (Marlinghaus et al., 2012).

Une étude a par ailleurs montré que la protéine Fbl n'est pas impliquée dans l'invasion de cellules eucaryotes épithéliales et endothéliales, un mutant *fbl* étant capable de s'internaliser dans ces cellules de la même façon que la souche sauvage (Szabados et al., 2011b).



**Figure 13. Adhésion de souches de *S. lugdunensis* au fibrinogène immobilisé (Marlinghaus et al., 2012).** Les trois souches cliniques de *S. lugdunensis* (DSM 4804, Stlu 8 et Stlu 76) se lient au fibrinogène, alors que cette liaison est abolie chez les mutants délétés pour le gène *fbl* (MB100, MB102 et MB103 respectivement). La souche délétée MB100 complétementée par le gène *fbl* (MB101) se lie à nouveau au fibrinogène. *S. aureus* Newman: contrôle positif ; *S. carnosus* TM 300 et puits sans bactéries: témoins négatifs.

### Rôles de *Fbl* dans la virulence *in vivo*

ClfA est un facteur de virulence essentiel de *S. aureus*, contribuant à sa pathogénicité dans des modèles expérimentaux d'arthrite septique chez la souris (Josefsson et al., 2001) et d'endocardite chez le rat (Moreillon et al., 1995; Que et al., 2005).

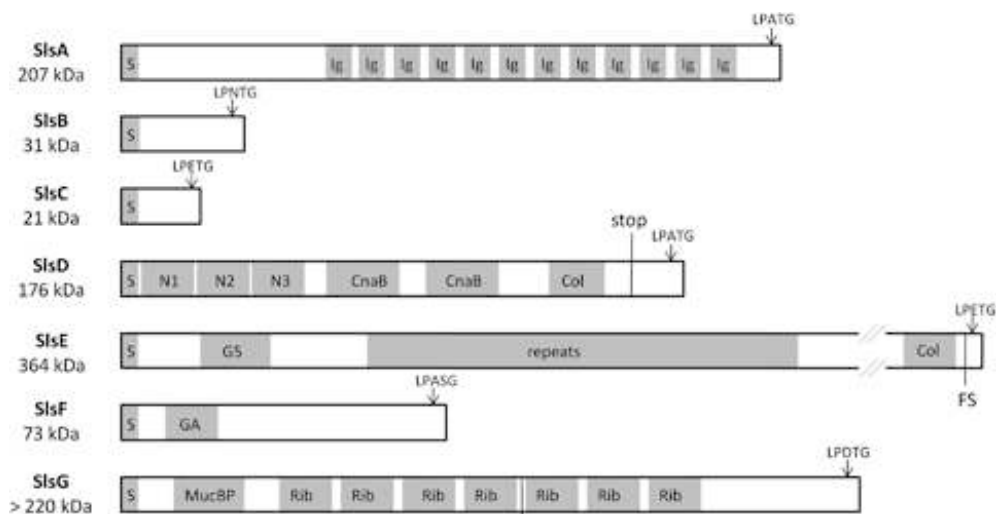
Heilbronner et al. ont étudié la virulence expérimentale de la souche clinique *S. lugdunensis* N920143 dans un modèle d'endocardite chez le rat, comparativement à celle de trois mutants délétés respectivement pour les gènes codant la sortase A ( $\Delta srtA$ ), et les protéines de surface Fbl ( $\Delta fbl$ ) et vWbl ( $\Delta vWbl$ ) (Heilbronner et al., 2013). La souche sauvage de *S. lugdunensis* provoquait une endocardite moins grave que la souche *S. aureus* Newman (taux de bactériémie plus faible et végétations de taille inférieure), mais des végétations comparables à celles de la souche *S. aureus* COL. Le mutant de *S. lugdunensis* dépourvu de sortase A était significativement moins virulent que la souche sauvage, alors que les mutants des protéines Fbl ou vWbl ne présentaient pas de différences significatives, même s'ils montraient une tendance à une virulence réduite (Heilbronner et al., 2013). Cela souligne l'importance des protéines ancrées à la paroi *via* le motif LPXTG dans la pathogénèse de *S. lugdunensis*, et suggère que plusieurs protéines de surface agissent de concert pour favoriser l'adhésion.

Ainsi, bien que la protéine Fbl semble être la protéine majeure de liaison au fibrinogène chez *S. lugdunensis* (Marlinghaus et al., 2012), aucune étude *in vivo* n'a à ce jour établi son rôle dans la virulence.

### 3.1.3. Les protéines de surface putatives Sls

L'analyse du génome complet de *S. lugdunensis* a révélé la présence de sept gènes susceptibles de coder des protéines ancrées à la paroi *via* un motif LPXTG, dont la taille varie de 20,8 à 380 kDa. Ces protéines ont été appelées **Sls** (*S. lugdunensis surface proteins*) A à G (**Figure 14**) (Heilbronner et al., 2011). L'analyse *in silico* a révélé des similarités de ces protéines avec des protéines de surface rencontrées chez d'autres espèces (*S. aureus*, *S. epidermidis* et *Peptostreptococcus magnus*), et des motifs putatifs de liaison aux facteurs de l'hôte tels que le collagène, le fibrinogène, l'albumine ou encore les mucines. Cependant, aucun ligand n'a été identifié pour ces protéines chez *S. lugdunensis*.

Pour deux de ces gènes, un décalage du cadre de lecture est observé chez la souche N920143. Le premier pour *slsD*, entraînant l'apparition d'un codon stop dans la protéine putative SlsD juste avant le motif d'ancrage LPXTG, également retrouvé chez la souche HKU09-0 ; le second pour *slsE* qui présente un décalage du cadre de lecture avant le motif LPXTG, non retrouvé chez la souche HKU09-01 (**Figure 14**) (Heilbronner et al., 2011; Tse et al., 2010).



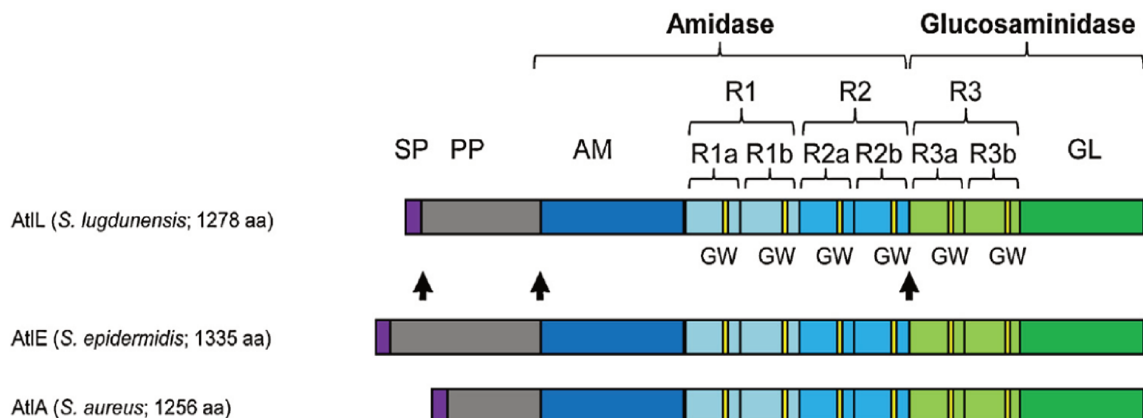
**Figure 14. Représentation des protéines de surface putatives *S. lugdunensis surface proteins* (Sls)** (Heilbronner et al., 2011). Les domaines prédits sont indiqués par des zones grises. Les protéines comportent toutes un peptide signal (S) et un motif de sortie LPXTG et entre, des domaines de liaison putatifs. FS, décalage du cadre de lecture.

Compte tenu de leur homologie avec les protéines SdrG de *S. epidermidis* (Ponnuraj et al., 2003) et les protéines de surface des streptocoques du groupe B (Wästfelt et al., 1996), ces protéines pourraient jouer un rôle dans l'adhésion, l'échappement au système immunitaire et la formation de biofilm. Aucune caractérisation fonctionnelle n'a cependant été menée à ce jour, probablement du fait de leur grande taille et de possibles phénomènes de redondance des adhésines lors de la délétion du gène codant l'une d'entre elles.

### 3.1.4. L'autolysine AtIL

Les hydrolases du peptidoglycane (HPG), ou muréines hydrolases, sont des enzymes qui, hydrolysant le PG, participent à un certains nombre de processus biologiques comme la croissance de la paroi cellulaire, le renouvellement du PG et la séparation des cellules filles. Ces enzymes peuvent également être impliquées dans la lyse induite par les antibiotiques et contribuer à la pathogénèse bactérienne en libérant des facteurs de virulence ou en contribuant à l'adhérence bactérienne. Certaines de ces enzymes, également impliquées dans la lyse cellulaire, sont appelées autolysines (Shockman et al., 1996).

La première autolysine de *S. lugdunensis*, **AtIL**, a tout d'abord été décrite par Bourgeois et al. en 2009 (Bourgeois et al., 2009). C'est une autolysine bifonctionnelle (140 kDa) possédant deux domaines enzymatiques, comme observé pour l'autolysine AtI de *S. aureus* (Oshida et al., 1995) et AtLE de *S. epidermidis* (Heilmann et al., 1997). Elle possède deux domaines enzymatiques, un domaine amidase (*N*-acétylmuramoyl-*L*-alanine amidase [AM] de 65 kDa) et un domaine glucosaminidase (*N*-acétylglucosaminidase [GL] de 55 kDa), qui après protéolyse génèrent deux HPG (Figure 15). Ces deux enzymes sont attachées de manière non covalente à la surface cellulaire (Bourgeois et al., 2009).

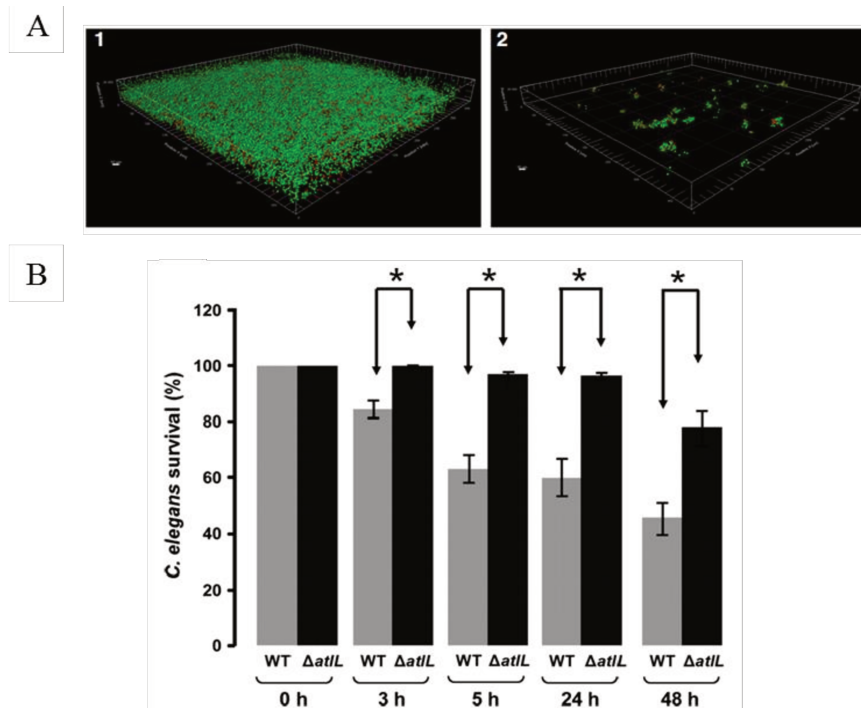


**Figure 15. Représentation de l'autolysine AtIL de *S. lugdunensis* et d'autolysines staphylococciques homologues** (adapté de Hussain et al., 2015). Les autolysines sont organisées en peptidoglycanes hydrolases bifonctionnelles avec des domaines amidase (AM) et glucosaminidase (GL), et génèrent après protéolyse (sites indiqués par des flèches) un propeptide (PP), une amidase active (AM-R1/R2) et une glucosaminidase active (R3-GL). SP, peptide signal; GW, motifs dipeptide glycine-tryptophane; R, domaines répétés.

L'autolysine AtIL de *S. lugdunensis* a ensuite été caractérisée simultanément par deux équipes grâce à la construction de mutants du gène *atIL* (Gibert et al., 2014; Hussain et al., 2015). Ses rôles physiologiques dans la séparation cellulaire et dans le *turnover* du PG ont été confirmés. De plus, le mutant *atIL* présente une sensibilité très diminuée à la lyse induite par le Triton X-

100, un détergent connu pour supprimer l'inhibition exercée par les acides lipotéichoïques sur le système autolytique bactérien général, suggérant qu'AtIL est l'autolysine majeure de *S. lugdunensis* (Gibert et al., 2014).

AtIL est également impliquée dans la pathogenèse bactérienne. La délétion du gène *atIL* entraîne en effet une diminution significative de la capacité du mutant à former du biofilm (Gibert et al., 2014; Hussain et al., 2015) ainsi qu'une virulence réduite dans le modèle d'infection du nématode *Caenorhabditis elegans* (Figure 16) (Gibert et al., 2014). Par ailleurs, AtIL joue un rôle significatif dans la liaison aux protéines de la matrice extracellulaire (fibronectine, fibrinogène et vitronectine) et dans les processus d'adhérence et d'internalisation dans les cellules eucaryotes (cellules épithéliales 5637 et A549, cellules endothéliales EA.hy926 et fibroblastes) (Hussain et al., 2015).



**Figure 16. Rôles de l'autolysine AtIL de *S. lugdunensis* dans la formation de biofilm et dans la virulence dans le modèle *Caenorhabditis elegans* (Gibert et al., 2014).** (A) Comparaison de la capacité de formation de biofilm de la souche *S. lugdunensis* sauvage (1) et du mutant  $\Delta atIL$  (2) par microscopie confocale à balayage laser après coloration *live/dead*. Les cellules vivantes apparaissent vertes et les cellules mortes rouges. (B) Survie des vers après une exposition de trois, 24 et 48 heures à la souche *S. lugdunensis* sauvage (barres grises) et au mutant  $\Delta atIL$  (barres noires). \*  $P < 0,001$ .

De plus, par analyse de zymogrammes, Rajendran et al. ont observé une activité bactériolytique supplémentaire à celle d'AtIL, probablement causée par l'autolysine putative **Aal** (codée par *aal*) homologue aux autolysines Aaa de *S. aureus* et Aae de *S. epidermidis* ; Aal est cependant non caractérisée à ce jour chez *S. lugdunensis* (Rajendran et al., 2015).

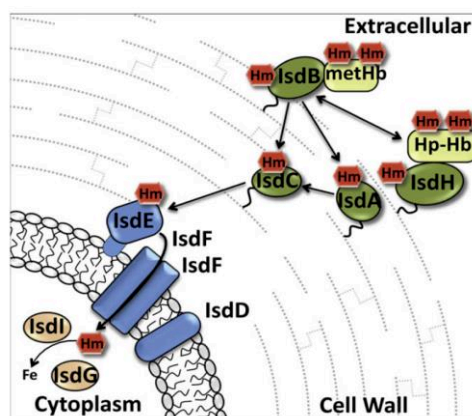
### 3.2. Systèmes de capture du fer

Le fer est un élément essentiel à la croissance des bactéries. Dans l'organisme hôte, celles-ci sont confrontées à une restriction extrême du fer libre  $Fe^{2+}$ , qui est séquestré à l'intérieur des cellules. Pour surmonter cette limitation lors de la colonisation ou d'une infection, les bactéries ont développé différents mécanismes permettant de capturer le fer des réserves de l'hôte.

En 2011, le séquençage du génome complet de la souche *S. lugdunensis* N920143 a révélé la présence des loci *isd* (*iron-regulated surface determinant*) et *sst* (*single iron-regulated ferric siderophore uptake system*) potentiellement impliqués dans l'acquisition du fer (Heilbronner et al., 2011). Seul le système Isd a été caractérisé chez *S. lugdunensis* et sera détaillé ici.

#### Fonctionnement du système Isd chez *S. aureus*

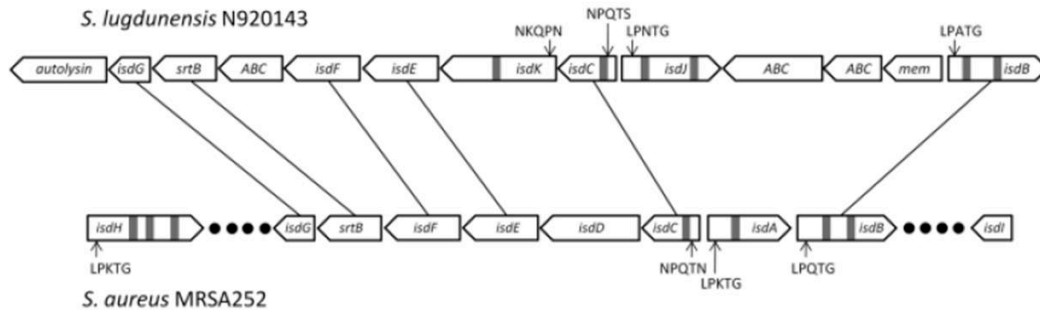
*S. aureus* est la seule autre espèce de staphylocoque connue pour héberger un locus *isd*, qui facilite l'acquisition de l'hème de l'hémoglobine en tant que source de fer (Figure 17) (Grigg et al., 2010). Neuf protéines constituent le système Isd. IsdA, IsdB, IsdC et IsdH sont des protéines de surface ancrées à la paroi cellulaire *via* leur motif LPXTG par la sortase A, ou leur motif NPQTN par la sortase B (*srtB* étant contenu dans l'unité de transcription du locus *isd*). Elles possèdent par ailleurs entre une et trois copies du motif NEAT (*near iron transporter*) de liaison à l'hème. Les protéines IsdB et IsdH lient l'hémoglobine et en extraient l'hème *via* leurs domaines NEAT. L'hème est ensuite transféré par les protéines IsdA et IsdC au transporteur membranaire IsdEF pour être internalisé. Une fois internalisé, l'hème peut être dégradé par IsdG ou IsdI, libérant ainsi le fer.



**Figure 17. Composants du système Isd de *S. aureus* impliqué dans le transport de l'hème et la libération du fer** (Grigg et al., 2010). Neuf protéines Isd interviennent dans ce système. IsdA, IsdB, IsdC et IsdH (vert) sont ancrées de manière covalente à la paroi cellulaire. IsdE et IsdF (bleu) sont les composants de la protéine de liaison et de la perméase d'un transporteur ABC, respectivement. IsdD (bleu) est une protéine membranaire de fonction inconnue. IsdG et IsdI (jaune) sont des enzymes cytoplasmiques dégradant l'hème. Hm, hème ; metHb, méthémoglobine et Hp, Haptoglobine.

### Organisation génétique du locus *isd* chez *S. lugdunensis*

Le locus *isd* de *S. lugdunensis* est composé d'un ensemble de 13 gènes, présentant une organisation relativement similaire à celui de *S. aureus* (Figure 18) (Heilbronner et al., 2011; Zapotoczna et al., 2012). Les homologies de séquences prédites en acides aminés varient de 36,8% à 74,7% en fonction des protéines.



**Figure 18. Comparaison des loci *isd* de *S. aureus* et *S. lugdunensis*** (Heilbronner et al., 2011). Les motifs NEAT sont représentés par des rectangles noirs. Les gènes orthologues sont liés par des lignes. Les pourcentages d'identités entre les protéines codées sont: IsdB 36,8%, IsdC 57,6%, IsdE, 74,7%, IsdF 57,7%, SrtB 58,2%, IsdG 68,2%. Les signaux d'ancrage à la paroi LPXTG et NPQTN sont indiqués. Les gènes *isdH* et *isdI* de *S. aureus* situés à l'extérieur du locus (indiqué par les cercles noirs) ne présentent pas d'orthologues dans le génome de *S. lugdunensis*.

*S. lugdunensis* possède deux protéines putativement ancrées à la paroi par la sortase A via leur motif LPXTG (IsdB et IsdJ) et deux autres par la sortase B (codée par le gène *srtB* contenu dans le locus *isd*) via leur motif NPQTS et NKQPN (IsdC et IsdK respectivement). Chacune de ces protéines possède en outre un ou deux motifs NEAT. A la différence de *S. aureus*, le locus *isd* de *S. lugdunensis* possède en plus un gène codant une autolysine (nommée plus tard IsdP [Farrand et al., 2015]) en aval de *isdG*, et trois gènes codant pour des transporteurs membranaires de type ABC mais dont l'implication dans le transport de l'hème n'est pas connue (Heilbronner et al., 2011; Zapotoczna et al., 2012).

### Fonctionnement du système Isd chez *S. lugdunensis*

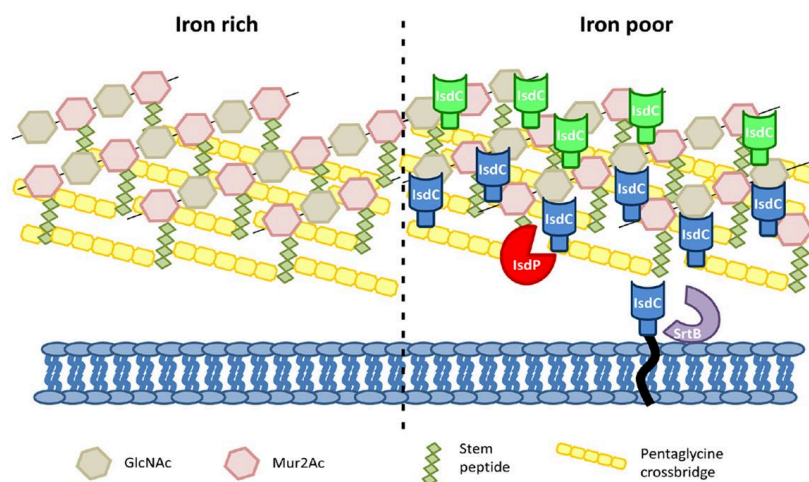
Peu après sa description, il a été confirmé que *S. lugdunensis* utilise bien le système Isd pour acquérir du fer hémique, et que les protéines Isd sont exprimées dans des conditions limitantes en fer (Zapotoczna et al., 2012). IsdB est le seul récepteur de l'hémoglobine chez *S. lugdunensis*, et transfère l'hème à IsdC. L'hème lié à IsdC pourrait ensuite être transféré aux transporteurs membranaires putatifs IsdEF (Zapotoczna et al., 2012). L'hème oxygénase IsdG dégrade ensuite l'hème, entraînant la libération de fer libre dans le cytoplasme (Haley et al., 2011).



Contrairement à IsdB et IsdC qui sont liées de façon covalente à la paroi, les protéines IsdJ et IsdK ne sont pas retrouvées au niveau de la paroi cellulaire de *S. lugdunensis* mais sont présentes dans le surnageant de culture, suggérant qu'elles pourraient acquérir l'hème du milieu extérieur (Zapotoczna et al., 2012). Il pourrait ainsi exister deux voies parallèles d'acquisition de l'hème chez *S. lugdunensis*, l'une utilisant les protéines IsdB et IsdC ancrées à la paroi et la seconde utilisant des protéines sécrétées qui acquièrent l'hème de l'environnement et le transmettent ensuite à IsdC.

Par ailleurs, IsdJ est une protéine multifonctionnelle qui reconnaît plusieurs ligands et confère une résistance aux acides gras antimicrobiens de la peau, pouvant contribuer à promouvoir la survie de *S. lugdunensis* dans son habitat naturel sur la peau humaine (Zapotoczna et al., 2012).

Le rôle essentiel de l'autolysine IsdP dans le fonctionnement du système Isd de *S. lugdunensis* a ensuite été déterminé. Le gène *isdP* est co-transcrit avec l'opéron *isd* dans des conditions limitantes en fer. IsdP clive le PG pour exposer des régions précédemment inaccessibles de la paroi cellulaire, et contribue à l'ancrage de la protéine IsdC au PG par la sortase B (Figure 19) (Farrand et al., 2015).



**Figure 19. Modèle de contribution de l'autolysine IsdP à l'acquisition de l'hème chez *S. lugdunensis*** (Farrand et al., 2015). Dans des conditions limitantes en fer, IsdP est exprimée et remodèle la paroi cellulaire en coupant des liaisons peptidiques, permettant ainsi l'ancrage de la protéine de liaison à l'hème IsdC (bleu) au peptidoglycane par la sortase B (SrtB).

Il est intéressant de noter que l'opéron *isd* s'est avéré être dupliqué en tandem dans la souche clinique *S. lugdunensis* HKU09-01 (Heilbronner et al., 2016). Cette duplication, instable et dépendante de RecA, conduit à une augmentation du niveau d'expression des protéines Isd. Ce processus améliore la capacité de liaison à l'hémoglobine de la souche *S. lugdunensis* HKU09-01 et lui confère un avantage compétitif important.

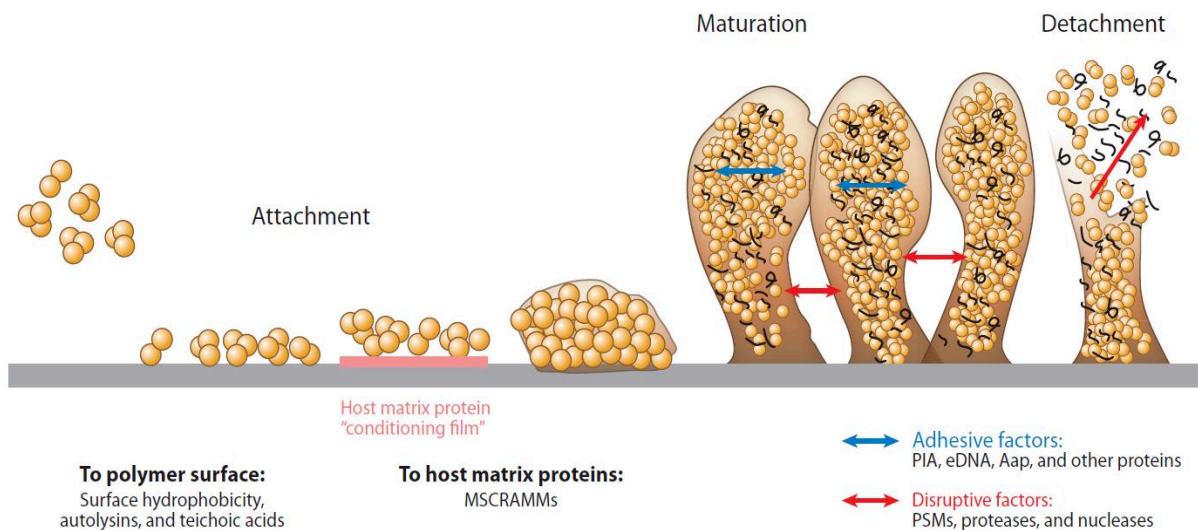
### 3.3. Formation de biofilm

Le biofilm est une communauté bactérienne complexe et dynamique agrégée dans une matrice extracellulaire autoproduite comprenant des polysaccharides, des protéines et/ou de l'ADN extracellulaire (ADNe) (Otto, 2013, 2018). En général, les infections liées à la production de biofilm sont difficiles à traiter car le biofilm protège les bactéries du système immunitaire de l'hôte et des traitements antimicrobiens (Lebeaux et al., 2014; Stewart and Costerton, 2001).

#### 3.3.1. Cycle de développement des biofilms staphylococciques

Le développement des biofilms chez les staphylocoques a fait l'objet de nombreuses études *in vitro* et plus récemment *in vivo*. Il est communément décrit comme un processus en trois étapes principales qui seront détaillées ici : attachement initial, prolifération / formation de la matrice et structuration / détachement (dispersion) (Figure 20) (Otto, 2013, 2018).

D'autres équipes proposent un développement du biofilm de *S. aureus* en cinq étapes comprenant l'attachement, la multiplication, l'exode, la maturation et la dispersion (Moormeier and Bayles, 2017; Moormeier et al., 2014).



**Figure 20. Phases du développement du biofilm staphylococcique (Otto, 2013).** L'attachement peut se produire directement sur une surface polymérique ou par liaison à des molécules de la matrice de l'hôte. La maturation survient ensuite *via* l'agglomération des bactéries, qui dépend de molécules adhésives formant une matrice extracellulaire (composée de polysaccharides, de protéines et/ou d'ADN extracellulaire). La formation de la structure caractéristique du biofilm en « tours » entre lesquelles circulent des « canaux » dépend de facteurs perturbateurs, qui facilitent également la dernière phase du développement du biofilm, le détachement.

### 3.3.1.1. L'attachement initial

L'attachement de cellules planctoniques à une surface, biotique ou abiotique, est considéré comme la première étape de développement du biofilm.

#### ***Surfaces abiotiques***

La fixation directe sur des matériaux abiotiques (comme les surfaces polymériques des dispositifs médicaux à demeure) est principalement médiée par des interactions hydrophobiques ou électrostatiques. Des molécules bactériennes de surface ont également été impliquées dans l'attachement à ces dispositifs, comme **AtlE** chez *S. epidermidis* et son homologue **Atl** chez *S. aureus* (Bose et al., 2012; Heilmann et al., 1997), ainsi que les **acides téichoïques** de paroi de *S. aureus* (Gross et al., 2001). Cependant, *in vivo*, ces surfaces sont rapidement recouvertes par les molécules de l'hôte (notamment la fibronectine, le fibrinogène et la vitronectine).

#### ***Surfaces biotiques***

La fixation aux surfaces dites biotiques comme les protéines et tissus de l'hôte est médiée par des protéines de surface staphylococciques. Parmi les protéines liées de manière covalente à la paroi, la famille la plus importante impliquée dans ce phénomène est celle des **MSCRAMMs** décrite plus haut (cf paragraphe 3.1) (Patti et al., 1994). Les protéines ClfA et ClfB, FnBPA et FnBPB (*fibrinogen/fibronectin-binding proteins*), et SdrC sont principalement impliquées (Speziale et al., 2014). Les protéines liées de manière non covalente à la surface, comme les autolysines de type **Atl**, peuvent également avoir un rôle dans l'adhésion. En outre, les **SERAMs**, protéines sécrétées ou liées de manière non covalente à la surface, se lient par des mécanismes non encore caractérisés (Chavakis et al., 2005). Parmi elles, les protéines **Eap** (*extracellular adherence protein*) et **Emp** (*extracellular matrix binding protein*) de *S. aureus* ont été décrites (Speziale et al., 2014).

### 3.3.1.2. La prolifération et la formation de la matrice

Après la fixation des cellules, celles-ci se multiplient et forment des agrégats « collants » appelés microcolonies. A mesure que les bactéries se développent, elles produisent une matrice extra-cellulaire essentielle à l'architecture du biofilm. Les polymères contenus dans cette matrice comprennent des molécules activement sécrétées comme des polysaccharides, des protéines et des acides téichoïques, ainsi que l'ADNe libéré par la lyse des cellules mortes.

### **Matrice exopolysaccharidique**

Chez les staphylocoques, et plus particulièrement chez les espèces les plus étudiées *S. aureus* et *S. epidermidis*, l'exopolysaccharide poly-*N*-acétylglucosamine (**PNAG**), également appelé *polysaccharide intercellular adhesin* (**PIA**), est la molécule adhésive du biofilm la plus importante (Maira-Litrán et al., 2002).

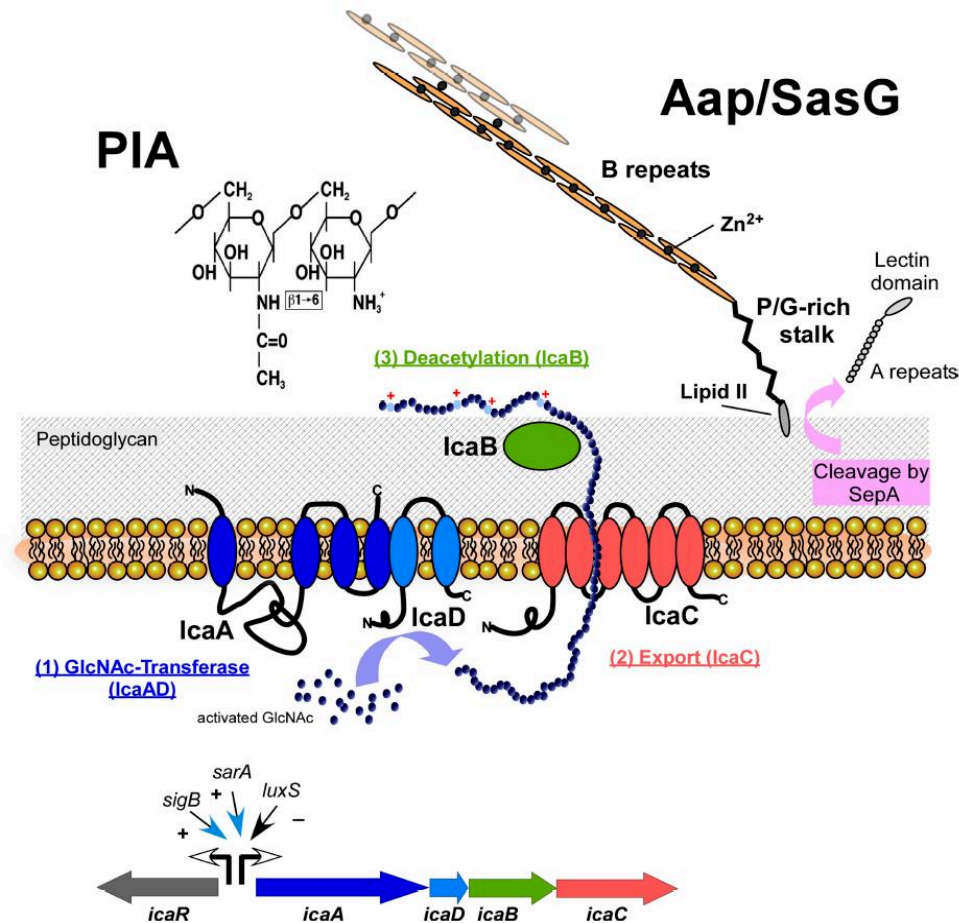
La biosynthèse du PNAG est liée aux produits du locus *ica* (*intercellular adhesion*), qui comprend les gènes *icaA*, *icaD*, *icaB* et *icaC* (**Figure 21**) (Heilmann et al., 1996). IcaA et IcaD forment une *N*-acétylglucosamine transférase membranaire qui produit un oligomère de *N*-acétylglucosamine. La croissance de la chaîne et son export sont ensuite médiés par la protéine membranaire IcaC. Une déacétylation est effectuée par la PNAG déacétylase IcaB, située à la surface bactérienne (Otto, 2018). Cette étape permet d'introduire des charges positives qui sont cruciales pour la rétention du PNAG à la surface bactérienne. En amont de l'opéron *ica* se trouve le gène *icaR*, transcrit dans le sens opposé de l'opéron *icaADBC*, et qui code IcaR, le répresseur transcriptionnel de l'opéron *ica* (Conlon et al., 2002).

### **Matrice protéique**

Cependant, il a été décrit que certains isolats de *S. aureus* et de *S. epidermidis* sont capables de former du biofilm en l'absence du locus *ica* et/ou de PNAG (Kogan et al., 2006; Rohde et al., 2007). Des protéines de surface remplacent alors le PNAG chez les isolats *ica* négatifs, ou participent à la matrice du biofilm chez les isolats *ica* positifs.

De nombreuses protéines de surface composent cette matrice, et notamment celles appartenant à la famille des MSCRAMMs, comme FnBPA, FnBPB et la protéine A. Parmi les autres protéines de surface impliquées, la protéine **Aap** (*accumulation-associated protein*) de *S. epidermidis* et son homologue **SasG** (*S. aureus surface protein G*) de *S. aureus* se distinguent par leur capacité à s'auto-polymériser et former des fibrilles qui interconnectent les cellules (**Figure 21**) (Banner et al., 2007; Corrigan et al., 2007; Geoghegan et al., 2010b). Aap est clivée par la protéase SepA en une forme active qui contient de nombreuses répétitions B responsables de l'adhésion auto- et inter-cellulaire, dépendante du Zn<sup>2+</sup> (Conrady et al., 2008).

La protéine **Bap** (*biofilm-associated protein*) de *S. aureus* (Cucarella et al., 2001), dont un homologue **Bhp** (*Bap homologue protein*) est présent chez *S. epidermidis* (Bowden, 2005), est également impliquée dans la formation de la matrice, et il a récemment été rapporté que Bap s'auto-assemble en agrégats amyloïdes fonctionnels pour construire cette matrice (Taglialegna et al., 2016).



**Figure 21. Composants principaux de la matrice des biofilms staphylococciques (Otto, 2018).** A gauche, l'exopolysaccharide *polysaccharide intercellular adhesin* (PIA), produit par de nombreux isolats de staphylocoques, est synthétisé dans la cellule par l'activité combinée des enzymes membranaires IcaA et IcaD, et exporté par IcaC. L'enzyme extracellulaire liée à la surface IcaB confère à la molécule de PIA une charge nette positive, l'ancrant à la surface cellulaire chargée négativement. En amont des gènes de biosynthèse *icaADBC*, se trouve le gène de régulation *icaR*. La transcription du *locus ica* est sous le contrôle des facteurs *sigB*, *sarA* et *luxS*. A droite, la protéine Aap présente chez *S. epidermidis*, et son homologue SasG chez *S. aureus*, est produite sous la forme d'un précurseur clivé par SepA. La protéine Aap mature est ancrée à la paroi cellulaire *via* une liaison covalente au lipide II, et forme des fibrilles à partir de domaines répétés B, dont la polymérisation dépend des ions  $Zn^{2+}$ .

### *Autres composants de la matrice*

Les polymères extracellulaires non protéiques impliqués dans la formation de biofilm comprennent les acides téichoïques et l'ADNe. La contribution des **acides téichoïques** à la matrice du biofilm a été démontrée pour *S. epidermidis* (Holland et al., 2011).

L'**ADNe** contribue à la formation de biofilm *in vitro*, probablement en raison de son caractère hautement polymérique et anionique. Il agirait comme une « glue » susceptible d'interagir avec de nombreuses autres molécules de surface, contribuant à la formation du réseau de la matrice (Whitchurch et al., 2002).

### 3.3.1.3. Structuration et détachement

#### **Structuration**

Les biofilms ont une structure tridimensionnelle caractéristique qui contient des « tours » (également décrites comme des « champignons ») entre lesquelles circulent des « canaux » remplis de fluide (**Figure 20**) (O'Toole et al., 2000). En parallèle des mécanismes adhésifs décrits ci-dessus, des mécanismes de rupture sont nécessaires pour créer ces structures. Cette fonction est médiée par les *phenol-soluble modulins* (**PSM**), une famille de peptides de type *pore forming toxins* qui présentent des propriétés analogues à celles d'un surfactant et perturbent ainsi les interactions non covalentes de la matrice du biofilm. Chez les staphylocoques, on distingue les PSM de type  $\alpha$  (qui chez *S. aureus* comprennent les peptides PSM $\alpha$  et  $\delta$ -toxine), et les PSM de type  $\beta$  (Cheung et al., 2014). Les PSM structurent les biofilms en formation de façon dépendante et indépendante du PNAG (Otto, 2018; Wang et al., 2011).

#### **Détachement / dispersion**

Lorsqu'une densité cellulaire spécifique est atteinte, un mécanisme est déclenché pour initier la dégradation de la matrice et libérer les cellules incluses dans le biofilm, qui pourront reformer du biofilm sur des sites distaux. Ce mécanisme facilite la dissémination systémique des bactéries et peut conduire à des complications infectieuses. Le détachement implique les **PSMs**, mais également des enzymes qui dégradent les polymères du biofilm, telles que des **nucléases** (Whitchurch et al., 2002) et surtout des **protéases** (Boles and Horswill, 2011). Il est à noter qu'aucune enzyme ne dégradant le PNAG n'est produite chez les staphylocoques.

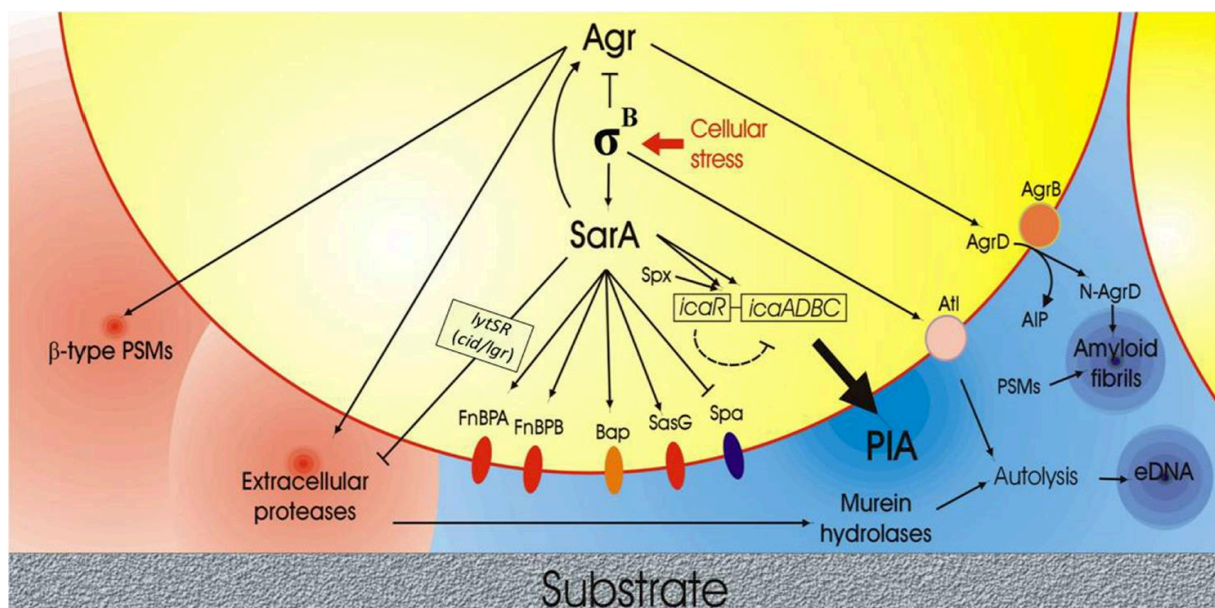
### **3.3.2. Régulation de la formation de biofilm chez les staphylocoques**

De nombreux régulateurs ont un rôle dans la formation de biofilm en modulant l'expression génique des bactéries en fonction des conditions environnementales. Les principaux facteurs de régulation impliqués dans le contrôle du biofilm des staphylocoques sont les systèmes à deux composants (*two-component regulatory systems* [TCS]), la famille des régulateurs Sar (*staphylococcal accessory regulator*) et de façon plus controversée le facteur  $\sigma^B$  (**Figure 22**) (Arciola et al., 2015; Otto, 2018).

Parmi les TCS impliqués dans la formation de biofilm, les principaux sont Agr (Kavanaugh and Horswill, 2016), ArlSR (Burgui et al., 2018) et LytSR (Sharma-Kuinkel et al., 2009) (cf partie 2). Le système de *quorum sensing* **Agr** est activé en réponse à la densité cellulaire bactérienne. Chez les staphylocoques, ce système semble impliqué dans les processus de structuration et de

dispersion des biofilms, en augmentant l'expression des PSMs et des protéases. En conséquence, les biofilms des mutants *agr* se développent de manière non structurée et étendue, comme cela a été montré pour *S. aureus* et *S. epidermidis* (Periasamy et al., 2012; Vuong et al., 2000).

Le prototype de la famille des régulateurs **Sar**, SarA, est un régulateur positif de la formation de biofilm, d'une manière dépendante et indépendante du système Agr (Otto, 2018). SarA module l'expression des protéases et contrôle positivement la transcription de *ica* chez *S. aureus* et *S. epidermidis* (Figure 22) (Tormo et al., 2005; Valle et al., 2003). Les signaux environnementaux qui stimulent l'expression de Sar ne sont à ce jour pas connus.



**Figure 22. Réseau complexe d'interactions régissant la formation et la dispersion du biofilm chez *S. aureus*** (Arciola et al., 2015). Le côté droit de la figure illustre la phase anabolique du biofilm avec la production des substances polymères extracellulaires fondamentales telles que le PIA, l'ADN extracellulaire et les fibrilles amyloïdes. Le centre de la figure représente les protéines de surface impliquées dans la formation du biofilm, notamment les adhésines FnBPs, la protéine associée au biofilm (Bap), SasG et la protéine A (Spa). Dans la partie gauche figurent les molécules jouant un rôle dans le catabolisme du biofilm et la perturbation de la matrice extracellulaire, telles que les *phenol-soluble modulins* (PSM) et les protéases extracellulaires. Les régulateurs centraux Agr, SarA et le facteur  $\sigma^B$  orchestrent le comportement bactérien au sein du biofilm, en réponse au stress, à la densité cellulaire et aux phases du cycle cellulaire.

Cette régulation est d'autant plus complexe qu'il existe au sein du biofilm une hétérogénéité environnementale due aux gradients des apports nutritionnels et en oxygène, modifiant les états métaboliques et l'expression des gènes des bactéries en fonction de leur localisation dans le biofilm (Moormeier and Bayles, 2017; Stewart and Franklin, 2008).

### 3.3.3. Le biofilm de *S. lugdunensis*

Chez *S. lugdunensis*, la capacité de formation de biofilm semble être une caractéristique relativement fréquente de l'espèce. Des analyses de formation de biofilm *in vitro* en microplaques de polystyrène ont révélé qu'entre 37% et 100% des souches forment du biofilm, à des niveaux variables selon les souches (Frank and Patel, 2007; Giormezis et al., 2015; Pereira et al., 2012). D'autre part, une étude a suggéré que la capacité de formation de biofilm est plus fréquente chez les souches responsables d'infections sur matériel (57,1%) que chez celles issues d'IPTM (36,4%) (Giormezis et al., 2015). Plus récemment, la capacité à former du biofilm a été évaluée par la technique du BioFilm Ring Test® chez 28 souches de *S. lugdunensis* responsables d'IOA (Argemi et al., 2017d). Cette technique est basée sur l'immobilisation progressive de billes magnétiques au sein d'un biofilm, et permet d'évaluer la cinétique de formation de ce biofilm. Soixante et onze % des 28 souches initiaient la formation de biofilm dans les deux premières heures, toutes produisaient du biofilm en quatre heures, et 89% immobilisaient complètement les billes après six heures. Ces résultats soulignent le rôle crucial joué par la production précoce de biofilm dans certaines infections à *S. lugdunensis*.

#### *Etape d'adhésion*

Si les MSCRAMMs de *S. lugdunensis* sont probablement impliquées dans l'adhésion initiale aux molécules de l'hôte, leur rôle dans la formation de biofilm n'a pas été étudié. Seule l'autolysine **AtIL** a été démontrée comme impliquée dans la formation de biofilm *in vitro*, probablement en médiant la phase d'attachement initial aux surfaces (Gibert et al., 2014; Hussain et al., 2015).

#### *Organisation génétique du locus ica de S. lugdunensis*

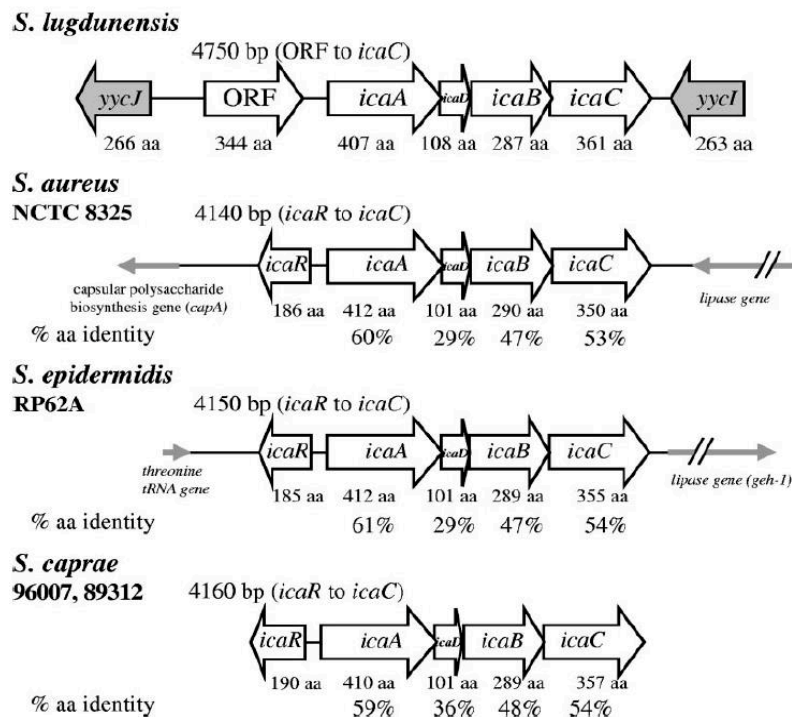
Le locus *icaADBC* a été identifié et séquencé en 2007 chez cinq souches de *S. lugdunensis* (Frank and Patel, 2007). Celui-ci présente une organisation génomique homologue à celle des espèces *S. aureus*, *S. epidermidis* et *Staphylococcus caprae* (Figure 23). L'analyse des séquences prédites en acides aminés a révélé des homologies de séquences en revanche assez faibles, allant de 29 à 61% selon les protéines.

Étonnamment, aucun homologue d'*icaR* n'est localisé en amont d'*icaA* chez *S. lugdunensis*, à la différence de ce qui est observé chez les autres espèces de staphylocoques (Figure 23). A la place, se trouve une séquence codante avec la même orientation qu'*icaA*, sans homologie avec des gènes d'autres espèces staphylococciques. Cette séquence code une glycosyl hydrolase



hypothétique présentant 26% d'identité en acides aminés avec des homologues de dispersines B d'*Actinobacillus*. Le rôle de cette protéine putative chez *S. lugdunensis* n'est pas élucidé, mais la dispersine B étant connue pour cliver les liaisons du PNAG, elle pourrait servir à *S. lugdunensis* à rivaliser *in vivo* avec des espèces formant du biofilm PNAG-dépendant (Frank and Patel, 2007).

De plus, des séquences codantes présentant des similitudes élevées avec *yycJ* et *yycI* de *S. aureus* et *S. epidermidis* sont situées de part et d'autre du *locus* (Figure 23) (Frank and Patel, 2007). La distance séparant ces deux gènes est surprenante car chez d'autres bactéries à Gram positif ils sont situés dans un même opéron, codant le système à deux composants YycFG. Ce TCS, également connu sous le nom de WalRK, est impliqué dans la croissance et la formation de biofilm chez *S. aureus* et *S. epidermidis* (Haag and Bagnoli, 2017). Son rôle sera détaillé dans le paragraphe 2.3.1 de la partie 2.

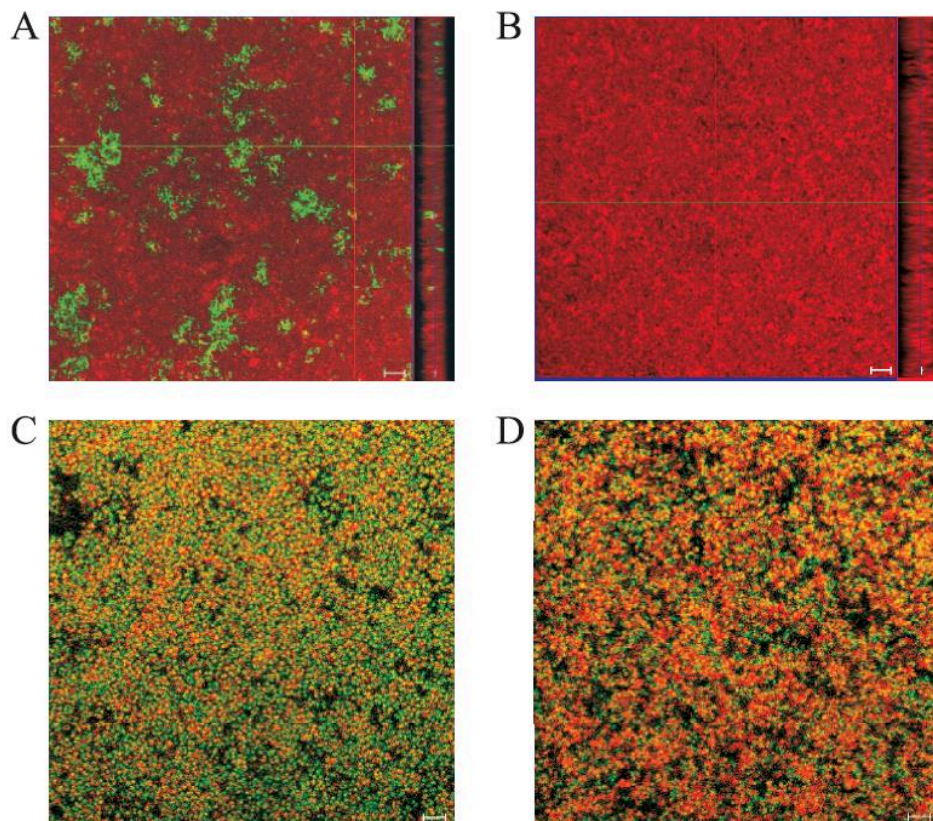


**Figure 23. Organisation génomique du locus *icaADBC* de *S. lugdunensis* comparativement à d'autres espèces de staphylocoques (Frank and Patel, 2007).** *S. lugdunensis* possède une organisation génétique du locus similaire à celle des espèces *S. aureus*, *S. epidermidis* et *S. caprae*, mais ne présente une homologie de séquences en acides aminés prédites que de 29 à 61% selon les protéines. A la différence des autres espèces, *S. lugdunensis* ne possède pas le locus *icaR* en amont du locus *icaADBC*, mais est situé à la place un gène codant une glycosyl hydrolase hypothétique. De plus, en amont et en aval du locus, sont situés des gènes homologues à *yycJ* et *yycI* codant chez *S. aureus* le système à deux composants YycFG.

L'absence du gène *icaR* et la présence des gènes *yycJ* et *yycI* de part et d'autre du locus *ica* soulèvent la question de l'origine évolutive de cette région génomique chez *S. lugdunensis*.

### **Composition de la matrice du biofilm de *S. lugdunensis***

Malgré la présence prévalente du *locus icaADBC* chez *S. lugdunensis*, le PNAG n'est pas un composant majeur de la matrice du biofilm, qui est majoritairement composée d'acides téichoïques, de facteurs protéiques et d'ADNe (Frank and Patel, 2007; Kogan et al., 2006; Sadvovskaya et al., 2006). En effet, les biofilms de souches de *S. lugdunensis* sont sensibles à l'action de protéases (protéinase K et trypsine) et insensibles à l'action de molécules dégradant le PNAG (sodium metaperiodate et dispersine B). De plus, l'analyse du biofilm par microscopie confocale à balayage laser (CLSM) a confirmé la nature protéique de la matrice du biofilm de *S. lugdunensis* et l'absence de PNAG (Figure 24) (Frank and Patel, 2007).



**Figure 24. Évaluation de la matrice extracellulaire de biofilms de *S. lugdunensis* et *S. epidermidis* par microscopie confocale à balayage laser (CLSM) (Frank and Patel, 2007).** (A et B) Visualisation de la présence ou de l'absence de poly-*N*-acétylglucosamine (PNAG) dans la matrice extracellulaire du biofilm d'une souche de *S. epidermidis* (A) et *S. lugdunensis* (B). Le PNAG est coloré en vert et les cellules bactériennes en rouges. De larges structures de PNAG sont visibles dans le biofilm de *S. epidermidis* mais absentes chez *S. lugdunensis*. (C et D) Détection des protéines extracellulaires dans les biofilms de *S. epidermidis* (C) et *S. lugdunensis* (D). Les protéines sont colorées en rouge, les bactéries en vert, et les zones jaunes indiquent une colocalisation des protéines et des cellules. Le biofilm de *S. lugdunensis* contient significativement plus de protéines que celui de *S. epidermidis*.

Une seule protéine a été identifiée à ce jour comme ayant un rôle dans l'interaction intercellulaire au sein du biofilm de *S. lugdunensis* ; il s'agit de la protéine **IsdC** appartenant au système de capture du fer Isd (cf paragraphe 3.2). Missineo et al. ont établi son rôle dans la formation de biofilm *in vitro* dans des conditions limitantes en fer (Missineo et al., 2014). IsdC est impliquée à la fois dans la phase de fixation primaire sur du polystyrène et dans la phase d'accumulation du biofilm, médiant des interactions cellule-cellule. Cette adhésion cellulaire est possiblement permise par des interactions homophiles entre les molécules IsdC des cellules voisines. En effet, la protéine IsdC forme des dimères en solution, et l'expression d'IsdC à la surface de *L. lactis* promeut l'adhérence à la protéine IsdC recombinante immobilisée, mais pas aux protéines IsdJ, IsdK ou IsdB. Du fait des très faibles concentrations de fer libre dans les fluides corporels, IsdC joue probablement un rôle majeur dans la formation de biofilm *in vivo*. Les autres protéines qui régissent l'adhésion au sein du biofilm de *S. lugdunensis* restent à identifier.

D'autre part, le gène impliqué dans la compétence bactérienne **comEB** est impliqué dans la formation de biofilm chez *S. lugdunensis*. En effet, un mutant lié à l'insertion d'un transposon inséré dans ce gène présente une capacité à former du biofilm significativement réduite (Rajendran et al., 2015). La matrice du biofilm du mutant présente par ailleurs une diminution de la quantité d'ADNe par rapport à la souche sauvage, non expliquée par une diminution de l'expression des gènes d'autolysines (*atlL* et *aal*) ni par une diminution de l'activité autolytique, ou par une viabilité cellulaire augmentée. Ces résultats suggèrent que la libération d'ADNe s'effectue *via* un mécanisme indépendant de la lyse bactérienne, qui reste encore à identifier.

La capacité de formation de biofilm de *S. lugdunensis* est considérée comme un facteur majeur de la virulence de cette espèce. Les résultats présentés ci-dessus suggèrent que des facteurs protéiques et l'ADNe, plutôt que le polysaccharide produit par le locus *icaADBC*, jouent un rôle important dans la matrice du biofilm de *S. lugdunensis*. Cependant, des travaux supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ces résultats *in vivo*, et déterminer si le locus *ica* est exprimé malgré tout dans certaines conditions.

### 3.4. Toxines et exoenzymes

*S. aureus* est capable de produire un grand nombre d'exotoxines jouant un rôle majeur dans sa virulence, comme les entérotoxines, la toxine du syndrome de choc toxique staphylococcique-1 (TSST-1), les exfoliatines et les *pore-forming toxins* (*hly*, *luk*, *hlg*). Malgré la description de quelques cas de chocs toxiques liés à *S. lugdunensis*, les tentatives d'identification d'exotoxines similaires à celles produites par *S. aureus* se sont souvent révélées infructueuses (Fleurette et al., 1989; Pareja et al., 1998). De même, l'analyse du génome complet de la souche *S. lugdunensis* N920143 a seulement mis en évidence la présence d'un *locus* codant une toxine streptolysine *S-like* putative (Heilbronner et al., 2011).

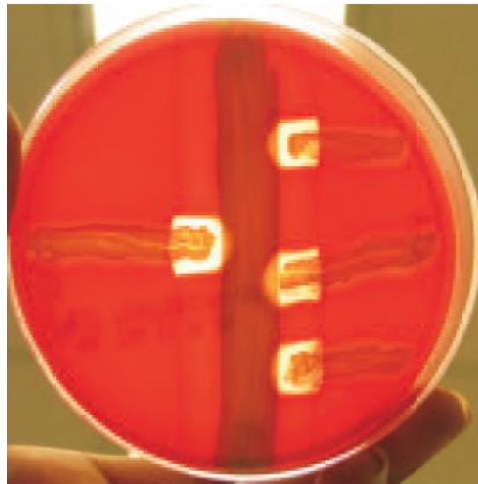
Une équipe a cependant identifié par PCR la présence de gènes codant des toxines chez des souches de *S. lugdunensis* isolées dans des prélèvements cliniques de nouveaux-nés hospitalisés (de Oliveira Calsolari et al., 2011; Vasconcelos et al., 2011). Les gènes codant les entérotoxines C, G et I (*sec-1*, *seg* et *sei*) ou la toxine TSST-1 (*tsst-1*) ont ainsi été identifiés chez trois souches de *S. lugdunensis*, dont deux exprimaient les gènes *sec* et *sei* lors d'une analyse par RT-PCR.

#### 3.4.1. Hémolysines

Les hémolysines de *S. aureus* sont classées en quatre groupes : les  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et  $\gamma$ -hémolysines, codées respectivement par les gènes *hla*, *hly*, *hld* et *hlg*. Ces toxines présentent des structures et des activités phénotypiques différentes (Dinges et al., 2000). Plusieurs études ont cherché à identifier et caractériser chez *S. lugdunensis* des hémolysines homologues à celles de *S. aureus*.

##### *$\delta$ -like hémolysine et opéron *slush**

Il a rapidement été décrit que la majorité des souches de *S. lugdunensis* produisent une  $\delta$ -like hémolysine, dont les propriétés phénotypiques sont similaires à la  $\delta$ -hémolysine de *S. aureus* (Hébert, 1990). Une activité hémolytique synergistique est en effet observée avec une  $\beta$ -hémolysine lors de la réalisation d'un *CAMP-test* (Figure 25). Dans ce test, une colonie de *S. lugdunensis* est ensemencée perpendiculairement à une souche staphylococcique produisant une  $\beta$ -hémolysine (par exemple *Staphylococcus intermedius* ou *S. aureus* RN4220) sur une gélose au sang de mouton. L'hémolysine  $\delta$ -like de *S. lugdunensis* agit en synergie avec la  $\beta$ -hémolysine pour produire une zone d'hémolyse complète dans la zone d'hémolyse incomplète provoquée par la  $\beta$ -hémolysine (Frank et al., 2008).



**Figure 25. Activité hémolytique synergique de *S. lugdunensis* révélée par CAMP-test** (Frank et al., 2008). *S. lugdunensis* IDRL-5258 (à gauche) et *S. lugdunensis* IDRL-2414 (à droite) sont ensemencées perpendiculairement à *S. aureus* RN4220, ensemencée verticalement. La photographie a été prise 18 heures après l'inoculation et l'incubation à 37°C. L'hémolysine  $\delta$ -like de *S. lugdunensis*, médiée par trois petits peptides produits lors de l'expression du *locus slush*, agit en synergie avec la  $\beta$ -hémolysine de *S. aureus* pour produire une zone d'hémolyse complète sur gélose au sang de mouton.

A la différence de la  $\delta$ -hémolysine de *S. aureus* codée par le gène *hld* contenu au sein du *locus agr*, l'hémolysine  $\delta$ -like de *S. lugdunensis* est codée par un opéron nommé ***slush*** (*S. lugdunensis synergistic hemolysin*), qui n'est pas situé dans le *locus agr* (Donvito et al., 1997). Le *locus* contient trois cadres ouverts de lecture codant trois peptides de 43 acides aminés de haute similitude (> 76% d'homologie), appelés SLUSH-A, SLUSH-B et SLUSH-C. Ces trois peptides présentent une certaine homologie avec les peptides PSM de type  $\beta$  de *S. aureus* et *S. epidermidis* (Donvito et al., 1997; Rautenberg et al., 2011). Ces PSM de type  $\beta$  ont un rôle pro-inflammatoire, leur libération induisant le chimiotactisme et l'activation des polynucléaires neutrophiles (Rautenberg et al., 2011).

### ***Autres hémolysines***

Il a également été identifié dans le génome de *S. lugdunensis* le gène ***hllb***, homologue au gène de *S. aureus* qui code une sphingomyelinase  $\beta$ -toxine, et un gène codant une **hémolysine III** putative, sans homologue décrit chez les *Staphylococcus* (Heilbronner et al., 2011).

### 3.4.2. La lugdulysine

Récemment, une équipe française a mis en évidence la production par *S. lugdunensis* d'une métalloprotéase, appelée lugdulysine (Argemi et al., 2017c). Celle-ci a été identifiée à partir d'isolats cliniques de *S. lugdunensis* présentant une activité protéolytique *in vitro*. Elle est codée par le gène *shpI*, appelé ainsi du fait d'une homologie avec le gène *shpI* de *Staphylococcus hyicus* qui code la métalloprotéase ShpI. La lugdulysine était produite par 50 des 81 isolats cliniques de *S. lugdunensis*, alors que le gène était identifié chez 100% des isolats.

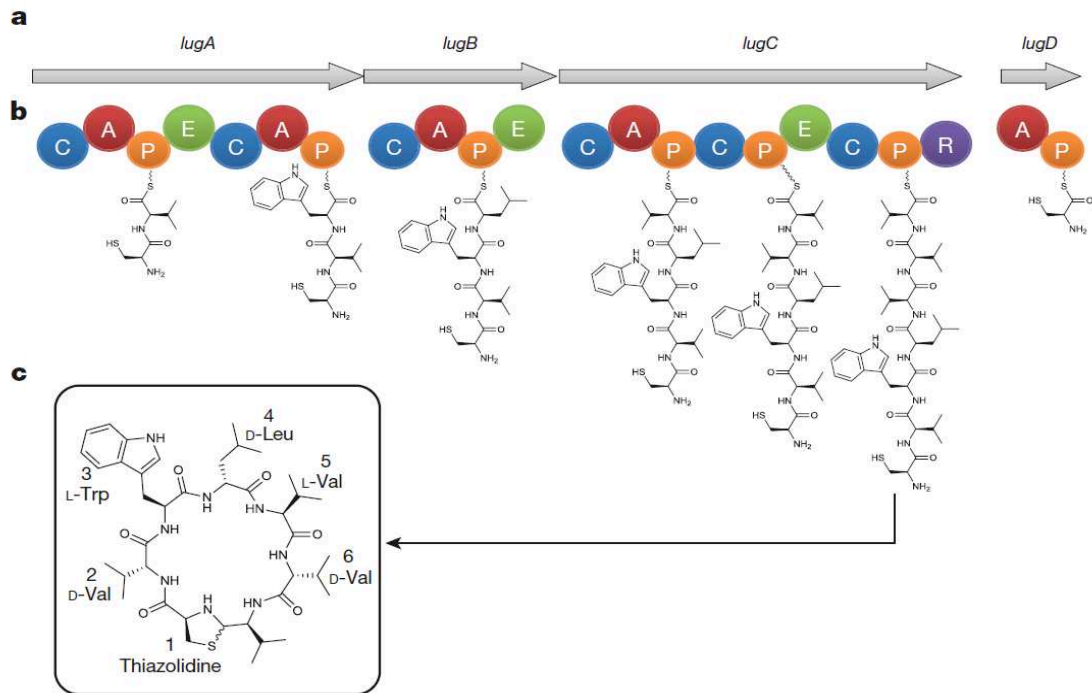
L'implication en pathologie humaine des métalloprotéases a notamment été décrite pour *S. aureus*, chez lequel la métalloprotéase auréolysine sécrétée jouerait un rôle dans le remodelage osseux pendant une ostéomyélite (Cassat et al., 2013). La sécrétion de la lugdulysine pourrait ainsi contribuer à la virulence de *S. lugdunensis*, particulièrement au cours des IOA, mais des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer ce rôle (Argemi et al., 2017c).

### 3.5. La lugdunine

En 2016, une équipe travaillant sur une collection d'isolats de *Staphylococcus* de prélèvements nasaux dans le but de dépister une activité antimicrobienne vis-à-vis de *S. aureus* a identifié une souche de *S. lugdunensis* capable d'inhiber la croissance de *S. aureus* (Zipperer et al., 2016).

Cette inhibition était liée à une substance antibactérienne, appelée lugdunine, produite uniquement dans des conditions limitantes en fer et en milieu solide. Des expériences de transposition ont permis d'identifier le *locus lug* (opéron d'environ 30 kpb), composé de quatre gènes codant une combinaison d'enzymes biosynthétisant cet antibiotique (Figure 26).

Cet opéron a été retrouvé dans tous les génomes de *S. lugdunensis* disponibles sur NCBI ainsi que par PCR dans toutes les souches de *S. lugdunensis* d'une collection, indiquant qu'il est caractéristique de l'espèce plutôt que spécifique à une souche. Le faible pourcentage en GC de l'opéron (26,9%) comparativement à celle de l'ensemble du génome (33,8%) est en faveur d'une acquisition par transfert horizontal, même s'il n'a pas été détecté chez d'autres espèces à ce jour (Zipperer et al., 2016).



**Figure 26. Groupe de gènes, voie de biosynthèse proposée et structure chimique de la lugdunine de *S. lugdunensis* (Zipperer et al., 2016).** (a) Opéron *lug*, constitué des quatre gènes *lugA*, *B*, *C*, et *D*. (b) Organisation modulaire des enzymes produites. Domaines fonctionnels: A, adénylation; P, protéine porteuse de peptidyle; C, condensation; E, épimérisation; R, réductase. La biosynthèse séquentielle de la lugdunine commence probablement au module d'initiation *LugD* et se poursuit avec *LugA* – *C*. (c) Structure chimique de la lugdunine.

La lugdunine est un peptide cyclique contenant cinq acides aminés et un cycle thiazolidine (Figure 26), exemple rare d'un composé bioactif synthétisé non ribosomalement à partir de bactéries associées à l'Homme. Elle est bactéricide vis-à-vis de *S. aureus* et d'autres agents pathogènes majeurs (comme les *Enterococcus* résistants à la vancomycine). Elle n'est pas susceptible de provoquer le développement de résistance chez *S. aureus*. Elle est de plus efficace dans le traitement d'infections à *S. aureus* dans un modèle murin d'infection de la peau (Zipperer et al., 2016).

Afin de déterminer si la colonisation nasale par *S. lugdunensis* empêche la co-colonisation par *S. aureus*, des écouvillonnages de nez chez 187 patients hospitalisés ont été analysés par culture. Les taux de colonisation par *S. aureus* et *S. lugdunensis* étaient respectivement de 32,1% et 9,1%. De façon intéressante, la colonisation à *S. lugdunensis* était associée à une réduction significative du portage à *S. aureus*. Ces résultats suggèrent donc que la lugdunine pourrait s'avérer être une stratégie utile dans le futur pour prévenir la colonisation par *S. aureus* et les infections invasives chez les patients à haut risque (Zipperer et al., 2016).

### 3.6. Autres facteurs de virulence

#### 3.6.1. Résistance au lysozyme

Le lysozyme est un composant enzymatique essentiel du système immunitaire inné humain, contenu dans les granules des polynucléaires neutrophiles et sécrété par les macrophages. Il est présent dans divers tissus et sécrétions, comme le sérum, la salive, la sueur ou les larmes. C'est une muramidase qui hydrolyse les liaisons  $\beta$ -1,4-glycosidiques du PG, entre l'acide *N*-acétylmuramique (NAM) et le *N*-acétylglucosamine (NAG) (Bera et al., 2005).

De nombreuses espèces de staphylocoques pathogènes sont résistantes au lysozyme. Ceci leur permet d'échapper au système immunitaire inné. Chez *S. aureus*, la résistance est médiée par une peptidoglycane O-acétyltransférase (OatA), conduisant à une O-acétylation du PG qui empêche la liaison du lysozyme (Bera et al., 2006). *S. lugdunensis* résiste également à des concentrations élevées de lysozyme, de l'ordre de 400 mg/ml (Freney et al., 1988). Il possède un gène *oatA* homologue à celui de *S. aureus* et du PG O-acétylé (Bera et al., 2006).

Il a récemment été montré que la survie de *S. lugdunensis* dans les macrophages était hautement dépendante de cette O-acétylation du PG (Flannagan et al., 2018). En effet, un mutant *oatA* était plus sensible à la destruction par le lysozyme et survivait dans une moindre mesure *in vitro* dans les macrophages. De même, dans un modèle murin d'infection systémique, le mutant *oatA* survivait moins dans les macrophages hépatiques. La survie intracellulaire de *S. lugdunensis* dans les macrophages pourrait ainsi constituer un réservoir contribuant à la dissémination des bactéries chez l'hôte (Flannagan et al., 2018).

#### 3.6.2. Autres facteurs de virulence putatifs

Les analyses génomiques ont permis d'identifier la présence de gènes codant d'autres facteurs de virulence putatifs (Heilbronner et al., 2011):

- Un *locus* de gènes homologues au *locus ess* (*ESAT-6 secretion system*) de *S. aureus*, codant chez cette espèce le système de sécrétion de type VII dont le rôle dans la virulence a été démontré, en particulier dans la formation d'abcès (Kneuper et al., 2014).
- Trois *clusters* de gènes codant des systèmes de **synthèse peptidique non-ribosomiaux**, la plupart des staphylocoques n'en possédant pas.
- Un *locus cap* codant une capsule, celle-ci n'ayant été mise en évidence phénotypiquement que par Lambe et al. en 1990 (Lambe et al., 1990).



Les différents facteurs de virulence ou de *fitness* décrits ici démontrent que *S. lugdunensis* est une espèce commensale bien équipée pour la survie et la compétition chez son hôte (Figure 27). Néanmoins, le comportement agressif de *S. lugdunensis*, qui le distingue des autres SCN et le rapproche de *S. aureus*, semble moins bien expliqué. Il pourrait être lié à des facteurs de virulence qui restent putatifs. Aucune information sur la régulation de la virulence n'est disponible chez cette espèce. De même, les données épidémiologiques concernant les infections à *S. lugdunensis* sont à ce jour très parcellaires.

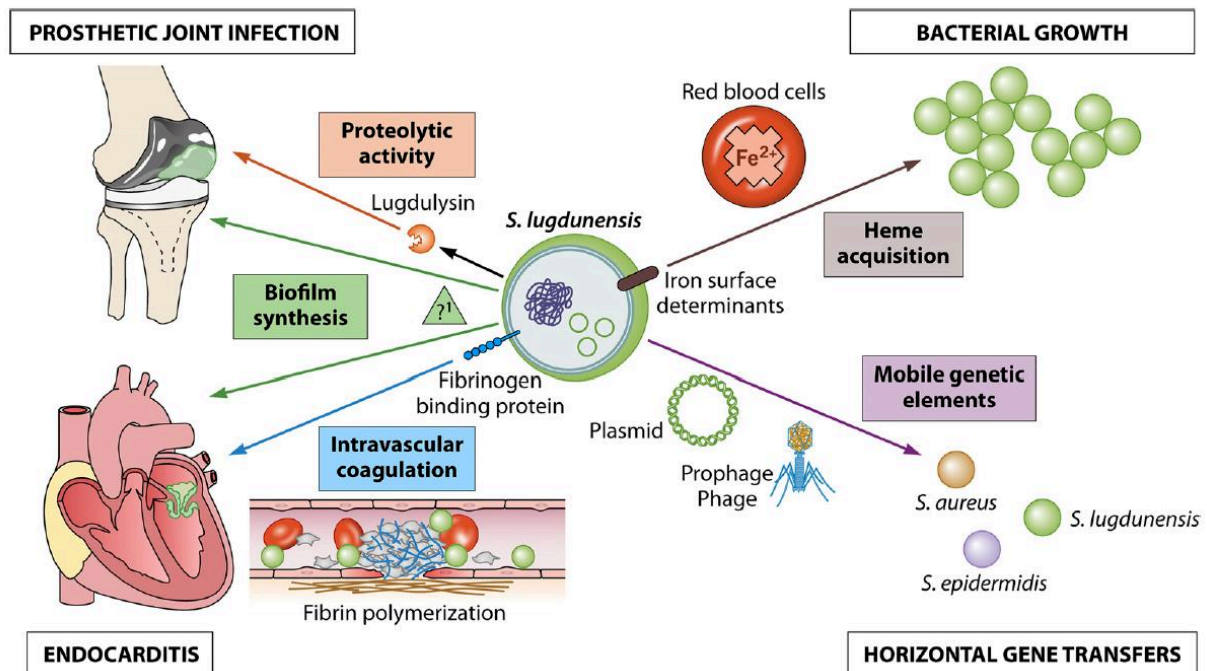


Figure 27. Rôles avérés et/ou putatifs des principaux facteurs de virulence dans la physiopathologie des infections à *S. lugdunensis* (Argemi et al., 2017e).

## **Partie 2 : Systèmes à deux composants et régulation de la virulence chez *Staphylococcus***

La capacité des bactéries du genre *Staphylococcus sp.* à s'adapter à des environnements variés se traduit par la présence de réseaux complexes qui régulent avec précision l'expression de leurs gènes, impliqués dans divers métabolismes et dans la virulence. L'un des mécanismes les plus largement répandus est le système de transduction de signal à deux composants (TCS), qui permet à la bactérie de moduler son profil d'expression génique en réponse à des *stimuli* environnementaux.

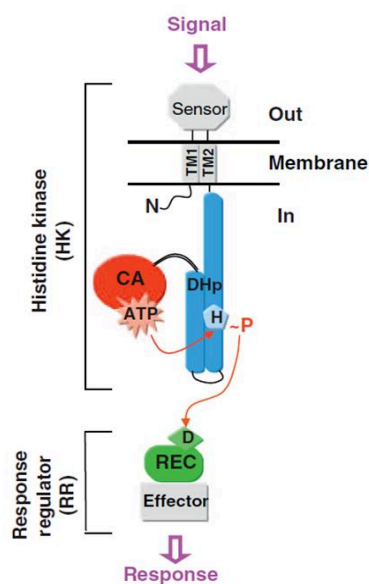
### **1. Généralités sur les systèmes à deux composants (TCS)**

#### **1.1. Structure et fonctionnement des TCS**

Les TCS sont des dispositifs de transduction de signaux répandus chez les bactéries, qui permettent de générer une réponse adaptative aux *stimuli* environnementaux par le biais de modifications de l'expression génique (Desai and Kenney, 2017; Tiwari et al., 2017).

Les TCS « typiques » sont composés d'un senseur situé au niveau membranaire possédant une activité d'histidine kinase (HK), et d'un régulateur de réponse (RR) qui agit généralement comme un facteur de transcription cytoplasmique (**Figure 28**). Le senseur détecte les *stimuli* extérieurs et les transforme en un signal cellulaire par autophosphorylation d'un résidu d'histidine conservé. Le groupement phosphorylé de l'histidine est ensuite transféré à un résidu d'acide aspartique (ou aspartate) conservé du RR (**Figure 28**). Cette phosphorylation induit un changement de conformation du RR qui module l'affinité de son domaine effecteur pour ses cibles, les promoteurs des gènes (Casino et al., 2010; West and Stock, 2001). A côté de ce mode de transduction classique, ont été décrits d'autres modes atypiques dits non-orthodoxes et hybrides (Liu et al., 2019) ou encore des modes incluant des mécanismes de phosphorylation croisée entre les HK (Casino et al., 2010).

Étant donné que jusqu'à 100 TCS peuvent coexister dans une seule cellule, une caractéristique clé des TCS est la spécificité d'interaction entre un HK et son RR apparenté (Casino et al., 2010).



**Figure 28. Représentation schématique du fonctionnement d'un système à deux composants (TCS)** (Casino et al., 2010). Le TCS comprend un senseur transmembranaire dimérique (histidine kinase, HK) et un régulateur de réponse (RR) cytoplasmique. L'HK est composé d'un domaine senseur détectant les signaux extérieurs, de deux hélices transmembranaires (TM1 et TM2), du domaine de dimérisation DHp (contenant un résidu Histidine H conservé) et du domaine de liaison à l'ATP (CA). Le RR est composé du domaine receveur REC (contenant un résidu d'acide aspartique D conservé) et de l'effecteur. L'HK est activée par un *stimulus* environnemental, catalysant l'autophosphorylation dépendante de l'ATP du résidu H. Le groupe phosphorylé (P) est ensuite transféré sur le résidu D du RR. Cette phosphorylation active le domaine effecteur du RR qui génère une réponse cellulaire spécifique.

Les signaux à l'origine de l'activation des TCS sont généralement peu connus, et très peu ont été identifiés expérimentalement. Parmi ces signaux, figurent des paramètres chimiques et physiques tels que la température, le pH, le niveau en nutriments, la pression osmotique, la pression en oxygène, la concentration ionique, l'osmolarité ou encore la densité bactérienne (Tiwari et al., 2017; West and Stock, 2001).

## 1.2. Rôles des TCS

Les TCS sont les principaux régulateurs de l'adaptation des bactéries aux changements environnementaux (Capra and Laub, 2012). Ces protéines de signalisation ont été trouvées dans les génomes de presque toutes les bactéries, à Gram positif comme à Gram négatif, la majorité des espèces codant des dizaines, voire des centaines de ces TCS. Il a été observé une corrélation positive entre la taille du génome et le nombre de ces systèmes, les génomes plus grands ayant tendance à comporter plus de gènes codant ces TCS (Ulrich et al., 2005). La capacité d'une bactérie à s'adapter à un large éventail de stress environnementaux est ainsi directement liée au nombre de TCS qu'elle possède (Desai and Kenney, 2017).

Les TCS sont impliqués dans la régulation de multiples *process*, comme la croissance bactérienne, le chimiotactisme, l'osmorégulation, le métabolisme ou encore le transport d'ions (Stock et al., 2000; West and Stock, 2001). En plus de réguler ces fonctions « de base », ils peuvent contrôler l'expression de protéines importantes pour la pathogenèse, et permettre à la bactérie de s'adapter aux différents micro-environnements rencontrés chez l'hôte au cours du cycle infectieux (Beier and Gross, 2006; Tiwari et al., 2017).

## **2. Implication des TCS dans la virulence chez *Staphylococcus***

Au sein du genre *Staphylococcus sp.*, et notamment chez les deux principaux agents pathogènes opportunistes *S. aureus* et *S. epidermidis*, la régulation des facteurs de virulence est soumise à un réseau complexe qui intègre des signaux de l'hôte et de l'environnement pour produire une réponse coordonnée. Ce réseau comprend de nombreux TCS, dont le plus étudié est celui du *quorum sensing* Agr. Couplés à ces TCS, des régulateurs cytoplasmiques interviennent également dans le contrôle de la virulence, comme ceux de la famille des régulateurs de transcription SarA (SarA, Rot, MgrA, etc.) et les facteurs sigma alternatifs SigB et SigH (Haag and Bagnoli, 2017; Novick, 2003).

La pathogénicité de *S. aureus* est médiée en grande partie à la production de nombreuses toxines, exoenzymes et adhésines. Ces déterminants sont exprimés de manière coordonnée au cours des différents stades de l'infection, sous l'égide des TCS. Le *core-genome* de *S. aureus* code 16 TCS (Kuroda et al., 2001), dont l'un est essentiel à la survie bactérienne (WalRK) (Tableau 4) (Villanueva et al., 2018).

A la différence de *S. aureus*, *S. epidermidis* possède peu d'adhésines et d'exoenzymes, et il est reconnu que son principal mécanisme de pathogenèse est sa capacité de former du biofilm (Becker et al., 2014). Une analyse comparative des génomes de souches de *S. aureus* et *S. epidermidis* a identifié 16 TCS conservés entre les deux espèces (Gill et al., 2005), résultat surprenant compte tenu du plus faible nombre de facteurs de virulence produits par *S. epidermidis*. Chez *S. lugdunensis*, aucune étude génomique n'a décrit à ce jour de façon exhaustive les TCS rencontrés chez cette espèce.

De nombreuses études se sont attachées à caractériser le rôle joué par ces différents TCS dans la pathogénicité des staphylocoques, que ce soit dans la production de facteurs de virulence ou dans le développement du biofilm. Pratiquement tous les TCS caractérisés contribuent dans une certaine mesure à la régulation de l'expression des gènes associés à la virulence.

TSC #	TCS	Alternative names	Gene name (N315) RR/HK	Family	Major function	Localization RR/HK <sup>a</sup>
1	WalRK	YycFG, VicRK, MicAB	SA0017/SA0018	OmpR	Bacterial cell envelope composition	C/M
2	TCS2 <sup>b</sup>		SA0066/SA0067	OmpR	Kdp-like, potassium transport	C/M
3	TCS3		SA0215/SA0216	AraC	Unknown function	C/M
4	LytRS		SA0251/SA0250	LytTR	Murein hydrolase activity	C/M
5	GraRS	ApsRS	SA0614/SA0615	OmpR	CAMP sensing	C/M
6	SaeRS		SA0661/SA0660	OmpR	Secreted factors mostly involved in immune evasion	C/M
7	TCS7		SA1159/SA1158	LuxR	Specific to staphylococci, unknown function	C/M
8	ArlRS		SA1247/SA1246	OmpR	Adhesion, autolysis, multidrug resistance and virulence genes, <i>arlR</i> truncated in N315	C/M
9	SrrAB	SrhSR, ResED	SA1323/SA1322	OmpR	Aerobic and anaerobic respiration	C/M
10	PhoPR		SA1516/SA1515	OmpR	Phosphate assimilation	C/M
11	AirSR	YhcSR	SA1666/SA1667	LuxR	Oxygen sensing	C/C
12	VraSR		SA1700/SA1701	LuxR	Cell wall biosynthesis	C/M
13	AgrAC		SA1844/SA1843	LytTR	Exo- and cell wall protein synthesis, quorum sensing	C/M
14	KdpED		SA1883/SA1882	OmpR	Potassium transport	C/M
15	HssRS		SA2151/SA2152	OmpR	heme sensing	C/M
16	NreCBA		SA2179/SA2180	LuxR	Nitrogen assimilation/oxygen regulatory protein NreC	C/C
17	BraRS	NsaRS, BceRS	SA2418/SA2417	OmpR	Bacitracin efflux/influx/sensing	C/M

<sup>a</sup>C = cytoplasm, M = membrane, RR = response regulator, HK = histidine kinase

<sup>b</sup>Not present in all strains

**Tableau 4. Systèmes à deux composants (TCS) décrits chez *S. aureus* (Haag and Bagnoli, 2017).**

Nous présenterons ici une revue de la littérature des principaux TCS impliqués dans le contrôle de la virulence, en fonction de leur rôle le plus caractéristique (Haag and Bagnoli, 2017):

- régulateurs globaux de l'expression des gènes de virulence (AgrCA et SaeRS),
- implication dans la respiration bactérienne (SrrAB),
- implication dans le métabolisme de la paroi cellulaire, dans l'autolyse et dans la mort cellulaire (ArlSR, WalRK et LytSR).

## **2.1. Régulateurs globaux de l'expression de la virulence**

Même si de nombreux TCS ont été décrits comme impliqués dans la régulation de la production de facteurs de virulence chez les staphylocoques, deux sont considérés comme des régulateurs globaux de la virulence. Il s'agit du système du *quorum sensing* AgrCA et de SaeRS.

### **2.1.1. Accessory Gene Regulator (Agr)**

Le TCS le plus étudié est celui codé par le *locus agr*, qui est activé en réponse à la densité cellulaire bactérienne et joue un rôle de régulateur global de la virulence. Le signal senseur de ce système est un peptide autoinducteur (AIP) qui est produit par les bactéries et s'accumule dans l'environnement extérieur. Une fois que celui-ci a atteint une concentration critique, en général quand la population cellulaire a atteint un « *quorum* », le système Agr est activé. Ce type de régulation, par lequel la population bactérienne répond à la densité cellulaire en modulant l'expression de gènes, définit le *quorum sensing* (Le and Otto, 2015). Le *locus agr* a été décrit pour la première fois en 1988 chez *S. aureus* (Peng et al., 1988), puis s'est avéré être conservé chez les différentes espèces de staphylocoque. Il a notamment été identifié en 1993 chez *S. lugdunensis* (Vandenesch et al., 1993b) et en 1998 chez *S. epidermidis* (Van Wamel et al., 1998). Cependant, un nombre limité d'études ont été réalisées pour valider les fonctions de ce *locus* chez les SCN (Thoendel et al., 2011).

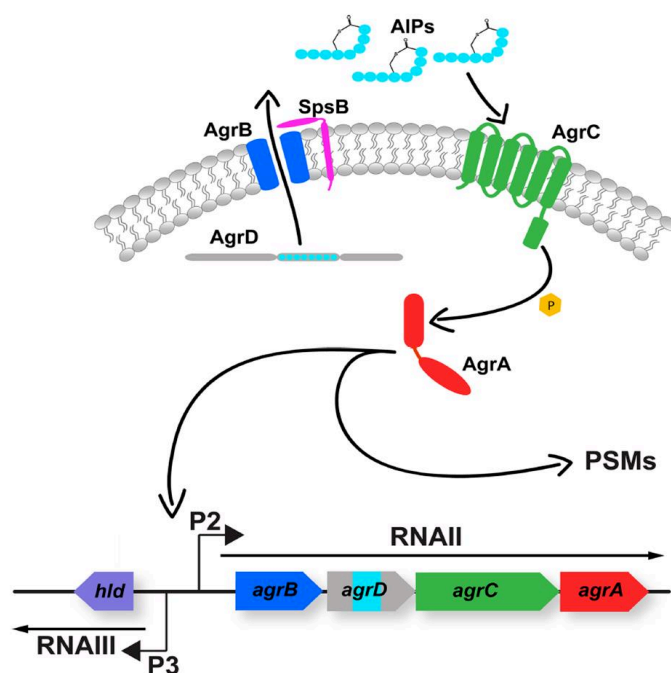
#### 2.1.1.1. Agr et *S. aureus*

##### **Organisation génétique du *locus agr***

Le *locus agr* (3,5 kb) appartient au *core-genome* de *S. aureus*. Il est composé de deux unités de transcription adjacentes mais divergentes, RNAII et RNAIII, contrôlées respectivement par deux promoteurs distincts, P2 et P3 (Figure 29) (Haag and Bagnoli, 2017; Jenul and Horswill, 2018).

Le transcrite RNAII est un opéron de quatre gènes (*agrBDCA*), codant les facteurs qui constituent la machinerie centrale du système du *quorum sensing*. AgrC et AgrA forment un TCS où AgrC est la protéine senseur HK transmembranaire et AgrA le RR cytoplasmique (Figure 29).

Le transcrite RNAIII est l'effecteur majeur du *locus agr* et contrôle positivement ou négativement l'expression de nombreux gènes au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Le RNAIII est également partiellement traduit et code la  $\delta$ -hémolysine.



**Figure 29. Organisation moléculaire, biosynthèse du signal senseur et cascade de transduction du système de *quorum sensing agr* de *S. aureus* (Jenul and Horswill, 2018).** AgrD est maturé en peptide autoinducteur (AIP), transporté dans le milieu extracellulaire par AgrB à l'aide de la *signal peptidase* SpsB. Lorsque la concentration d'AIP extracellulaire atteint un niveau critique, le signal est détecté par l'histidine kinase AgrC, qui subit une autophosphorylation. Le groupement phosphate est ensuite transféré à AgrA, qui ainsi activé se lie aux promoteurs P2 et P3, entraînant l'expression des transcrits RNAII et RNAIII, respectivement. Le transcrit RNAII contient l'opéron *agrBDCA*, codant la machinerie centrale pour la biosynthèse et la détection de l'AIP. Le RNAIII est la principale molécule effectrice du système *agr* et dirige l'expression des gènes cibles en aval. AgrA phosphorylé contrôle également l'expression des gènes des *phenol-soluble modulins* (PSMs) en se liant à leurs promoteurs.

Durant la phase exponentielle de croissance, AgrD, le précurseur peptidique de l'AIP, est synthétisé. Il est maturé en un peptide de sept à neuf acides aminés, dont les cinq derniers résidus sont cyclisés en une structure thiolactone par une chaîne latérale de sérine, sous l'action protéolytique de l'endopeptidase transmembranaire AgrB. L'AIP est ensuite exporté à travers la paroi dans l'environnement extracellulaire sous l'action de la peptidase SpsB. À une concentration seuil (directement liée à la densité cellulaire), l'AIP se lie au récepteur extracellulaire d'AgrC. Cette liaison induit l'autophosphorylation du résidu histidine d'AgrC. Ce signal est relayé par le transfert du groupement phosphorylé à AgrA qui, ainsi activé, se lie aux promoteurs P2 et P3 (**Figure 29**) (Haag and Bagnoli, 2017; Jenul and Horswill, 2018).

L'induction de P2 se traduit par la transcription de l'opéron *agrBDCA* (RNAII), créant une boucle d'auto-activation, alors que l'induction de P3 est suivie de la transcription de RNAIII. De plus, AgrA se lie aux promoteurs contrôlant positivement l'expression des peptides PSM $\alpha$  et PSM $\beta$ , de façon indépendante de RNAIII (**Figure 29**).

L'activité d'*agr* est non seulement sous le contrôle de l'autorégulation par AgrA, mais également sous celui de facteurs environnementaux et métaboliques (pH, glucose, carence nutritive...), de *stimuli* de l'hôte (activités inhibitrices de l'hémoglobine et de l'apolipoprotéine), de protéines régulatrices (CodY, MgrA, SarA,  $\sigma^B$ ...) et d'autres TCS (SrrAB, ArlSR), qui impacteront positivement ou négativement l'expression d'*agr* (**Tableau 5**) (Jenul and Horswill, 2018; Tan et al., 2018).

Regulator	Impact on <i>agr</i>	Function
ArlRS	Negative	Represses <i>agr</i> P2 and P3
CcpA	Positive	Activates <i>agr</i> P3
CodY	Negative	Repress <i>agr</i> P1 promoter in <i>agrC</i>
MgrA	Positive	Activation of <i>agr</i> P3
Rsr	Negative	Represses <i>agr</i> P3
SarA	Positive	Activates <i>agr</i> P2 expression
SarR	Negative	Represses <i>agr</i> P2 expression
SarT	Negative	Represses <i>agr</i> P3
SarU	Positive	Activation of <i>agr</i> P2 and P3
SarX	Negative	Represses <i>agr</i> P2 and P3
SarZ	Positive	Activates <i>agr</i> promoter
SrrAB	Negative	Represses <i>agr</i> P2 and P3
$\sigma^B$	Negative	Represses <i>agr</i> P3

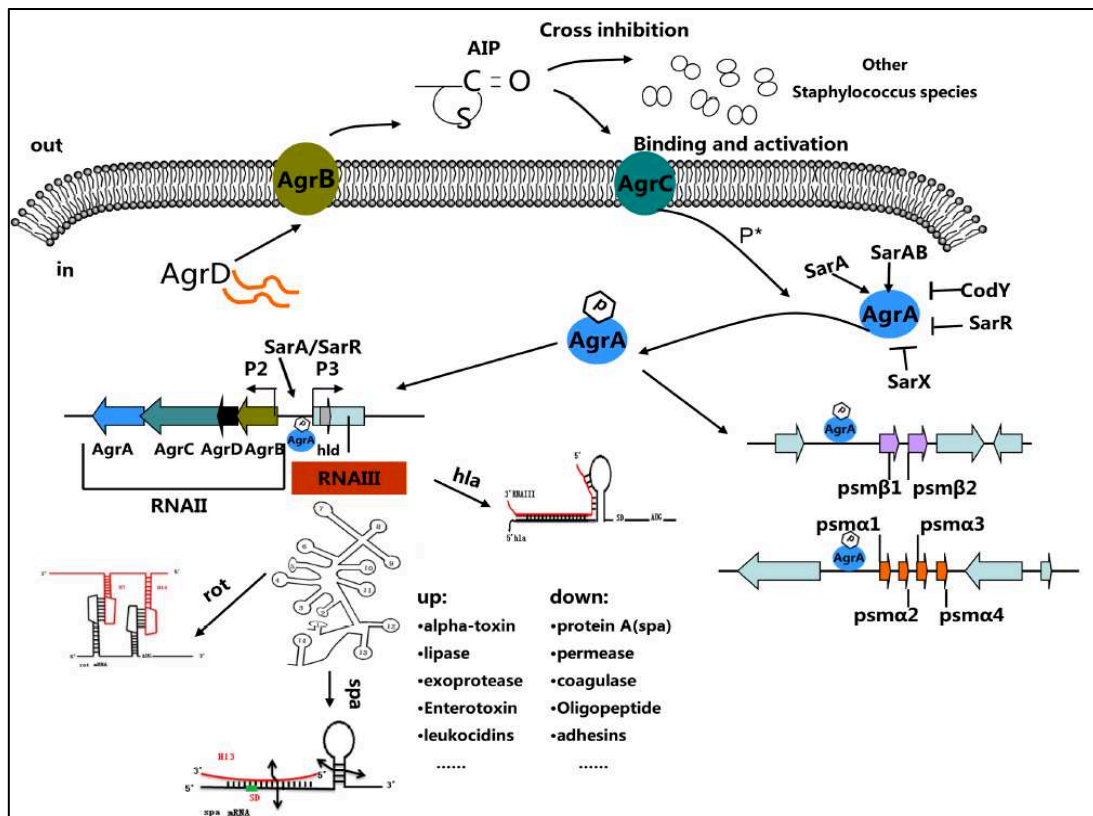
**Tableau 5. Régulateurs ayant un impact, positif ou négatif, sur la fonction du système *agr*** (Jenul and Horswill, 2018).

### ***Propriétés régulatrices d'Agr***

*S. aureus* utilise le système *agr* pour s'adapter à l'évolution des conditions environnementales pendant la croissance et pour réguler la production de ses facteurs de virulence (Singh and Ray, 2014). Dunman et al. ont identifié 104 gènes régulés positivement et 34 gènes régulés négativement par *agr* d'une manière dépendante de la densité cellulaire (Dunman et al., 2001).

Le système *agr* est généralement décrit comme ayant une double action. En effet, dans des conditions de densité cellulaire élevée, il réprime la transcription de plusieurs facteurs de colonisation comme des protéines de surface (protéine A, coagulase, protéines de liaison à la fibronectine) et active celle de plusieurs exoprotéines au cours de la phase post-exponentielle (**Figure 30**) (Tan et al., 2018). Ainsi, la production de toxines telles que les hémolysines ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ), les leucocidines, les superantigènes comme la TSST-1, les entérotoxines, les exfoliatines et la leucocidine de Pantan-Valentine (PVL), ainsi que diverses enzymes telles que des protéases, des lipases ou encore des nucléases, est régulée positivement par le système Agr. Il contrôle en outre des gènes impliqués dans diverses fonctions cellulaires comme le transport de nutriments ou le métabolisme des acides aminés (Bronner et al., 2004; Haag and Bagnoli, 2017; Thoendel et al., 2011).

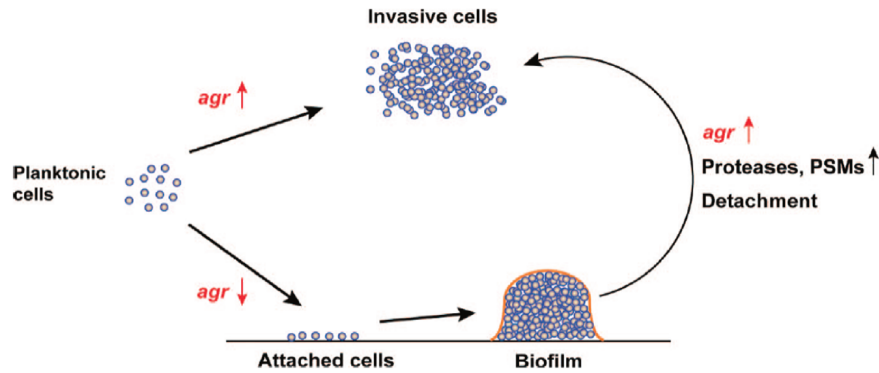




**Figure 30. Rôle du système de *quorum sensing agr* dans la régulation de la production de facteurs de virulence chez *S. aureus* (Tan et al., 2018).** Le transcrite RNAIII est un ARN régulateur de grande taille ayant une structure secondaire complexe comportant 14 motifs tiges/boucles, régulant l'expression de nombreux facteurs de virulence. Il interagit, directement ou indirectement, en modulant l'initiation de la transcription ou à un niveau posttranscriptionnel en interagissant avec les transcrits de ses gènes cibles. D'autres régulateurs (tels que les protéines SarA ou CodY et SrrAB) peuvent stimuler ou inhiber l'activité d'*agr*.

De nombreuses études ont confirmé le rôle du système *agr* dans la régulation de la virulence dans différents modèles animaux d'infection. Des mutants *agr* de *S. aureus* présentent en effet une virulence atténuée dans des modèles d'infections cutanées et de pneumonies murins, ou encore d'endocardites infectieuses et d'ostéomyelites chez le lapin (Jenul and Horswill, 2018; Thoendel et al., 2011).

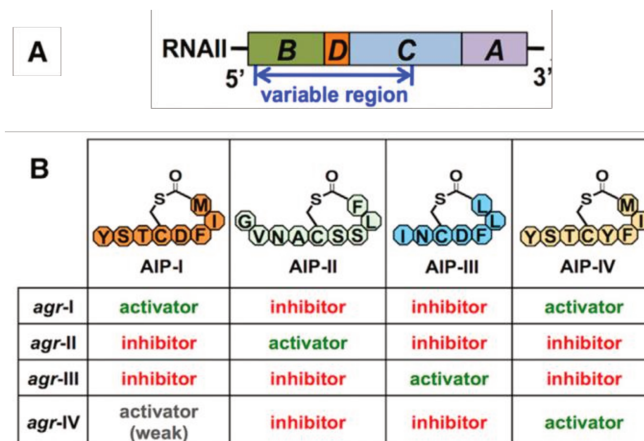
Agr contrôle ainsi la transition du phénotype de colonisation à celui d'infection. À faible densité cellulaire, le système Agr n'est pas activé et l'expression des facteurs d'adhésion et de colonisation est favorisée. Ensuite, la multiplication bactérienne à des densités cellulaires plus élevées active le système Agr, qui réprime les facteurs de colonisation et induit la sécrétion d'exoenzymes et de toxines, entraînant une destruction et un envahissement des tissus de l'hôte (Figure 31) (Le and Otto, 2015; Thoendel et al., 2011). En outre, Agr joue un rôle dans la structuration et le détachement du biofilm en augmentant l'expression des protéases et des PSMs.



**Figure 31. Implication du système *agr* dans la pathogénicité de *S. aureus*** (Thoendel et al., 2011). Dans des conditions d'activation du système *agr*, *S. aureus* sécrète des facteurs invasifs comme des exoenzymes et des toxines. Lorsque le système *agr* est peu exprimé, *S. aureus* adhère préférentiellement aux tissus de l'hôte, et développe un biofilm si les conditions de croissance le permettent. L'activation du système *agr* dans le biofilm entraîne un détachement des cellules *via* la production de protéases et de PSMs.

### Groupes d'AIP et *agr* typing

L'opéron *agr* est conservé chez les souches de *S. aureus*, mais il comporte une portion hypervariable dans la région centrale du locus (*agrBDC*) (Figure 32A) (Wang and Muir, 2016), qui a permis de définir quatre allèles nommés *agr* types I à IV (Novick, 2003). Ces variants sont caractérisés par des polymorphismes dans le domaine senseur d'AgrC et dans la séquence de l'AIP (Dufour et al., 2002; Jarraud et al., 2002). Les quatre groupes d'AgrC et d'AIP correspondant sont nommés I à IV. Au sein d'un groupe donné, chaque souche produit un peptide AIP qui peut activer la réponse *agr* des souches appartenant à ce groupe, alors que les AIP appartenant à des groupes différents sont généralement mutuellement inhibiteurs (Figure 32B) (Jarraud et al., 2000).



**Figure 32. Locus *agrBDCA* et groupes des peptides autoinducteurs (AIP) associés chez *S. aureus*** (adapté de Wang and Muir, 2016). (A) La région variable du locus *agrBDCA* comporte l'extrémité 3' du gène *agrB* (codant l'endopeptidase membranaire AgrB), le gène *agrD* (codant l'AIP) et l'extrémité 5' du gène *agrC* (codant la protéine transmembranaire senseur AgrC). (B) Structure et activités croisées stimulatrices ou inhibitrices de chacun des quatre groupes d'AIP vis-à-vis des trois autres.

De nombreuses études ont recherché d'éventuels liens entre ces groupes *agr* et les lignées phylogénétiques définies par la technique de typage *multilocus sequence typing* (MLST) (cf paragraphe 2.1 de la partie 2) (Holtfreter et al., 2007), le profil de résistance aux antibiotiques des souches (Nichol et al., 2011), la production de biofilm ou de toxines ou encore le type d'infection (Choudhary et al., 2018; Dufour et al., 2002; Jarraud et al., 2002). Ainsi, le groupe *agr-I* a-t-il été généralement retrouvé chez les souches appartenant aux complexes clonaux (CC) 8, CC25, CC22, CC45 et CC395 et chez les souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline d'origine communautaire, alors que le groupe *agr-II* est plutôt retrouvé dans les lignées de CC5, CC12 et CC15, chez les souches résistantes à la méticilline acquises en milieu hospitalier et chez les souches ayant une forte capacité à produire du biofilm.

#### 2.1.1.2. Agr et *S. epidermidis*

##### **Organisation génétique du locus *agr***

Le système *agr* de *S. epidermidis* présente une homologie nucléotidique de 68% avec celui de *S. aureus*. Il se caractérise par un opéron *agrBDCA* codant les composants centraux, un signal AIP et un ARN régulateur de type RNAIII codant une  $\delta$ -hémolysine (Figure 33) (Thoendel et al., 2011; Van Wamel et al., 1998).

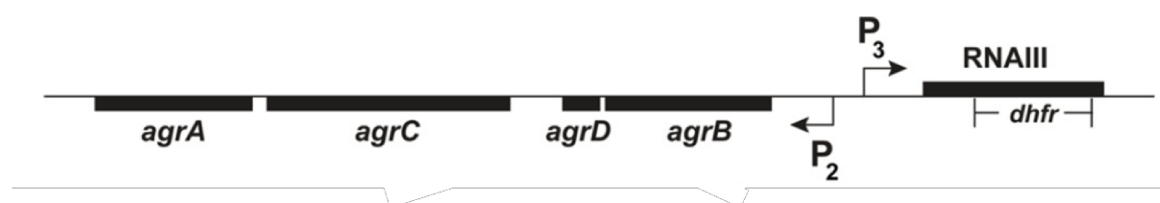


Figure 33. Organisation génétique du locus *agr* de *S. epidermidis* (adapté de Olson et al., 2014).

##### **Propriétés régulatrices d'Agr**

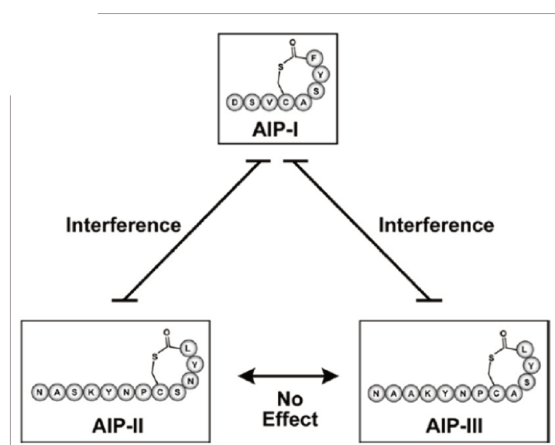
L'auto-induction du système *agr* de *S. epidermidis* apparaît au cours de la phase exponentielle tardive de manière dépendante de la densité cellulaire. Elle conduit à une régulation négative de protéines associées à la surface des cellules et à une régulation positive de l'expression de toxines et d'exoprotéines sécrétées, telles que des lipases et des protéases (Batzilla et al., 2006; Vuong et al., 2000; Yao et al., 2006).

Comme chez *S. aureus*, *agr* régule négativement la formation de biofilm chez *S. epidermidis* (O'Gara, 2007; Vuong et al., 2003). En effet, des souches délétées du locus *agr* présentent une

capacité accrue à former du biofilm et à adhérer aux surfaces de polymères (Vuong et al., 2003). Ce phénomène est notamment médié par AtlE dont l'expression est régulée négativement par *agr* chez *S. epidermidis*, et qui joue un rôle dans l'attachement initial aux surfaces (Thoendel et al., 2011). Ce mécanisme est différent de celui observé chez *S. aureus* chez lequel l'expression de *atl* n'est pas sous le contrôle du système *agr*. D'autre part, l'expression des PSMs est également strictement régulée positivement par *agr* chez *S. epidermidis*. Ces PSMs contribuent à la structuration et au décollement du biofilm *in vitro*, ainsi qu'à la dissémination bactérienne à partir de cathéters colonisés dans un modèle d'infection de souris (Wang et al., 2011).

### Groupes d'AIP et *agr* typing

De la même façon que chez *S. aureus*, le locus *agr* de *S. epidermidis* comprend une région hypervariable. Trois *agr* types ont ainsi été décrits chez *S. epidermidis*, désignés I, II et III, correspondant aux groupes AIP-I, II et III respectivement (Figure 34) (Olson et al., 2014). Les AIP de *S. epidermidis* activent généralement les récepteurs AgrC appartenant au même groupe, et inhibent de manière compétitive les récepteurs non apparentés (Otto et al., 2001). Il a de plus été observé une inhibition croisée des récepteurs de *S. aureus* AgrC I à III par le groupe AIP-I de *S. epidermidis* (Tal-Gan et al., 2016).



**Figure 34. Structure et interaction des peptides autoinducteurs (AIP) I à III codés par le locus *agr* de *S. epidermidis*** (adapté de Olson et al., 2014).

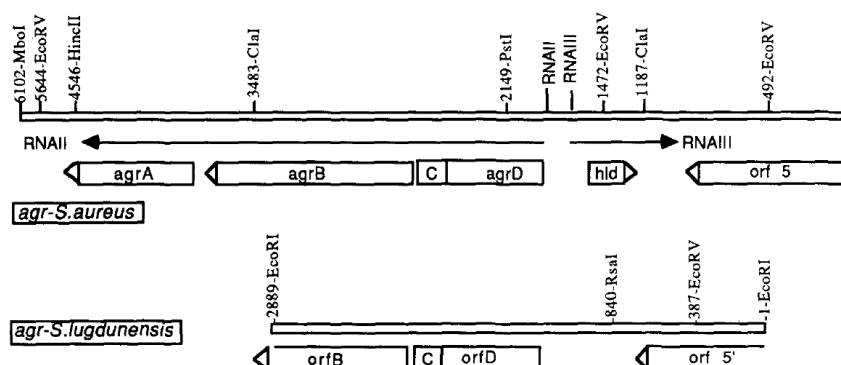
Des études analysant la répartition des *agr* types chez *S. epidermidis* ont révélé que les souches appartenant au groupe I étaient plus fréquemment isolées dans un contexte d'infection qu'en situation de portage (Carmody and Otto, 2004; Li et al., 2004). De la même façon, les souches des groupes I et III étaient préférentiellement associées à un phénotype de multi-résistance aux antibiotiques (Mertens and Ghebremedhin, 2013).

2.1.1.3. Agr et *S. lugdunensis*

**Organisation génétique du locus agr**

Le locus agr de *S. lugdunensis*, nommé agr-sl, a été décrit pour la première fois en 1993 (Vandenesch et al., 1993b). Il contient une région codant le transcrite RNAIII, une région intergénique, et les gènes agrD, agrC et une partie d'agrB (Figure 35). L'identité nucléotidique globale avec le locus agr de *S. aureus* est de 63%, certaines régions étant hautement conservées comme celles des promoteurs P2, P3 et la région intergénique (région putative de l'initiation de la transcription). Les protéines prédites montrent une homologie assez élevée avec celles de *S. aureus*, à savoir 51% pour AgrB, 44% pour AgrC et 44% pour AgrD. Le RNAIII présente un haut degré de conservation dans les régions 5' et 3' terminales, mais une homologie moindre dans sa région centrale. A la différence de *S. aureus* et *S. epidermidis*, le transcrite RNAIII de *S. lugdunensis* ne code pas de δ-hémolysine (Vandenesch et al., 1993b).

L'activité hémolytique de *S. lugdunensis* est en effet liée aux peptides SLUSH codés par un cluster de gènes situé en dehors du locus agr (cf paragraphe 3.4.1 de la partie 1), mais dont il n'a pas encore été démontré si l'expression est contrôlée par agr (Donvito et al., 1997).



**Figure 35. Organisation génétique comparative du locus agr chez *S. aureus* et *S. lugdunensis*** (Vandenesch et al., 1993b). En haut est représentée une carte de restriction d'un fragment de 6,1 kb contenant l'opéron agr de *S. aureus*, contenant les gènes agrA, agrB, agrC, agrD, hld et orf5. Les transcrits RNAII et RNAIII sont indiqués par des flèches. En bas est représentée une carte de restriction d'un fragment de 2,9 kb isolé de *S. lugdunensis* RN8160, contenant les gènes orfB, orfC, orfD et orf5' respectivement, homologues aux gènes agrB, agrC, agrD, et orf5 de *S. aureus*.

La fonctionnalité du locus agr de *S. lugdunensis* a ensuite été démontrée par clonage des gènes agrBD chez un mutant agr de *S. aureus* qui permet la production d'un signal AIP fonctionnel (Ji et al., 1997). De la même façon, le transcrite RNAIII de *S. lugdunensis* complétement chez un mutant agr de *S. aureus* restaure partiellement le phénotype Agr (Benito et al., 1998).

**Groupes d'AIP et agr typing**

Le séquençage de la région hypervariable du *locus agr* de *S. lugdunensis* a permis l'identification de deux *agr types* (*agr-1<sub>Sl</sub>* et *agr-2<sub>Sl</sub>*) (Dufour et al., 2002). Ces deux *agr types* sont associés à la production des peptides AIP-I et AIP-II, composés chacun de sept acides aminés, les cinq derniers résidus étant contenus dans le cycle thiolactone (**Tableau 6**) (Tal-Gan et al., 2016). Ces peptides sont capables d'agir comme des inhibiteurs croisés des récepteurs AgrC de certains groupes de *S. aureus* (Ji et al., 1997; Tal-Gan et al., 2016), et sont ainsi évoqués comme cibles thérapeutiques pour le traitement d'infections à staphylocoques (Gordon et al., 2016).

Peptide name	Sequence
<i>S. aureus</i> AIP-I	Y-S-T-(C-D-F-I-M)
<i>S. aureus</i> AIP-II	G-V-N-A-(C-S-S-L-F)
<i>S. aureus</i> AIP-III	I-N-(C-D-F-L-L)
<i>S. aureus</i> AIP-IV	Y-S-T-(C-Y-F-I-M)
<i>S. epidermidis</i> AIP-I	D-S-V-(C-A-S-Y-F)
<i>S. epidermidis</i> AIP-II <sup>b</sup>	N-A-S-K-Y-N-P-(C-S-N-Y-L)
<i>S. epidermidis</i> AIP-III <sup>b</sup>	N-A-A-K-Y-N-P-(C-A-S-Y-L)
<i>S. lugdunensis</i> AIP-I	D-I-(C-N-A-Y-F)
<i>S. lugdunensis</i> AIP-II <sup>c</sup>	D-M-(C-N-G-Y-F)

**Tableau 6. Structure des peptides autoinducteurs (AIP) des espèces *S. aureus* (quatre groupes d'AIP), *S. epidermidis* (trois groupes d'AIP) et *S. lugdunensis* (deux groupes d'AIP) (Tal-Gan et al., 2016).** Les acides aminés entre parenthèses sont les résidus cyclisés en une structure thiolactone. Les zones grises correspondent aux peptides dont l'activité sur les récepteurs AgrC de *S. aureus* a été étudiée dans l'article.

Quelques études d'*agr typing* ont été menées pour des souches cliniques de *S. lugdunensis*. La première a porté sur 11 isolats issus de bactériémies entre 2007 et 2008 à l'hôpital universitaire de Taiwan, typés par séquençage de la région hypervariable d'*agr* et par électrophorèse en champ pulsé (*pulsed-field gel electrophoresis* [PFGE]) (Tseng et al., 2015). Les deux *agr types* initialement décrits ont été identifiés, quatre isolats appartenant au groupe *agr-1<sub>Sl</sub>* et sept isolats au groupe *agr-2<sub>Sl</sub>*. Les isolats de mêmes *agr types* étaient regroupés dans les mêmes *clusters* par PFGE. Par ailleurs, les isolats appartenant au groupe *agr-2<sub>Sl</sub>* présentaient des activités hémolytiques et protéasiques plus élevées que les isolats appartenant au groupe *agr-1<sub>Sl</sub>*, dans la limite du faible nombre d'isolats étudiés (Tseng et al., 2015).

Une seconde étude a typé par SCC*mec*, *agr* et PFGE 118 isolats cliniques de *S. lugdunensis* collectés entre 2003 et 2013 au « *Chang Gung Memorial Hospital* » à Taiwan (Yeh et al., 2015).

L'*agr typing* était cette fois effectué grâce à une PCR multiplexe amplifiant au sein du gène *agrC* une région de 586 pb pour *agr-1<sub>sl</sub>* et 771 pb pour *agr-2<sub>sl</sub>*. Parmi ces isolats, 67 (56,8%) étaient classés « pathogènes » (isolés de sites normalement stériles ou de deux paires d'hémocultures, ou d'une seule hémoculture mais avec des critères cliniques d'infection) et 51 (43,2%) classés « commensaux » (collectés d'hémocultures isolées sans signes cliniques associés). Au total, les deux *agr types* étaient distribués de façon équitable (45% pour *agr-1<sub>sl</sub>* et 55% pour *agr-2<sub>sl</sub>*). Aucune différence statistique n'était observée entre la distribution des *agr types* et les groupes « pathogènes » et « commensaux », ni selon la présence ou non d'une activité hémolytique synergique. Cependant, le nombre élevé d'isolats issus d'hémocultures limitait l'étude de corrélation entre *agr types* et contexte clinique. Par contre, une forte corrélation entre *agr types* et *SCCmec types* était observée pour les isolats résistants à l'oxacilline, probablement du fait que ces isolats appartenaient au même clone. En effet, 93% (13 sur 14) des isolats de *SCCmec type II* appartenaient au groupe *agr-1<sub>sl</sub>* et les 22 isolats de *SCCmec type V* appartenaient au groupe *agr-2<sub>sl</sub>* (Yeh et al., 2015). La même équipe a ensuite analysé 62 isolats supplémentaires responsables de divers types d'infections et n'a pas mis en évidence de corrélation entre la distribution des *agr types* et le type d'infection, et selon le contexte d'acquisition (infections communautaires ou infections associées aux soins [IAS]) (Yeh et al., 2016).

Ainsi, ces quelques données moléculaires ne permettent pas d'établir de lien entre diversité génétique du *locus agr* de *S. lugdunensis* et contexte clinique d'isolement des souches. De plus, aucune caractérisation fonctionnelle du *locus agr* n'a encore été menée chez cette espèce, probablement du fait de la difficulté d'obtenir des mutants. Compte tenu de l'impact important du système Agr dans la pathogénèse d'autres espèces de staphylocoques, l'implication de ce *locus* dans la régulation de la virulence chez *S. lugdunensis* mériterait d'être étudiée.

### **2.1.2. *S. aureus* exoprotein expression (SaeRS)**

Le locus *sae* a été initialement décrit chez *S. aureus* (Giraud et al., 1994) puis chez *S. epidermidis* (Handke et al., 2008). Il est impliqué dans l'expression de nombreux gènes de virulence chez *S. aureus*, et dans la pathogénèse des deux espèces (Liu et al., 2016).

#### 2.1.2.1. SaeRS et *S. aureus*

Le locus *sae* a été décrit pour la première fois en 1994, à la faveur de la caractérisation d'un mutant d'insertion Tn551 de *S. aureus* présentant une diminution de la sécrétion d'exoprotéines ( $\alpha$ - et  $\beta$ -hémolysines, DNase et coagulase) (Giraud et al., 1994).

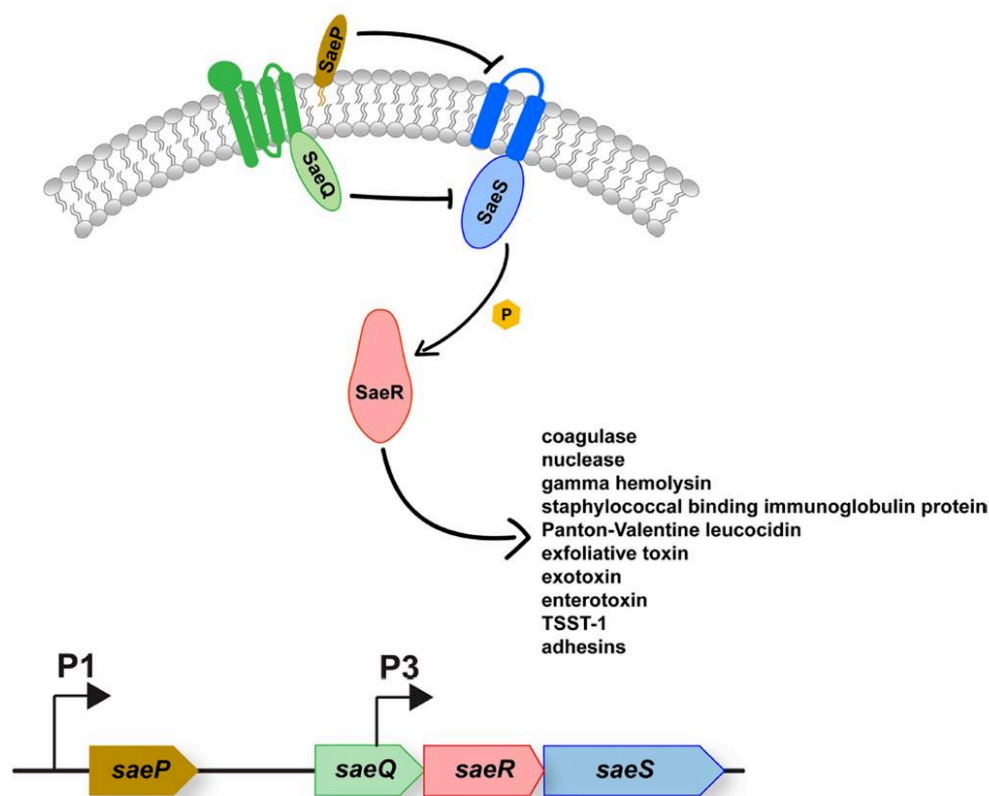
#### ***Organisation génétique du locus sae***

Le locus *sae* est constitué de quatre gènes (*saeP*, *saeQ*, *saeR* et *saeS*), codant les protéines du TCS SaeRS (SaeS étant le senseur HK et SaeR le RR) et deux protéines auxiliaires SaeP (lipoprotéine) et SaeQ (protéine membranaire) (**Figure 36**) (Liu et al., 2016).

L'opéron est sous le contrôle de deux promoteurs, P1 et P3 (Liu et al., 2016). Le promoteur **P3**, situé au sein du gène *saeQ*, est constitutif mais faible ; il permet la cotranscription de *saeR* et *saeS*. Ce promoteur fournit les niveaux basaux du TCS SaeRS, permettant la détection et la réponse aux *stimuli* environnementaux.

Le promoteur **P1**, situé en amont du gène *saeP*, active la transcription des quatre gènes du locus. Comparé à P3, P1 est beaucoup plus fort et est auto-induit. Il conduit à une augmentation des taux des protéines SaeRS mais sans augmenter l'activité du TCS. En effet, la production de SaePQ réduit l'activité globale de Sae en induisant l'activité phosphatase de SaeS par formation d'un complexe ternaire SaePQS (**Figure 36**). La transcription de l'opéron *sae* à partir du promoteur P1 est maximale en phase de croissance post-exponentielle (Novick and Jiang, 2003).





**Figure 36. Organisation moléculaire et transduction du signal du système à deux composants SaeRS de *S. aureus* (Jenul and Horswill, 2018).** (En bas) Le locus *sae* comprend quatre gènes, *saeP*, *saeQ*, *saeR* et *saeS*. La transcription de *saeS* et de *saeR* est contrôlée par le promoteur P3 situé dans la région codante de *saeQ* ; et les quatre gènes du locus sont transcrits à partir du promoteur P1 situé en amont de *saeP*. (En haut) Lors de l'exposition aux signaux inducteurs, SaeS phosphoryle son régulateur de réponse apparenté SaeR. SaeR phosphorylé peut alors se lier à la région promotrice des gènes cibles (y compris *saeP*) et induire l'expression de nombreux facteurs de virulence. Le *phosphorelay* de SaeS à SaeR est inhibé par l'action combinée de SaeP et SaeQ, qui induisent l'activité phosphatase de SaeS.

### Propriétés régulatrices de Sae

Une analyse transcriptomique a révélé un sous-ensemble de 80 gènes et 133 gènes qui étaient respectivement régulés positivement et négativement chez un mutant délété de *saeRS* (Voyich et al., 2009). Il a ainsi été mis en évidence que Sae joue un rôle majeur dans la régulation transcriptionnelle de plus de 20 facteurs de virulence, et active de façon directe l'expression d'hémolysines (*hla* et *hlb*,  $\alpha$  et  $\beta$ -hémolysines), de leucocidines (*luk*), de superantigènes (*ssl*, entérotoxines), de protéines de surface (*coa*, coagulase ; *fnbA* et *fnbB*, protéines de liaison à la fibronectine A et B), de nucléases (*nuc*) ou encore de protéases (*splA*, sérine protéase) (Liu et al., 2016). Certains gènes au contraire sont connus pour être régulés négativement par le système, comme le locus *cap* (codant pour la capsule polysaccharidique), même si cette médiation semble être indirecte (Steinhuber et al., 2003).

De façon intéressante, la protéine senseur SaeS présente des polymorphismes et trois variants ont été décrits : SaeS<sup>P</sup> qui possède une activité kinase augmentée, SaeS<sup>SK</sup> et son dérivé SaeS<sup>SKT</sup> (Liu et al., 2016).

D'autre part, deux classes de gènes-cibles de SaeR ont été identifiées, leurs promoteurs différant par leur nombre de site de liaison à SaeR (Mainiero et al., 2010):

- Les gènes-cibles de classe I (par exemple *coa*, *fnbA* ou *saePI*), dits de faible affinité car leur transcription nécessite des taux relativement élevés de SaeR phosphorylé. Leur transcription dépend également du polymorphisme de SaeS (gènes plus fortement exprimés si la souche possède SaeS<sup>P</sup>).
- Les gènes-cibles de classe II (*hla* et *hlb*), dits de haute affinité pour SaeR, le niveau basal de phosphorylation de SaeR étant suffisant pour leur transcription, et qui sont insensibles au polymorphisme de SaeS.

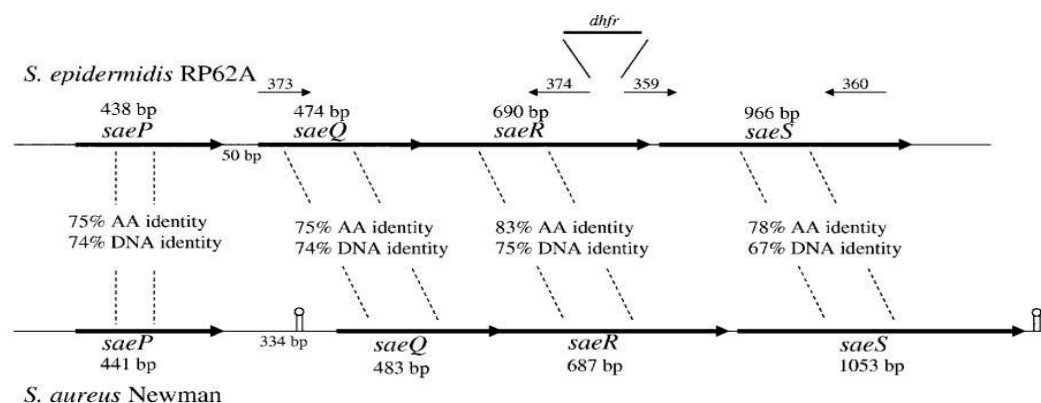
D'un point de vue expérimental, le locus *sae* a été démontré comme impliqué dans la formation de biofilm, de manière positive ou négative selon les études, probablement en fonction de l'environnement dans lequel se trouve la bactérie (Cue et al., 2015). Il est également impliqué dans l'adhésion et l'invasion de cellules épithéliales et endothéliales (Steinhuber et al., 2003) et comme un élément essentiel de la pathogénèse dans divers modèles infectieux animaux (Liu et al., 2016; Voyich et al., 2009).

Il a été montré que le locus *sae* n'affecte pas la transcription d'*agr*, suggérant ainsi qu'il module la production des facteurs de virulence en aval de celui-ci (Novick and Jiang, 2003). Sa transcription semble affectée par d'autres systèmes de régulation (comme WalRK qui l'affecterait positivement), sans qu'il existe de preuve directe de cette régulation. Les mécanismes moléculaires par lesquels le TCS SaeRS reçoit et traite les signaux ne sont pas encore élucidés, mais diverses molécules pouvant l'activer, telles des molécules produites par les polynucléaires neutrophiles (calprotectine et peptides antimicrobiens) et le peroxyde d'hydrogène, ou l'inhiber (comme les acides lipotéichoïques, un pH bas ou divers ions métalliques), ont été identifiées (Bronner et al., 2004; Liu et al., 2016).

Le système Sae apparaît donc comme le deuxième système de régulation majeur à deux composants qui intervient dans le contrôle de l'expression d'adhésines, de toxines et de protéines immunomodulatrices chez *S. aureus*. A ce titre, *agr* et *sae* sont évoqués comme des cibles intéressantes dans le développement de nouvelles thérapeutiques ciblant la virulence de *S. aureus* (Kong et al., 2016).

2.1.2.2. SaeRS et *S. epidermidis***Organisation génétique du locus *sae***

Le locus *saePQRS* de *S. epidermidis* est organisé de manière similaire à celle décrite pour *S. aureus*, et présente avec celui-ci une homologie nucléotidique et une homologie prédite en acides aminés élevées (Figure 37) (Handke et al., 2008).



**Figure 37. Comparaison des séquences nucléotidiques et protéiques du système à deux composants Sae de *S. aureus* et *S. epidermidis*** (Handke et al., 2008). « DNA identity » : pourcentage d'identité entre les séquences nucléotidiques ; « AA identity » : pourcentage d'identité entre les séquences en acides aminés.

**Propriétés régulatrices de Sae**

Des analyses transcriptomiques ont montré que *sae* est transcrit au cours de la phase exponentielle de croissance chez *S. epidermidis*. Il permet de contrôler des processus métaboliques de base (métabolisme du pyruvate et des acides aminés), et contrairement à *S. aureus*, il intervient peu dans la régulation de la transcription de gènes de virulence. Cependant, il pourrait indirectement réguler l'expression des gènes de virulence. En effet, SaeR est impliqué dans les phases aiguës précoces de l'infection dans un modèle murin d'infection, la réponse des polynucléaires neutrophiles par une souche déletée du gène *saeR* s'étant révélée significativement diminuée (Handke et al., 2008).

Il a ensuite été montré que SaeRS chez *S. epidermidis* est impliqué dans la formation de biofilm et, à la différence de *S. aureus*, dans l'autolyse. En effet, une délétion de *saeRS* résulte en une augmentation de la formation de biofilm associée à une augmentation d'ADNe et une diminution de la viabilité cellulaire (plus de cellules mortes au sein du biofilm). Ces phénomènes sont en lien avec une augmentation de l'expression de la protéine associée à l'accumulation de biofilm (Aap), ainsi qu'avec une augmentation de la transcription des gènes d'autolysines (*atlE*, autolysine AtlE et *aae*, autolysine Aae) chez le mutant (Lou et al., 2011,

2014). Ainsi, bien que très proche d'un point de vue nucléotidique et protéique, le TCS SaeRS semble jouer des rôles assez différents chez *S. aureus* et chez *S. epidermidis*.

## **2.2. Respiration et fermentation**

Les staphylocoques sont des bactéries anaérobies facultatifs, capables de croître en l'absence d'oxygène par respiration anaérobie ou par fermentation, processus qui interviennent notamment au cours de certaines infections profondes (Bronner et al., 2004). Plusieurs TCS sont activés lors d'un faible niveau en oxygène dans l'environnement, afin d'affiner l'activité respiratoire et de détourner les flux énergétiques dans différentes voies métaboliques (Haag and Bagnoli, 2017).

### **2.2.1. Staphylococcal respiratory response (SrrAB)**

Le système SrrAB (ou SrrSR) a été décrit chez *S. aureus* simultanément par deux équipes comme étant un régulateur global de la virulence en cas de faible teneur en oxygène (Throup et al., 2001; Yarwood et al., 2001). SrrAB est un homologue du TCS ResED de *Bacillus subtilis* impliqué dans la régulation globale du métabolisme respiratoire aérobie et anaérobie. Il a ensuite fait l'objet d'une caractérisation fonctionnelle chez *S. epidermidis* (Wu et al., 2015).

#### 2.2.1.1. SrrAB et *S. aureus*

##### **Organisation génétique du locus *srrAB***

Le locus *srrAB* est constitué de deux gènes, *srrA* et *srrB*, codant respectivement le RR cytoplasmique SsrA et la protéine senseur transmembranaire HK SsrB. Il contient deux cadres ouverts de lecture, les gènes pouvant être co-transcrits ou *srrA* transcrit de façon indépendante (Pragman et al., 2004).

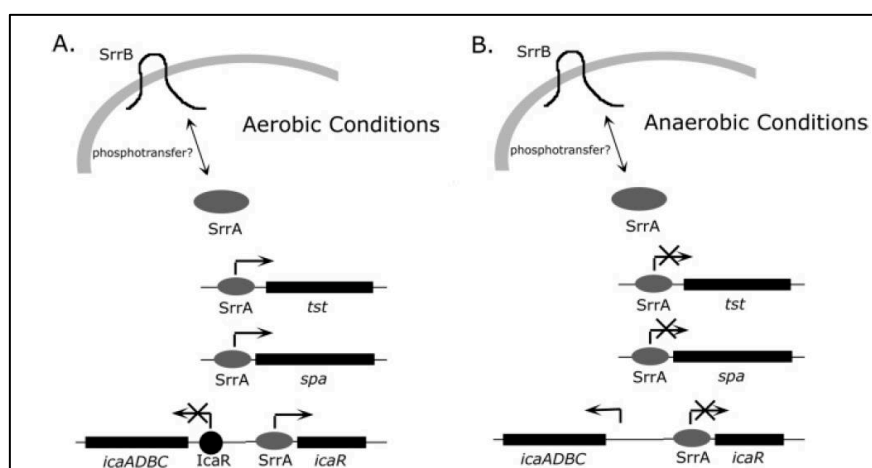
##### **Propriétés régulatrices de SrrAB**

SrrAB est un coordinateur global de réponse aux stress hypoxique, nitrosatif et oxydant, jouant ainsi un rôle important dans la survie de *S. aureus* au cours des processus infectieux chez l'hôte.

Ce TCS est nécessaire à la croissance en anaérobiose de *S. aureus*, un mutant *srrAB* présentant un déficit de croissance en l'absence d'oxygène. SrrAB régule en effet positivement des gènes impliqués dans le métabolisme anaérobie (Kinkel et al., 2013) et l'expression d'enzymes impliquées dans la fermentation (alcool et L-lactate déshydrogénases par exemple) (Throup et al., 2001). De plus, *srrAB* répond à l'hypoxie en régulant un certain nombre de procédés

métaboliques, permettant de maintenir la production d'énergie et les processus biosynthétiques essentiels (Throup et al., 2001). Il promeut également la résistance au stress nitrosatif par activation de systèmes de détoxification (Kinkel et al., 2013) et la résistance au peroxyde d'hydrogène (Mashruwala and Boyd, 2017).

SrrAB agit également comme un régulateur de la production de facteurs de virulence. L'équipe de Schlievert a en effet montré que dans des conditions de faible pression partielle en oxygène ou de milieu pauvre en nutriments, SrrAB réprime l'expression du transcrit RNAIII du locus *agr*, d'*icaR* et de facteurs de virulence comme la protéine A et la toxine TSST-1 (Figure 38) (Pragman et al., 2004, 2007; Yarwood et al., 2001). Au contraire, dans des conditions d'aérobiose, le système SrrAB augmente le niveau de ces transcrits (Pragman et al., 2007).



**Figure 38. Modélisation du fonctionnement du système à deux composants SrrAB de *S. aureus* en fonction de la présence ou non d'oxygène dans le milieu (Pragman et al., 2007).** (A) En condition aérobie, SrrA se lie en amont des promoteurs des gènes *tst*, *spa* et *icaR* et active leur transcription, entraînant une augmentation de l'expression des facteurs de virulence TSST-1 et protéine A. (B) Dans des conditions anaérobies ou dans des milieux pauvres en nutriments, SrrA réprime la transcription des loci *tst*, *spa* et *icaR*, entraînant une réduction de l'expression des facteurs de virulence TSST-1 et protéine A.

Il a été montré que l'activation de SrrAB protège les bactéries de la destruction par les polynucléaires neutrophiles (Ulrich et al., 2007). Cette protection est liée d'une part à une production accrue de PNAG (la répression d'*icaR* entraînant l'activation de l'opéron *ica*) (Ulrich et al., 2007), et d'autre part à une résistance aux stress oxydatif et nitrosatif médiés par les neutrophiles. En effet, sous l'action du stress oxydant, l'activation de *srrAB* entraîne une régulation positive du gène *plc*. Ce gène code la phospholipase C spécifique du phosphatidylinositol (PI-PLC), enzyme importante pour la survie de *S. aureus* dans le sang et les polynucléaires neutrophiles humains (White et al., 2014). De plus, SrrAB est essentiel à la

survie de *S. aureus* dans un modèle d'ostéomyélite, potentiellement en lien avec la résistance aux polynucléaires neutrophiles (Wilde et al., 2015).

En outre, SrrAB est impliqué positivement dans la formation de biofilm, des mutants du *locus* présentant une réduction de l'épaisseur du biofilm. De façon étonnante, cette diminution est associée à une augmentation de PNAG, suggérant une régulation indépendante de *ica*. Des niveaux accrus de mort cellulaire sont également observés dans le biofilm du mutant (Kinkel et al., 2013; Tu Quoc et al., 2007).

Deux études récentes ont apporté un éclairage sur le rôle joué par SrrAB dans cette formation de biofilm. La première a démontré que l'augmentation du nombre de cellules mortes présentée par le mutant *srrAB* dans le biofilm serait liée à une activation de l'expression de l'opéron *cidABC*, connu comme étant un médiateur-clé de la mort cellulaire. Cette mort est associée à une accumulation accrue d'espèces réactives de l'oxygène de façon dépendante de CidB, démontrant le rôle de cette protéine dans l'induction de la mort cellulaire. Les auteurs ont alors supposé que l'activation du système SrrAB entraîne une inhibition de la mort cellulaire par répression directe de la transcription de l'opéron *cidABC* (Windham et al., 2016). La deuxième a montré que l'hypoxie favorise la formation de biofilm chez *S. aureus* et que dans des conditions de fermentation, SrrAB active la transcription du gène codant l'autolysine AtlA. L'augmentation de la lyse cellulaire résultante entraîne une accumulation d'ADNe qui participe à la matrice du biofilm (Mashruwala et al., 2017).

#### 2.2.1.2. SrrAB et *S. epidermidis*

##### **Organisation génétique du locus *srrAB***

Chez *S. epidermidis*, les gènes *srrA* et *srrB* forment un opéron dont la cotranscription est activée par une faible teneur en oxygène, comme chez *S. aureus*. La protéine SrrA de *S. epidermidis* partage en outre 90,5% d'identité avec celle de *S. aureus* (Wu et al., 2015).

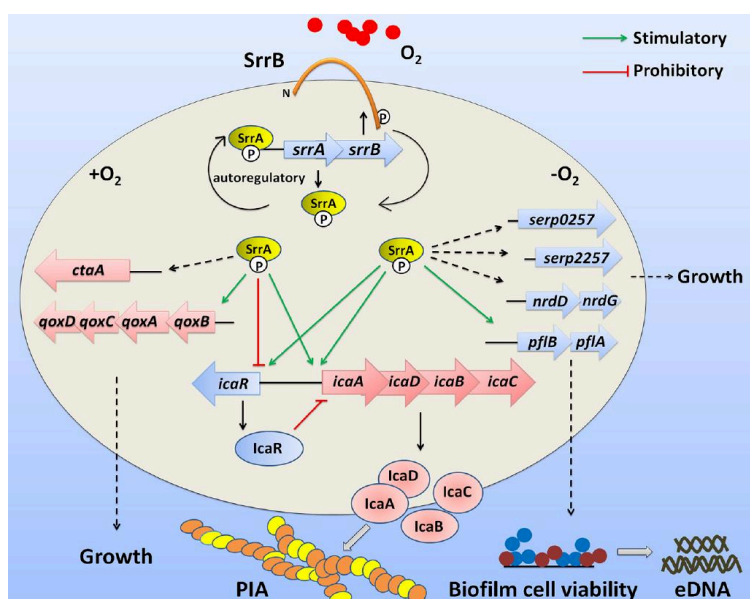
##### **Propriétés régulatrices de SrrAB**

Le TCS SrrAB est impliqué chez *S. epidermidis* dans la croissance bactérienne et la formation de biofilm. En effet, un mutant  $\Delta srrA$  de *S. epidermidis* présente une croissance retardée, que ce soit en aérobiose comme dans des conditions de microaérophilie (Wu et al., 2015). Ces résultats diffèrent de *S. aureus* chez lequel *srrAB* est nécessaire à la croissance uniquement en anaérobiose (Throup et al., 2001), suggérant un rôle différent de ce système dans la croissance

chez ces deux espèces. Des analyses transcriptomiques ont montré que les mécanismes de régulation de la croissance bactérienne par SrrAB chez *S. epidermidis* varient en fonction de la concentration en oxygène dans l'environnement (**Figure 39**) (Wu et al., 2015):

- en condition d'aérobiose, SrrAB régule positivement l'expression de gènes impliqués dans le maintien de la chaîne respiratoire (comme *qoxBACD*, codant une quinol oxidase) ;
- tandis qu'en condition de microaérobiose, il régule les processus de fermentation et la réplication de l'ADN *via* l'activation de l'opéron *pflAB* (codant PflA, une enzyme activant PflB, une formate acetyltransferase) et des gènes *nrdDG* (codant NrdG activant NrdD, une ribonucléoside triphosphate réductase anaérobie) respectivement.

De plus, SrrAB régule positivement la formation de biofilm chez *S. epidermidis*. Un mutant  $\Delta$ *srrA* présente une formation de biofilm altérée associée à une diminution de la production de PNAG (contrairement à *S. aureus*), dans des conditions aérobie comme de microaérophilie. Cet effet est médié par une liaison directe aux promoteurs des gènes *icaA* et *icaR* (**Figure 39**).



**Figure 39. Modèle de la régulation par *srrAB* proposé chez *S. epidermidis*** (Wu et al., 2015). L'activation de SrrB en l'absence d'oxygène (O<sub>2</sub>) entraîne la phosphorylation de SrrA, qui contrôle directement de manière positive son propre opéron *srrAB* (autorégulation), ainsi que les opérons *ica*, *qox* et *pfl* (lignes vertes continues). Les gènes qui sont indirectement régulés positivement sont indiqués par des lignes en pointillés. Dans le même temps, SrrA-P joue également le rôle de répresseur d'*icaR* (ligne rouge) qui réprime l'opéron *ica*. + O<sub>2</sub>, dans des conditions aérobies; -O<sub>2</sub>, dans des conditions microaérobies.

### 2.2.2. Autres TCS impliqués dans la respiration

Deux autres TCS sont impliqués dans les processus de respiration/fermentation (NreCBA et AirRS), mais leur rôle dans la virulence étant plus limité, ils ne seront pas détaillés ici (Haag and Bagnoli, 2017).

### 2.3. Métabolisme de la paroi cellulaire, autolyse et mort cellulaire

Comme vu dans le paragraphe 3.1.4 de la partie 1, les HPG participent à un certain nombre de processus biologiques. Certaines de ces enzymes, également impliquées dans la lyse cellulaire, sont appelées autolysines. Leur activité doit par conséquent être étroitement contrôlée.

Chez *S. aureus*, trois TCS régulent le métabolisme de la paroi cellulaire et l'autolyse, positivement (WalRK) ou négativement (ArlSR et LytSR). Ces TCS sont ainsi impliqués à la fois dans la physiologie cellulaire (WalRK étant le seul à être essentiel à la croissance) et la pathogénèse bactérienne (Bronner et al., 2004).

#### 2.3.1. WalRK (ou YycFG)

Le TCS WalRK (également connu sous le nom de YycFG, VicRK ou MicAB) est impliqué dans le contrôle positif de l'activité autolytique, et est le seul système de transduction de signal essentiel requis pour la croissance bactérienne. Ce TCS est hautement conservé et semble être spécifique aux bactéries à Gram positif à faible teneur en G/C (Haag and Bagnoli, 2017).

##### 2.3.1.1. WalRK et *S. aureus*

#### *Organisation génétique du locus walRK*

Chez *S. aureus*, l'opéron est constitué des gènes *walR* (*yycF*), qui code le RR WalR, *walK* (*yycG*), qui code le senseur HK WalK, *yycH* et *yycI*, qui codent des protéines de régulation putatives et *yycJ*, qui code une exonucléase impliquée dans la réparation des mésappariements (Figure 40) (Cameron et al., 2016).



**Figure 40. Organisation génétique de l'opéron *walRK* chez *S. aureus* (Cameron et al., 2016).** Le système de régulation à deux composants WalRK est codé par les gènes *walR* et *walK*, situés en amont des gènes *yycH*, *yycI* et *yycJ*. Les domaines transmembranaires prédits sont présentés en noir.



### **Propriétés régulatrices de WalRK**

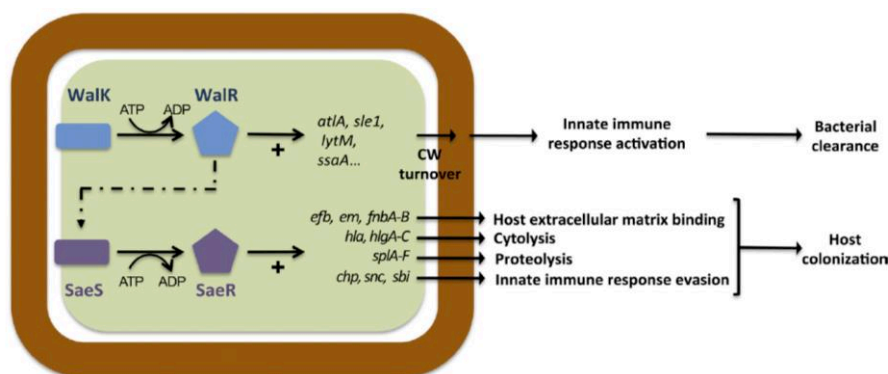
Le TCS WalRK contrôle le métabolisme de la paroi cellulaire et est essentiel à la viabilité cellulaire chez *S. aureus*.

Ce système a été découvert en 1999, par l'obtention d'un mutant létal sensible à la température chez *S. aureus* qui présentait une mutation dans le locus *yycFG* (Martin et al., 1999). WalRK coordonne le métabolisme de la paroi cellulaire et de la division cellulaire. Son rôle essentiel à la croissance bactérienne pourrait être lié au contrôle des enzymes LytM (endopeptidase) et SsA (amidase), induisant une relaxation de la réticulation du PG par hydrolyse croisée. En effet, le clonage des gènes encodant l'une ou l'autre de ces deux protéines dans un mutant *walRK* restaure la viabilité cellulaire de *S. aureus* (Delauné et al., 2011).

D'autre part, le niveau d'expression de *walRK* dans une souche inductible est corrélé positivement avec la capacité de formation de biofilm. Cet effet est probablement en lien avec le contrôle positif exercé par WalRK sur l'activité autolytique, et en particulier par le contrôle de l'activité des deux autolysines majeures de *S. aureus*, Atl et LytM (Dubrac et al., 2007).

Chez *S. aureus*, WalR se lie directement à une séquence *consensus* identifiée en amont de 13 gènes, impliqués dans la virulence, le métabolisme de la paroi cellulaire et sa dégradation (Dubrac and Msadek, 2004). Il contrôle également positivement l'expression de gènes impliqués dans la virulence de façon indirecte, par activation du signal de transduction du TCS SaeRS (Figure 41) (Delauné et al., 2012). Ces gènes codent des protéines impliquées dans l'interaction avec la matrice extra-cellulaire de l'hôte (*efb*, protéine de liaison au fibrinogène ; *emp*, protéine de liaison à la matrice extracellulaire ; *fnbA* et *fnbB*, protéines de liaison à la fibronectine), des toxines cytotolytiques (*hla*, *hly*, et *hlgACB*, hémolysines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) ainsi que des molécules d'échappement au système immunitaire inné (*scn*, protéine inhibitrice du complément, *chp*, protéine inhibitrice du chimiotactisme et *sbi*, protéine de liaison aux IgG).

La régulation précise de l'activité de WalRK pourrait être essentielle à la transition entre les modes de vie commensal et pathogène de *S. aureus*. En effet, dans un modèle d'infection murin, la virulence de souches productrices d'une protéine WalR constitutivement active est fortement diminuée. Cette diminution de la virulence est liée au fait que la stimulation de l'activité autolytique induite par WalR entraîne la libération de fragments de PG, activant le recrutement des polynucléaires neutrophiles et la production de cytokines pro-inflammatoires. L'activation précoce de la réponse inflammatoire de l'hôte est associée de fait à une clairance accrue des bactéries (Figure 41) (Delauné et al., 2012)



**Figure 41. Impact du système à deux composants (TCS) WalRK dans la virulence de *S. aureus*** (Delauné et al., 2012). Le TCS WalRK est activé *via* la phosphorylation de WalR par WalK, ce qui conduit à une expression accrue de plusieurs gènes impliqués dans la dégradation et le renouvellement de la paroi cellulaire. La libération des produits de dégradation de la paroi peut activer la réponse immunitaire innée de l'hôte, entraînant une élimination plus efficace des bactéries et une diminution de la virulence. Une activité accrue de WalRK conduit également à la stimulation du TCS SaeRS (flèche en pointillé) et à une augmentation de l'expression des gènes de virulence impliqués dans les interactions hôte-pathogène et dans l'échappement au système immunitaire inné.

### 2.3.1.2. WalRK et *S. epidermidis*

#### **Organisation génétique du locus walRK**

Chez *S. epidermidis*, l'opéron est organisé de manière similaire à celui de *S. aureus*. Il est constitué des gènes *walR* (*yycF*) qui code le RR, *walk* (*yycG*) qui code le senseur HK, et *yycH* et *yycI* qui codent des protéines de régulation putatives (Xu et al., 2017).

#### **Propriétés régulatrices de WalRK**

Le TCS WalRK est un régulateur clé de la viabilité cellulaire de *S. epidermidis*. L'inhibition de l'expression de *walRK* chez la souche de *S. epidermidis* 1457 par une technique d'ARN antisens entraîne en effet un retard important (d'environ quatre à cinq heures) d'entrée dans la phase exponentielle de croissance (Xu et al., 2017). Comme chez *S. aureus*, ce retard est partiellement restauré par la surexpression de *ssaA*, codant l'amidase SsaA (*S. epidermidis* ne possédant pas le gène *lytM*).

Une recherche *in silico* a identifié chez *S. epidermidis* plus de 300 sites de liaison potentiels de WalR à des gènes impliqués dans la production d'énergie, la traduction et le métabolisme de la paroi cellulaire (Xu et al., 2017). De plus, WalRK régule négativement la formation de biofilm chez *S. epidermidis*. Cependant, à la différence de *S. aureus*, cet effet est lié à une modulation de la production de PNAG. Il a en effet été montré que WalR réprime la transcription du locus *ica*, ainsi que celle des régulateurs impliqués dans la formation de biofilm de façon *ica*-dépendante *arlR*, *sarA* et *sarX*, par liaison directe aux promoteurs (Xu et al., 2017).

### **2.3.2. Autolysis-related locus (ArlSR)**

Le TCS ArlSR est un régulateur négatif de l'autolyse, impliqué dans la croissance et la division cellulaire, mais également dans la pathogénèse bactérienne chez *S. aureus* (Jenul and Horswill, 2018) et chez *S. epidermidis* (Wu et al., 2015).

#### 2.3.2.1. ArlSR et *S. aureus*

##### **Organisation génétique du locus arlSR**

Le locus *arlSR* est constitué de deux gènes cotranscrits, *arlS* et *arlR*, codant respectivement la protéine senseur HK ArlS et la protéine RR ArlR, appartenant à la famille des protéines PhoB-OmpR.

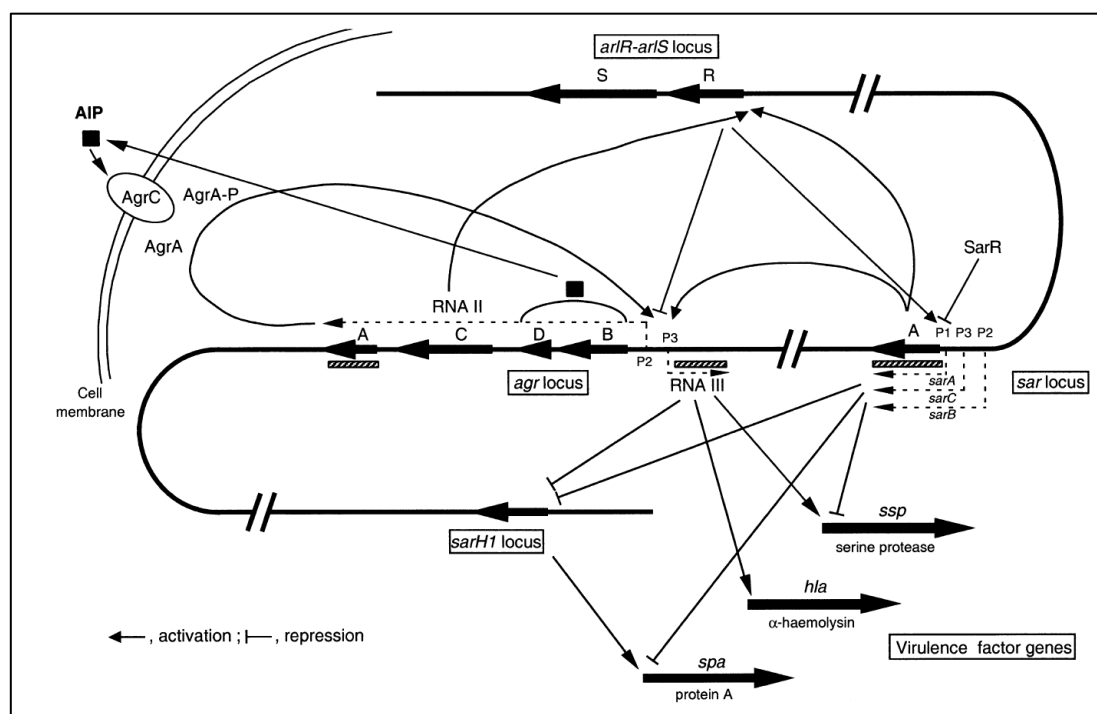
##### **Propriétés régulatrices de ArlSR**

Le TCS ArlSR est décrit comme un régulateur négatif du processus autolytique. Il régule de plus des processus métaboliques et influence l'expression de nombreux facteurs de virulence.

La première description du locus *arlSR* a été effectuée lors de la caractérisation d'un mutant construit chez *S. aureus*, comportant un transposon situé près de l'extrémité 5' du gène *arlS*. Ce mutant présentait une adhérence augmentée aux polymères et au polystyrène, et un taux d'autolyse accru lié à une augmentation de l'activité des HPG sécrétées (Fournier and Hooper, 2000). De façon intéressante, il a été observé qu'ArlSR est un répresseur de l'autolyse chez les souches de *S. aureus* sensibles à la méticilline (*methicillin-sensitive Staphylococcus aureus* [MSSA]) par répression du gène codant l'autolysine LytN, mais pas chez les souches résistantes (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus* [MRSA]), dont l'autolyse est contrôlée par un autre mécanisme non défini (Memmi et al., 2012).

De plus, le système ArlSR régule négativement la production de facteurs de virulence ( $\alpha$ - et  $\beta$ -hémolysines, lipase, coagulase et protéine A) et augmente l'expression de protéines de surface, de façon dépendante de la phase de croissance (Fournier et al., 2001; Liang et al., 2005). ArlSR serait un régulateur positif de l'activité protéolytique extracellulaire, en particulier de l'activité de sérine protéases, enzymes capables de cliver les anticorps de l'hôte (Fournier et al., 2001). L'effet sur la transcription de ces facteurs est cependant indirect, ArlR interagissant avec d'autres régulateurs (répression du locus *agr* et activation et de *sarA*) (Figure 42) (Liang et al., 2005). Il a également été suggéré qu'ArlSR pourrait réguler positivement la formation de capsule chez *S. aureus* d'une façon dépendante de  $\sigma^B$  (Meier et al., 2007).

Le locus *arl* n'est pas autorégulé, et sa transcription est activée par les systèmes Agr et Sar (Figure 42) (Fournier et al., 2001; Liang et al., 2005).



**Figure 42. Modélisation des interactions du système à deux composants ArlSR de *S. aureus* avec d'autres régulateurs et avec des gènes codant des facteurs de virulence.** Les lignes en pointillés représentent les transcrits des loci *agr* et *sar*. Les flèches et les barres perpendiculaires indiquent les régulations positive et négative respectivement, entre les différents acteurs. AIP, peptide autoinducteur (Fournier et al., 2001).

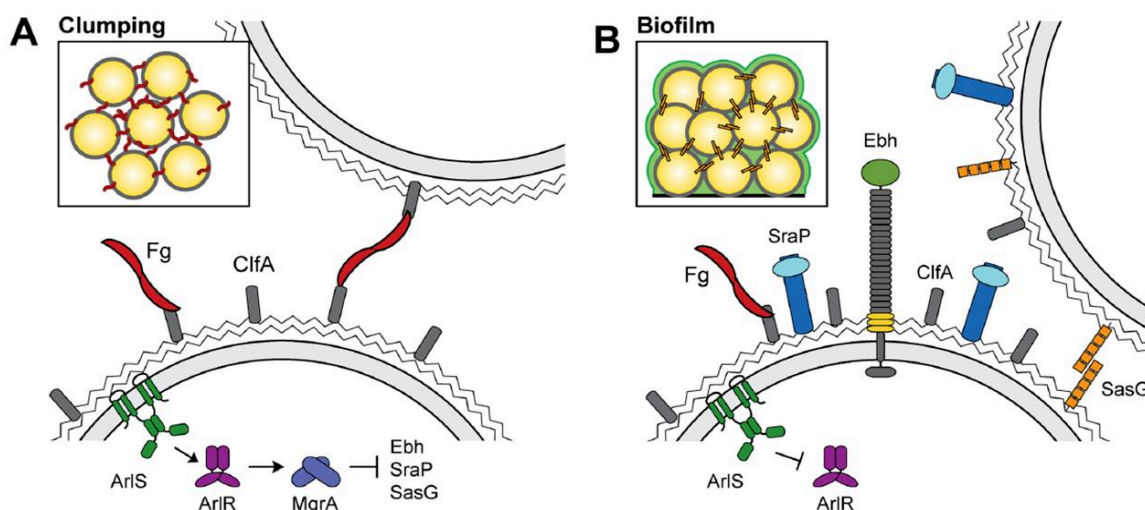
La contribution d'ArlSR à la virulence de *S. aureus* a été montrée dans plusieurs modèles animaux d'infection (Benton et al., 2004; Walker et al., 2013). Outre la régulation de la production des facteurs de virulence décrits ci-dessus, l'implication de ce TCS dans la pathogenèse de *S. aureus* peut être expliquée par plusieurs autres mécanismes.

Tout d'abord, ArlSR semble réguler le processus par lequel *S. aureus* se protège du déficit en manganèse induit par la calprotectine chez l'hôte, en changeant de source de carbone (Radin et al., 2016). Pour cela, ArlSR réprime les systèmes d'absorption du glucose et active les gènes impliqués dans l'utilisation des acides aminés en tant que source de carbone (Liang et al., 2005).

D'autre part, ArlSR est impliqué dans la formation de biofilm chez *S. aureus*. Il a tout d'abord été décrit comme un inhibiteur de ce mécanisme, divers mutants du locus présentant une augmentation de la formation de biofilm (Fournier and Hooper, 2000; Toledo-Arana et al., 2005). Plus récemment, une étude a au contraire montré qu'ArlSR est le TCS principalement

impliqué *in vivo* dans la colonisation de cathéters par des souches de *S. aureus*. En effet, parmi les 15 TCS étudiés, le mutant *arl* présentait la plus faible capacité à coloniser des cathéters implantés chez des souris, et était le seul à présenter un déficit majeur de production de PNAG. Ces résultats ont été confirmés par analyse transcriptomique, ArlSR réprimant la transcription d'*icaR* entraînant ainsi l'expression de l'opéron *icaADBC*, en lien avec une production accrue de PNAG (Burgui et al., 2018).

Enfin, il a été démontré que le système ArlSR est essentiel à la formation de caillots/agglutinats de *S. aureus* en présence de plasma humain ou de fibrinogène, par interaction avec le régulateur global MgrA (Figure 43) (Walker et al., 2013). En effet, *in vivo*, *S. aureus* utilise les protéines ClfA et ClfB pour interagir avec le fibrinogène et former des caillots qui protègent les bactéries du système immunitaire de l'hôte. ArlSR intervient dans ce processus en activant MgrA, qui réprime l'expression de huit protéines de surface (Ebh, SraP, Spa, FnbB, SasG, SasC, FmtB, and SdrD) (Crosby et al., 2016). Ces protéines, et plus particulièrement la protéine de surface géante Ebh (*Extracellular matrix Binding Homologue Protein*), ont normalement pour rôle d'affecter l'agglutination en interférant physiquement dans la liaison Clf/fibrinogène. Cette cascade régulatrice ArlSR-MgrA est cruciale pour la pathogénèse de *S. aureus*, les souches dépourvues des *loci arlSR* ou *mgrA* étant moins virulentes dans un modèle d'endocardite de lapin (Crosby et al., 2016; Walker et al., 2013).



**Figure 43. Modèle du contrôle de la formation d'agglutinats (A) et de la formation de biofilm (B) par la cascade de régulation ArlSR-MgrA chez *S. aureus* (Crosby et al., 2016).** (A) En réponse à un signal inconnu, le système à deux composants ArlSR est activé, et active à son tour l'expression de MgrA qui réprime l'expression de huit protéines de surface (dont Ebh, SraP et SasG), permettant ainsi à ClfA d'interagir avec le fibrinogène (Fg) et de former des agglutinats. (B) Lorsque ArlSR est inhibé, la production de MgrA diminue et l'expression des protéines de surface augmente. Ces protéines de surface interfèrent avec la liaison ClfA/Fg, tandis que l'augmentation de SasG peut favoriser la formation de biofilm. Les flèches et les barres perpendiculaires indiquent les régulations positive et négative respectivement.

#### 2.3.2.2. ArlSR et *S. epidermidis*

##### **Organisation génétique du locus *arlSR***

Chez *S. epidermidis*, le TCS ArlSR est également codé par les deux gènes *arlS* et *arlR* qui sont cotranscrits (Wu et al., 2012).

##### **Propriétés régulatrices de ArlSR**

De la même façon que chez *S. aureus*, ArlSR régule négativement l'autolyse chez *S. epidermidis*, un mutant délété d'*arlSR* présentant un taux plus élevé d'autolyse que la souche sauvage (Wu et al., 2012).

De plus, ArlR active la transcription de l'opéron *icaADBC* par liaison directe à la région promotrice, et favorise ainsi la formation de biofilm chez *S. epidermidis* (Wu et al., 2012). Un mutant délété d'*arlSR* présente en effet une très forte diminution de la capacité de formation de biofilm à la fois *in vitro* et *in vivo* dans un modèle d'infection sous-cutanée chez le lapin, en lien avec une diminution de PNAG, sans que la quantité d'ADNe ne soit affectée.

La même équipe a ensuite confirmé le rôle joué par ce TCS dans la formation de biofilm chez des isolats cliniques de *S. epidermidis*. Quinze isolats non producteurs de biofilm exprimaient en effet des niveaux bas d'ARNm d'*arlR* et d'*icaA*, associés à une production significativement moins importante de PNAG, comparativement à une souche de référence de *S. epidermidis* productrice de biofilm (Wu et al., 2014).

### **2.3.3. LytSR**

Le TCS LytSR est un régulateur clé de l'activité des HPG, impliqué dans différents processus métaboliques majeurs mais également dans le contrôle de la mort cellulaire programmée et de la lyse au sein du biofilm.

#### **2.3.3.1. LytSR et *S. aureus***

Les gènes *lytSR* ont été découverts au cours d'une stratégie de séquençage de fragments d'ADN chez *S. aureus* dans l'objectif d'identifier des gènes codant de potentiels senseurs (Brunskill and Bayles, 1996a).

#### ***Organisation génétique du locus *lytSR****

Le locus *lytSR* est constitué de deux gènes cotranscrits, *lytS* et *lytR*, codant respectivement la protéine HK LytS (senseur) et la protéine de RR cytoplasmique LytR. Cependant, contrairement à la plupart des protéines senseur qui possèdent deux domaines transmembranaires, la protéine LytS en contient six à son extrémité N-terminale (Bronner et al., 2004).

#### ***Propriétés régulatrices de LytSR***

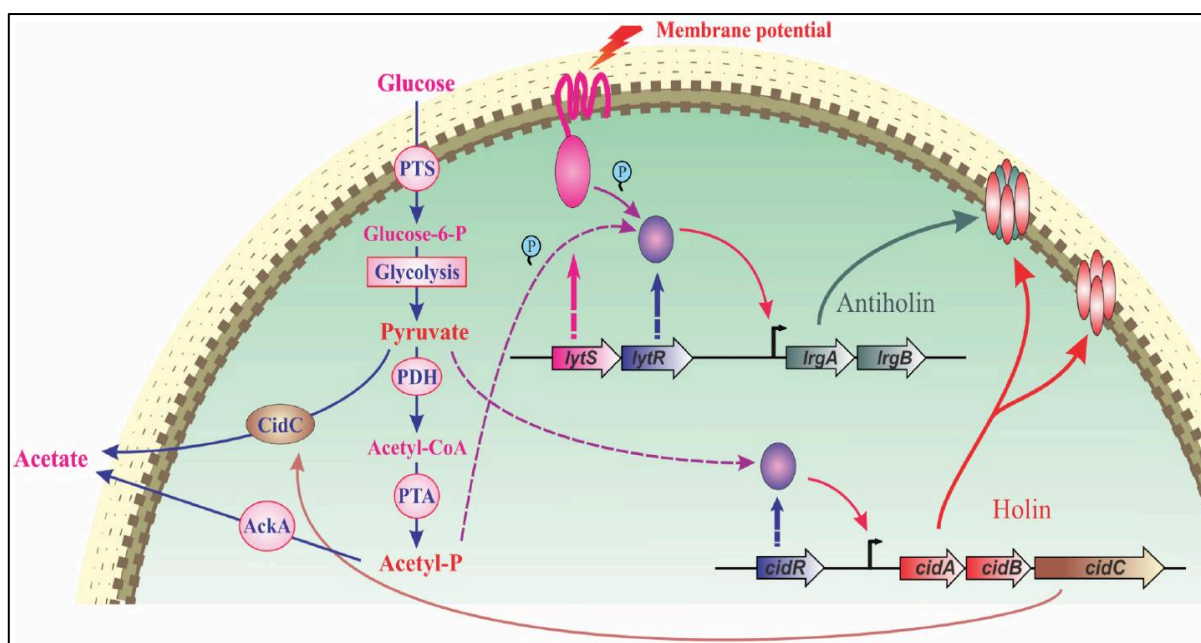
LytSR est un régulateur négatif de l'activité des HPG et de l'autolyse chez *S. aureus*. Il a plus récemment été décrit comme impliqué dans le contrôle des processus de mort et de lyse cellulaire au cours du développement du biofilm.

##### **○ *Activité des HPG et autolyse***

LytSR a été à l'origine décrit comme un TCS putatif qui affecterait le contrôle de l'activité des HPG et de l'autolyse (Brunskill and Bayles, 1996a). En effet, un mutant *lytS* présente une autolyse accrue et une altération des niveaux d'activité des HPG. Une caractérisation plus approfondie de l'opéron *lytSR* a conduit à la découverte de l'opéron *lrgAB* situé immédiatement en aval, dont l'expression s'est révélée être régulée positivement par LytSR (Figure 44) (Brunskill and Bayles, 1996b). Un double mutant du locus *lrgAB* présente une augmentation de l'activité des HPG ainsi qu'une augmentation de la mort cellulaire induite par la pénicilline en phase stationnaire de croissance, moment où l'expression de l'opéron *lrgAB* est maximale (Groicher et al., 2000).

En parallèle, l'opéron *cidABC* a été identifié comme ayant un rôle opposé à celui de *lrgAB*, en induisant une augmentation de l'activité des HPG et de la mort cellulaire induite par la pénicilline (Rice et al., 2003).

De façon intéressante, LrgA et CidA partagent des caractéristiques de structure secondaire avec les protéines de la famille des holines/antiholines (Brunskill and Bayles, 1996b). Cette famille est connue pour jouer un rôle important au cours de l'infection bactérienne par des bactériophages. En effet, les holines phagiques s'oligomérisent au sein de la membrane bactérienne, formant un canal qui permet aux HPG phagiques d'accéder au PG et de l'hydrolyser, entraînant une lyse cellulaire et la libération des particules de bactériophages nouvellement formées (Young et al., 2000). Il a ainsi été proposé que *cidA* code une holine qui, en s'oligomérisant à la membrane et formant un pore, est un effecteur de l'activité des HPG et de la lyse cellulaire. LrgA au contraire, fonctionne comme une antiholine qui inhibe ces *process* (Figure 44) (Bayles, 2000; Ranjit et al., 2011).



**Figure 44. Système de régulation Cid/Lrg impliqué dans le contrôle de la mort cellulaire et de la lyse chez *S. aureus*.** Les gènes *cidA* et *lrgA* codent des protéines hydrophobes homologues qui fonctionnent respectivement comme holine et antiholine. Les gènes *cidB* et *lrgB* codent des protéines hydrophobes homologues. Le gène *cidC* code une pyruvate oxydase qui décarboxyle le pyruvate en acétate. Quand le système de régulation à deux composants LytSR détecte une diminution du potentiel membranaire, il répond en induisant la transcription de *lrgAB*. En présence d'excès de glucose et d'oxygène, l'acétyl-Phosphate peut activer directement LytR, indépendamment de LytS. L'accumulation de pyruvate et/ou d'acétate intracellulaire active le régulateur de transcription CidR, qui induit la transcription de *cidABC*. PTS, phosphotransférase; PDH, pyruvate déshydrogénase; PTA, phosphotransacétylase; AckA, acétate kinase (Sadykov and Bayles, 2012).



L'analyse transcriptomique d'un mutant *lytS* a confirmé que l'opéron *lrgAB* est la cible principale de la régulation induite par LytSR, mais que ce système de régulation a également un impact sur l'expression d'une grande variété de gènes impliqués dans des métabolismes de base. La plupart des gènes régulés négativement chez le mutant sont impliqués dans le métabolisme des carbohydrates, le métabolisme énergétique ou nucléotidique, ainsi que dans la réplication, la transcription et la traduction (Sharma-Kuinkel et al., 2009).

○ *Mort cellulaire et lyse au cours du développement du biofilm*

De façon intéressante, des délétions dans les opérons *cid* ou *lrg* conduisent à des altérations dans la formation de biofilm et dans la libération d'ADNe. Ainsi, chez *S. aureus*, un mutant *lytS* forme un biofilm adhérent avec une augmentation d'ADNe (Sharma-Kuinkel et al., 2009), tandis qu'un mutant *cidA* présente les caractéristiques inverses (Rice et al., 2007).

Il a ainsi été proposé que les opérons *cid* et *lrg* ont pour fonction biologique de réguler la mort cellulaire programmée et la lyse au cours du développement du biofilm (Bayles, 2007; Sadykov and Bayles, 2012). En effet, au sein du biofilm, une sous-population de bactéries mortes se lyse et libère de l'ADNe, qui joue alors un rôle essentiel dans l'adhésion intercellulaire et la stabilité du biofilm, au profit des bactéries survivantes. CidA agirait alors comme un effecteur positif de la lyse cellulaire et de la libération d'ADN dans le biofilm, tandis que LrgA serait un inhibiteur de ces phénomènes. Ainsi, la balance entre CidA et LrgA au sein de chaque cellule détermine lesquelles vivront et se répliqueront, et lesquelles mourront et se lyseront, mais sans que les processus déterminant cette balance soient élucidés (Windham et al., 2016).

○ *Signaux d'activation*

Les opérons *lrg* et *cid* étant impliqués dans la lyse cellulaire, leur transcription est soumise à un contrôle complexe. Deux réseaux de régulation sont impliqués.

Le premier est en lien avec le métabolisme des glucides, en réponse à un excès de glucose et d'oxygène. Cet excès conduit à une production de pyruvate et d'acétate qui active le régulateur de transcription CidR, activant la transcription de *cidABC* (Figure 44) (Yang et al., 2005). Il a plus récemment été démontré que ces conditions activent également la transcription de *lrgAB* via une activation directe de LytR, indépendamment de LytS. Cette activation pourrait être expliquée par une phosphorylation directe de LytR par une petite molécule donneuse de phosphate, telle que l'acétyl-phosphate (Figure 44) (Patel and Golemi-Kotra, 2015; Sadykov and Bayles, 2012).

Le TCS LytSR répond d'autre part à une diminution du potentiel de membrane (force proton motrice de la membrane cytoplasmique) (**Figure 44**), la présence de six domaines transmembranaires de LytS serait idéalement adaptée pour détecter ces signaux (Patton et al., 2006). Ces changements de potentiel de membrane peuvent survenir *in vivo* chez l'hôte, en présence de peptides antimicrobiens cationiques qui perturbent la membrane cellulaire bactérienne et en altèrent le potentiel de membrane, conduisant à une action bactéricide rapide. Il a ainsi été suggéré que LytSR, en détectant ces changements de potentiel de membrane, jouerait un rôle important dans les réponses adaptatives de *S. aureus* aux peptides antimicrobiens. Un mutant *lytS* présente en effet une augmentation significative *in vitro* de la sensibilité à une large gamme de peptides cationiques, alors qu'un mutant *lrgAB* ne présente pas d'altération (Yang et al., 2013). Ces données sont corroborées *in vivo* dans un modèle d'endocardite de lapin lors d'un traitement avec de la daptomycine liée au calcium (modifiant le potentiel de membrane) où le mutant *lytS*, mais pas le mutant *lrgAB*, survit significativement moins longtemps dans les tissus (Yang et al., 2013).

Des études ont été menées dans l'objectif de mieux comprendre comment ces signaux d'activation sont impliqués dans la coordination de l'expression des opérons *cid* et *lrg* au cours du développement du biofilm. Grâce à des technologies microfluidiques, il a été montré que leur expression varie de façon temporelle et spatiale au cours du développement du biofilm. Au sein des larges structures en tours (à croissance rapide), l'expression de *lrgAB* est constitutive et diffuse alors que celle de *cid* est retardée et située à l'intérieur des structures, probablement en réponse aux conditions hypoxiques qui apparaissent au fur et à mesure que la taille de la structure augmente. Au contraire, dans les petites structures en tours (à croissance lente), l'expression de *cid* est constitutive tandis que celle de *lrgAB* est indétectable. Ces données reflètent ainsi l'hétérogénéité métabolique existante au sein du biofilm, et le fait que l'expression de ces deux opérons est contrôlée par des systèmes de régulation distincts qui répondent à des signaux métaboliques différents (Moormeier and Bayles, 2017; Moormeier et al., 2013).

Par conséquent, une meilleure compréhension des différences métaboliques existant dans les différentes structures au sein des biofilms pourra à l'avenir permettre de mieux comprendre les signaux métaboliques détectés par les systèmes de régulation CidR et LytSR.

2.3.3.2. LytSR et *S. epidermidis***Organisation génétique du locus *lytSR***

L'opéron *lytSR* de *S. epidermidis* est homologue à celui de *S. aureus*. Immédiatement en aval de *lytR* est également localisé l'opéron *lrgAB*, codant deux protéines putatives membranaires *holin-like* (Figure 45) (Zhu et al., 2010).

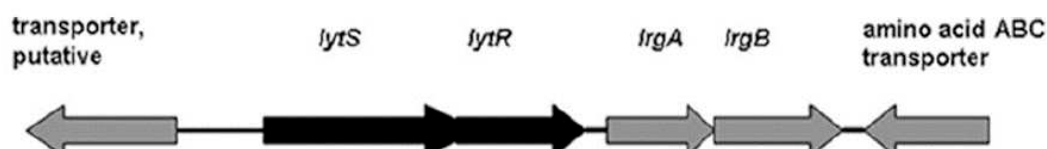


Figure 45. Représentation schématique du locus *lytSR* de *S. epidermidis* (Zhu et al., 2010).

**Propriétés régulatrices de *LytSR***

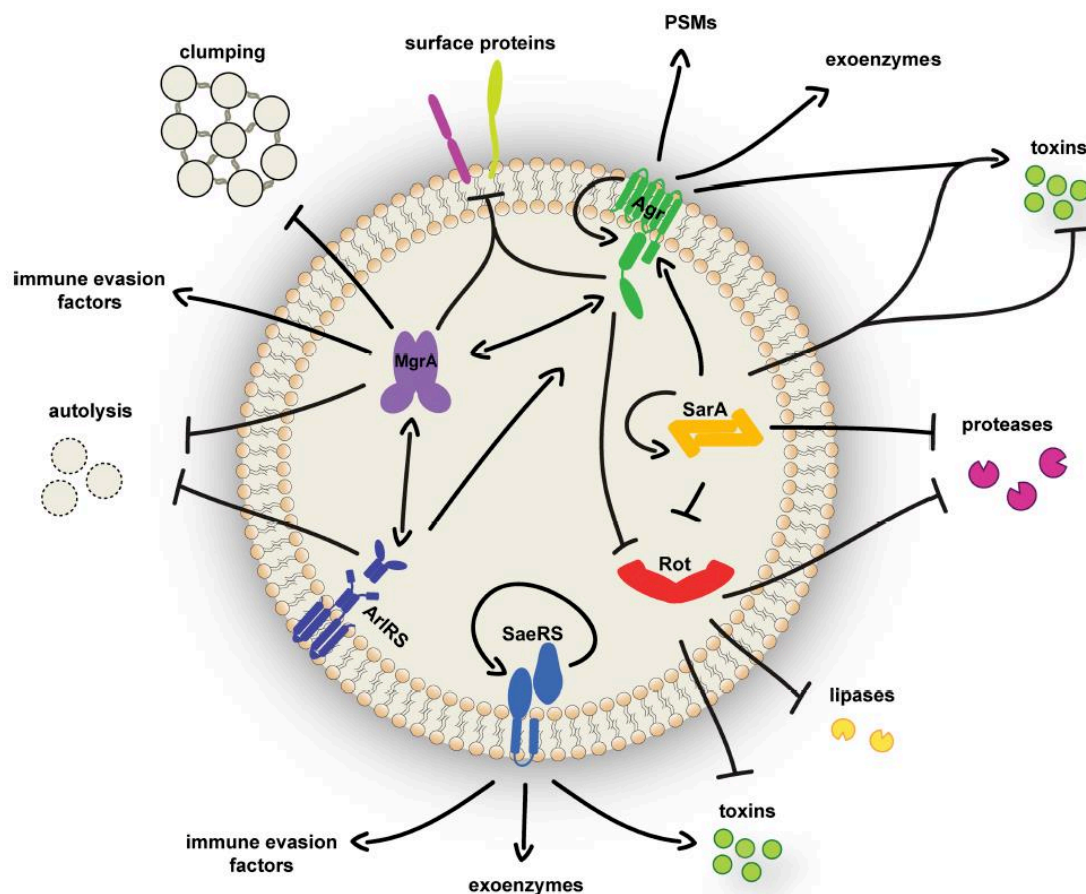
Chez *S. epidermidis*, le TCS *LytSR* régule l'activité extracellulaire des HPG, la mort cellulaire au cours de la formation de biofilm et l'utilisation du pyruvate (Zhu et al., 2010). Cependant, à la différence de *S. aureus*, il ne semble pas ou peu avoir de rôle dans l'autolyse.

En effet, un mutant délété de *lytSR* chez *S. epidermidis* présente une diminution de l'activité des HPG extracellulaires et produit plus de biofilm avec un taux significativement moins élevé de cellules mortes (Zhu et al., 2010). Cependant, il ne présente pas de différence avec la souche sauvage dans l'autolyse induite par le Triton X-100. L'analyse transcriptomique montre que la délétion de *lytSR* entraîne une réponse stringente, avec une régulation négative des gènes impliqués dans la synthèse protéique et le métabolisme énergétique, alors que les gènes impliqués dans la biosynthèse des acides aminés et des nucléotides sont régulés positivement. Les signaux à l'origine de l'activation de *LytSR* chez *S. epidermidis* restent à ce jour inconnus.

Ainsi, bien que très conservé, le TCS *LytSR* joue des rôles variables au sein de chaque espèce, tout en restant en lien avec le métabolisme et/ou la mort cellulaire (van den Esker et al., 2017).

Les TCS s'intègrent à un réseau complexe qui permet aux staphylocoques de s'adapter à une grande diversité de *stimuli* environnementaux. Ce réseau interconnecté leur permet notamment de s'implanter dans les différentes niches rencontrées au cours de leur cycle de vie commensal et infectieux chez l'hôte. L'implication de ces régulateurs dans la pathogenèse a été très étudiée chez *S. aureus*. Les principaux sont représentés dans la **Figure 46**. Il reste cependant encore beaucoup à découvrir, notamment sur les signaux détectés par les TCS et leur relais, dont la compréhension pourrait contribuer à fournir des cibles pour le développement de stratégies de lutte contre les infections à staphylocoques.

Le génome des souches de *S. lugdunensis* N920143 et HKU09-01 (Heilbronner et al., 2011; Tse et al., 2010) possède les principaux TCS impliqués dans le contrôle de la virulence décrits ci-dessus, mais aucune caractérisation fonctionnelle n'a été effectuée à ce jour.



**Figure 46. Représentation des réseaux d'interaction des principaux régulateurs globaux de la virulence chez *S. aureus* (Jenul and Horswill, 2018).** Le schéma décrit un aperçu de six systèmes de régulation, trois systèmes à deux composants (Agr, SaeRS et ArlRS) et trois membres de la famille des protéines SarA (SarA, Rot et MgrA). Les facteurs de virulence contrôlés pour chaque système sont représentés



### **3. Travail personnel : rôle du système à deux composants *LytSR* dans la pathogénèse et la formation de biofilm chez *S. lugdunensis***

#### **3.1. Introduction**

##### *Contexte et objectifs de l'étude*

*S. lugdunensis* est une espèce de SCN particulièrement pathogène. Parmi les facteurs de virulence décrits, la capacité de formation de biofilm au sein des tissus de l'hôte et sur les dispositifs médicaux implantés semble jouer un rôle dans la pathogénèse de nombreuses infections causées par cette espèce (Argemi et al., 2017d; Frank et al., 2008). A la différence des autres espèces de staphylocoques, le PNAG n'est pas un composant majeur de la matrice du biofilm de *S. lugdunensis*, malgré l'identification d'un *locus icaADBC*. Les facteurs protéiques et l'ADNe semblent au contraire majoritairement impliqués dans la matrice de son biofilm (Frank and Patel, 2007). Même si les protéines composant cette matrice n'ont jamais été décrites de façon exhaustive, l'autolysine AtlL (Gibert et al., 2014), la protéine IsdC (Missineo et al., 2014) et le gène impliqué dans la compétence *comEB* (Rajendran et al., 2015) ont été identifiés comme jouant un rôle dans la formation de biofilm de *S. lugdunensis*.

Les espèces *S. aureus* et *S. epidermidis* sont également capables de former un biofilm protéique, indépendamment du PNAG (Kogan et al., 2006; Rohde et al., 2007). De façon intéressante, il a été montré chez *S. aureus* que des signaux environnementaux peuvent déterminer la composition plutôt polysaccharidique ou plutôt protéique de la matrice (Vergara-Irigaray et al., 2009). Ces signaux peuvent notamment être détectés par les TCS, qui, en réponse à certains *stimuli* environnementaux, modulent l'expression de nombreux gènes (Haag and Bagnoli, 2017). Certains TCS ont ainsi un rôle régulateur dans la formation de biofilm chez *S. aureus*, tels qu'*agr* (Kavanaugh and Horswill, 2016), *arlSR* (Burgui et al., 2018) et *lytSR* (Sharma-Kuinkel et al., 2009).

Fait intéressant, le TCS *LytSR* joue un rôle important dans le développement de biofilm chez *S. aureus* comme chez *S. epidermidis* par un mécanisme indépendant du *locus ica* (Sharma-Kuinkel et al., 2009; Zhu et al., 2010). Cet effet est lié au contrôle exercé par *LytSR* sur la lyse et la mort cellulaire au sein du biofilm (Sadykov and Bayles, 2012).

A la suite des travaux menés sur la caractérisation des rôles de l'autolysine majeure de *S. lugdunensis* AtlL (Bourgeois et al., 2009; Gibert et al., 2014), le GRAM a souhaité développer une approche plus globale en s'intéressant à l'étude des mécanismes régulateurs de l'autolyse et au TCS LytSR. En effet, par analogie à ce qui est décrit chez *S. aureus*, le système autolytique de *S. lugdunensis* pourrait être sous le contrôle d'un système homologue de LytSR, où LytS est le senseur et LytR le régulateur transcriptionnel.

Ainsi, l'objectif de ce premier volet de Doctorat était la caractérisation fonctionnelle de LytSR chez *S. lugdunensis*. Par une approche de délétion des gènes *lytSR* chez la souche *S. lugdunensis* DSM 4804 (Freney et al., 1988), le rôle du TCS dans la formation de biofilm, dans l'autolyse induite et dans la virulence *in vivo* a été étudié. En outre, une approche transcriptomique par analyse de puces à ADN a été réalisée afin d'identifier les gènes sous le contrôle de LytSR, et les voies métaboliques impactées par la délétion.

## Résultats

Le locus *lytSR* de *S. lugdunensis* présente une forte homologie en séquence nucléotidique (67%) et en acides aminés (64%) avec son homologue chez *S. aureus*. Ces gènes sont co-transcrits, leur transcription étant maximale à six heures de culture. En aval du locus *lytSR* sont situés les gènes *lrgAB*, dont l'expression est maximale après huit heures de culture.

Pour investiger le rôle de *LytSR*, un mutant *S. lugdunensis* DSM 4804 délété des gènes *lytSR* a été construit par recombinaison homologue. Dans l'objectif d'exclure un effet polaire de la délétion, nous avons complémenté la souche  $\Delta$ *lytSR* avec les plasmides pCU1:*lytSR* et pCU1. Les quatre souches ont présenté une cinétique de croissance identique en milieu liquide trypticase-soja, sans différence de viabilité cellulaire.

Le TCS *LytSR* chez *S. lugdunensis* ne semble être impliqué ni dans le contrôle de l'autolyse induite par un stress, ni dans la mort cellulaire induite par les antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi cellulaire (pénicilline G et glycopeptides). En effet, aucune différence de lyse n'a été observée entre la souche sauvage et le mutant  $\Delta$ *lytSR* en présence de Triton X-100. De la même façon, les courbes de bactéricidie ont montré que la souche sauvage *S. lugdunensis* DSM 4804 est tolérante aux glycopeptides, tout comme le mutant  $\Delta$ *lytSR*, alors que la pénicilline G a une activité bactéricide identique sur les souches sauvage et mutée.

En revanche, le système *LytSR* joue un rôle dans la formation de biofilm chez *S. lugdunensis*. L'étude de l'architecture du biofilm des souches sauvage, mutante et complémentées a été menée par CLSM en collaboration avec les Dr Ludovic Galas et Damien Schapman de la plateforme Primacen de l'Université de Rouen. Les analyses menées grâce au logiciel Imaris ont montré une diminution significative de la biomasse ainsi qu'un taux de cellules mortes significativement plus élevé dans le biofilm de la souche mutée  $\Delta$ *lytSR* par rapport à la souche sauvage. De plus, le biofilm de la souche mutée ne présentait plus les structures typiques en tours observées dans le biofilm de la souche sauvage. La complémentation du mutant avec *lytSR* restaurait partiellement ces structures.

En collaboration avec le Pr Olivier Lesouhaitier du Laboratoire de Microbiologie Signaux et MicroEnvironnement (LMSM EA4312) de l'Université de Rouen, nous avons évalué l'effet de la délétion de *lytSR* sur la pathogénèse de *S. lugdunensis* (i) *in vitro* en utilisant le modèle de cytotoxicité cellulaire sur la lignée de kératinocytes humains HaCaT et (ii) *in vivo* par utilisation du modèle d'infection du nématode *C. elegans* en milieu solide (*slow killing*) et en milieu liquide (*fast killing*). La souche mutée était significativement moins virulente dans le test de *slow*



*fast killing*, 50% des vers en contact avec la souche  $\Delta$ *lytSR* mourraient en 19 jours alors qu'en présence de la souche sauvage 50% des vers mourraient en 15 jours ( $P < 0,0001$ ). En revanche, aucun effet de la délétion de *lytSR* n'a été observé dans le test de *fast killing* de *C. elegans* ni dans la libération de lactate dehydrogenase (LDH) par les cellules HaCaT.

Enfin, une analyse comparée du transcriptome de la souche sauvage et de la souche mutante a été menée après six heures et huit heures de culture, en collaboration avec l'UMR 1245 du Pr Thierry Frébourg de l'Université de Rouen. La délétion  $\Delta$ *lytSR* affectait significativement ( $P < 0,05$ ) l'expression de 244 gènes, à des niveaux deux fois supérieurs ou inférieurs par rapport à la souche sauvage. La transcription de 124 gènes était affectée à six heures (79 régulés positivement et 45 négativement), et 174 gènes à huit heures (108 régulés positivement et 66 négativement). L'opéron *lrgAB* a été le plus fortement impacté par la délétion, l'expression de *lrgA* et *lrgB* à huit heures chez le mutant  $\Delta$ *lytSR* ayant été diminuée de 195 et 162 fois respectivement. Ce résultat a été confirmé par qRT-PCR. D'autre part, les principaux gènes sous-exprimés par la souche  $\Delta$ *lytSR* étaient impliqués dans les voies de synthèse des acides aminés (*thrBC*, SLUG\_15840, SLUG\_15710...), de dégradation des bases azotées (*xpt*, *pyn*, *guaAB*...) et dans les voies de réplication de l'ADN (*dnaC* et SLUG\_13250), alors que les gènes sur-exprimés intervenaient dans le métabolisme du nitrate et du nitrite (*narGHIIJ* et *nirBD*), le métabolisme du pyruvate (*cidC*, SLUG\_09450, SLUG\_02280 à SLUG\_02310), dans la dégradation des acides aminés (SLUG\_09494, SLUG\_09450, SLUG13970...) et dans la synthèse des bases azotées (*nrdD*, *rpoE*, *tmk*...). De plus, *LytSR* régulait négativement des gènes codant un grand nombre de protéines membranaires, connues comme la protéine de liaison au fibrinogène Fbl (*fbl*) ou putatives comme les Sls (*slsB* et *slsC*). Au contraire, il régulait positivement l'expression des gènes codant l'autolysine majeure AtIL (*atlL*), des protéines exportées putatives ainsi que de facteurs de virulence présumés tels que le système de sécrétion de type VII (*essB*, *esaB* et *essA*).

Cette étude est la première à décrire le rôle d'un TCS chez *S. lugdunensis*, un SCN particulièrement virulent. Nos résultats démontrent que *LytSR* joue un rôle important dans la formation de biofilm chez cette espèce, probablement en relation avec la mort cellulaire et le métabolisme. Les analyses transcriptomiques apportent un nouvel éclairage sur des facteurs de virulence présumés de *S. lugdunensis* qui pourraient être régulés par *LytSR*. *LytSR* apparaît ainsi comme un TCS majeur impliqué dans la pathogénèse de *S. lugdunensis*, comme en témoigne le modèle d'infection du nématode *C. elegans*.

**3.2. Publication n°1 : rôle du système à deux composants LytSR dans la formation de biofilm et la pathogenèse de *S. lugdunensis***

**Role of the LytSR two-component regulatory system in *Staphylococcus lugdunensis* biofilm formation and pathogenesis.**

S. Dahyot, V. Oxaran, M. Niepceron, E. Dupart, S. Legris, J. Didi, T. Clamens, O. Lesouhaitier, Y. Zerdoumi, J.M. Flaman, M. Pestel-Caron.

Article en préparation, pour une soumission dans *Frontiers in Microbiology*.



1  
2 **Role of the LytSR two-component regulatory system in *Staphylococcus***  
3 ***lugdunensis* biofilm formation and pathogenesis**  
4  
5

6 S. Dahyot<sup>1,6</sup>, V. Oxaran<sup>2,6</sup>, M. Niepceron<sup>3</sup>, E. Dupart<sup>3</sup>, S. Legris<sup>3</sup>, Jennifer Didi<sup>3</sup>, T. Clamens<sup>4</sup>,  
7 O. Lesouhaitier<sup>4</sup>, Y. Zerdoumi<sup>5</sup>, J.M. Flaman<sup>5</sup>, M. Pestel-Caron<sup>1</sup>  
8

9 <sup>1</sup>Normandie Univ, UNIROUEN, GRAM EA2656, Rouen University Hospital, F-76000 Rouen,  
10 France

11 <sup>2</sup>Present address: Department of Biological Sciences, Border Biomedical Research Center,  
12 University of Texas at El Paso, 500 West University Avenue, El Paso, TX 79968, USA

13 <sup>3</sup>Normandie Univ, UNIROUEN, GRAM EA2656, F-76000 Rouen, France

14 <sup>4</sup>Normandie Univ, UNIROUEN, Laboratory of Microbiology Signals and Microenvironment  
15 LMSM EA 4312, 27000 Evreux, France

16 <sup>5</sup>Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1245, Normandy Centre for Genomic and  
17 Personalized Medicine, Rouen University Hospital, F-76000 Rouen, France  
18

19 <sup>6</sup>S. Dahyot and V. Oxaran contributed equally to this work  
20  
21  
22

23 \*Corresponding author: S. Dahyot

24 E-mail: [sandrine.dahyot@chu-rouen.fr](mailto:sandrine.dahyot@chu-rouen.fr)

25 Phone number : +33235148299 ; fax number : +33235148203

26 Groupe de Recherche sur l'Adaptation Microbienne (EA2656), Normandie Univ, UNIROUEN,  
27 Rouen University Hospital, F-76000 Rouen, France  
28  
29  
30  
31

32 **Abstract**

33

34 **Background.** *Staphylococcus lugdunensis* is a coagulase negative *Staphylococcus*, increasingly  
35 recognized as a virulent pathogen. It is responsible for a wide variety of infections, some of  
36 which being associated with biofilm production, such as implanted medical devices infections  
37 or endocarditis. However, little is known about *S. lugdunensis* virulence regulation. Two-  
38 component regulatory systems (TCS) play critical roles in bacterial adaptation, survival and  
39 virulence. Among them, LytSR is widely conserved, but has variable roles in different  
40 organisms, all being connected to metabolism or cell death and lysis in biofilms. Therefore, we  
41 investigated here the functions of LytSR in *S. lugdunensis* pathogenesis.

42

43 **Results.** Deletion of *lytSR* did not alter neither the susceptibility to Triton X-100 induced  
44 autolysis nor the death induced by antibiotics targeting cell wall synthesis. However, the  $\Delta$ *lytSR*  
45 strain produced less biofilm, and exhibited no tower structures as well as a higher rate of dead  
46 cells within the biofilm compared to the wild-type strain. Virulence in *Caenorhabditis elegans*  
47 slow killing assay was significantly reduced for the mutant compared to the wild-type strain.  
48 The deletion of *lytSR* had no effect on the cytotoxicity in human keratinocyte cell line HaCaT.  
49 Transcriptional analyses conducted at mid- and late-exponential phases showed that *lytSR*  
50 deletion affected the expression of 244 genes involved in basic functions such as metabolism  
51 of amino acid, carbohydrates and nucleotides. Furthermore, LytSR appeared to downregulate a  
52 great number of known or putative membrane proteins, including the fibrinogen-binding  
53 protein Fbl, while upregulating exported proteins like the major autolysin AtlL as well as  
54 putative virulence factors like genes encoding the type VII secretion system.

55

56 **Conclusion.** Overall, our data suggest that the LytSR TCS is implicated in *S. lugdunensis*  
57 pathogenesis, through its involvement in biofilm formation and potentially by the control of  
58 genes encoding putative virulence factors.

59

## 60 **Introduction**

61 *Staphylococcus lugdunensis* is part of coagulase-negative staphylococci (CoNS). This  
62 bacterium belongs to the human skin flora ; van der Mee-Marquet et al. found for example an  
63 inguinal *S. lugdunensis* carriage for 22% of 140 incoming patients (van der Mee-Marquet et al.,  
64 2003). However, its pathogenicity is closer to that of *Staphylococcus aureus* than that of other  
65 CoNS in terms of tissue destruction ability and clinical course (Frank et al., 2008). In particular,  
66 *S. lugdunensis* native valve endocarditis can be particularly aggressive and destructive, often  
67 requiring surgery (Anguera et al., 2005). It can also cause a wide range of infections such as  
68 abscess and wound infections (Böcher et al., 2009; Heldt Manica and Cohen, 2017), bone and  
69 joint infections (Argemi et al., 2017) and infections associated with catheter or implanted  
70 medical devices (Nesher et al., 2017). Only few virulence factors have been so far identified to  
71 explain such a pathogenicity (Heilbronner et al., 2011). Similarly to other staphylococci, the  
72 pathogeny of *S. lugdunensis* appears in many infections to be related to biofilm formation  
73 within host tissues or on indwelling medical devices (Argemi et al., 2017; Frank and Patel,  
74 2007). The resulting infections are usually difficult to treat because biofilm protects bacteria  
75 from the host's immune system and antimicrobial therapies (Lebeaux et al., 2014; Stewart and  
76 Costerton, 2001).

77

78 In staphylococci, and more particularly in the most studied staphylococcal species *S. aureus*  
79 and *Staphylococcus epidermidis*, the exopolysaccharide poly-*N*-acetylglucosamine (PNAG),  
80 also termed polysaccharide intercellular adhesion (PIA), is the most important adhesive biofilm  
81 molecule (Maira-Litrán et al., 2002). PIA is encoded by the *icaADBC* operon composed of four  
82 genes whose expression is regulated by the transcriptional repressor IcaR. Despite the  
83 identification of an *icaADBC locus*, PIA is not a major component of the *S. lugdunensis* biofilm  
84 matrix (Frank and Patel, 2007). Instead, biofilm consists of extracellular factors which are  
85 mainly proteinaceous. However, all of these proteins have not yet been identified. Amongst the  
86 identified surface proteins that are involved in *S. lugdunensis* biofilm formation, the iron-  
87 regulated surface determinant IsdC under iron limited conditions (Missineo et al., 2014) and  
88 the major autolysin AtlL (Gibert et al., 2014; Hussain et al., 2015) have been demonstrated to  
89 be important actors.

90

91 Although their clinical significance, production and regulation of staphylococcal biofilms  
92 remain poorly defined. It is assumed that environmental signals can influence the rather

93 polysaccharide or proteinaceous composition of the biofilm matrix (Vergara-Irigaray et al.,  
94 2009). Indeed, some isolates of *S. aureus* and *S. epidermidis* are able to form biofilm without  
95 PIA (Arciola et al., 2015; Rohde et al., 2007). The ability of bacteria to adapt to environment is  
96 mediated by complex regulatory networks, including two-component signal transduction  
97 systems (TCSs) which allow a pathogen to alter its gene expression in response to  
98 environmental stimuli (Beier and Gross, 2006; Haag and Bagnoli, 2017). Some of these TCSs  
99 have been shown to be involved in controlling staphylococcal biofilm formation, such as *agr*  
100 (Kavanaugh and Horswill, 2016), *arlRS* (Burgui et al., 2018) and *lytSR* (Sharma-Kuinkel et al.,  
101 2009). Interestingly, LytSR TCS plays an important role in biofilm development in *S. aureus*  
102 (Sharma-Kuinkel et al., 2009) as in *S. epidermidis* (Zhu et al., 2010) through an *ica*-independent  
103 mechanism.

104

105 The LytSR system was firstly identified in *S. aureus*, where it was shown to affect murein  
106 hydrolase activity and autolysis (Brunskill and Bayles, 1996a). Further characterization  
107 demonstrated that LytSR positively regulates the expression of the immediately downstream  
108 *lrgAB* operon (Brunskill and Bayles, 1996b) which, along with the *cidABC* operon, is  
109 implicated in the control of programmed cell death and lysis during biofilm development  
110 (Bayles, 2007; Rice et al., 2007; Sadykov and Bayles, 2012). Indeed, the *cidA* gene encodes a  
111 holin-like protein that is an effector of extracellular murein hydrolase activity, cell lysis and  
112 DNA release, while *lrgA* encodes an antiholin-like protein which is an inhibitor of these  
113 processes (Rice et al., 2007). Thus, within the biofilm, the subpopulation of dead bacteria that  
114 lyses releases eDNA which plays a critical role in intercellular adhesion and biofilm stability  
115 (Bayles, 2007). As the *lrg* and *cid* operons are involved in autolysis and cell death (van den  
116 Esker et al., 2017), their transcription is subject to a complex control. They are under the control  
117 of two overlapping regulatory networks, one in response to metabolism of carbohydrates (Patel  
118 and Golemi-Kotra, 2015; Yang et al., 2005) and the second in response to changes in membrane  
119 potential (Patton et al., 2006).

120

121 Given the critical role of LytSR in the control of lysis and cell death in the biofilm of *S. aureus*  
122 and *S. epidermidis*, it seemed interesting to explore its functions in the particularly virulent  
123 CoNS, *S. lugdunensis*. In the present study, we constructed a DSM 4804  $\Delta$ *lytSR* strain, and  
124 investigated the effects of the deletion on bacterial autolysis, biofilm formation as well as *in*

125 *vivo* virulence. Furthermore, we set out to determine the full extent of the *S. lugdunensis* LytSR  
126 regulon by transcriptional profile analysis.



## 127 **Materials and Methods**

### 128 **Bacterial strains and growth conditions**

129 The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. Unless otherwise  
130 mentioned, *S. lugdunensis* strains were grown in trypticase soy broth (TSB; Bio-Rad, Marnes  
131 la Coquette, France), while *Escherichia coli* TOP10 strain (Invitrogen, Thermo Fisher  
132 Scientific, Massachusetts, USA) was cultured in Luria-Bertani medium (Bio-Rad) at 37°C  
133 under aerobic conditions. When necessary, antibiotics were used at the following  
134 concentrations: ampicillin, 100 µg/mL, chloramphenicol, 50 µg/mL and erythromycin, 2.5  
135 µg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

136

### 137 **DNA extraction and PCR amplification**

138 Isolates were grown overnight at 37°C on tryptic soy agar (TSA; Bio-Rad) with 5% horse blood  
139 agar plate. DNA was extracted using the InstaGene Matrix kit (Bio-Rad) according to the  
140 manufacturer's recommendations. PCRs were performed using a Veriti Thermal Cycler  
141 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a final volume of 25 µL containing 12.5 µL  
142 GoTaq G2 Green Master Mix (Promega, Charbonnières-Les-Bains, France), 0.50 µM of each  
143 primer and 5 µL of DNA. When necessary, PCR products were purified and verified by  
144 sequencing by Eurofins GATC Biotech SARL (Konstanz, Germany).

145

### 146 **Construction of the *S. lugdunensis* DSMΔ*lytSR* mutant and complementation strains**

147 The *lytSR* deletion mutant was constructed by homologous recombination using the plasmid  
148 pMAD (Arnaud et al., 2004). The fragment containing the upstream region of *lytS* (with respect  
149 to the *lytS* translation initiation site) and the downstream region of *lytR* (with respect to the *lytR*  
150 stop codon) were amplified by a two-steps overlap PCR reaction using the oligonucleotide pairs  
151 *lytS\_EcoRI\_F* / *lytS\_R* and *lytR\_F* / *lytR\_BamHI\_R* (Table 2). The purified PCR product was  
152 digested with EcoRI and BamHI restriction enzymes (New England BioLabs, Évry, France)  
153 and ligated into the pMAD vector with T4 DNA ligase (New England BioLabs) following the  
154 manufacturer's instructions and then cloned into *E. coli* TOP10. Clones containing the resulting  
155 recombinant pMADΔ*lytSR* vector were selected on TS supplemented with ampicillin. The  
156 recombinant plasmid pMADΔ*lytSR* was extracted (NucleoBond Xtra Midi endotoxin free,  
157 Macherey Nagel, Hoerdt, France) and used to transform the wild-type (WT) *S. lugdunensis*  
158 DSM 4804 strain (Freney et al., 1988) by protoplasts formation as previously described  
159 (Marlinghaus et al., 2012; Szabados et al., 2011). After incubation at 30°C for 5 days, clones

160 containing the plasmid were selected, and the double-crossover event was performed by a shift  
161 of temperature to 43°C and in presence of erythromycin (Arnaud et al., 2004). The loss of the  
162 plasmid was obtained after successive shifts between 30 and 43°C and in absence of antibiotic.  
163 Successful deletion of the *lytSR* operon *via* homologous recombination and loss of the plasmid  
164 pMAD $\Delta$ *lytSR* was verified by PCR and sequencing.

165

166 To construct the complemented strain, the *lytSR* operon including its predicted promoter and  
167 ribosome binding site was amplified by PCR using primers 5'\_lytS and 3'\_lytR (282 bp  
168 upstream *lytS* and 441 bp downstream *lytR*) (Table 2) and was ligated into the pCU1 plasmid  
169 (Augustin et al., 1992) at the EcoRI/BamHI restriction sites and subcloned into *E. coli* TOP10.  
170 After verification by PCR and sequencing of the vector pCU1:*lytSR*, this vector as well as the  
171 empty vector pCU1 were transformed into *S. lugdunensis* DSM $\Delta$ *lytSR* by protoplasts  
172 formation.

173

#### 174 **Triton X-100 induced autolysis**

175 Triton X-100-induced autolysis assay was performed as previously described (Brunskill and  
176 Bayles, 1996a). Briefly, cells were grown in TSB containing 1 M NaCl to mid-exponential  
177 phase (OD<sub>600 nm</sub> = 0.7) and 50 mL were pelleted by centrifugation. Cells were washed twice  
178 with 50 mL of ice-cold sterile water and resuspended in 50 mL of 0.05 M Tris-HCl (pH 7.2)  
179 containing 0.05% (vol/vol) Triton X-100. Cells were then incubated at 37 °C under shaking  
180 (180 rpm). The OD<sub>600 nm</sub> was measured at 15 min intervals for 1h, and then at 30 min intervals  
181 for 2 h to evaluate autolysis. All experiments were conducted using at least three biological  
182 replicates.

183

#### 184 **Antibiotic time-kill assays**

185 For time-kill kinetic assays, bacteria were subcultured in Mueller-Hinton broth (MHB) to early  
186 exponential phase (3 h), diluted to approximately 5 x 10<sup>5</sup> CFU/mL in MHB containing  
187 antimicrobial agents, and incubated for 24 h at 37°C (National Committee for Clinical  
188 Laboratory Standards, 1999). Penicillin G, vancomycin or teicoplanin were added to a final  
189 concentration equivalent to ten times their MICs (i.e. final concentration of 0.64 mg/L for  
190 penicillin G, 10 mg/L for vancomycin and 2.5 mg/L for teicoplanin). Bacterial counts were  
191 performed just before, at 6 and at 24 h after antibiotic addition. A 1 mL aliquot was taken and  
192 serially diluted in 0.9% sodium chloride, and viable cells were quantified by plating dilutions

193 on TSA. All experiments were repeated at least three times. Tolerance was defined as a <3-  
194 log<sub>10</sub> reduction of the bacterial count after 24 h according to CLSI guidelines (National  
195 Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999).

196

### 197 **Biofilm assays and confocal laser scanning microscopy (CLSM)**

198 Overnight cultures of *S. lugdunensis* WT and mutant strains grown in TSB supplemented with  
199 1% glucose (TSB<sub>1%glc</sub>) were adjusted to an OD<sub>600nm</sub> of 0.01 in TSB<sub>1%glc</sub>. Cultures were  
200 distributed in triplicate into 6-well flat-bottom plate. After 24 h incubation at 37 °C, cells were  
201 washed gently two times with sterile distilled water and stained with SYTO® 9 and propidium  
202 iodide (PI) (Live/Dead kit, Thermo Fisher Scientific). The architecture of biofilms were  
203 observed with a confocal laser scanning microscope (Leica TCS SP2). CLSM z-stack  
204 processing was performed using the Leica Confocal Software. Measurements of the biofilms  
205 produced were performed using the IMARIS software (Bitplane, Belfast, Ireland), calculating  
206 the biomass and the percentage of cells labeled by SYTO® 9 and PI. Each confocal experiment  
207 was repeated a minimum three times. Statistical significance was calculated by the non-  
208 parametric Kruskal-Wallis test; *P* value <0.05 was considered as significant.

209

### 210 ***Caenorhabditis elegans* virulence assays**

211 The *Caenorhabditis elegans* wild-type Bristol strain N2 was obtained from the *Caenorhabditis*  
212 Genetics Center (Minneapolis, MN, USA). *C. elegans* worms were maintained under standard  
213 culturing conditions at 23°C on nematode growth medium (NGM; 3 g NaCl, 2.5 g peptone, 17  
214 g agar, 5 mg cholesterol, 1 mL 1 M CaCl<sub>2</sub>, 1 mL 1 M MgSO<sub>4</sub>, 25 mL 1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O to 1  
215 liter) agar plates with *Escherichia coli* OP50 as a food source. Synchronous cultures of worms  
216 were generated as previously described (Blier et al., 2011), and used for both slow-killing assay  
217 and liquid killing assay.

218

219 Bacterial lawns used for *C. elegans* survival slow killing assays were prepared by spreading 50  
220 µL of DSM WT or DSMΔ*lytSR* strains on 35 mm NGM conditioned Petri dishes supplemented  
221 with both 0.05 mg/ml of 5-fluoro-2'-deoxyuridine and 5 µmol/L of tryptophan. The plates were  
222 incubated overnight at 37 °C and then placed at room temperature for 4 h. Fifteen to twenty L4  
223 (48 hours old) synchronized nematodes were harvested with M9 solution (3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 g  
224 NaHPO<sub>4</sub>, 5 g NaCl, 1 mL 1 M MgSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O to 1 litre), placed on the 35 mm assay Petri dishes  
225 and incubated at 23 °C. *C. elegans* survival was scored at 1 h, 24 h and each subsequent day

226 until death, using an Axiovert S100 optical microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany)  
227 equipped with a Nikon digital Camera DXM 1200F (Nikon Instruments, Melville, NY, USA).  
228 The nematodes were considered dead when they remained static without grinder movements  
229 for 20 s or did not respond to light flashes. The results were expressed as the percentage of  
230 living nematodes, and correspond to the average of two independent assays. Nematode survival  
231 was calculated by the Kaplan-Meier method, and survival differences were tested for  
232 significance by using the log rank test (GraphPad Prism version 4.0; GraphPad Software, San  
233 Diego, California, USA).

234

235 A liquid killing assay (Chua et al., 2014) was also performed using the supernatants from  
236 overnight cultures. Volumes of 80  $\mu$ L were distributed onto microtiter plate wells. Immediately  
237 after, 20  $\mu$ L of M9 solution containing fifteen to twenty L4 (48 hours old) synchronized worms  
238 were added to the bacterial supernatants and incubated at 23 °C. Exact worm number was  
239 immediately determined (t = 0 h), and worm survival was scored at different time points (24,  
240 48 and 120 h) using an Axiovert S100 optical microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). Each  
241 value reported for the assays is the mean measurement for six replicates of six independent  
242 preparations. The nonparametric Mann–Whitney U-test was used to compare the means within  
243 sets of experiment.

244

#### 245 **HaCaT cells cytotoxicity tests**

246 The direct cytotoxicity activity of the bacteria was studied using the human keratinocyte cell  
247 line HaCaT (Eppelhein, Germany) as previously described (N'Diaye et al., 2016). Briefly,  
248 HaCaT cells were grown at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, in Dulbecco's modified Eagle's  
249 medium (DMEM, Lonza, Levallois-Perret, France) supplemented with 10% fetal calf serum  
250 and 1% antibiotic cocktail (HyClone Thermo Scientific, Illkirch, France). Cells were used  
251 between passages 41 and 65. One day before use, the HaCaT cells were starved of antibiotic  
252 and fetal calf serum. The cells were incubated for 24 h with bacteria at a multiplicity of infection  
253 (MOI) of 10:1. Bacterial cytotoxicity was determined by measurement of lactate dehydrogenase  
254 (LDH) release. LDH is a stable cytosolic enzyme that diffuses into the culture medium upon  
255 cell lysis and was measured using a Cytotox 96 assay (Promega, Charbonnières-Les-Bains,  
256 France). Each experiment was done in biological triplicate.

257

#### 258 **RNA extraction and quantitative real-time PCR (qRT-PCR)**

259 Cells were grown in TSB at 37°C under shaking conditions (150 rpm). One mL was centrifuged  
260 (5 min at 8,000xg, 4°C) at different time points (4, 6, 8 and 24 h). RNA were extracted using  
261 the NucleoSpin® RNA kit (Macherey Nagel, Hoerdt, France) according to the manufacturer's  
262 instructions. The cDNA synthesis was then performed using the Omniscript® RT kit (Qiagen,  
263 Hilden, Germany), as previously described (Dahyot et al., 2019). To valid the differential gene  
264 expression obtained by microarray, qRT-PCR was carried out using a CFX96 real-time PCR  
265 detection system (Bio-Rad) with SYBR® Green PCR Master Mix (Bio-Rad, Marnes la  
266 Coquette, France), 1 µl of diluted cDNA template and primers listed in Table 2 in 20 µL PCR  
267 mixtures. Cycling conditions were one initial denaturation step at 95°C for 10min, followed by  
268 40 cycles of amplification including denaturation at 95°C for 30s, annealing at T<sub>m</sub> depending  
269 on the primers for 30s, and extension at 72°C for 30s. Relative expression of genes was  
270 quantified using the gene expression analysis module of the CFX Manager™ software, with  
271 16S rRNA gene as reference to normalize the results. All experiments were performed in at  
272 least three independent RNA preparations, and the results are presented as the mean ± the  
273 standard error of the mean.

274

#### 275 **RNA extraction and sample preparation for microarray**

276 To decipher the mechanisms affected by the deletion of the *lytRS* genes, the transcriptome of  
277 the  $\Delta$ *lytSR* and WT strains was compared by DNA microarray at 6h and 8 h of growth. *S.*  
278 *lugdunensis* was grown in TSB and cells were collected at 6 and 8 h of growth. Total RNA was  
279 extracted using the RNeasy Mini kit (Qiagen) following the manufacturer's procedure. Two  
280 DNase treatments were successively performed using DNase I (Sigma) and Turbo DNA free  
281 (Thermo Fisher Scientific). The quality of RNA was evaluated using the RNA 6000 Nano with  
282 a Bioanalyzer (Agilent, Les Ulis, France). The preparation of the samples and array processing  
283 were performed using the Two-color Microbased Exon Analysis kit (Agilent) following the  
284 manufacturer's procedures. Briefly, cRNA was labelled with either Cy3 or Cy5 before being  
285 quantified and co-hybridized on the microarray. The custom-made *S. lugdunensis* GeneChips  
286 (Agilent) used in this study were generated based on the DNA sequences from two publicly  
287 available genomes, *S. lugdunensis* N920143 and HKU09-01 strains (Heilbronner et al., 2011;  
288 Tse et al., 2010). Then, the microarray was washed and scanned. Genes with significant  
289 different expression ( $P \leq 0.05$ ) were selected based on at least a 2 fold change in expression  
290 level. The genes identifies were grouped following the classification established in KEGG  
291 pathway database (<http://www.kegg.com>).

## 292 **Results**

### 293 ***In silico* and transcription analyses of *lytSR* locus**

294 We first amplified and sequenced the *lytSR* region of the *S. lugdunensis* DSM 4804 strain.  
295 Sequence analysis revealed a 1755-nucleotide *lytS* open reading frame (ORF) immediately  
296 followed by a 762-nucleotide *lytR* ORF. BLAST searches indicated 67% homology with the  
297 *lytSR* operon of *S. aureus* strain NCTC5661 and 69% with the *S. epidermidis* ATCC 12228  
298 strain (Zhang et al., 2003). The transcription start site was tentatively located 63 pb upstream  
299 of the *lytS* gene, preceded by a canonical -10 element (TGTTAAAAT) and near-canonical -35  
300 element (TTAACA). A consensus ribosome-binding site (GGGAG) was found nine bp  
301 upstream of the *lytS* ATG start codon.

302

303 The predicted amino acid sequence of the *lytS* gene product (LytS) contains 584 amino acids  
304 corresponding to 64.83 kDa. This protein shares 77% and 71% amino acid sequence identity  
305 which those of *S. aureus* and *S. epidermidis* respectively. The *lytR* gene encodes a putative 253  
306 amino acid protein (29.4 kDa) which shares 64% and 63% amino acid identity with the LytR  
307 protein of *S. aureus* and *S. epidermidis* respectively. The predicted LytS and LytR proteins  
308 share putative conserved domains with members of a two-component regulatory system,  
309 namely a sensor histidine kinase protein and a response regulator transcription factor  
310 respectively. Sequence analysis revealed 510 bp downstream *lytR* the presence of the two genes  
311 *lrgA* and *lrgB* predicted to encode two antiholone-like proteins.

312

313 To determine whether *lytS*, *lytR*, *lrgA* and *lrgB* genes are temporally regulated, RNA was  
314 extracted from *S. lugdunensis* DSM 4804 culture at various time points. Transcription of the  
315 *lytS* and *lytR* genes appeared maximal at 6 h growth (mid-exponential phase), whereas that of  
316 the *lrgA* and *lrgB* genes reached its maximum at 8 h (late exponential phase) (data not shown).  
317 A fragment overlapping the genes *lytS* and *lytR* was obtained by RT-PCR analysis, indicating  
318 that these genes are co-transcribed (data not shown).

319

### 320 **Construction of *S. lugdunensis* $\Delta$ *lytSR* strain and the complemented strains**

321 To investigate the roles of LytSR in *S. lugdunensis*, a DSM $\Delta$ *lytSR* strain was generated by  
322 homologous recombination. We verified by PCR that the  $\Delta$ *lytSR* strain presented the 1200-bp  
323 deletion at the *lytSR* locus. In order to exclude a polar effect of this deletion, we carried out the  
324 complementation of the  $\Delta$ *lytSR* strain using the plasmid pCU1:*lytSR*. The  $\Delta$ *lytSR* strain

325 containing the plasmid pCU1 was used as a negative control. All four strains showed similar  
326 growth rate in TSB medium with no difference in cell viability (i.e. no difference in CFU/mL  
327 counts when incubated 48 h at 37°C) (Fig. 1).

328

### 329 **Implication of LytSR in autolysis**

330 To determine the contribution of LytSR in the regulation of autolysis, Triton X-100-induced  
331 autolysis of *S. lugdunensis* WT and the  $\Delta$ *lytSR* strain was measured. Autolysis monitoring  
332 revealed no difference between both strains, while *S. lugdunensis*  $\Delta$ *atlL* strain used as a negative  
333 control (Gibert et al., 2014) showed increased resistance to autolysis (Fig. 2).

334

### 335 **Impact of *lytSR* deletion on antibiotic-induced killing**

336 The possible role of LytSR in antibiotic-induced cell death was assessed by time-kill kinetic  
337 assays. A  $\beta$ -lactam (penicillin G) and two glycopeptides (vancomycin and teicoplanin), which  
338 interfere with the peptidoglycan biosynthesis, were used. The MICs of these antibiotics were  
339 the same for the WT and the mutant strains (data not shown). Penicillin or glycopeptides were  
340 added to early exponential growth cultures at a lytic concentration (10 times their MICs) and  
341 the rate of living cells was determined. The decrease in bacterial counts was not significantly  
342 different between the WT and the mutant strains, exposed to either penicillin or glycopeptides,  
343 for 6 h and 24 h (Fig. 3 and Table 3). Penicillin was bactericidal with a 5-log CFU/mL reduction  
344 after 24 h exposure for both strains. On the contrary, the WT strain was tolerant to  
345 glycopeptides, a phenomenon also observed for the  $\Delta$ *lytSR* strain (i.e.  $\Delta$ logCFU/mL <3 at 24  
346 h).

347

### 348 **Impact of *lytSR* deletion on biofilm formation**

349 We examined the biofilm architecture and the cell viability of the WT, the mutant and the  
350 complemented strains using CLSM. With the Live/Dead viability staining method, bacteria  
351 with intact cell membranes were stained in green, whereas bacteria with damaged membranes  
352 were stained in red. Firstly, we observed that the mature biofilm of the WT strain contained  
353 typical tower structures (Fig. 4A) that were not observed in the biofilm of the  $\Delta$ *lytSR* strain  
354 (Fig. 4B). Complementation with *lytSR* partially restored these structures (Fig. 4C). The total  
355 biomass of the biofilm was two-fold lower for the mutant strain compared to that of the WT  
356 strain. Moreover, the percentage of dead cells was significantly increased in the biofilm of the  
357  $\Delta$ *lytSR* strain (5.68%) compared to the parental strain (1.06%) ( $P < 0.05$ , Kruskal-Wallis test).

358

359 **Impact of *LytSR* on virulence towards *Caenorhabditis elegans***

360 We assessed the effect of the *lytSR* deletion on pathogenesis of *S. lugdunensis* using the *C.*  
361 *elegans* infection model. The slow killing test showed that when worms were in contact with  
362 the WT strain as the sole source of food, it took 15 days to kill 50 % of *C. elegans* (Fig. 5A).  
363 Interestingly, the survival of *C. elegans* in the presence of the  $\Delta$ *lytSR* strain was significantly  
364 increased ( $P < 0.0001$ ), with 19 days required for 50% of the worms to die (Fig. 5A). In contrast,  
365 no difference in the survival kinetics of *C. elegans* was observed between the mutant and the  
366 WT strains in liquid medium (Fig. 5B).

367

368 **Cytotoxicity towards HaCaT cells *in vitro***

369 We evaluated the cytotoxicity of *S. lugdunensis* WT and  $\Delta$ *lytSR* strains, as well as the  
370 complemented strains, towards the human keratinocyte cell line HaCaT. The release of LDH  
371 by HaCaT reflecting cell necrosis was identical for all strains (Fig. 6) 24 h post infection.

372

373 **Transcriptional profiling of *S. lugdunensis*  $\Delta$ *lytSR* strain**

374 To identify genes regulated by the *LytSR* two-component regulatory system, a transcriptional  
375 profile analysis of the WT and  $\Delta$ *lytSR* strains was performed. RNA samples were isolated from  
376 both strains at mid-exponential phase (6 h) and late-exponential phase (8 h) of growth,  
377 corresponding respectively to the maximal expression of *lytSR* and *lrgAB* determined by qRT-  
378 PCR analyses as described in the section “*In silico* and transcription analyses of *lytSR* locus”.  
379 Overall, the deletion of *lytSR* affected the expression of 244 genes compared to the WT strain  
380 with a threshold of at least twofold change (Table 4). The expression of 124 genes was affected  
381 at 6 h (79 upregulated and 45 downregulated), and 174 genes at 8 h (108 upregulated and 66  
382 downregulated). Some genes were upregulated ( $n = 9$ ) or downregulated ( $n = 9$ ) at both times.  
383 Transcription of *lrgAB* operon was the most dramatically impacted by the deletion, with *lrgA*  
384 and *lrgB* expression at 8 h in the  $\Delta$ *lytSR* strain being decreased of 195 and 162 fold respectively.

385

386 The main genes identified as being upregulated in the  $\Delta$ *lytSR* strain included those involved in  
387 the nitrate and nitrite metabolism (*narGHIJ* and *nirBD*), pyruvate metabolism (*cidC*,  
388 SLUG\_09450, SLUG\_02280 to SLUG\_02310), amino acid degradation (SLUG\_09450,  
389 SLUG\_09450, SLUG\_13970, SLUG\_13950...) and nitrogenous bases synthesis (*nrdD*, *rpoE*  
390 *tmk*...) (Table 4). Interestingly, a large number of genes encoding putative membrane proteins



391 ( $n = 24$ ) were upregulated in the  $\Delta$ *lytSR* strain, including surface-anchored proteins (*fbl*, *slsB*  
392 and *slsC*) and iron siderophore uptake proteins (*sstABD*).

393

394 In contrast, genes downregulated in the  $\Delta$ *lytSR* strain were involved in the pathways of amino  
395 acid biosynthesis (*thrBC*, SLUG\_15840, SLUG\_15710, SLUG\_15720, SLUG\_15840,  
396 SLUG\_20810...), nitrogen base degradation (*xpt*, *pyn*, *guaAB*...) and DNA replication  
397 pathways (*dnaC* and SLUG\_13250) (Table 4). Genes encoding putative exported proteins ( $n =$   
398 10) were downregulated, including two genes coding autolysins (*atlL* and SLUG\_11580),  
399 CAAX amino terminal protease family protein and two putative secretory antigen precursors  
400 (SLUG\_07310 and SLUG\_21330) homologous to the extracellular immune dominant protein  
401 staphylococcal secretory antigen A SsaA. Moreover, down-regulation of genes encoding  
402 putative virulence factors was observed, like those of the type VII secretion system (*essB*, *esaB*  
403 and *essA*) or transcriptional regulators (*mgrA* and *sarR*).

404

405 The results of the microarray data were confirmed by qRT-PCR for the three genes (*lrgA*, *lrgB*  
406 and *cidA*) whose transcription was the most impacted by the deletion (Table 5).

407

## 408 Discussion

409 In any biofilm there is a variable proportion of cells that lyse and release genomic DNA.  
410 Because of its adhesive properties, this eDNA plays a key role in the biofilm matrix. In *S. aureus*  
411 and *S. epidermidis*, this process is regulated by operons *cidABC* and *lrgAB*, under the control  
412 of two regulators, CidR and TCS LytSR respectively (Sadykov and Bayles, 2012). Because the  
413 LytSR TCS has been identified as a regulator of cell death and lysis in staphylococcal biofilms,  
414 we have assumed that it could also be involved in the control of these processes in  
415 *S. lugdunensis*, which is a particularly virulent species (Argemi et al., 2017; Frank and Patel,  
416 2007; Pereira et al., 2012). In order to explore the role of this TCS, a *lytSR* knock-out mutant  
417 of the WT biofilm-forming strain *S. lugdunensis* DSM 4804 (Freney et al., 1988) was generated  
418 and studied.

419  
420 Firstly, no difference in the growth kinetics and cell viability was observed between the mutant  
421 and the parental strain, indicating that *lytSR* is not essential for bacterial growth in  
422 *S. lugdunensis*, as observed for *S. epidermidis* (Zhu et al., 2010). In order to determine whether  
423 the *lytSR* deletion had an impact in bacterial autolysis, we performed autolysis assays with  
424 Triton X-100, a detergent known to remove the inhibition exerted by lipoteichoic acids on the  
425 general bacterial autolytic system. The *S. lugdunensis*  $\Delta$ *lytSR* strain exhibited the same Triton  
426 X-100-induced autolysis rate as the WT strain, revealing that LytSR was not implicated in this  
427 induced autolysis for the *S. lugdunensis* DSM 4804 strain. This result is similar to that obtained  
428 for the *S. epidermidis* 1457 $\Delta$ *lytSR* strain (Zhu et al., 2010). Interestingly, for *S. aureus*, this  
429 characteristic appears to be strain-dependent, since the *S. aureus* UAMS-1 *lytS* knockout mutant  
430 does not show an increased Triton X-100 induced lysis (Sharma-Kuinkel et al., 2009) whereas  
431 the LytSR system plays an important role in autolysis of the *S. aureus* RN4220 strain (Brunskill  
432 and Bayles, 1996a). Thus, effects of LytSR on autolysis seems to depend on the genetic  
433 backgrounds of staphylococcal strains.

434  
435 In the same way, our work has showed that LytSR was not involved in death induced by  
436 antibiotics targeting cell wall synthesis such as penicillin G and glycopeptides. Of note, the  
437 *lytSR* deletion did not increase sensitivity to the killing effects of glycopeptides towards the *S.*  
438 *lugdunensis* DSM 4804 strain which is tolerant to glycopeptides (Bourgeois et al., 2007).  
439 However, it could be highlighted that the time-kill kinetic experiments were conducted as  
440 recommended by CLSI on cells growing in early-exponential phase (3 h) (National Committee

441 for Clinical Laboratory Standards, 1999), a time at which *lytSR* and especially *lrgAB* operons  
442 were poorly expressed. For *S. aureus*, it has been described that a *lrgAB* deletion enhanced  
443 penicillin-induced killing of cells approaching the stationary growth phase, the time at which  
444 the *lrgAB* operon is maximally expressed, whereas it did not affect penicillin-induced killing of  
445 cells growing in early-exponential phase, a time at which *lrgAB* expression is minimal  
446 (Groicher et al., 2000). Thus, in order to further study whether the deletion of *lytSR* could also  
447 promote antibiotic-induced killing in *S. lugdunensis*, it would be interesting to carry out these  
448 experiments with cells reaching the late exponential phase.

449

450 Since biofilm formation is one of the main determinants of *S. lugdunensis* pathogenicity  
451 (Argemi et al., 2017; Frank et al., 2008), the effect of *lytSR* deletion on biofilm formation was  
452 further investigated. Our results revealed the involvement of LytSR on biofilm production since  
453 the  $\Delta$ *lytSR* strain produced significantly less biofilm than the parental strain. Moreover, CLSM  
454 analyses showed that the mutation disrupted the normal architecture of the biofilm, with a lack  
455 of tower structures. Interestingly, a study has shown that *lrgAB* is specifically expressed within  
456 tower structures during *S. aureus* biofilm formation (Moormeier et al., 2013). Live/dead  
457 staining showed a higher rate of red fluorescence inside the mutant biofilm, which is in favor  
458 of a decrease of cell viability. Thus, the impaired biofilm formation of the mutant does not seem  
459 related to a reduced cell lysis, even if to confirm this fact it would be necessary to quantify  
460 eDNA levels inside biofilms. These results are in contradiction with those obtained for other  
461 staphylococcal species. For *S. aureus*, a *lytS* mutant as well as a *lrgAB* mutant produced more  
462 adherent biofilm with increased levels of eDNA in the biofilm matrix (Mann et al., 2009;  
463 Sharma-Kuinkel et al., 2009). For *S. epidermidis*, a *lytSR* mutant produced more biofilm but  
464 contained a significantly decrease in the rate of dead cells inside (Zhu et al., 2010). Thus, LytSR  
465 is involved in controlling the formation of staphylococcal biofilms, but the pathways of  
466 involvement appear to depend on the species.

467

468 In order to evaluate the involvement of LytSR in the *in vivo* pathogenicity of *S. lugdunensis*,  
469 the *C. elegans* nematode was used as a host model organism. This model was chosen because  
470 *C. elegans* has already been successfully used for the study of host-pathogen interactions,  
471 especially for *S. aureus* (Sifri et al., 2003). We first used a slow killing test to observe  
472 nematodes' death after bacterial colonization of the intestine. The mutant strain showed  
473 significant attenuation of virulence compared to the WT strain. This observation could be

474 related to its lower ability to form biofilm in the nematode's intestine (Tan et al., 1999). On the  
475 contrary, no difference in liquid killing assay or LDH release by HaCaT cells was observed,  
476 which can be in favor of similar release of toxins or yet unknown cytoplasmic virulence factors  
477 by both strains.

478

479 Another part of this study focused on the impact of *lytSR* on global gene expression by  
480 transcriptomic analysis. Two time points were studied, at 6 h of growth equivalent to the mid-  
481 exponential phase when the expression of *lytSR* was maximal and at 8 h equivalent to the late  
482 exponential phase when that of *lrgAB* was maximal. Of note, it was also found that *lrgAB*  
483 operon transcription of *S. aureus* appeared maximal when cells entered stationary phase  
484 (Groicher et al., 2000). Transcription of *lrgAB* was constitutively decreased drastically in  
485  $\Delta$ *lytSR* strain, indicating that the operon was activated by LytSR in *S. lugdunensis*. This is  
486 consistent with what is described for *S. aureus* and *S. epidermidis* (Sharma-Kuinkel et al., 2009;  
487 Zhu et al., 2010).

488

489 In addition, DNA microarray analyses revealed that LytSR TCS regulates expression of a wide  
490 variety of genes involved in major cellular processes like metabolism of carbohydrates,  
491 nucleotides, and amino acids as well as energy metabolism. These results were also observed  
492 for other staphylococcal species (Sharma-Kuinkel et al., 2009; Zhu et al., 2010), suggesting that  
493 LytSR could affect cell viability and environmental adaptation by regulating the expression of  
494 genes controlling the bacterial metabolic state. Unlike *S. epidermidis*, genes involved in  
495 pyruvate metabolism like the *cidC* gene that encodes a pyruvate:menequinone oxidoreductase  
496 were downregulated by LytSR. The higher expression level of *cidC* (2.7) in the *S. lugdunensis*  
497  $\Delta$ *lytSR* strain might partly explain the higher rate of dead cells observed in the  $\Delta$ *lytSR* biofilm.  
498 Indeed, in *S. aureus* CidC protein plays a major role in the bacterial programmed cell death  
499 during the stationary phase and in biofilm by converting intracellular pyruvate to acetate (Patton  
500 et al., 2005) which leads to cytoplasmic acidification and respiratory inhibition (Thomas et al.,  
501 2014). Overflow metabolism and specifically the balance between acetate and acetoin determines  
502 the fate of *S. aureus* cells (van den Esker et al., 2017). LytSR could therefore belong to the  
503 regulatory networks implicated in the connection between programmed cell death and  
504 metabolism in *S. lugdunensis*.

505

506 More surprisingly, our results revealed that LytSR was involved in the regulation of genes  
507 encoding putative virulence factors. It seems to downregulate a great number of genes encoding  
508 putative membrane proteins as well as surface-anchored proteins including the *S. lugdunensis*  
509 surface proteins (SlsB and SlsC) (Heilbronner et al., 2011) and Fbl, the main fibrinogen-binding  
510 protein of *S. lugdunensis* (Marlinghaus et al., 2012). Moreover, the genes *sstABD* encoding  
511 putative iron siderophore uptake proteins were shown to be downregulated by LytSR. The  
512 SstABCD ABC transporter is essential to use catechols and catecholamines as an iron source  
513 and therefore to staphylococcal survival and virulence (Beasley et al., 2011).

514

515 Among the genes upregulated in a *lytSR*-dependant manner, are genes encoding putative  
516 exported proteins. Especially the *atll* gene coding the bifunctional autolysin Atll (Gibert et al.,  
517 2014; Hussain et al., 2015) as well as SLUG\_11580 encoding a putative autolysin were  
518 downregulated in the  $\Delta$ *lytSR* strain. However, our study did not show any involvement of LytSR  
519 in autolysis, suggesting that other systems might be involved in the control of autolysins in  
520 *S. lugdunensis*. For example, in *S. epidermidis*, *atlE* transcription is regulated by *agr* (Vuong et  
521 al., 2003), a system also described in *S. lugdunensis* (Vandenesch et al., 1993) but not yet  
522 functionally characterized. Interestingly, genes encoding the putative type VII secretion system  
523 (*essB*, *esaB* and *essa*) of *S. lugdunensis* were also upregulated. These genes have been described  
524 by Warne et al. as homologous to those of *S. aureus*. This secretion system is implicated in the  
525 excretion of extracellular proteins across *S. aureus* cell membranes and has been associated  
526 with virulence, especially in abscess development (Warne et al., 2016). Several other genes  
527 encoding putative virulence factors have been shown to be upregulated by LytSR, like the  
528 CAAX amino terminal protease family proteins described as putative membrane-bound  
529 metalloproteases (Pei and Grishin, 2001), secretory antigen precursor homologous to the  
530 extracellular immune dominant protein SsaA postulated to be involved in *S. epidermidis*  
531 biofilm-associated infections (Lang et al., 2000), or the peptide methionine sulfoxide reductase  
532 MsrA which is implicated in oxidative stress tolerance and virulence in *S. aureus* (Singh et al.,  
533 2015, 2018). Of note, apart from *atll*, no gene involved in *S. lugdunensis* biofilm formation,  
534 such as *isdC* (Missineo et al., 2014) or *comEB* (Rajendran et al., 2015), were upregulated by  
535 LytSR. Decreased capacity of the  $\Delta$ *lytSR* strain to form biofilm could therefore be related to the  
536 downregulation of *atll* (Gibert et al., 2014), and *ssaA* (Lang et al., 2000; Resch et al., 2005) or  
537 be indirectly linked to the altered metabolic state of the cells.

538

539 Lastly, LytSR was shown to upregulate (SarA family) and downregulate (IclR, MerR and GntR  
540 families) the transcription of several other transcriptional regulators controlling a wide diversity  
541 of metabolic processes and virulence (Jenul and Horswill, 2018; Rodionov, 2007). Further  
542 studies are necessary to determine whether the involvement of LytSR in the transcription of  
543 genes described here is direct or indirect through interaction with other regulators. Especially,  
544 electrophoretic gel shift assays could be conducted to determine whether the LytR response  
545 regulator binds directly to the promoter regions of its target genes.

546

## 547 **Conclusion**

548 This study is the first to characterize a two-component regulatory system in *S. lugdunensis*, a  
549 particularly virulent CoNS. Our results demonstrate that LytSR plays a significant role in the  
550 biofilm formation of *S. lugdunensis*, probably in connection with cell death and metabolism.  
551 Transcriptional analyses sheds new light on putative virulence factors of *S. lugdunensis* that  
552 could be regulated by LytSR. Furthermore, LytSR appears to play a role in the virulence of  
553 *S. lugdunensis*, as evidenced by the *in vivo* model of *C. elegans* infection, but this deserves to  
554 be confirmed for example in a rat endocarditis model. Overall, LytSR appears as a major TCS  
555 implicated in *S. lugdunensis* pathogenesis. Further studies of this regulatory system will be  
556 important to investigate how LytSR activation fits into the regulatory networks modulating *S.*  
557 *lugdunensis* virulence.

558 **Acknowledgements**

559 Images were obtained on PRIMACEN (<http://primacen.crihan.fr>), the Cell Imaging Platform of  
560 Normandy, IRIB, Faculty of Sciences, University of Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, F-  
561 France.

562

563 **Conflict of interests**

564 Competing financial interests: The authors declare that they have no competing interests.

565

566 **Author contributions statement**

567 SD, VO and MPC designed the study. JMF, VO and YZ performed microarrays analyses. TC  
568 and OL performed cytotoxicity assays and *C. elegans* virulence assays. ED, JD, MN, SD, SL  
569 and VO performed all other experiments. SD, VO and MPC analyzed the data and wrote the  
570 manuscript. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

571

572

573

574 **References**

- 575 Anguera, I., Del Río, A., Miró, J. M., Martínez-Lacasa, X., Marco, F., Gumá, J. R., et al. (2005).  
576 *Staphylococcus lugdunensis* infective endocarditis: description of 10 cases and analysis of  
577 native valve, prosthetic valve, and pacemaker lead endocarditis clinical profiles. *Heart Br. Card.*  
578 *Soc.* 91, e10. doi:10.1136/hrt.2004.040659.
- 579 Arciola, C. R., Campoccia, D., Ravaioli, S., and Montanaro, L. (2015). Polysaccharide intercellular  
580 adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5, 7.  
581 doi:10.3389/fcimb.2015.00007.
- 582 Argemi, X., Prévost, G., Riegel, P., Provot, C., Badel-Berchoux, S., Jehl, F., et al. (2017). Kinetics of  
583 biofilm formation by *Staphylococcus lugdunensis* strains in bone and joint infections. *Diagn.*  
584 *Microbiol. Infect. Dis.* 88, 298–304. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2017.05.002.
- 585 Arnaud, M., Chastanet, A., and Débarbouillé, M. (2004). New vector for efficient allelic replacement in  
586 naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*  
587 70, 6887–6891. doi:10.1128/AEM.70.11.6887-6891.2004.
- 588 Augustin, J., Rosenstein, R., Wieland, B., Schneider, U., Schnell, N., Engelke, G., et al. (1992). Genetic  
589 analysis of epidermin biosynthetic genes and epidermin-negative mutants of *Staphylococcus*  
590 *epidermidis*. *Eur. J. Biochem.* 204, 1149–1154.
- 591 Bayles, K. W. (2007). The biological role of death and lysis in biofilm development. *Nat. Rev.*  
592 *Microbiol.* 5, 721–726. doi:10.1038/nrmicro1743.
- 593 Beasley, F. C., Marolda, C. L., Cheung, J., Buac, S., and Heinrichs, D. E. (2011). *Staphylococcus aureus*  
594 transporters Hts, Sir, and Sst capture iron liberated from human transferrin by Staphyloferrin A,  
595 Staphyloferrin B, and catecholamine stress hormones, respectively, and contribute to virulence.  
596 *Infect. Immun.* 79, 2345–2355. doi:10.1128/IAI.00117-11.
- 597 Beier, D., and Gross, R. (2006). Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr.*  
598 *Opin. Microbiol.* 9, 143–152. doi:10.1016/j.mib.2006.01.005.
- 599 Blier, A.-S., Veron, W., Bazire, A., Gerault, E., Taupin, L., Vieillard, J., et al. (2011). C-type natriuretic  
600 peptide modulates quorum sensing molecule and toxin production in *Pseudomonas aeruginosa*.  
601 *Microbiol. Read. Engl.* 157, 1929–1944. doi:10.1099/mic.0.046755-0.
- 602 Böcher, S., Tønning, B., Skov, R. L., and Prag, J. (2009). *Staphylococcus lugdunensis*, a common cause  
603 of skin and soft tissue infections in the community. *J. Clin. Microbiol.* 47, 946–950.  
604 doi:10.1128/JCM.01024-08.
- 605 Bourgeois, I., Pestel-Caron, M., Lemeland, J.-F., Pons, J.-L., and Caron, F. (2007). Tolerance to the  
606 glycopeptides vancomycin and teicoplanin in coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob.*  
607 *Agents Chemother.* 51, 740–743. doi:10.1128/AAC.00719-06.
- 608 Brunskill, E. W., and Bayles, K. W. (1996a). Identification and molecular characterization of a putative  
609 regulatory locus that affects autolysis in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 178, 611–618.
- 610 Brunskill, E. W., and Bayles, K. W. (1996b). Identification of LytSR-regulated genes from  
611 *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 178, 5810–5812.
- 612 Burgui, S., Gil, C., Solano, C., Lasa, I., and Valle, J. (2018). A Systematic Evaluation of the Two-  
613 Component Systems Network Reveals That ArlRS Is a Key Regulator of Catheter Colonization  
614 by *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.* 9, 342. doi:10.3389/fmicb.2018.00342.



- 615 Chua, S. L., Liu, Y., Yam, J. K. H., Chen, Y., Vejborg, R. M., Tan, B. G. C., et al. (2014). Dispersed  
616 cells represent a distinct stage in the transition from bacterial biofilm to planktonic lifestyles.  
617 *Nat. Commun.* 5, 4462. doi:10.1038/ncomms5462.
- 618 Dahyot, S., Lebeurre, J., Laumay, F., Argemi, X., Dubos, C., Lemée, L., et al. (2019). fbl-Typing of  
619 *Staphylococcus lugdunensis*: A Frontline Tool for Epidemiological Studies, but Not Predictive  
620 of Fibrinogen Binding Ability. *Front. Microbiol.* 10, 1109. doi:10.3389/fmicb.2019.01109.
- 621 Frank, K. L., Del Pozo, J. L., and Patel, R. (2008). From clinical microbiology to infection pathogenesis:  
622 how daring to be different works for *Staphylococcus lugdunensis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 21,  
623 111–133. doi:10.1128/CMR.00036-07.
- 624 Frank, K. L., and Patel, R. (2007). Poly-N-Acetylglucosamine Is Not a Major Component of the  
625 Extracellular Matrix in Biofilms Formed by icaADBC-Positive *Staphylococcus lugdunensis*  
626 Isolates. *Infect. Immun.* 75, 4728–4742. doi:10.1128/IAI.00640-07.
- 627 Freney, J., Brun, Y., Bes, M., Meugnier, H., Grimont, F., Grimont, P. A., et al. (1988). *Staphylococcus*  
628 *lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two species from human clinical  
629 specimens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 38, 168–172.
- 630 Gibert, L., Didi, J., Marlinghaus, L., Lesouhaitier, O., Legris, S., Szabados, F., et al. (2014). The major  
631 autolysin of *Staphylococcus lugdunensis*, AtlL, is involved in cell separation, stress-induced  
632 autolysis and contributes to bacterial pathogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 352, 78–86.  
633 doi:10.1111/1574-6968.12374.
- 634 Groicher, K. H., Firek, B. A., Fujimoto, D. F., and Bayles, K. W. (2000). The *Staphylococcus aureus*  
635 *lrgAB* operon modulates murein hydrolase activity and penicillin tolerance. *J. Bacteriol.* 182,  
636 1794–1801.
- 637 Haag, A. F., and Bagnoli, F. (2017). The Role of Two-Component Signal Transduction Systems in  
638 *Staphylococcus aureus* Virulence Regulation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 409, 145–198.  
639 doi:10.1007/82\_2015\_5019.
- 640 Heilbronner, S., Holden, M. T. G., van Tonder, A., Geoghegan, J. A., Foster, T. J., Parkhill, J., et al.  
641 (2011). Genome sequence of *Staphylococcus lugdunensis* N920143 allows identification of  
642 putative colonization and virulence factors: *Staphylococcus lugdunensis* genome sequence.  
643 *FEMS Microbiol. Lett.* 322, 60–67. doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02339.x.
- 644 Heldt Manica, L. A., and Cohen, P. R. (2017). *Staphylococcus lugdunensis* Infections of the Skin and  
645 Soft Tissue: A Case Series and Review. *Dermatol. Ther.* 7, 555–562. doi:10.1007/s13555-017-  
646 0202-5.
- 647 Hussain, M., Steinbacher, T., Peters, G., Heilmann, C., and Becker, K. (2015). The adhesive properties  
648 of the *Staphylococcus lugdunensis* multifunctional autolysin AtlL and its role in biofilm  
649 formation and internalization. *Int. J. Med. Microbiol.* 305, 129–139.  
650 doi:10.1016/j.ijmm.2014.11.010.
- 651 Jenul, C., and Horswill, A. R. (2018). Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. *Microbiol.*  
652 *Spectr.* 6. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018.
- 653 Kavanaugh, J. S., and Horswill, A. R. (2016). Impact of Environmental Cues on Staphylococcal Quorum  
654 Sensing and Biofilm Development. *J. Biol. Chem.* 291, 12556–12564.  
655 doi:10.1074/jbc.R116.722710.

- 656 Lang, S., Livesley, M. A., Lambert, P. A., Littler, W. A., and Elliott, T. S. (2000). Identification of a  
657 novel antigen from *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 29, 213–220.  
658 doi:10.1111/j.1574-695X.2000.tb01525.x.
- 659 Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., and Beloin, C. (2014). Biofilm-related infections: bridging the gap between  
660 clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol.*  
661 *Mol. Biol. Rev. MMBR* 78, 510–543. doi:10.1128/MMBR.00013-14.
- 662 Maira-Litrán, T., Kropec, A., Abeygunawardana, C., Joyce, J., Mark, G., Goldmann, D. A., et al. (2002).  
663 Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface  
664 polysaccharide. *Infect. Immun.* 70, 4433–4440.
- 665 Mann, E. E., Rice, K. C., Boles, B. R., Endres, J. L., Ranjit, D., Chandramohan, L., et al. (2009).  
666 Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm  
667 maturation. *PLoS One* 4, e5822. doi:10.1371/journal.pone.0005822.
- 668 Marlinghaus, L., Becker, K., Korte, M., Neumann, S., Gatermann, S. G., and Szabados, F. (2012).  
669 Construction and characterization of three knockout mutants of the *fbl* gene in *Staphylococcus*  
670 *lugdunensis*: CHARACTERIZATION OF ISOGENIC MUTANTS OF FBL. *APMIS* 120, 108–  
671 116. doi:10.1111/j.1600-0463.2011.02819.x.
- 672 Missineo, A., Di Poto, A., Geoghegan, J. A., Rindi, S., Heilbronner, S., Gianotti, V., et al. (2014). IsdC  
673 from *Staphylococcus lugdunensis* induces biofilm formation under low-iron growth conditions.  
674 *Infect. Immun.* 82, 2448–2459. doi:10.1128/IAI.01542-14.
- 675 Moormeier, D. E., Endres, J. L., Mann, E. E., Sadykov, M. R., Horswill, A. R., Rice, K. C., et al. (2013).  
676 Use of microfluidic technology to analyze gene expression during *Staphylococcus aureus*  
677 biofilm formation reveals distinct physiological niches. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 3413–  
678 3424. doi:10.1128/AEM.00395-13.
- 679 National Committee for Clinical Laboratory Standards (1999). *Methods for determining bactericidal*  
680 *activity of antimicrobial agents*. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory  
681 Standards.
- 682 N’Diaye, A., Mijouin, L., Hillion, M., Diaz, S., Konto-Ghiorghi, Y., Percoco, G., et al. (2016). Effect  
683 of Substance P in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Virulence:  
684 Implication for Skin Homeostasis. *Front. Microbiol.* 7. doi:10.3389/fmicb.2016.00506.
- 685 Neshet, L., Tarrand, J., Chemaly, R. F., and Rolston, K. V. (2017). *Staphylococcus lugdunensis*  
686 infections, filling in the gaps: a 3-year retrospective review from a comprehensive cancer center.  
687 *Support. Care Cancer Off. J. Multinat. Assoc. Support. Care Cancer* 25, 1063–1069.  
688 doi:10.1007/s00520-016-3493-7.
- 689 Patel, K., and Golemi-Kotra, D. (2015). Signaling mechanism by the *Staphylococcus aureus* two-  
690 component system LytSR: role of acetyl phosphate in bypassing the cell membrane electrical  
691 potential sensor LytS. *F1000Research* 4, 79. doi:10.12688/f1000research.6213.2.
- 692 Patton, T. G., Rice, K. C., Foster, M. K., and Bayles, K. W. (2005). The *Staphylococcus aureus* *cidC*  
693 gene encodes a pyruvate oxidase that affects acetate metabolism and cell death in stationary  
694 phase. *Mol. Microbiol.* 56, 1664–1674. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04653.x.
- 695 Patton, T. G., Yang, S.-J., and Bayles, K. W. (2006). The role of proton motive force in expression of  
696 the *Staphylococcus aureus* *cid* and *lrg* operons. *Mol. Microbiol.* 59, 1395–1404.  
697 doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05034.x.

- 698 Pei, J., and Grishin, N. V. (2001). Type II CAAX prenyl endopeptidases belong to a novel superfamily  
699 of putative membrane-bound metalloproteases. *Trends Biochem. Sci.* 26, 275–277.
- 700 Pereira, E. M., Teixeira, C. A. A., Alvarenga, A. L. M., Schuenck, R. P., Giambiagi-Demarval, M.,  
701 Holandino, C., et al. (2012). A Brazilian lineage of *Staphylococcus lugdunensis* presenting  
702 rough colony morphology may adhere to and invade lung epithelial cells. *J. Med. Microbiol.*  
703 61, 463–469. doi:10.1099/jmm.0.033001-0.
- 704 Rajendran, N. B., Eikmeier, J., Becker, K., Hussain, M., Peters, G., and Heilmann, C. (2015). Important  
705 contribution of the novel locus comEB to extracellular DNA-dependent *Staphylococcus*  
706 *lugdunensis* biofilm formation. *Infect. Immun.* 83, 4682–4692. doi:10.1128/IAI.00775-15.
- 707 Resch, A., Rosenstein, R., Nerz, C., and Götz, F. (2005). Differential gene expression profiling of  
708 *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Appl. Environ.*  
709 *Microbiol.* 71, 2663–2676. doi:10.1128/AEM.71.5.2663-2676.2005.
- 710 Rice, K. C., Mann, E. E., Endres, J. L., Weiss, E. C., Cassat, J. E., Smeltzer, M. S., et al. (2007). The  
711 cidA murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in  
712 *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 8113–8118.  
713 doi:10.1073/pnas.0610226104.
- 714 Rodionov, D. A. (2007). Comparative genomic reconstruction of transcriptional regulatory networks in  
715 bacteria. *Chem. Rev.* 107, 3467–3497. doi:10.1021/cr068309+.
- 716 Rohde, H., Burandt, E. C., Siemssen, N., Frommelt, L., Burdelski, C., Wurster, S., et al. (2007).  
717 Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of  
718 *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee  
719 joint infections. *Biomaterials* 28, 1711–1720. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.11.046.
- 720 Sadykov, M. R., and Bayles, K. W. (2012). The control of death and lysis in staphylococcal biofilms: a  
721 coordination of physiological signals. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 211–215.  
722 doi:10.1016/j.mib.2011.12.010.
- 723 Sharma-Kuinkel, B. K., Mann, E. E., Ahn, J.-S., Kuechenmeister, L. J., Dunman, P. M., and Bayles, K.  
724 W. (2009). The *Staphylococcus aureus* LytSR Two-Component Regulatory System Affects  
725 Biofilm Formation. *J. Bacteriol.* 191, 4767–4775. doi:10.1128/JB.00348-09.
- 726 Sifri, C. D., Begun, J., Ausubel, F. M., and Calderwood, S. B. (2003). *Caenorhabditis elegans* as a model  
727 host for *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Infect. Immun.* 71, 2208–2217.
- 728 Singh, V. K., Singh, K., and Baum, K. (2018). The Role of Methionine Sulfoxide Reductases in  
729 Oxidative Stress Tolerance and Virulence of *Staphylococcus aureus* and Other Bacteria.  
730 *Antioxid. Basel Switz.* 7. doi:10.3390/antiox7100128.
- 731 Singh, V. K., Vaish, M., Johansson, T. R., Baum, K. R., Ring, R. P., Singh, S., et al. (2015). Significance  
732 of four methionine sulfoxide reductases in *Staphylococcus aureus*. *PloS One* 10, e0117594.  
733 doi:10.1371/journal.pone.0117594.
- 734 Stewart, P. S., and Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet Lond.*  
735 *Engl.* 358, 135–138.
- 736 Szabados, F., Nowotny, Y., Marlinghaus, L., Korte, M., Neumann, S., Kaase, M., et al. (2011).  
737 Occurrence of genes of putative fibrinogen binding proteins and hemolysins, as well as of their  
738 phenotypic correlates in isolates of *S. lugdunensis* of different origins. *BMC Res. Notes* 4, 113.

- 739 Tan, M. W., Mahajan-Miklos, S., and Ausubel, F. M. (1999). Killing of *Caenorhabditis elegans* by  
740 *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proc. Natl. Acad.*  
741 *Sci. U. S. A.* 96, 715–720. doi:10.1073/pnas.96.2.715.
- 742 Thomas, V. C., Sadykov, M. R., Chaudhari, S. S., Jones, J., Endres, J. L., Widhelm, T. J., et al. (2014).  
743 A central role for carbon-overflow pathways in the modulation of bacterial cell death. *PLoS*  
744 *Pathog.* 10, e1004205. doi:10.1371/journal.ppat.1004205.
- 745 Tse, H., Tsoi, H. W., Leung, S. P., Lau, S. K. P., Woo, P. C. Y., and Yuen, K. Y. (2010). Complete  
746 Genome Sequence of *Staphylococcus lugdunensis* Strain HKU09-01. *J. Bacteriol.* 192, 1471–  
747 1472. doi:10.1128/JB.01627-09.
- 748 Tseng, C.-P., Cheng, J.-C., Tseng, C.-C., Wang, C., Chen, Y.-L., Chiu, D. T.-Y., et al. (2003). Broad-  
749 range ribosomal RNA real-time PCR after removal of DNA from reagents: melting profiles for  
750 clinically important bacteria. *Clin. Chem.* 49, 306–309.
- 751 van den Esker, M. H., Kovács, Á. T., and Kuipers, O. P. (2017). From Cell Death to Metabolism: Holin-  
752 Antiholin Homologues with New Functions. *mBio* 8. doi:10.1128/mBio.01963-17.
- 753 van der Mee-Marquet, N., Achard, A., Mereghetti, L., Danton, A., Minier, M., and Quentin, R. (2003).  
754 *Staphylococcus lugdunensis* Infections: High Frequency of Inguinal Area Carriage. *J. Clin.*  
755 *Microbiol.* 41, 1404–1409. doi:10.1128/JCM.41.4.1404-1409.2003.
- 756 Vandenesch, F., Projan, S. J., Kreiswirth, B., Etienne, J., and Novick, R. P. (1993). Agr-related  
757 sequences in *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 111, 115–122.  
758 doi:10.1111/j.1574-6968.1993.tb06370.x.
- 759 Vergara-Irigaray, M., Valle, J., Merino, N., Latasa, C., García, B., Ruiz de Los Mozos, I., et al. (2009).  
760 Relevant role of fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* biofilm-associated  
761 foreign-body infections. *Infect. Immun.* 77, 3978–3991. doi:10.1128/IAI.00616-09.
- 762 Vuong, C., Gerke, C., Somerville, G. A., Fischer, E. R., and Otto, M. (2003). Quorum-sensing control  
763 of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Infect. Dis.* 188, 706–718.  
764 doi:10.1086/377239.
- 765 Warne, B., Harkins, C. P., Harris, S. R., Vatsiou, A., Stanley-Wall, N., Parkhill, J., et al. (2016). The  
766 Ess/Type VII secretion system of *Staphylococcus aureus* shows unexpected genetic diversity.  
767 *BMC Genomics* 17, 222. doi:10.1186/s12864-016-2426-7.
- 768 Yang, S.-J., Rice, K. C., Brown, R. J., Patton, T. G., Liou, L. E., Park, Y. H., et al. (2005). A LysR-type  
769 regulator, CidR, is required for induction of the *Staphylococcus aureus* cidABC operon. *J.*  
770 *Bacteriol.* 187, 5893–5900. doi:10.1128/JB.187.17.5893-5900.2005.
- 771 Zhang, Y.-Q., Ren, S.-X., Li, H.-L., Wang, Y.-X., Fu, G., Yang, J., et al. (2003). Genome-based analysis  
772 of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228).  
773 *Mol. Microbiol.* 49, 1577–1593.
- 774 Zhu, T., Lou, Q., Wu, Y., Hu, J., Yu, F., and Qu, D. (2010). Impact of the *Staphylococcus epidermidis*  
775 LytSR two-component regulatory system on murein hydrolase activity, pyruvate utilization and  
776 global transcriptional profile. *BMC Microbiol.* 10, 287. doi:10.1186/1471-2180-10-287.

## Figure legends

### **Figure 1. Growth curves of *S. lugdunensis* WT, $\Delta$ lytSR and the complemented strains.**

Bacterial cultures were grown in TSB at 37 °C. Growth was monitored by measuring OD<sub>600 nm</sub> and viable cell counts were determined by plating diluted aliquots on TSA.

### **Figure 2. Triton X-100 autolysis assays of *S. lugdunensis* WT and derivatives ( $\Delta$ lytSR and $\Delta$ atlL) strains.**

Bacterial cells were collected from early exponentially growth (OD<sub>600 nm</sub> = 0.7) and resuspended in an equal volume of buffer containing 0.05% Triton X-100. The rate of autolysis was monitored at OD<sub>600 nm</sub>. The *S. lugdunensis* *atlL* deletion mutant was used as a negative control. Error bars represent the SD of 3 independent experiments.

### **Figure 3. Time-kill kinetics of (A) penicillin G, (B) vancomycin and (C) teicoplanin against *S. lugdunensis* WT and $\Delta$ lytSR strains.**

Antibiotics (10 times the MICs) were added to early exponential growth cultures of the strains. Viable bacterial counts were determined after 6 and 24 h of antibiotic exposure by plating diluted aliquots on TSA. Error bars represent the SD of 3 independent experiments.

### **Figure 4. Analysis of *S. lugdunensis* biofilm by confocal laser scanning microscopy (CLSM).**

The 24 h-mature biofilms of (A) *S. lugdunensis* WT, (B)  $\Delta$ lytSR, (C)  $\Delta$ lytSR(pCU1-lytSR) and (D)  $\Delta$ lytSR(pCU1) were visualized after Live/Dead staining under CLSM. Live cells stained with SYTO® 9 appear in green, while dead cells stained with propidium iodide are in red. The three-dimension structural images were reconstructed, and the amount of fluorescence of viable and dead cells were determined using Imaris software. The figures represent one of three independent experiments.

### **Figure 5. *S. lugdunensis* virulence toward *Caenorhabditis elegans* worms. (A) Kinetics of survival of *C. elegans* fed with WT and $\Delta$ lytSR strains in solid killing assay (slow killing).**

Each value is the mean of measurement of eight replicates from two independent preparations. Nematode survival was calculated by the Kaplan-Meier method, and survival differences were tested for significance by using the log rank test. The survival kinetics of *C. elegans* in the presence of  $\Delta$ lytSR strain was significantly increased ( $P < 0.0001$ ). (B) Liquid killing assay

(fast killing) of *C. elegans* exposed to the supernatant of WT,  $\Delta lytSR$ ,  $\Delta lytSR(pCU1)$  and  $\Delta lytSR(pCU1:lytSR)$  strains. Nematode survival was evaluated after 24, 48 and 120 h of exposure. Each value is the mean  $\pm$  SEM of measurement of eight replicates from six independent preparations. The nonparametric Mann–Whitney U-test was used to compare the means within the same set of experiment.

**Figure 6. Cytotoxicity towards HaCaT cells.** Comparative effect on the cytotoxicity of *S. lugdunensis* WT,  $\Delta lytSR$  and the complemented strains toward HaCaT keratinocytes. Cytotoxicity levels were measured by the release of lactate dehydrogenase (LDH). Histograms are expressed as mean  $\pm$  SEM. The results are representative of three independent experiments.

## Tables

**Table 1. Bacterial strains and plasmids**

Strain or plasmid	Description	Reference
<b>Strains</b>		
<i>S. lugdunensis</i>		
DSM 4804	Clinical axillary lymph node isolate	(Freney et al., 1988)
DSM $\Delta$ <i>lytSR</i>	<i>lytSR</i> mutant	This study
DSM $\Delta$ <i>lytSR</i> (pCU1)	<i>lytSR</i> mutant containing the empty cloning vector	This study
DSM $\Delta$ <i>lytSR</i> (pCU1 : <i>lytSR</i> )	<i>lytSR</i> complementary strain	This study
DSM $\Delta$ <i>atlL</i>	<i>atlL</i> mutant resistant to autolysis	(Gibert et al., 2014)
<i>E. coli</i>		
TOP10	Host strain for construction of recombinant plasmid	Invitrogen
<b>Plasmids</b>		
pMAD	temperature-sensitive shuttle vector; Amp <sup>R</sup> , Ery <sup>R</sup>	(Arnaud et al., 2004)
pCU1	shuttle vector; Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	(Augustin et al., 1992)

Amp<sup>R</sup>, Ampicillin resistance; Ery<sup>R</sup>, Erythromycin resistance; Cm<sup>R</sup>, Chloramphenicol resistance

**Table 2. Primers**

Primer	Sequence (5'- 3')	Restriction enzyme	Reference
<b><i>lytSR</i> deletion</b>			
lytS_EcoRI_F	AGGCTGAATTCATAATGAACCCACGATATTTAATGCTAG	EcoRI	
lytS_R	CGTGTGTTAGATTTATGCCATTGTGCCATACTCCCAAAAAAATATT		This study
lytR_F	TGGGAGTATGGCACAATGAGCATAAACTAACACACGAATCAAATG		
lytR_BamHI_R	ATTGGATCCCTGGCATTGGAAACGGTATAAAAAC	BamHI	This study
<b><i>lytSR</i> complementation</b>			
5'_lytS	AGGCTGAATTCAAAACCTGAGATGAATGATTGTATATTGAAAA	EcoRI	
3'_lytR	ATTGGATCCACATCCCCGACATACAAAAAACAC	BamHI	This study
<b>qRT-PCR analyses</b>			
lytS1_F	CCAGTGCCTGTTTCAGAGTTG		
lytS1_R	CACGACGATGCGATTCAATTAAC		This study
lytR1_F	TGCCATTATTGACGGTTACGG		
lytR2_R	AAACACGCATACGAAGCAAAC		This study
lytS2_F	GATGCGATTCAATTAACCTGTA		
lytR2_R	AAAATAATGTAAGGTGCATGT		This study
lrgA_F	ACGCTGTACCAACACTTTCAAC		
lrgA_R	CCAATGCCAGCTTCAGTAATAGG		This study
lrgB_F	CCAACGATAACGACTGCAATACTG		
lrgB_R	TTAGGCACAAGCGGACATACAC		This study
cidA_F	TAGCAGGCAGTATTGTAGGC		
cidA_R	ACCCGTCTTTCACCCATTG		This study
16S_F (Q3)	GAGGAAGGIGIGGAIGACGT		
16S_R (Q4)	AGICCCGIGAACGTATTCAC		(Tseng et al., 2003)



**Table 3. Effect of the *lytSR* deletion on antibiotic sensitivity.** Penicillin G or two glycopeptides, vancomycin and teicoplanin were added at a concentration of 10 times the MICs to early-exponential growth cultures of *S. lugdunensis* WT and  $\Delta$ *lytSR* strains. Viable bacterial counts were determined after 6 and 24 h by plating diluted aliquots on TSA. Data are means  $\pm$  SD of 3 independent experiments.

	Mean $\pm$ SD $\Delta$ logCFU/mL					
	Penicillin G		Vancomycin		Teicoplanin	
	6 h	24 h	6 h	24 h	6 h	24 h
WT	-4,36 $\pm$ 0,98	-5,48 $\pm$ 0,04	-0,92 $\pm$ 0,14	-2,55 $\pm$ 0,48	-1,23 $\pm$ 0,45	-2,13 $\pm$ 0,43
$\Delta$ <i>lytSR</i>	-2,88 $\pm$ 0,73	-5,31 $\pm$ 0,04	-0,60 $\pm$ 0,18	-1,91 $\pm$ 0,10	-1,39 $\pm$ 0,24	-1,66 $\pm$ 0,76

**Table 4. List of genes expressed differentially in strain DSM $\Delta$ lytSR compared to the wild-type strain**

Complete list of the 79 genes up-regulated at 6 h by the deletion of *lytSR*

Genes involved in	ORF number	Common gene name	Description or predicted function	Fold up-regulation
<b>1. Metabolism</b>				
<b>1.1. Overview</b>				
Carbon metabolism	SLUG_02290		dehydrogenase E1 component family protein	4,1
	SLUG_02310		2-oxoacid dehydrogenases acyltransferase family protein	4,1
	SLUG_02300		putative transketolase	3,7
	SLUG_02280		pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family protein	3,5
	SLUG_05050	<i>gntK</i>	putative gluconokinase	2,8
	SLUG_15030	<i>odhB</i>	dihydroloipoamide succinyltransferase E2 component of 2-ox...	2,6
	SLUG_04660		putative L-serine dehydratase, beta chain	
	SLUG_18900	<i>argG</i>		
	SLUG_18910	<i>argH</i>	putative argininosuccinate synthase	3,2
	SLUG_04660		putative L-serine dehydratase, beta chain	
<b>1.2. Carbohydrate metabolism</b>				
Glycolysis / Gluconeogenesis	SLUG_02290		dehydrogenase E1 component family protein	4,1
	SLUG_02310		2-oxoacid dehydrogenases acyltransferase family protein	4,1
	SLUG_02300		putative transketolase	3,7
	SLUG_02280		pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family protein	3,5
	SLUG_07050		PTS system, arbutin-like IIBC component	3,4
	SLUG_03770	<i>bglA</i>	6-phospho-beta-glucosidase	3,2
	SLUG_02290		dehydrogenase E1 component family protein	4,1
	SLUG_02310		2-oxoacid dehydrogenases acyltransferase family protein	4,1
	SLUG_02300		putative transketolase	3,7
	SLUG_02280		pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family protein	3,5
Citrate cycle (TCA cycle)	SLUG_15030	<i>odhB</i>	dihydroloipoamide succinyltransferase E2 component of 2-ox...	2,6
	SLUG_02290		dehydrogenase E1 component family protein	4,1
	SLUG_02310		2-oxoacid dehydrogenases acyltransferase family protein	4,1
	SLUG_02300		putative transketolase	3,7
Pyruvate metabolism	SLUG_02280		pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family protein	3,5
	SLUG_02310		2-oxoacid dehydrogenases acyltransferase family protein	4,1
	SLUG_02300		putative transketolase	3,7
	SLUG_02280		pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family protein	3,5
Fructose and mannose metabolism	SLUG_21010	<i>fruA</i>	PTS transport system, fructose-specific IIABC component	3,3
	SLUG_24140		glycosyl hydrolase family protein	2,9
Galactose metabolism	SLUG_22490	<i>tdcB</i>	putative threonine dehydratase	2,8
	SLUG_24140		glycosyl hydrolase family protein	2,9
Starch and sucrose metabolism	SLUG_22490	<i>tdcB</i>	putative threonine dehydratase	2,8
	SLUG_05050	<i>gntK</i>	putative gluconokinase	2,8
Pentose phosphate pathway			glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isome...	
	SLUG_09130	<i>glmS / gcaA</i>		2,7
<b>1.3. Energy metabolism</b>				
Nitrogen metabolism	SLUG_05970	<i>narG</i>	nitrate reductase beta chain	22,8
	SLUG_05970	<i>narG</i>	nitrate reductase alpha chain	14,8
	SLUG_05980	<i>narH</i>	respiratory nitrate reductase delta chain	19,0
	SLUG_05990	<i>narJ</i>		
	SLUG_06000	<i>narI</i>	putative nitrate reductase gamma chain	5,2
	SLUG_05940	<i>nasD / nasBC / nirB</i>	nitrite reductase large subunit	3,8
	SLUG_05950			
	SLUG_05960	<i>nasE</i>	tetrapyrrole (corrin/porphyrin) methylase family protein	5,0
	SLUG_05950	<i>nasE / nasBD / nirD</i>	assimilatory nitrite reductase small subunit	
	SLUG_05960		trapyrole (corrin/porphyrin) methylase family protein	5,2
Porphyrin and chlorophyll metabolism	SLUG_02710		putative membrane protein	27,9
	SLUG_02710		PfKb family carbohydrate kinase	28,5
<b>1.4. Amino acid metabolism</b>				
Arginine and proline metabolism	SLUG_02450	<i>odc1</i>	ornithine decarboxylase	5,1
	SLUG_18900	<i>argG</i>		
	SLUG_18910	<i>argH</i>	putative argininosuccinate synthase	3,2
	SLUG_04300		aldehyde dehydrogenase family protein	3,0
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	SLUG_22480	<i>ald2</i>	alanine dehydrogenase 2	3,7
	SLUG_12190	<i>ald1</i>	alanine dehydrogenase 1	5,2

	SLUG_18900	<i>argG</i>		
	SLUG_18910	<i>argH</i>	putative argininosuccinate synthase	3,2
	SLUG_04300		aldehyde dehydrogenase family protein	3,0
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism			glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isome...	2,7
	SLUG_09130	<i>glmS / gcaA</i>		
Glycine, serine and threonine metabolism			pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family protein	3,5
	SLUG_02280		putative L-serine dehydratase, beta chain	
	SLUG_04660		2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase	2,9
Valine, leucine and isoleucine degradation			pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family protein	3,5
	SLUG_02280			
Lysine degradation			dihydrolypoamide succinyltransferase E2 component of 2-ox...	2,6
	SLUG_15030	<i>odhB</i>		
Cysteine and methionine metabolism			putative L-serine dehydratase, beta chain	
	SLUG_04660			
<b>1.5. Metabolism of other amino acids</b>				
Glutathione metabolism	SLUG_02450	<i>odc1</i>	ornithine decarboxylase	5,1
Taurine and hypotaurine metabolism	SLUG_12190	<i>ald1</i>	alanine dehydrogenase 1	5,2
	SLUG_22480	<i>ald2</i>	alanine dehydrogenase 2	3,7
<b>1.6. Metabolism of cofactors and vitamins</b>				
Porphyrin and chlorophyll metabolism	SLUG_05950			
	SLUG_05960	<i>nasE</i>	tetrapyrrole (corrin/porphyrin) methylase family protein	5,0
	SLUG_05950	<i>nasE / nasBD / nirD</i>	assimilatory nitrite reductase small subunit	
	SLUG_05960		trapyrole (corrin/porphyrin) methylase family protein	5,2
Folate biosynthesis	SLUG_20960		putative radical activating enzyme	3,2
	SLUG_20950		putative 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase	
	SLUG_20960		putative radical activating enzyme	3,1
	SLUG_20940		conserved hypothetical protein	3,1
<b><u>2. Genetic Information Processing</u></b>				
<b>2.1. Translation</b>				
Ribosome	SLUG_22670	<i>rplL</i>	50S ribosomal protein L7/L12	3,1
	SLUG_13260	<i>rpsT</i>	putative 30S ribosomal protein S20	2,7
	SLUG_22610	<i>rpsG</i>	30S ribosomal protein S7	2,6
<b>2.2. Folding, sorting and degradation</b>				
RNA degradation	SLUG_15900		hypothetical protein	
	SLUG_15910	<i>miaA</i>	conserved hypothetical protein	3,2
	SLUG_15900		putative tRNA delta 2-isopentenyl pyrophosphatetransferase	
	SLUG_15910	<i>miaA</i>		2,8
<b><u>3. Environmental Information Processing</u></b>				
<b>3.1. Membrane transport</b>				
ABC transporters	SLUG_20690	<i>sstB</i>		
	SLUG_20700	<i>sstA</i>	FecCD transport family protein	
	SLUG_21690	<i>mntB</i>		
	SLUG_21700	<i>mntC</i>	ABC transporter permease protein	4,9
	SLUG_21680	<i>mntA</i>	ABC transporter ATP-binding protein	4,2
	SLUG_19820		putative solute binding protein	3,7
	SLUG_21690	<i>mntB</i>		
	SLUG_21700	<i>mntC</i>	ABC transporter extracellular binding protein	3,4
	SLUG_20680	<i>sstD</i>	lipoprotein	3,2
Phosphotransferase system (PTS)	SLUG_03760		phosphosugar transferase system	4,5
	SLUG_07050		PTS system, arbutin-like IIBC component	3,4
	SLUG_21010	<i>fruA</i>	PTS transport system, fructose-specific IIBC component	3,3
<b>3.2. Signal transduction</b>				
Two-component system	SLUG_05970	<i>narG</i>	nitrate reductase beta chain	22,8
	SLUG_05980	<i>narH</i>	respiratory nitrate reductase delta chain	19,0
	SLUG_06040	<i>narT</i>	nitrite transport protein	14,1
	SLUG_05970	<i>narG</i>	nitrate reductase alpha chain	14,8
	SLUG_06020	<i>nreB</i>	putative histidine kinase	5,3
	SLUG_06030	<i>nreC</i>	putative response regulator	4,9
	SLUG_06010	<i>nreA</i>	hypothetical protein	4,0
<b><u>4. Human Diseases</u></b>				
<b>Infectious diseases</b>				
<i>Staphylococcus aureus</i> infection	SLUG_16350	<i>fbl</i>	receptin fbl	2,4
<b><u>5. Others</u></b>				
Transcription factors	SLUG_00760		GntR family transcriptional regulator	2,6
	SLUG_01350		flavodoxin-like fold domain protein	
	SLUG_01360		MerR family transcriptional regulator	3,3
Enzymes	SLUG_01700		putative pyruvate formate-lyase activating enzyme	2,2

Transporters	SLUG_01710	<i>arsR2</i>	arsenical resistance operon repressor 2	
	SLUG_01720	<i>arsB1</i>	arsenical pump membrane protein 1	2,2
	SLUG_02460	<i>arcD</i>	arginine/ornithine antiporter	4,6
	SLUG_02690		sodium:solute symporter family protein	2,8
Transcription factors	SLUG_02700		putative nucleoside permease	32,5
	SLUG_04650		putative membrane protein	3,2
	SLUG_05040	<i>gntR</i>	gluconate operon transcriptional repressor	2,7
	SLUG_05060	<i>gntP</i>	putative gluconate permease	3,6
	SLUG_06620		putative lipoprotein	
	SLUG_06630		putative Sec-independent exported protein	3,0
	SLUG_06620			
	SLUG_06630			
	SLUG_06640		putative Sec-independent exported protein	2,7
	SLUG_06620		putative lipoprotein	
Enzymes, transporters	SLUG_06630		putative Sec-independent exported protein	2,5
Enzymes	SLUG_06630		putative Sec-independent exported protein	
Transporters	SLUG_06640		putative membrane protein	2,7
Transporters, Ion channels	SLUG_09020		conserved hypothetical protein	2,8
	SLUG_10700		putative membrane protein	2,8
	SLUG_12530		putative GTP-binding protein	3,0
	SLUG_13670			
	SLUG_13680		hypothetical protein	
	SLUG_14550		conserved hypothetical protein	
	SLUG_15810		ABC transporter ATP-binding protein	3,2
	SLUG_15960	<i>glpF</i>	putative glycerol uptake facilitator protein	2,5
	SLUG_16500	<i>epr</i>	epr protein	2,5
	SLUG_16510	<i>lytN</i>	putative cell wall hydrolase	2,5
	SLUG_19800		putative membrane protein	
	SLUG_21140		putative cobalamin synthesis protein	2,2
	SLUG_22300		hypothetical protein	2,9
	SLUG_22380		glycosyltransferase	2,9
	SLUG_22500		amino acid permease	2,5
	SLUG_22600	<i>fus</i>	translation elongation factor G	3,1
	SLUG_24130		H <sup>+</sup> /sugar symporter family protein	4,7
	SLUG_24290		putative short chain dehydrogenase	10,0
	SLUG_24300		major facilitator superfamily protein	11,4
	SLUG_24310		carbohydrate kinase family protein	9,2
SLUG_24330		transcriptional regulator		
SLUG_24340		putative membrane protein	2,2	
SLUG_24350		putative membrane protein	2,1	

Complete list of the 45 genes down-regulated at 6 h by the deletion of *lytSR*

Genes involved in	ORF number	Common gene name	Description or predicted function	Fold down-regulation
<b>1. Metabolism</b>				
<b>1.1. Overview</b>				
Biosynthesis of amino acids	SLUG_15690	<i>thrB</i>	homoserine kinase	
	SLUG_15700	<i>thrC</i>	et threonine synthase	7,2
	SLUG_15710		putative homoserine dehydrogenase	6,3
	SLUG_15720		putative aspartate kinase	3,4
	SLUG_15840		conserved hypothetical protein	3,4
	SLUG_20810		putative aminotransferase	2,7
	SLUG_14830	<i>lysC</i>	aspartokinase II	2,6
2-Oxocarboxylic acid metabolism	SLUG_15720		putative aspartate kinase	3,4
	SLUG_14830	<i>lysC</i>	aspartokinase II	2,6
	SLUG_09120		putative phosphoglucosamine mutase	2,3
<b>1.2. Carbohydrate metabolism</b>				
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	SLUG_04290		NAD dependent epimerase/dehydratase family protein	2,0
Galactose metabolism	SLUG_04290		NAD dependent epimerase/dehydratase family protein	2,0
<b>1.3. Nucleotide metabolism</b>				
Purine metabolism	SLUG_23690	<i>xpt</i>	putative xanthine phosphoribosyltransferase	3,8
	SLUG_23660	<i>guaA</i>	putative GMP synthase	3,0
	SLUG_23670	<i>guaB</i>	putative inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	3,0
<b>1.4. Amino acid metabolism</b>				
Glycine, serine and threonine metabolism	SLUG_15690	<i>thrB</i>	homoserine kinase	
	SLUG_15700	<i>thrC</i>	et threonine synthase	7,2
	SLUG_15710		putative homoserine dehydrogenase	6,3
	SLUG_15720		putative aspartate kinase	3,4
	SLUG_15840		conserved hypothetical protein	3,4
	SLUG_14830	<i>lysC</i>	aspartokinase II	2,6
	SLUG_15710		putative homoserine dehydrogenase	6,3
Cysteine and methionine metabolism	SLUG_15720		putative aspartate kinase	3,4
	SLUG_14830	<i>lysC</i>	aspartokinase II	2,6
	SLUG_15710		putative homoserine dehydrogenase	6,3
Lysine biosynthesis	SLUG_15720		putative aspartate kinase	3,4
	SLUG_14830	<i>lysC</i>	aspartokinase II	2,6
	SLUG_20810		putative aminotransferase	2,7
Histidine metabolism	SLUG_20810		putative aminotransferase	2,7
Tyrosine metabolism	SLUG_20810		putative aminotransferase	2,7
Phenylalanine metabolism	SLUG_20810		putative aminotransferase	2,7
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	SLUG_20810		putative aminotransferase	2,7
<b>1.5. Metabolism of cofactors and vitamins</b>				
Vitamin B6 metabolism	SLUG_15690	<i>thrB</i>	homoserine kinase	
	SLUG_15700	<i>thrC</i>	et threonine synthase	7,2
<b>1.6. Biosynthesis of other secondary metabolites</b>				
Novobiocin biosynthesis	SLUG_20810		putative aminotransferase	2,7
<b>1.7. Xenobiotics biodegradation and metabolism</b>				
<b>2. Genetic Information Processing</b>				
<b>2.1. Translation</b>				
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	SLUG_21940	<i>argS</i>	putative arginyl-tRNA synthetase	2,3
<b>2.2. Replication and repair</b>				
DNA replication	SLUG_00150	<i>dnaC</i>	DnaB-like helicase	2,4
<b>3. Environmental Information Processing</b>				
<b>3.1. Membrane transport</b>				
ABC transporters	SLUG_06770		putative permease	
	SLUG_06780		ABC transporter ATP-binding protein	6,0
	SLUG_23470		putative transport system membrane protein	2,8
<b>3.2. Signal transduction</b>				
Two-component system	SLUG_05540	<i>lrgA</i>	holin-like protein	3,3
<b>4. Human Diseases</b>				
<b>Infectious diseases</b>				
Staphylococcus aureus infection	SLUG_19300	<i>dltD</i>	putative lipoteichoic acid biosynthesis protein	2,1
<b>5. Others</b>				
	SLUG_01590		conserved hypothetical membrane protein	3,0
	SLUG_02030		MarR family transcriptional regulator	2,5
	SLUG_02040	<i>isaB</i>	immunodominant antigen B	2,5
	SLUG_03650		conserved hypothetical protein	2,4
	SLUG_03780	<i>tanA</i>	tannase TanA	2,3

	SLUG_03920		GgnB-like taichoic acid biosynthesis enzyme	1,9
	SLUG_05380		putative transport protein	2,2
	SLUG_05490		putative membrane protein	2,6
Transporters	SLUG_05570		putative transport protein	2,7
	SLUG_05600		hypothetical protein	2,7
Transporters	SLUG_06820	<i>tcaB</i>	teicoplanin resistance associated membrane protein	2,1
	SLUG_06950		conserved hypothetical protein	2,6
	SLUG_07350	<i>sarR</i>	staphylococcal accessory regulator A homologue	2,7
Enzymes, Peptidases	SLUG_10100		putative acetyltransferase	
Transfer RNA biogenesis , Prokaryotic Type	SLUG_10110		putative glycoprotease	2,1
Ribosome biogenesis	SLUG_10160		conserved hypothetical protein	3,0
	SLUG_10390		hypothetical protein	2,9
	SLUG_10880		conserved hypothetical protein	3,5
	SLUG_10890		putative aminopeptidase	4,2
	SLUG_10900		conserved hypothetical protein	4,2
Enzymes, peptidases	SLUG_13820		putative peptidase	2,5
	SLUG_15660		amino acid permease	2,8
	SLUG_15680		haloacid dehalogenase-like hydrolase	2,2
Enzymes	SLUG_18190	<i>atl</i>	bifunctional autolysin precursor	2,2
Enzymes, peptidases	SLUG_18620	<i>pepB</i>	putative oligopeptidase	3,2
	SLUG_21450		conserved hypothetical protein	2,5
	SLUG_21490		putative membrane protein	2,5
	SLUG_23410		putative membrane protein	2,5
Transporters	SLUG_23680	<i>pbuX</i>	putative xanthine permease	3,8
	SLUG_23820		hypothetical protein	3,1

---

Complete list of the 108 genes up-regulated at 8 h by the deletion of *lrrSR*

Genes involved in	ORF number	Common gene name	Description or predicted function	Fold up-regulation
<b>1. Metabolism</b>				
<b>Overview</b>				
Fatty acid metabolism	SLUG_02150		short chain dehydrogenase	3,5
Carbon metabolism	SLUG_01310		PfkB family protein	2,5
	SLUG_01320		KDPG and KHG aldolase family protein	2,2
Biosynthesis of amino acids	SLUG_03580		putative peptidase	2,3
	SLUG_05160		putative peptidase	2,1
2-Oxocarboxylic acid metabolism	SLUG_05160		putative peptidase	2,1
<b>Carbohydrate metabolism</b>				
Fructose and mannose metabolism	SLUG_21020		putative phosphofructokinase	3,2
Propanoate metabolism	SLUG_09450		aldehyde dehydrogenase family protein	2,7
Pyruvate metabolism	SLUG_04500	<i>cidC</i>	thiamine pyrophosphate enzyme	2,7
	SLUG_09450		aldehyde dehydrogenase family protein	2,7
Pentose phosphate pathway	SLUG_01310		PfkB family protein	2,5
	SLUG_01320		KDPG and KHG aldolase family protein	2,2
Pentose and glucuronate interconversions	SLUG_09450		aldehyde dehydrogenase family protein	2,7
Glycolysis / Gluconeogenesis	SLUG_09450		aldehyde dehydrogenase family protein	2,7
Ascorbate and aldarate metabolism	SLUG_09450		aldehyde dehydrogenase family protein	2,7
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	SLUG_15650	<i>katA</i>	catalase	2,4
	SLUG_01320		KDPG and KHG aldolase family protein	2,2
Butanoate metabolism	SLUG_05410		zinc dependent dehydrogenase	2,1
<b>Energy metabolism</b>				
Nitrogen metabolism	SLUG_19440		putative dioxygenase	4,1
	SLUG_05970	<i>narG</i>	nitrate reductase alpha chain	2,3
	SLUG_05980	<i>narH</i>	nitrate reductase beta chain	2,4
	SLUG_05990	<i>narJ</i>	respiratory nitrate reductase delta chain	2,1
<b>Lipid metabolism</b>				
Fatty acid biosynthesis	SLUG_02150		short chain dehydrogenase	3,5
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	SLUG_02150		short chain dehydrogenase	3,5
Fatty acid degradation	SLUG_09450		aldehyde dehydrogenase family protein	2,7
Glycerolipid metabolism	SLUG_09450		aldehyde dehydrogenase family protein	2,7
<b>Nucleotide metabolism</b>				
Purine metabolism	SLUG_03600	<i>nrdD</i>	anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase	3,5
	SLUG_09390	<i>rpoE</i>	DNA-directed RNA polymerase delta subunit	3,3
Pyrimidine metabolism	SLUG_03600	<i>nrdD</i>	anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase	3,5
	SLUG_09390	<i>rpoE</i>	DNA-directed RNA polymerase delta subunit	3,3
	SLUG_23260	<i>tmk</i>	putative thymidylate kinase	2,3
<b>Amino acid metabolism</b>				
Histidine metabolism	SLUG_09450		aldehyde dehydrogenase family protein	2,7
Lysine degradation	SLUG_09450		aldehyde dehydrogenase family protein	2,7
Valine, leucine and isoleucine degradation	SLUG_09450		aldehyde dehydrogenase family protein	2,7
	SLUG_13970	<i>bfmB</i> ( <i>bfmB2</i> , <i>bfmBB</i> )	lipoamide acyltransferase component of branched-chain alp...	2,6
	SLUG_13950	<i>bfmBAA</i> ( <i>bfmB1A</i> ),		
	SLUG_13960	<i>bfmBAB</i> ( <i>bfmB1B</i> )	2-oxoisovalerate dehydrogenase alpha subunit	2,3
Tryptophan metabolism	SLUG_09450		2-oxoisovalerate dehydrogenase beta subunit	2,7
	SLUG_15650	<i>katA</i>	aldehyde dehydrogenase family protein	2,4
Arginine and proline metabolism	SLUG_09450		catalase	2,4
	SLUG_03140	<i>arcA</i>	aldehyde dehydrogenase family protein	2,7
	SLUG_05160		arginine deiminase	2,4
	SLUG_03580		putative peptidase	2,1
Lysine biosynthesis	SLUG_03580		putative peptidase	2,3
<b>Metabolism of other amino acids</b>				
beta-Alanine metabolism	SLUG_09450		aldehyde dehydrogenase family protein	2,7
<b>Glycan biosynthesis and metabolism</b>				
Peptidoglycan biosynthesis	SLUG_17190	<i>pbpA</i>	penicillin-binding protein 1	2,4
	SLUG_17180	<i>mraY</i>	phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase	2,1
<b>Metabolism of cofactors and vitamins</b>				
Biotin metabolism	SLUG_02150		short chain dehydrogenase	3,5
Pantothenate and CoA biosynthesis	SLUG_01080		putative ketopantoate reductase	2,8
Nicotinate and nicotinamide metabolism	SLUG_18560		conserved hypothetical protein	2,4
<b>Metabolism of terpenoids and polyketides</b>				
Carotenoid biosynthesis	SLUG_01840		putative glycosyl transferase	4,0
	SLUG_01850	<i>crtM</i>	squalene desaturase	3,5
	SLUG_01830		putative phytoene dehydrogenase related protein	3,3
	SLUG_01860	<i>crtN</i>	squalene synthase	2,8
	SLUG_01820		putative membrane protein	2,8
Limonene and pinene degradation	SLUG_09450		aldehyde dehydrogenase family protein	2,7
<b>Xenobiotics biodegradation and metabolism</b>				
Chloroalkane and chloroalkene degradation	SLUG_09450		aldehyde dehydrogenase family protein	2,7
<b>2. Genetic Information Processing</b>				
<b>Transcription</b>				
RNA polymerase	SLUG_09390	<i>rpoE</i>	DNA-directed RNA polymerase delta subunit	3,3
<b>Translation</b>				
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	SLUG_01370	<i>thrZ</i>	threonyl-tRNA synthetase	2,9
	SLUG_15630		30S ribosomal protein S14	2,4
<b>Folding, sorting and degradation</b>				



RNA degradation	SLUG_15900		conserved hypothetical protein	5,3
<b>3. Environmental Information Processing</b>				
<b>Membrane transport</b>				
ABC transporters	SLUG_05420	<i>opuCA</i>	putative glycine betaine/carnitine/choline transport ATP-...	
	SLUG_05430	<i>opuCB</i>	putative glycine betaine/carnitine/choline transport syst...	3,1
	SLUG_05440	<i>opuCC</i>		
	SLUG_05450	<i>opuCD</i>	putative glycinebetaine/carnitine/choline-binding lipopro...	2,9
	SLUG_07410		BioY family protein	2,6
	SLUG_17680		ABC transporter extracellular binding protein	
	SLUG_17690		putative ABC transport system permease	2,5
	SLUG_20830		ABC transporter permease protein	
	SLUG_20840		ABC transporter ATP-binding protein	2,5
<b>Signal transduction</b>				
Two-component system	SLUG_05970	<i>narG</i>	nitrate reductase alpha chain	2,3
	SLUG_05980	<i>narH</i>	nitrate reductase beta chain	2,4
	SLUG_05990	<i>narI</i>	respiratory nitrate reductase delta chain	2,1
<b>4. Human Diseases</b>				
<b>Infectious diseases</b>				
<i>Staphylococcus aureus</i> infection	SLUG_16350	<i>fbl</i>	receptin fbl	3,0
<b>Drug resistance</b>				
beta-Lactam resistance	SLUG_17190	<i>pbpA</i>	penicillin-binding protein 1	2,4
<b>5. Others</b>				
	SLUG_17200		putative cell division protein	2,4
	SLUG_01300		IcIR family transcriptional regulator	2,5
	SLUG_01360		MerR family transcriptional regulator	2,4
	SLUG_01380		OxyL-like protein	3,8
	SLUG_01670		putative reductase	2,0
Enzymes	SLUG_01700		putative pyruvate formate-lyase activating enzyme	3,3
	SLUG_01810		Tsp0 family protein	2,8
	SLUG_02070		conserved hypothetical protein	2,9
	SLUG_02090		putative membrane protein	2,3
	SLUG_02100		hypothetical membrane protein	2,2
	SLUG_02140		putative N-acetyltransferase	2,8
	SLUG_02250		putative membrane protein	3,3
	SLUG_02630		hypothetical protein	2,7
	SLUG_02970		conserved hypothetical protein	2,1
	SLUG_03440		conserved membrane protein	2,9
	SLUG_03550		sulfite exporter TauE/SafE family protein	2,3
Enzymes	SLUG_03610	<i>nrdG</i>	putative anaerobic ribonucleotide reductase activating pr...	3,1
	SLUG_03620		hypothetical membrane protein	2,4
	SLUG_03640	<i>culT</i>	choline transporter	2,3
	SLUG_03850	<i>stsc</i>	putative LPXTG cell wall-anchored protein	2,6
	SLUG_03860		putative membrane protein	3,1
	SLUG_04020		conserved hypothetical protein	3,0
	SLUG_04150		amino acid permease family protein	2,8
	SLUG_04160		putative membrane protein	1,8
	SLUG_04170		conserved hypothetical protein	2,7
	SLUG_04330		conserved hypothetical protein	2,5
	SLUG_04340		CorA-like Mg2+ transporter protein	4,6
	SLUG_04760	<i>stxB</i>	putative LPXTG cell wall-anchored protein	2,7
	SLUG_04790		acetyltransferase (GNAT) family protein	2,2
	SLUG_05860		putative membrane protein	2,5
	SLUG_06100		conserved hypothetical protein	2,4
	SLUG_06700	<i>lldP2</i>	putative L-lactate permease 2	2,8
	SLUG_07000		putative short chain dehydrogenase	2,2
<b>Chaperones and folding catalysts</b>				
	SLUG_07360	<i>clpL</i>	putative ATP-dependent protease ATP-binding subunit ClpL	3,2
	SLUG_08930		putative membrane protein	2,6
	SLUG_08950	<i>asp23</i>	alkaline shock protein 23	2,6
	SLUG_09330		putative peptidase	
	SLUG_09340		hypothetical protein	3,4
	SLUG_09360		hypothetical protein	2,6
	SLUG_09380		putative acetyltransferase	3,2
	SLUG_10700		putative membrane protein	2,4
Enzymes Peptidases	SLUG_10930		ThiJ/Pfpl family protein	3,5
	SLUG_11210		putative membrane protein	2,1
	SLUG_11490		aldo/keto reductase family protein	2,3
	SLUG_11760		putative exported protein / General stress protein-like protein	2,2
	SLUG_11890		putative exported protein	2,5
	SLUG_11900		putative membrane protein	2,9
Enzymes Peptidases DNA repair and recombination proteins		<i>dinR</i> ( <i>lexA</i> )		
	SLUG_15590		DNA damage-inducible repressor	2,0
	SLUG_15780		hypothetical uncharacterized protein	2,4
Enzymes Prenyltransferases Transfer RNA biogenesis	SLUG_15910	<i>miaA</i>	putative tRNA delta 2-isopentenyl pyrophosphatetransferase	5,3
	SLUG_16040		conserved hypothetical protein	2,4
	SLUG_16620			
	SLUG_16630			
	SLUG_16640		hypothetical protein	2,4
	SLUG_17240		acetyltransferase (GNAT) family protein	3,5

	SLUG_17920		hypothetical protein	3,3
	SLUG_18280		hypothetical protein	2,5
Enzymes	SLUG_18550		putative RNA pseudouridylylase	2,4
	SLUG_19450		putative CBS domains-containing hemolysin	3,1
	SLUG_19810		conserved hypothetical protein	3,1
	SLUG_19930		OsmC-like protein	2,3
Transcription factors	SLUG_21030		DeoR family regulatory protein	3,2
	SLUG_21170		putative exported protein	2,6
	SLUG_21200		conserved hypothetical protein (pseudogene)	3,9
	SLUG_21210		hypothetical protein	2,2
	SLUG_21320		putative membrane protein	2,2
	SLUG_21740		putative membrane protein	
Transporters	SLUG_21745		NADH-Ubiquinone/plastoquinone (complex I) oxidoreductase protein	2,3
Transporters	SLUG_21760		putative membrane protein	2,5
			putative NADH-Ubiquinone/plastoquinone (complex I) oxidoreductase protein	
Transporters	SLUG_21770		oxidoreductase protein	2,3
	SLUG_21860		putative exported protein	3,5
	SLUG_22040		aldo/keto reductase family protein	2,5
	SLUG_22170			
	SLUG_22180		hypothetical protein	3,1
	SLUG_22210		putative amino acid permease	2,8
	SLUG_22290	<i>scdA</i>	cell wall metabolism protein	3,0
Transporters	SLUG_22310	<i>proP</i>	putative proline/betaine transporter	3,5
	SLUG_23710		hypothetical protein	2,6
	SLUG_23810		putative membrane protein	3,1

---

## Complete list of the 66 genes down-regulated at 8 h by the deletion of *lytSR*

Genes involved in	ORF number	Common gene name	Description or predicted function	Fold down-regulation
<b>1. Metabolism</b>				
<b>1.1. Overview</b>				
Carbon metabolism	SLUG_21640		putative D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase	3,3
	SLUG_13750	<i>gcvT</i>	putative aminomethyltransferase	2,5
	SLUG_22130	<i>pta</i>	putative phosphate acetyltransferase	2,2
	SLUG_11980	<i>fhs</i>	formate--tetrahydrofolate ligase	2,1
<b>1.2. Carbohydrate metabolism</b>				
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	SLUG_21640		putative D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase	3,3
	SLUG_09270	<i>deoC1</i>	deoxyribose-phosphate aldolase	3,0
Pentose phosphate pathway	SLUG_05720		putative glycerate kinase	2,6
	SLUG_04230		D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase	2,3
Pyruvate metabolism	SLUG_22130	<i>pta</i>	putative phosphate acetyltransferase	2,2
Propanoate metabolism	SLUG_22130	<i>pta</i>	putative phosphate acetyltransferase	2,2
<b>1.3. Energy metabolism</b>				
Methane metabolism	SLUG_21640		putative D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase	3,3
	SLUG_22130	<i>pta</i>	putative phosphate acetyltransferase	2,2
<b>1.4. Lipid metabolism</b>				
Glycerolipid metabolism	SLUG_05720		putative glycerate kinase	2,6
Secondary bile acid biosynthesis	SLUG_02810		putative choloylglycine hydrolase	2,2
<b>1.5. Nucleotide metabolism</b>				
Purine metabolism	SLUG_22650	<i>rpoB</i>	DNA-directed RNA polymerase beta chain protein	2,3
	SLUG_13250		conserved hypothetical protein	2,3
Pyrimidine metabolism	SLUG_22650	<i>rpoB</i>	DNA-directed RNA polymerase beta chain protein	2,3
	SLUG_13250		conserved hypothetical protein	2,3
	SLUG_09280	<i>pyn / pdp</i>	putative pyrimidine-nucleoside phosphorylase	2,2
<b>1.6. Amino acid metabolism</b>				
Glycine, serine and threonine metabolism	SLUG_05720		putative glycerate kinase	2,6
	SLUG_13750	<i>gcvT</i>	putative aminomethyltransferase	2,5
<b>1.7. Metabolism of other amino acids</b>				
Taurine and hypotaurine metabolism	SLUG_22130	<i>pta</i>	putative phosphate acetyltransferase	2,2
<b>1.8. Metabolism of cofactors and vitamins</b>				
One carbon pool by folate	SLUG_13750	<i>gcvT</i>	putative aminomethyltransferase	2,5
	SLUG_11980	<i>fhs</i>	formate--tetrahydrofolate ligase	2,1
Thiamine metabolism	SLUG_06350	<i>thiC</i>	thiamine biosynthesis protein ThiC	2,1
<b>2. Genetic Information Processing</b>				
<b>2.1. Transcription</b>				
RNA polymerase	SLUG_22650	<i>rpoB</i>	DNA-directed RNA polymerase beta chain protein	2,3
<b>2.2. Translation</b>				
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	SLUG_22790	<i>glx</i>	putative glutamyl-tRNA synthetase	2,3
Ribosome	SLUG_16790	<i>rpmB</i>	50S ribosomal protein L28	2,0
<b>2.3. Replication and repair</b>				
DNA replication	SLUG_13250		conserved hypothetical protein	2,3
Mismatch repair	SLUG_13250		conserved hypothetical protein	2,3
Homologous recombination	SLUG_13250		conserved hypothetical protein	2,3
<b>3. Environmental Information Processing</b>				
<b>3.1. Membrane transport</b>				
ABC transporters	SLUG_21680	<i>mntA</i>	ABC transporter ATP-binding protein	3,2
	SLUG_21690	<i>mntB</i>	ABC transporter extracellular binding protein	2,7
<b>3.2. Signal transduction</b>				
Two-component system	SLUG_05540	<i>lrgA</i>	holin-like protein	195,0
	SLUG_05530	<i>lrgB</i>	holin-like protein	162,1
	SLUG_00860	<i>(SCCmec) kdpA</i>	potassium-transporting ATPase A chain	2,2
	SLUG_00880	<i>(SCCmec) kdpC</i>	potassium-transporting ATPase C chain	2,1

#### 4. Others

	SLUG_00670	hypothetical lipoprotein	2,0
	SLUG_00680	hypothetical lipoprotein x3	2,2
	SLUG_00930 <i>IsdJ</i>	putative LPXTG cell wall-anchored NEAT domain protein	2,2
	SLUG_01060	acetyltransferase family protein	2,3
Enzymes	SLUG_01550 <i>msrA3</i>	hypothetical protein	2,2
	SLUG_01790	conserved hypothetical protein	2,1
	SLUG_02750	CAAX amino terminal protease family protein	2,1
	SLUG_02760	CAAX amino terminal protease family protein	2,3
Transporters	SLUG_04480 <i>cidA</i>	hypothetical protein	
	SLUG_04490 <i>cidB</i>	hypothetical protein	2,4
Enzymes, peptidases	SLUG_04810	peptidase M48 family protein	2,4
Transporters	SLUG_04970	putative transporter protein	2,1
	SLUG_05140	hypothetical protein	2,2
	SLUG_05380	putative transport protein	2,4
	SLUG_05490	putative membrane protein	5,5
	SLUG_05500	Putative EsaC protein analog	2,5
		putative exported protein / Secretory antigen precursor	
	SLUG_07310	SsaA	2,4
Translation factors	SLUG_10130	ABC transporter ATP-binding protein	2,1
	SLUG_10330	putative membrane protein	2,6
	SLUG_10890	putative aminopeptidase	2,2
	SLUG_10900	conserved hypothetical protein	2,1
	SLUG_11580	putative exported protein / Autolysin	3,2
	SLUG_11670	conserved hypothetical protein	2,3
	SLUG_11710	conserved hypothetical protein	2,3
Enzymes	SLUG_12150	putative thiol peroxidase	2,4
Transcription factors	SLUG_12910	conserved hypothetical protein	2,1
	SLUG_13400	PhoH-like protein	2,3
Enzymes, peptidases	SLUG_13820	putative peptidase	2,6
	SLUG_15070	putative membrane protein	2,2
Enzymes	SLUG_15380 <i>msrA2</i>	peptide methionine sulfoxide reductase I	2,0
		putative exported protein / Hydrolase (HAD superfamily)	
	SLUG_16100 <i>cvfA</i>		2,4
	SLUG_17590	conserved hypothetical protein	2,4
Enzymes, peptidases	SLUG_18620 <i>pepB</i>	putative oligopeptidase	2,2
	SLUG_19660 <i>essB</i>	Putative secretion system component EssB/YukC	2,3
	SLUG_19670 <i>esaB</i>	Putative secretion accessory protein EsaB/YukD	
	SLUG_19680 <i>essA</i>	Putative secretion system component EssA	2,4
	SLUG_20070	putative lysin decarboxylase family protein	2,2
		putative exported protein / putative secretory antigen precursor	
	SLUG_20440		3,5
	SLUG_21050	putative exported protein	2,5
	SLUG_21150 <i>mgrA</i>	MarR family regulatory protein	2,9
		putative exported protein / Secretory antigen precursor	
	SLUG_21330	SsaA	2,8
	SLUG_21450	conserved hypothetical protein	2,4
	SLUG_21630	conserved hypothetical protein	4,4
Enzymes	SLUG_22140	conserved hypothetical protein	2,6
Transporters	SLUG_23680 <i>pbuX</i>	putative xanthine permease	2,2
	SLUG_23750	conserved hypothetical protein	2,7
	SLUG_24160	hypothetical exported protein	3,7

---

**Table 5. Expression of genes regulated by LytSR confirmed by qRT-PCR**

ORF number	Gene	Predicted function	Expression ratio ( $\Delta$ <i>lytSR</i> /WT)	
			Microarray	qRT-PCR
SLUG_05540	<i>lrgA</i>	Antiholin-like protein LrgA	0,005	0,008
SLUG_05530	<i>lrgB</i>	LrgA-associated membrane protein LrgB	0,006	0,013
SLUG_04480	<i>cidA</i>	Holin-like protein CidA	0,417	0,441

Figure 1.

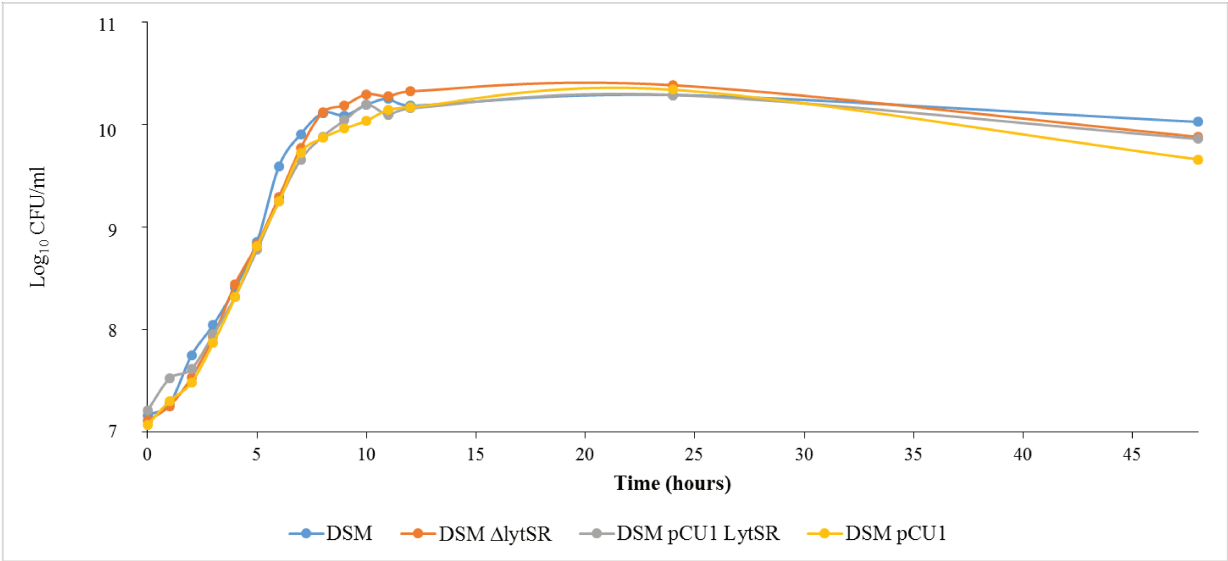


Figure 2.

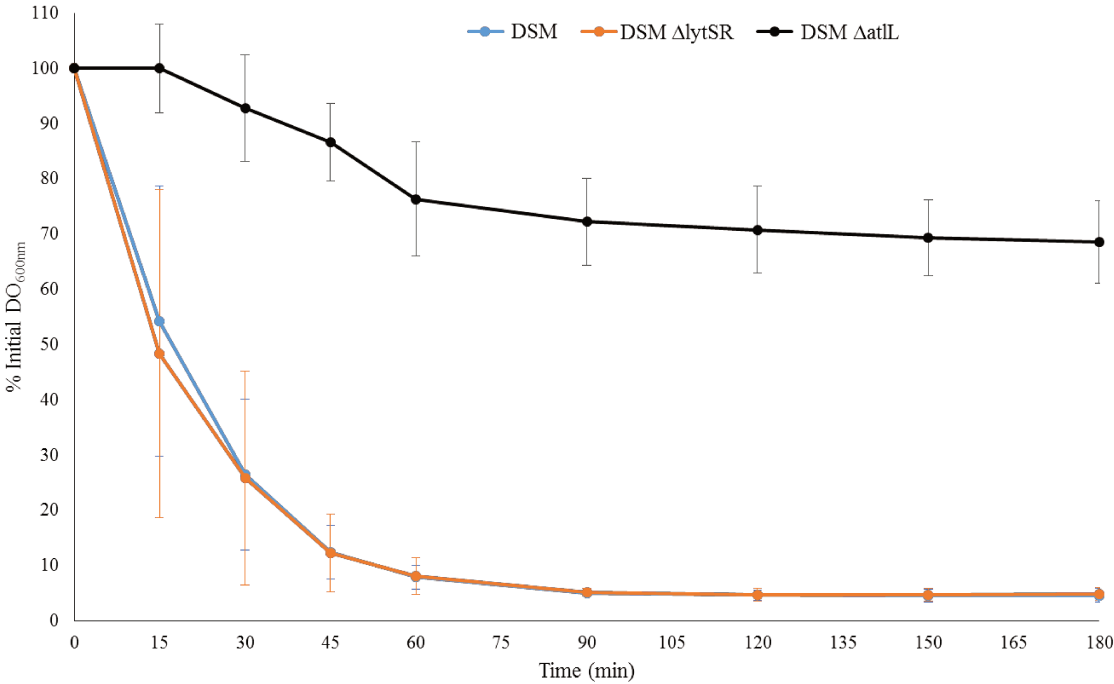


Figure 3.

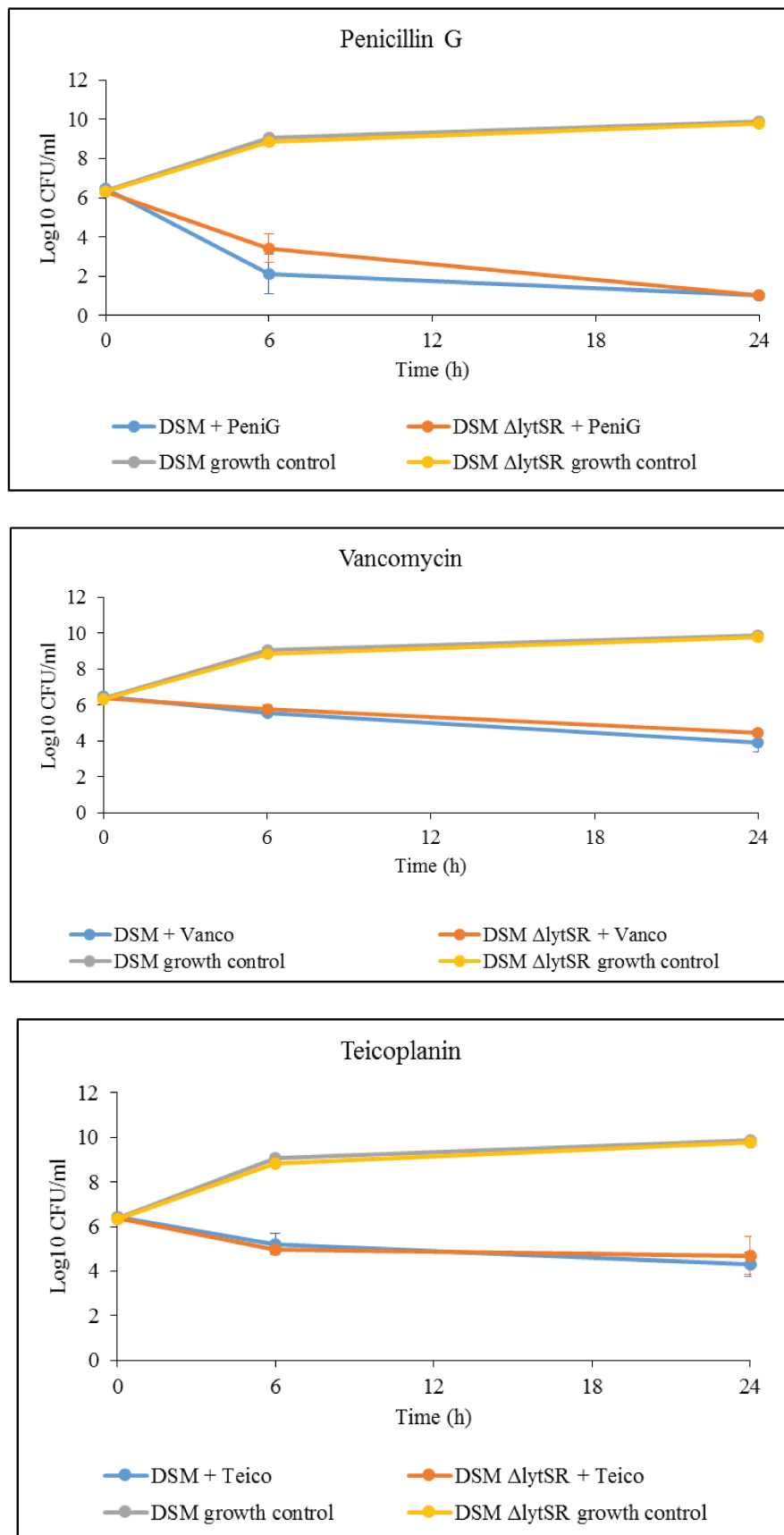




Figure 4.

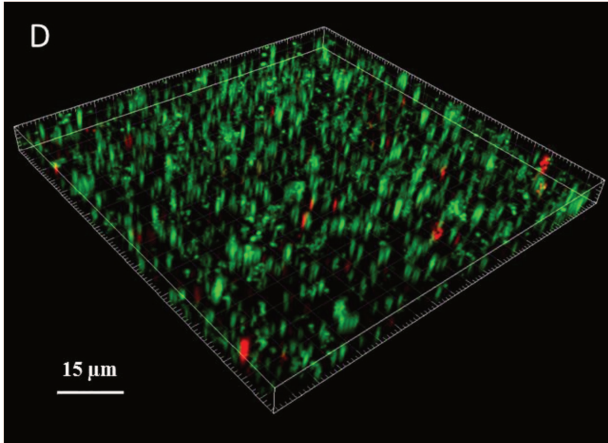
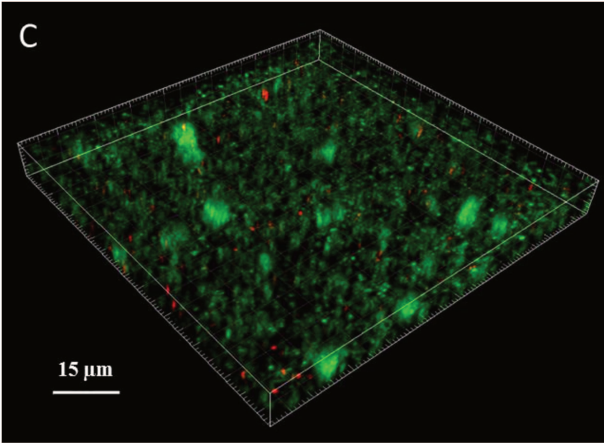
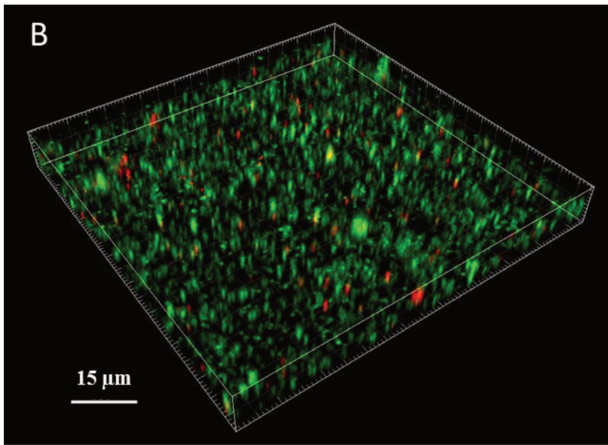
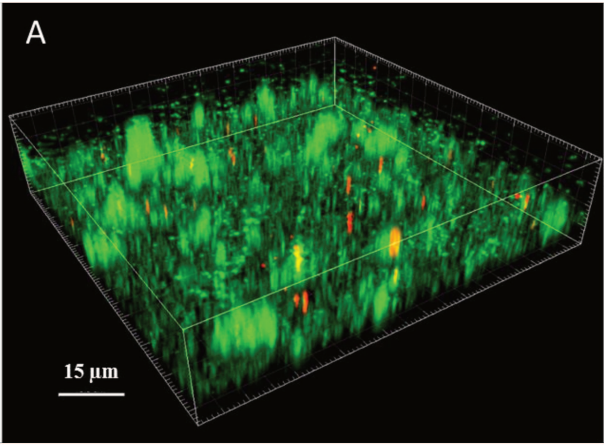
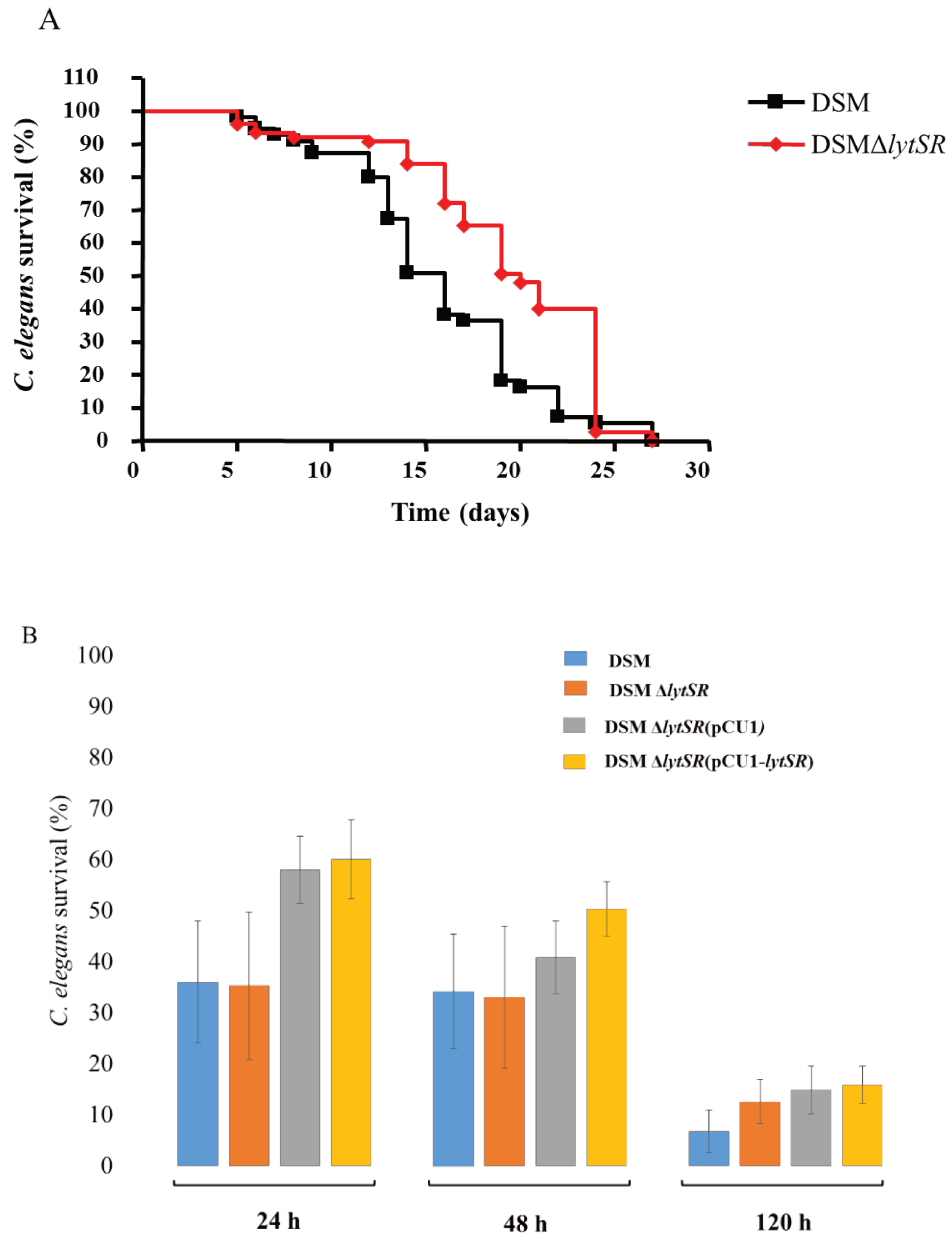
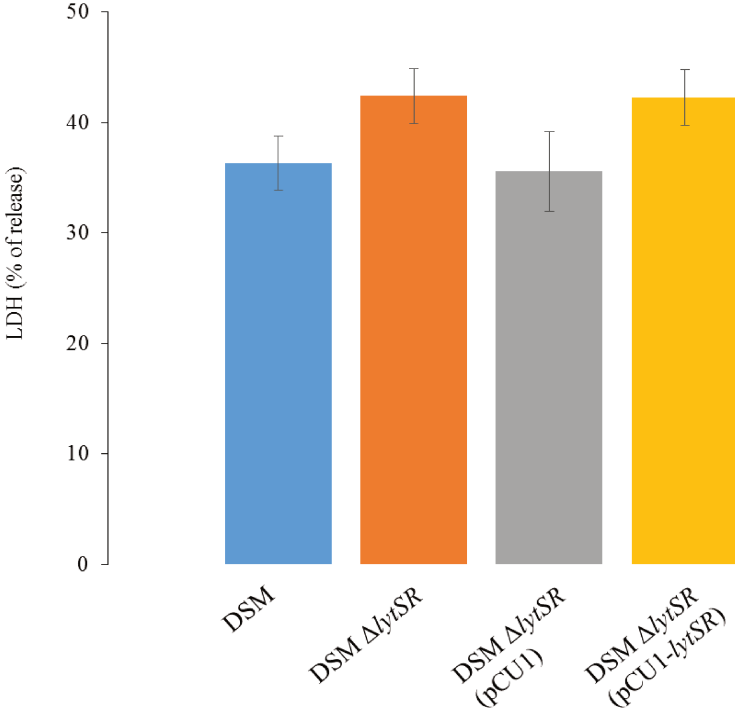


Figure 5.



**Figure 6.**



## Supplementary Material

### Role of the LytSR two-component regulatory system in *Staphylococcus lugdunensis* biofilm formation and pathogenesis

**Table S1. Biomass and viability in the biofilm**

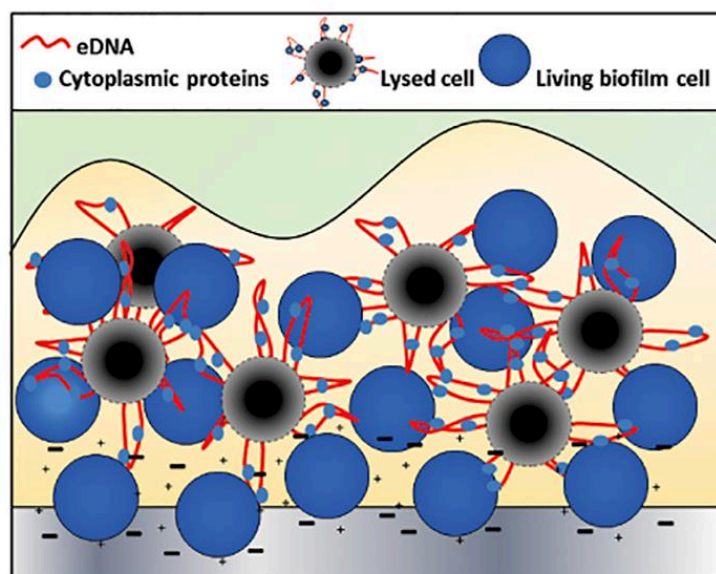
	<b>Total Biomass</b>	<b>Green fluorescence</b>	<b>Red fluorescence</b>	<b>death cell %</b>
DSM	15901,80	15733,60	168,20	1,06
DSM $\Delta$ <i>lytSR</i>	8014,64	7559,14	455,50	5,68
DSM $\Delta$ <i>lytSR</i> (pCU1)	3544,25	3007,00	537,25	15,16
DSM $\Delta$ <i>lytSR</i> (pCU1- <i>lytSR</i> )	9984,40	8946,20	1038,20	10,40

Total biomass, live cells stained with SYTO®9 (green fluorescence) and dead cell stained with propidium iodide (red fluorescence) were measured by CLSM and analyzed using IMARIS software.



### 3.3. Discussion et perspectives

Peu de facteurs de virulence ont été caractérisés à ce jour chez *S. lugdunensis* (Argemi et al., 2017e; Frank et al., 2008). La plupart des souches ont la capacité de former du biofilm, dont la matrice est composée essentiellement de protéines et d'ADNe (Frank and Patel, 2007; Rajendran et al., 2015). L'ADNe joue un rôle clé dans la matrice du biofilm en raison de ses propriétés adhésives. Il est libéré au cours de la lyse d'une fraction de cellules mortes présentes au sein du biofilm (Figure 47) (Moormeier and Bayles, 2017).



**Figure 47. Modèle d'interactions cellulaires au sein du biofilm de *S. aureus*** (Moormeier and Bayles, 2017). Au cours de l'étape d'attachement initial, des cellules planctoniques se fixent à la surface par le biais d'interactions électrostatiques (indiquées par les symboles + et -). Ensuite, au cours de la phase de multiplication, une sous-population de cellules meurt et se lyse (cercles noirs) libérant de l'ADN extracellulaire (lignes rouges) et des protéines cytoplasmiques (petits ronds bleu clair) dans le milieu extracellulaire, constituant une matrice autour des cellules vivantes (cercles bleus).

Chez *S. aureus* et *S. epidermidis*, ce processus est régulé par les opérons *cidABC* et *lrgAB*, qui sont sous le contrôle respectif des régulateurs CidR et LytSR (Sadykov and Bayles, 2012).

Le TCS LytSR ayant été identifié comme un régulateur clé de la mort cellulaire et de la lyse dans les biofilms staphylococciques, nous avons supposé qu'il pourrait également jouer un rôle dans le contrôle de ces processus chez *S. lugdunensis*. Nos travaux avaient ainsi pour objectif la caractérisation fonctionnelle de LytSR chez cette espèce.

### ***Souches utilisées dans l'étude***

En premier lieu, un mutant délété des gènes *lytSR* a été construit par utilisation de la souche *S. lugdunensis* DSM 4804 (Freney et al., 1988). Nous avons choisi cette souche car elle est productrice de biofilm, et parce qu'elle avait précédemment permis d'obtenir un mutant délété du gène *atlL* au laboratoire (Gibert et al., 2014). En effet, *S. lugdunensis* est une espèce très réfractaire à la transformation du fait (i) d'un PG épais agissant comme une barrière physique et (ii) de la présence de systèmes de restriction-modification (Heilbronner et al., 2013). Une des techniques de transformation nécessite l'utilisation de protoplastes (digestion du PG avec de la lysostaphine), technique mise au point au laboratoire du Pr Gatermann (*Institute of Hygiene and Microbiology*, Université de la Ruhr, Bochum, Allemagne) (Marlinghaus et al., 2012).

Nous avons également complété la souche délétée des gènes *lytSR* avec les plasmides pCU1-*lytSR* et pCU1. La croissance des quatre souches en milieu liquide était identique, tout comme la viabilité cellulaire associée. Ces résultats indiquent que *LytSR* n'est pas essentiel à la croissance bactérienne, comme démontré chez *S. epidermidis* (Zhu et al., 2010).

### ***Impact de *LytSR* dans l'autolyse induite et la mort cellulaire***

Dans l'objectif de déterminer si *LytSR* était impliqué dans l'autolyse chez *S. lugdunensis*, des essais d'autolyse induite par le **Triton X-100** ont été menés. Le Triton X-100 est un détergent qui lève l'inhibition exercée par les acides téichoïques sur le système autolytique global. La souche délétée du gène *atlL* a été utilisée comme témoin de résistance à l'autolyse (Gibert et al., 2014). La souche  $\Delta$ *lytSR* présentait le même taux d'autolyse induite que la souche sauvage, révélant que *LytSR* n'est pas impliqué dans ce processus chez la souche *S. lugdunensis* DSM 4804.

Ce résultat est similaire à celui obtenu avec le mutant  $\Delta$ *lytSR* de la souche *S. epidermidis* 1457 (Zhu et al., 2010). Fait intéressant, chez *S. aureus*, cette caractéristique semble être dépendante de la souche, car le mutant délété du gène *lytS* chez la souche *S. aureus* UAMS-1 ne montre pas d'augmentation de la lyse induite par le Triton X-100 (Sharma-Kuinkel et al., 2009) alors qu'un mutant *lytS* de la souche *S. aureus* RN4220 présente une autolyse accrue (Brunskill and Bayles, 1996a). Ainsi, les effets de *LytSR* sur le système autolytique semblent dépendre des différents fonds génétiques des souches de staphylocoque.

De la même manière, *LytSR* n'est pas impliqué chez *S. lugdunensis* dans la mort cellulaire induite par des **antibiotiques** ciblant la synthèse de la paroi cellulaire, tels que la pénicilline G et les glycopeptides. Cependant, il convient de souligner que les expériences de bactéricidie ont

été conduites sur des bactéries en phase exponentielle précoce de croissance (trois heures), comme recommandé par le *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI ; [National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999](#)). Or, à ce temps de croissance, nos expériences de qRT-PCR ont montré que les opérons *lytSR* et *lrgAB* étaient encore peu exprimés. Pour *S. aureus*, il a été décrit qu'une délétion de *lrgAB* augmente la mort cellulaire induite par la pénicilline lorsque les bactéries approchent de la phase de croissance stationnaire, moment où l'opéron de *lrgAB* est exprimé au maximum. Au contraire, la délétion de *lrgAB* n'affecte pas la mort cellulaire induite par la pénicilline en phase exponentielle précoce, moment où l'expression de *lrgAB* est minimale ([Groicher et al., 2000](#)). Ainsi, afin d'étudier si la délétion de *lytSR* pourrait favoriser la mort induite par les antibiotiques chez *S. lugdunensis*, il serait intéressant de mener ces expériences avec des cellules en phase exponentielle tardive.

Il est à noter que la souche sauvage *S. lugdunensis* DSM 4804 est naturellement tolérante aux glycopeptides, et que la délétion de *lytSR* n'a pas eu d'effet sur cette tolérance. Ce défaut d'activité bactéricide des glycopeptides a été décrit pour de nombreux isolats de l'espèce *S. lugdunensis* ([Bourgeois et al., 2007](#)). Parmi les mécanismes putatifs à l'origine de cette tolérance, figurent une altération des systèmes régulateurs de l'autolyse. Ainsi, l'étude de tels systèmes chez *S. lugdunensis* mériterait d'être envisagée, en caractérisant d'autres TCS comme WalRK ou ArlSR ([Haag and Bagnoli, 2017](#)). En effet, WalRK contrôle positivement les activités des autolysines Atl de *S. aureus* ([Dubrac et al., 2007](#)) et probablement celles d'AtIE de *S. epidermidis* ([Xu et al., 2017](#)). La caractérisation fonctionnelle de WalRK chez *S. lugdunensis* apparaît d'autant plus intéressante que les gènes *yycJ* et *yycI* homologues à ceux de *S. aureus* et *S. epidermidis* ne sont pas adjacents, mais juste en amont et en aval du *locus ica* (cf paragraphe 3.3.3 de la partie 1). D'autre part, le rôle du *locus agr* serait également intéressant à investiguer chez *S. lugdunensis*, puisque chez *S. epidermidis* il contrôle négativement l'expression du gène *atIE* ([Vuong et al., 2003](#)).

### ***Impact de LytSR dans la formation de biofilm***

La formation de biofilm étant l'un des principaux déterminants de la pathogénicité de *S. lugdunensis* ([Argemi et al., 2017d](#); [Frank et al., 2008](#)) l'impact de la délétion de *lytSR* sur la formation de biofilm a fait l'objet d'une étude approfondie par CLSM. Le mutant  $\Delta$ *lytSR* produisait beaucoup moins de biofilm que la souche parentale. De plus, la délétion perturbait l'architecture normale du biofilm, avec une absence de structures en tours par rapport à la souche



sauvage. Il est intéressant de noter que chez *S. aureus*, *lrgAB* est constitutivement exprimé au sein des larges structures en tours lors du développement du biofilm (Moormeier et al., 2013).

La coloration *live/dead* a mis en évidence un taux plus élevé de fluorescence rouge à l'intérieur du biofilm de la souche  $\Delta$ *lytSR* comparativement à la souche sauvage, en faveur d'une diminution de la viabilité cellulaire. Ainsi, l'altération de la formation de biofilm chez le mutant ne semble pas être liée à une réduction de la lyse cellulaire, même si pour confirmer ce fait, il serait nécessaire de quantifier les niveaux d'ADNe dans le biofilm.

Ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus pour d'autres espèces de staphylocoques. En effet, chez *S. aureus*, un mutant *lytS* ainsi qu'un mutant *lrgAB* produisent un biofilm plus adhérent en lien avec des niveaux accrus d'ADNe dans la matrice du biofilm (Mann et al., 2009; Sharma-Kuinkel et al., 2009). Chez *S. epidermidis*, un mutant *lytSR* produit également plus de biofilm, mais avec une diminution significative du nombre de cellules mortes à l'intérieur (Zhu et al., 2010). Ainsi, *LytSR* est impliqué dans le contrôle de la formation de biofilm chez les staphylocoques, mais les voies de régulation semblent grandement dépendre de l'espèce.

### ***Impact de LytSR dans la pathogénicité de S. lugdunensis***

Afin d'évaluer *in vivo* l'implication de *LytSR* dans la pathogénicité, le nématode *C. elegans* a été utilisé comme organisme hôte. Ce modèle a été choisi parce que *C. elegans* a déjà été utilisé avec succès pour l'étude des interactions hôte-pathogène, en particulier chez *S. aureus* (Sifri et al., 2003). Nous avons d'abord utilisé le test de *slow killing*, qui permet d'observer la mort des vers par un processus semblable à une infection au cours duquel la bactérie s'accumule dans l'intestin des vers (Tan et al., 1999). La souche mutante a montré une atténuation significative de la virulence par rapport à la souche sauvage, observation qui pourrait être en lien avec sa plus faible capacité à former du biofilm.

Au contraire, aucune différence n'a été observée entre la souche sauvage et la mutante dans les tests de *C. elegans* en milieu liquide (*fast killing*) et dans l'induction de libération de LDH par les cellules HaCaT. Ces résultats peuvent suggérer une libération similaire de toxines ou de facteurs de virulence par les souches.

Pour compléter ces modèles, il serait intéressant de tester la virulence des souches sauvage et  $\Delta$ *lytSR* dans d'autres modèles *in vivo* d'infection, comme un modèle d'endocardite de rat simulant l'infection par un corps étranger, qui correspond au pouvoir pathogène naturel de l'espèce.

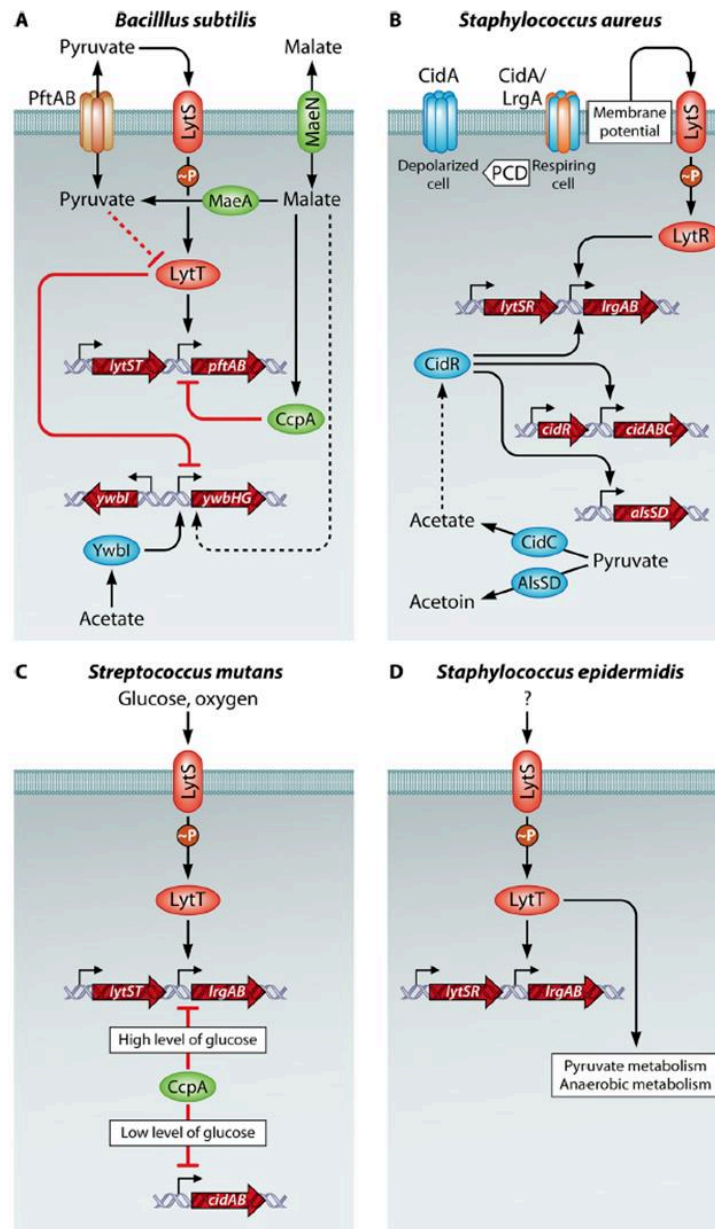
### ***Analyses transcriptomiques***

Une autre partie de cette étude a porté sur l'impact de *lytSR* dans l'expression génique globale par analyse comparée du transcriptome des souches sauvage et mutée. Pour cela, les ARN ont été extraits à deux temps de culture distincts : six heures de croissance (milieu de phase exponentielle) lorsque l'expression de *lytSR* était maximale, et huit heures (fin de phase exponentielle) lorsque celle de *lrgAB* était maximale.

La transcription de ***lrgAB*** a diminué de manière drastique chez le mutant, indiquant que cet opéron est la cible principale de LytSR chez *S. lugdunensis*. Cela concorde avec ce qui a précédemment été décrit chez *S. aureus* et *S. epidermidis* (Sharma-Kuinkel et al., 2009; Zhu et al., 2010). En outre, LytSR régule l'expression d'une grande variété de gènes impliqués dans des processus cellulaires majeurs tels que le métabolisme des glucides, des nucléotides, des acides aminés et le métabolisme énergétique. Ces résultats ont également été observés pour d'autres espèces de staphylocoques (Sharma-Kuinkel et al., 2009; Zhu et al., 2010), suggérant que LytSR pourrait affecter la viabilité cellulaire et l'adaptation à des changements environnementaux en contrôlant l'état métabolique des cellules.

Contrairement à *S. epidermidis*, les gènes impliqués dans le métabolisme du pyruvate, comme le gène *cidC* qui code pour une pyruvate ménéquinone oxydoréductase, étaient régulés négativement par LytSR. Il a été décrit que la protéine CidC de *S. aureus* joue un rôle majeur dans la mort cellulaire programmée des bactéries en convertissant le pyruvate intracellulaire en acide acétique (Patton et al., 2005), conduisant à une acidification cytoplasmique et à une inhibition de la respiration (Thomas et al., 2014b). Ainsi, l'hyperexpression de ***cidC*** (2.7) dans le mutant  $\Delta$ *lytSR* de *S. lugdunensis* pourrait expliquer en partie le taux plus élevé de cellules mortes observé dans le biofilm.

LytSR pourrait donc appartenir aux réseaux de régulation impliqués dans la connexion entre la mort cellulaire programmée et le métabolisme chez *S. lugdunensis*, comme cela a été décrit pour d'autres espèces (**Figure 48**) (van den Esker et al., 2017).



**Figure 48.** Voies de régulation du système à deux composants LytSR chez *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *Streptococcus mutans* et *S. epidermidis* (van den Esker et al., 2017). Les flèches noires décrivent l'activation de la transcription, la conversion métabolique ou le transport, tandis que les barres rouges indiquent une régulation négative. Les interactions directes et indirectes sont indiquées par des lignes continues et des lignes en pointillés, respectivement.

De façon plus surprenante, nos résultats ont révélé que LytSR pourrait être impliqué dans la régulation de gènes codant des **facteurs de virulence putatifs**. Il régule **négativement** un grand nombre de gènes codant des protéines **membranaires** putatives, ainsi que des protéines ancrées de façon covalente à la paroi comme les protéines putatives Sls (SlsB et SlsC) (Heilbronner et al., 2011) ou la protéine majeure de liaison au fibrinogène Fbl de *S. lugdunensis* (Marlinghaus et al., 2012).

En outre, les gènes *sstABD* codant des protéines putatives impliquées dans la capture du fer sont régulés négativement par *LytSR*. Il a été décrit que les staphylocoques peuvent utiliser à la fois les catéchols et les catécholamines comme source de fer *via* ce transporteur ABC *SstABCD*, qui participe ainsi à la survie et à la virulence des staphylocoques (Beasley et al., 2011).

Parmi les gènes présumés impliqués dans la virulence régulés **positivement** par *lytSR*, on trouve des gènes codant des protéines **exportées** putatives. En particulier, l'expression des gènes *atIL* codant l'autolysine bifonctionnelle AtIL (Gibert et al., 2014) et SLUG\_11580 codant une autolysine putative, est diminuée dans le mutant  $\Delta$ *lytSR*. Cependant, notre étude n'a montré aucune implication de *LytSR* dans l'autolyse induite par le Triton X-100, suggérant que d'autres systèmes pourraient être impliqués dans le contrôle de l'autolyse chez *S. lugdunensis*.

Fait intéressant, des gènes codant le système de sécrétion putatif de type VII (*essB*, *esaB* et *essA*) de *S. lugdunensis* sont également régulés positivement par *LytSR*. Ces gènes ont été décrits par Warne et al. comme homologues à ceux de *S. aureus*. Ce système de sécrétion joue un rôle dans l'excrétion de protéines extracellulaires à travers les membranes cellulaires de *S. aureus* et a été associé à la virulence, particulièrement à la formation d'abcès (Warne et al., 2016).

Plusieurs autres gènes homologues de gènes codant des facteurs de virulence chez d'autres espèces de staphylocoques se sont avérés être régulés positivement par *LytSR* : les protéines de la famille protéase amino-terminale CAAX décrites comme des métalloprotéases putativement liées à la membrane (Pei and Grishin, 2001), le précurseur du *staphylococcal secretory antigen* SsaA qui serait impliqué dans les infections associées au biofilm chez *S. epidermidis* (Lang et al., 2000), ou la peptide méthionine sulfoxyde réductase MsrA impliquée dans la tolérance au stress oxydant et la virulence chez *S. aureus* (Singh et al., 2015, 2018).

Fait à noter, mis à part *atIL*, aucun gène décrit comme impliqué dans la formation de **biofilm** chez *S. lugdunensis*, tel que *isdC* (Missineo et al., 2014) ou *comEB* (Rajendran et al., 2015), ne semble être régulés positivement par *LytSR*. La diminution de la capacité de la souche  $\Delta$ *lytSR* à former du biofilm pourrait donc être liée à la régulation négative des gènes *atIL* (Gibert et al., 2014) ou *ssaA* (Lang et al., 2000; Resch et al., 2005), ou être liée indirectement à l'état métabolique altéré des cellules.

Enfin, il a été démontré que LytSR contrôle l'expression de plusieurs autres **régulateurs de la transcription**, positivement (famille SarA) et négativement (familles IclR, MerR et GntR). Ces régulateurs sont décrits chez d'autres espèces bactériennes comme impliqués dans le contrôle d'une grande diversité de processus métaboliques et dans la virulence (Jenul and Horswill, 2018; Rodionov, 2007). Des études complémentaires sont donc nécessaires pour déterminer si l'implication de LytSR dans la transcription des gènes décrits ici est directe ou indirecte *via* une interaction avec ces gènes régulateurs. En particulier, des expériences de gel retard pourraient être effectuées pour déterminer si le régulateur de réponse LytR se lie directement aux régions promotrices des gènes cibles.

### *Perspectives*

Outres les points déjà évoqués, d'autres perspectives s'offrent à nous pour compléter ce travail.

En premier lieu, il serait nécessaire d'étudier si LytSR est impliqué dans le contrôle de l'activité des muréines hydrolases chez *S. lugdunensis*, comme cela a été décrit pour d'autres espèces (Brunskill and Bayles, 1996a; Zhu et al., 2010). Pour cela, l'analyse qualitative (zymogramme) et quantitative de l'activité autolytique des surnageants des souches sauvage et  $\Delta$ *lytSR* est envisagée.

En outre, il serait intéressant d'identifier les signaux à l'origine de l'activation de LytSR. Il a notamment été montré chez *S. aureus* que ce système est activé en réponse à une diminution du potentiel de membrane (force proton motrice) (Patton et al., 2006). Ainsi, l'expression des gènes *lrgAB* pourra être analysée par qRT-PCR à partir de cultures des souches *S. lugdunensis* sauvage et  $\Delta$ *lytSR* exposées à de la gramicidine et à du cyanure de carbone m-chlorophénylhydrazone (CCCP), agents antimicrobiens dissipant le  $\Delta$ pH et le potentiel membranaire  $\Delta\psi$ .

Enfin, la caractérisation d'autres systèmes régulateurs permettra d'appréhender l'interconnexion des réseaux de régulation modulant la virulence de *S. lugdunensis*.

## Partie 3 : Epidémiologie moléculaire au sein du genre *Staphylococcus*

Le typage moléculaire bactérien est au cœur de l'épidémiologie des maladies infectieuses. Il est en effet essentiel pour comprendre les voies et sources de transmission de bactéries virulentes et/ou résistantes provoquant des épidémies, pour en détecter l'émergence, en prévenir la transmission et en déterminer la distribution mondiale. Il peut également être appliqué à la recherche fondamentale, notamment à l'étude des structures des populations bactériennes et l'étude de la diversité génétique microbienne dans divers écosystèmes (Hallin et al., 2012).

### 1. Généralités

#### 1.1. Objectifs du typage bactérien

Le typage consiste en la distinction de différents isolats bactériens au sein d'une même espèce. La question posée est de savoir si ces isolats appartiennent à un même **clone**, c'est-à-dire s'ils sont issus d'un ancêtre commun sur une période donnée (van Belkum et al., 2007). Les méthodes traditionnelles basées sur le phénotype, comme le sérotype ou le biotype, ont été utilisées pendant de nombreuses années, mais manquent de fiabilité.

Des méthodes plus récentes examinant la relation entre isolats au niveau moléculaire ont révolutionné la capacité à différencier les souches bactériennes. Certaines de ces méthodes moléculaires permettent en outre l'étude de la structure des populations bactériennes et leur dynamique. Ces méthodes de génotypage peuvent être classés en trois grands groupes (Li et al., 2009b):

- (1) les méthodes basées sur la comparaison de **profils de bandes d'ADN**, qui classent les bactéries en fonction de la taille de fragments générés par amplification et / ou digestion enzymatique de l'ADN,
- (2) les méthodes basées sur le **séquençage de l'ADN** (d'un seul *locus*, de plusieurs *loci*, ou du génome entier), qui classent les bactéries en fonction du polymorphisme des séquences nucléotidiques,
- (3) les méthodes basées sur **l'hybridation de l'ADN** utilisant des sondes nucléotidiques.

Il est classique de distinguer, en fonction des problématiques, deux types d'analyses épidémiologiques :

### ***Epidémiologie locale ou micro-épidémiologie***

Les études micro-épidémiologiques sont réalisées à un niveau local (dans un hôpital par exemple) lors d'enquêtes au cours d'épidémies bactériennes. Une épidémie peut être définie comme une augmentation temporelle de l'incidence de l'infection (ou de la colonisation) par une espèce bactérienne, causée par la transmission accrue d'une souche (ou d'un support tel un plasmide) particulière. Dans ce contexte, les méthodes de typage sont appliquées pour générer et tester des hypothèses. Les objectifs sont de définir la relation entre les isolats suspects d'appartenir à la même chaîne de transmission, de confirmer ou non l'état épidémique, et d'aider à identifier la ou les sources de contamination et la voie de transmission. Des isolats qui ont des génotypes identiques sont plus susceptibles d'être issus d'une source commune que ceux avec des génotypes différents. Ce concept constitue la base de l'application du typage moléculaire pour la surveillance et la prévention des épidémies (van Belkum et al., 2007).

Les techniques utilisées lors de ces enquêtes doivent avoir le pouvoir discriminant nécessaire pour distinguer les isolats épidémiologiquement indépendants, même très proches phylogénétiquement. Elles doivent également être rapides, peu coûteuses, reproductibles et faciles d'interprétation. Elles reposaient initialement sur la comparaison de profils de bandes générées par clivage de l'ADN à l'aide d'enzymes de restriction comme la PFGE, et aujourd'hui plus volontiers sur l'amplification comme la *multiple-locus variable number tandem repeats analysis* (MLVA) (Sabat et al., 2013).

La **PFGE** a longtemps été considérée comme le « *gold standard* » pour typer un grand nombre d'espèces bactériennes d'importance médicale (McDougal et al., 2003; Tosh et al., 2011; Yu et al., 2012). Elle consiste en la digestion du chromosome bactérien par des enzymes de restriction à sites de coupure rares, suivie d'une séparation des fragments générés par électrophorèse en champ pulsé. L'analyse des profils définit des pulsotypes qui sont comparés entre isolats d'une même espèce. Cette méthode, très discriminante et relativement peu coûteuse, présente les inconvénients de nécessiter un temps technique important et de produire des données non facilement exportables entre laboratoires. Cependant, une standardisation des protocoles et de l'interprétation des résultats a permis à cette méthode de garder une place au sein de réseaux de laboratoires référents, pour la surveillance et l'investigation des épidémies d'origine alimentaire par exemple (<https://www.cdc.gov/pulsenet/what-pulsenet-does.html>) (Sabat et al., 2013).

La **MLVA** repose sur l'analyse du polymorphisme du nombre de répétitions de plusieurs *loci* de séquences répétées en tandem (cf paragraphe 2.3). Cette technique présente les avantages de rapidité d'exécution et d'interprétation facile grâce aux nouvelles technologies.

***Epidémiologie globale ou macro-épidémiologie et étude de la génétique des populations bactériennes***

Le typage bactérien peut être mis en oeuvre pour une surveillance épidémiologique à plus long terme et à une échelle internationale, dans l'objectif d'étudier la distribution des clones et potentiellement de mettre en évidence des clones émergents (Hallin et al., 2012), mais également dans le but de déterminer la structure de population d'une espèce bactérienne et son mode d'évolution génomique pour en déduire des hypothèses phylogénétiques sur l'évolution des micro-organismes et sur leurs liens de parenté (Smith et al., 1993).

Les méthodes utilisées doivent alors produire des résultats ayant une stabilité suffisante dans le temps, c'est-à-dire reposer sur des marqueurs évoluant plus lentement. De plus, elles doivent produire des données non-ambiguës et exportables pour des comparaisons entre laboratoires, facilement accessibles *via* une base de données en ligne, et s'appuyer sur une nomenclature normalisée au niveau international (Sabat et al., 2013).

La technique de **MLST**, reposant sur des données de séquences nucléotidiques, répond parfaitement à ces critères (cf paragraphe 2.1) (Maiden, 2006). Elle est devenue la méthode de référence dans ce domaine jusqu'à l'avènement de la technologie de séquençage à haut débit de génomes complets (*next generation sequencing* [NGS]).

## **1.2. Validation d'une méthode de typage**

Avant qu'une méthode de typage ne soit utilisée dans une situation donnée, elle doit avoir été évaluée et validée par rapport à un certain nombre de critères, décrits par van Belkum et al. en 2007 (van Belkum et al., 2007). Plusieurs critères de performance clés doivent tout d'abord être évalués à l'aide d'un groupe d'isolats pertinents d'un point de vue épidémiologique, provenant de régions géographiques aussi diverses que celles où la méthode sera appliquée.

Ces critères de performance sont :

- La **stabilité**, le marqueur utilisé doit rester stable pendant la période de l'étude. Idéalement, cette stabilité doit être étudiée *in vivo*, mais dans la plupart des cas elle est évaluée *in vitro* en laboratoire par l'analyse de la stabilité des profils obtenus à partir de multiples subcultures d'une souche. Un marqueur peut également être considéré comme stable si plusieurs isolats d'une souche épidémique obtenus auprès de patients différents à des intervalles de temps différents ne peuvent pas être distingués par ce marqueur.



- La **typabilité**, qui est définie par la capacité à obtenir un résultat non ambigu pour chaque isolat analysé. Elle est caractérisée par le pourcentage d'isolats typables parmi la totalité des isolats analysés ; elle est idéalement de 100%.
- La **reproductibilité**, définie par la capacité de la méthode à attribuer le même type à un isolat indépendamment des changements d'opérateurs, de lieux et de temps. Elle peut être influencée par de nombreux paramètres impliqués dans le protocole de typage, y compris l'interprétation des résultats. La reproductibilité a des dimensions intra-laboratoires mais également inter-laboratoires, essentielles pour permettre l'échange de données. Cela implique l'adoption de protocoles standardisés et une formation adéquate du personnel.
- Le **pouvoir discriminant**, défini par la capacité d'une méthode à attribuer un type différent à deux souches non apparentées épidémiologiquement échantillonnées de manière aléatoire à partir de la population d'une espèce donnée. Il peut être évalué par le calcul de l'indice de diversité de Simpson (**DI**), modifié par Hunter et Gaston, associé au calcul d'un intervalle de confiance (Hunter and Gaston, 1988). L'indice est idéalement de 1,00 (probabilité que deux isolats non épidémiologiquement apparentés choisis au hasard dans la population appartiennent à des types différents égale à 100%), mais dans la pratique il se doit d'être au moins de l'ordre de 0,95 (probabilité d'erreur  $\leq 5\%$ ). Le DI permet de pouvoir comparer le pouvoir discriminant de plusieurs méthodes de typage. Ce paramètre dépend de la diversité génétique au sein de l'espèce. En effet, certaines espèces dérivant d'un faible nombre de clones rendent les souches responsables d'épidémies indifférenciables des souches sporadiques, quelle que soit la technique utilisée (sauf par la méthode NGS).
- La **concordance épidémiologique**, les isolats épidémiologiquement apparentés (collectés de différents patients au cours d'une épidémie présumée à une seule souche, ou obtenus d'un même patient sur une période relativement courte) doivent présenter des types identiques ou apparentés.

Des critères supplémentaires pour évaluer la faisabilité de la méthode incluent sa rapidité de mise en oeuvre, son coût, sa facilité d'utilisation (besoin de personnel expérimenté ou non), l'objectivité des résultats et leur exportabilité (van Belkum et al., 2007). Ces deux derniers critères deviennent de plus en plus importants du fait de la nécessité croissante d'échanger des données entre laboratoires au niveau mondial.

### **1.3. Applications phylogénétiques des méthodes de génotypage**

Les génomes bactériens sont remarquablement stables d'une génération à l'autre, mais sont plastiques à l'échelle évolutive du temps (Darmon and Leach, 2014). Cette plasticité génomique permet aux bactéries de faire face à l'évolution des conditions environnementales, guidée par la dérive génétique et la sélection naturelle (Hershberg, 2015).

Les deux grands mécanismes à l'origine de la diversité génétique bactérienne sont les mutations ponctuelles (*single-nucleotide polymorphisms* [SNPs]) et la recombinaison homologue suite à des transferts horizontaux de gènes (par transformation, conjugaison ou transduction), qui peut concerner des fragments plus ou moins grands d'ADN.

Cependant, l'instabilité du génome peut également résulter de réarrangements génomiques tels que des délétions, des insertions, des excisions, des duplications ou des translocations médiés par divers mécanismes (Darmon and Leach, 2014):

- Des phénomènes de recombinaison dus à des séquences répétées au sein du chromosome.
- Des éléments génétiques « spécialisés » :
  - o éléments mobiles : séquences d'insertion (IS), éléments transposables miniatures à répétition inversée (MITE), *repetitive extragenic palindromic (REP) sequences*, *bacterial interspersed mosaic elements* (BIME), transposons et îlots génomiques,
  - o introns et intégrons,
  - o éléments génétiques qui contrôlent la stabilité des éléments mobiles: les systèmes toxines/antitoxines, de restriction-modification et les CRISPR-Cas.

Il est intéressant de noter que ni le mécanisme ni la fréquence à l'origine de ces polymorphismes génétiques ne sont répartis de manière aléatoire sur le génome, et certaines séquences d'ADN sont considérées comme des points chauds mutationnels (Zhou et al., 2014). Les méthodes de typage pourront alors reposer sur des marqueurs présentant une évolution génétique différente (Hallin et al., 2012):

- Marqueurs évoluant rapidement comme les séquences répétées en tandem analysées par MLVA, plutôt utilisés au cours des analyses micro-épidémiologiques.
- Marqueurs évoluant plus lentement comme les SNPs des gènes domestiques analysés par la MLST, soumis généralement à une forte pression de sélection négative. Ces marqueurs sont pertinents pour les études macro-épidémiologiques, leur stabilité permettant de comparer des génotypes à une échelle mondiale et à long terme.

Sont décrites brièvement ci-après les principales applications des méthodes de génotypage.

### **1.3.1. Génétique des populations**

La vitesse évolutive, la diversité de l'espèce et la structure génétique de la population diffèrent largement parmi les agents pathogènes bactériens humains (Hallin et al., 2012). L'étude des structures de populations s'effectue par estimation de la fréquence avec laquelle les génomes bactériens sont soumis aux transferts horizontaux de gènes, afin d'évaluer si une espèce évolue plutôt par accumulation de mutations ponctuelles ou plutôt par des événements de recombinaison. Cette estimation est complexe et souvent controversée ; elle doit ainsi s'appuyer sur un faisceau d'arguments, dont certains sont décrits ci-dessous (Feil and Spratt, 2001).

#### ***Calcul de l'index d'association ( $I_a$ )***

Smith et al. en 1993 ont développé un test statistique pour déterminer la structure de population bactérienne à partir des données générées par *multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE) chez différentes espèces (Smith et al., 1993). Ce test statistique, appelé index d'association ( $I_a$ ) évalue les associations entre les allèles des différents *loci* et mesure ainsi le déséquilibre de liaison entre les allèles :

- une valeur d' $I_a$  non significativement différente de zéro indique une association aléatoire entre les *loci* (**équilibre de liaison**), et donc des événements de recombinaison fréquents au sein de l'espèce,
- alors qu'une valeur d' $I_a$  significativement supérieure à zéro indique une association non aléatoire entre les *loci* (**déséquilibre de liaison**), et donc que le phénomène de recombinaison est rare voir absent.

#### ***Construction d'arbres phylogénétiques***

La comparaison d'arbres phylogénétiques obtenus à partir de l'analyse de différents gènes permet également de déterminer si l'évolution est strictement mutationnelle ou s'il existe une recombinaison (Feil and Spratt, 2001). La construction de ces arbres repose sur différentes méthodes de calcul, dont les plus utilisées sont celles basées sur les distances comme les méthodes de *neighbor-joining*, d'*unweighted pair-group method with arithmetic averages* (UPGMA) ou de *minimum spanning tree*.

Si la recombinaison est absente, l'historique de l'évolution de chaque gène est identique, et les arbres construits à partir des différents gènes sont congruents, c'est-à-dire que les isolats seront regroupés dans les mêmes *clusters* quels que soient les *loci* (**Figure 49**). Si les isolats sont au

contraire regroupés dans des *clusters* différents selon les *loci*, cette non-congruence est révélatrice d'un historique de recombinaison (Feil and Spratt, 2001).

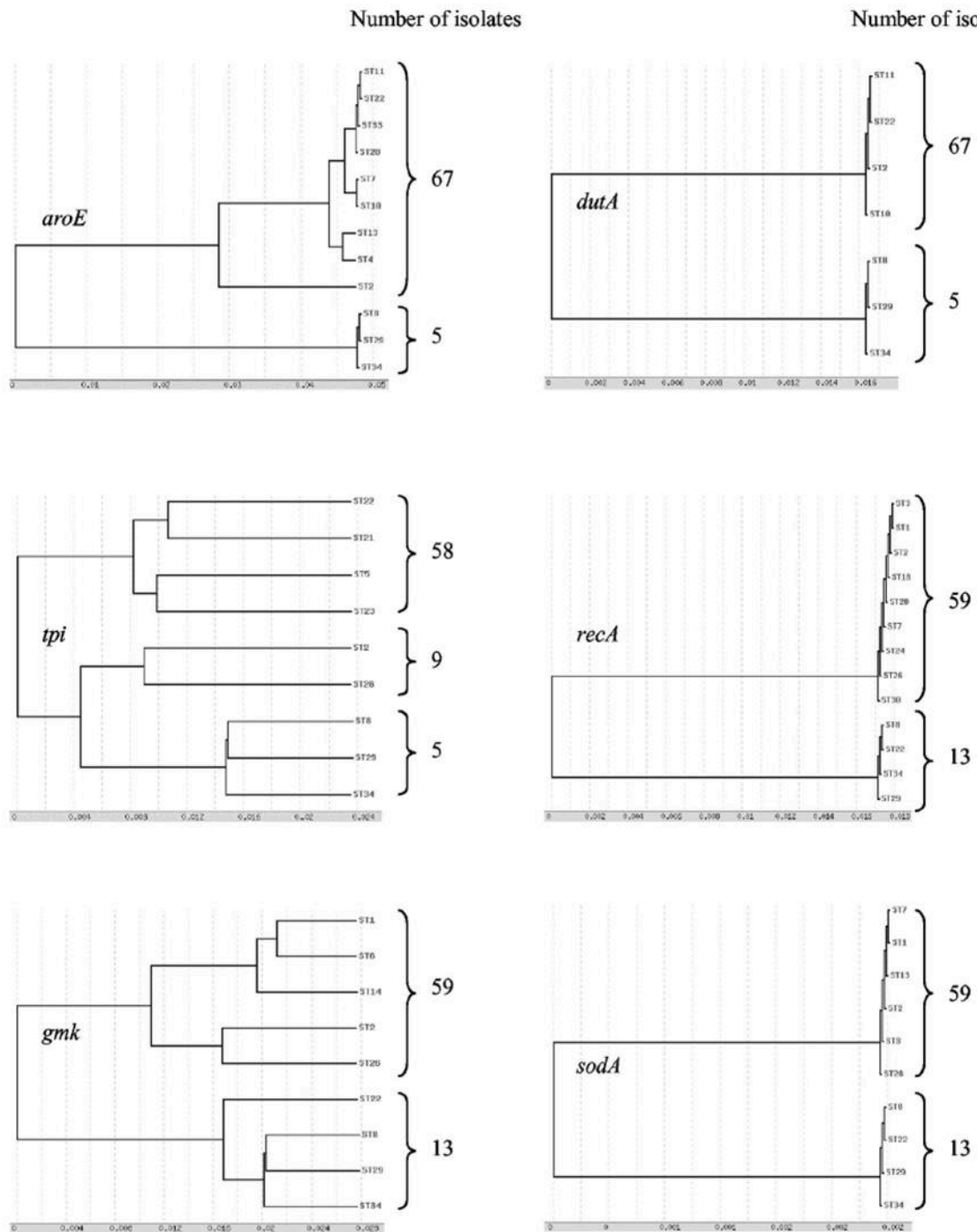


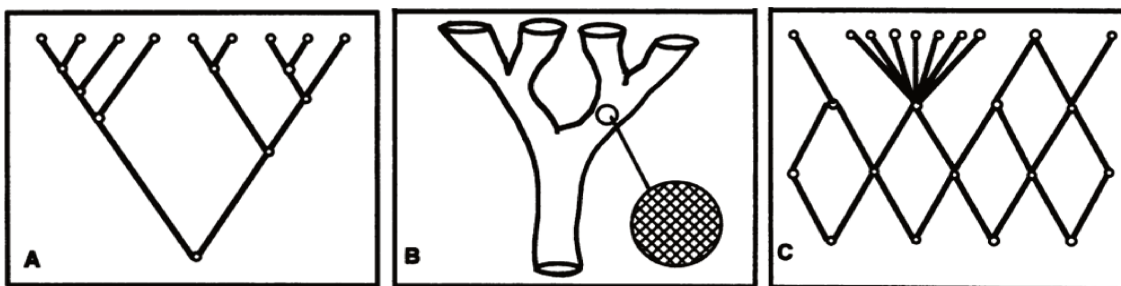
Figure 49. Dendrogrammes montrant les relations génétiques de 72 isolats de *Clostridium difficile* basés sur les séquences alléliques des six *loci* individuels utilisés pour le développement d'un schéma *multilocus sequence typing* (MLST) (Lemee et al., 2004). Les dendrogrammes individuels des six *loci* sont congruents, en faveur d'une évolution mutationnelle de l'espèce. Les chiffres à côté des accolades représentent le nombre d'isolats dans les *clusters*.

**Modèles d'évolution des populations**

Sur la base de ces tests, la structure de la population d'une espèce bactérienne est ainsi évaluée. Elle peut être représentée par un *continuum* allant de la clonalité stricte vers la panmixie (Feil and Spratt, 2001; Smith et al., 1993).

Dans la **clonalité** stricte, les cellules filles issues de la division cellulaire binaire sont identiques aux cellules parentales, et la diversification ne se produit que par mutation aléatoire (Figure 50A). Les populations définies comme majoritairement clonales, comme *S. aureus* (Enright et al., 2000) ou *Clostridium difficile* (Lemee et al., 2004), se caractérisent par des niveaux de diversité génétique limités. En effet, des lignées dominantes persistent avec des variations minimales sur des centaines voire des milliers d'années (Spratt and Maiden, 1999).

A l'inverse, dans la **panmixie**, les cellules filles varient considérablement par rapport aux cellules parentales en raison du taux élevé d'échanges par recombinaison suite à des transferts horizontaux de gènes. Les populations définies comme panmixiques, ou hautement recombinantes comme *Neisseria meningitidis* (Feil et al., 1999) ou *Streptococcus pneumoniae* (Enright and Spratt, 1998), présentent une variabilité génétique importante. Les lignées se diversifient si rapidement que les isolats récupérés en une décennie peuvent être complètement différents de ceux récupérés dans la suivante (van Belkum et al., 2007; Spratt and Maiden, 1999). Au sein de ces populations, certains clones peuvent cependant acquérir un avantage sélectif, diffuser et devenir épidémiques (clonalité « transitoire ») (Figure 50C).



**Figure 50. Représentation des différentes structures de population bactérienne (Smith et al., 1993).** (A et B) Populations clonales constituées d'isolats ayant évolué en deux branches principales. La structure de la population A est clonale à tous les niveaux, de sorte que le dendrogramme est un arbre évolutif, aucune recombinaison ne se produit. En B, la recombinaison ne se produit pas entre les isolats des deux branches principales, mais une recombinaison fréquente a lieu entre les isolats de chaque branche principale. La structure de ces branches ressemble donc à un filet plutôt qu'à un arbre, comme le montre la section élargie de l'une des branches principales. (C) Structure de population panmixique dans laquelle il y a une recombinaison fréquente au sein de tous les membres de la population, telle que la structure est un filet plutôt qu'un arbre. Il arrive parfois qu'un clone apparaisse et acquiert un avantage sélectif, de sorte qu'il devienne épidémique.

De la compréhension de cette structure de population bactérienne découle ensuite la sélection des méthodes de typage appropriées (Spratt and Maiden, 1999). Par exemple, une même technique de typage peut s'avérer extrêmement discriminante lorsqu'elle est appliquée à une espèce panmictique, mais pas assez discriminante lorsqu'elle est appliquée à une espèce hautement clonale.

### **Ratio $d_N/d_S$**

Le choix des gènes dans les analyses phylogénétiques est crucial, et la probabilité d'observer des polymorphismes génétiques dans un petit échantillon d'isolats bactériens dépend de la vitesse à laquelle ces polymorphismes se produisent, mais également des forces de sélection exercée sur ces *loci* (Feil and Spratt, 2001).

Les substitutions nucléotidiques dans les gènes codant des protéines peuvent être synonymes (ou silencieuses) c'est-à-dire de pas induire de changement en acide aminé, ou non synonymes induisant des changements en acide aminé. La plupart des modifications non synonymes sont éliminées, mais dans certaines conditions la sélection naturelle peut conduire à leur conservation. Le calcul du *ratio* du nombre de substitutions non synonymes ( $d_N$ ) sur le nombre de celles synonymes ( $d_S$ ) au sein d'un gène permet ainsi d'évaluer le degré de sélection exercé sur la protéine (Nei and Gojobori, 1986).

Le rapport  $d_N/d_S$  peut alors être interprété comme suit (Rocha et al., 2006):

- $< 1$  : correspond à une sélection **négative** (ou « purificatrice »), la sélection naturelle supprimant les substitutions non synonymes, souvent en lien avec les contraintes biologiques fonctionnelles de la protéine associée,
- $> 1$  : correspond à une sélection **positive**, la sélection naturelle favorisant certaines substitutions non silencieuses,
- $= 1$  : correspond à une sélection **neutre**.

### **1.3.2. Phylogénie de la virulence**

Le typage bactérien, et en particulier la MLST, a largement été utilisé pour rechercher des lignées spécifiques d'hôtes ou associées à certains types d'infections, comme des infections invasives ou particulièrement sévères. Il a ainsi été montré que les souches de portage asymptomatique de *N. meningitidis* sont beaucoup plus diversifiées que les souches responsables d'infection invasive, et qu'il existe des clones dits « hypervirulents » (Jolley et al., 2000). Chez *Streptococcus agalactiae*, le clone de *sequence type* (ST) 17 défini par MLST est

associé aux méningites néonatales (Jones et al., 2006), alors que chez *Escherichia coli* le ST131 est la lignée prédominante mondiale associée aux infections extra-intestinales (Nicolas-Chanoine et al., 2014).

### 1.3.3. Phylogénie de la résistance aux antibiotiques

L'utilisation de diverses techniques de typage à une échelle nationale et internationale permet également de mettre en évidence l'émergence et la diffusion de clones résistants aux antibiotiques. Il est ainsi apparu qu'un groupe de clones d'*Enterococcus faecium* très prévalents en milieu hospitalier au niveau international, appartenant au complexe clonal 17, est caractérisé par une résistance de haut niveau à l'amoxicilline et aux fluoroquinolones, et plus récemment à la vancomycine (Lee et al., 2019). Les méthodes de typage ont également été appliquées à l'étude de l'épidémiologie moléculaire des clones de *S. aureus* résistants à la méticilline (MRSA), et ont permis de mieux comprendre l'origine et la propagation de ces clones (Lakhundi and Zhang, 2018) (cf paragraphes suivants).

À ce jour, de nombreuses méthodes moléculaires existent pour caractériser les isolats bactériens appartenant à différentes espèces. Chacune est caractérisée par des critères de performance qui lui sont propres, et aucune d'entre elles n'est universellement applicable (Tableau 7). Par conséquent, le choix d'une méthode dans une situation donnée dépendra de deux paramètres principaux: (1) la structure de la population de l'espèce bactérienne à typer et (2) l'échelle spatiale et temporelle de l'étude épidémiologique (van Belkum et al., 2007; Hallin et al., 2012).

Methods	Discriminatory power	Reproducibility	Polyvalence	Objectivity of data	Portability of data	Throughput
<i>Fingerprint-based:</i>						
RFLP + probe	Good	Good	Good	Good	Poor	Low
PFGE	Excellent	Good	Excellent	Poor to good	Poor	Low
MLVA	Good	Good	Excellent	Good	Poor	Medium
Rep-PCR	Good	Poor to good	Excellent	Poor	Poor	Medium
<i>Sequence-based:</i>						
SLST	Poor-good	Excellent	Poor	Excellent	Excellent	Medium
MLST	Good	Excellent	Excellent	Excellent	Excellent	Low
SNP	Excellent	Excellent	Excellent	Excellent	Excellent	High
Whole genome	Optimal	Excellent	Excellent	Excellent	Excellent	Low
<i>Hybridization:</i>						
Oligotyping	Good	Excellent	Poor	Good	Good	Medium
Microarray	Excellent	Good	Poor	Good	Good	High

**Tableau 7. Comparaison des performances de différentes méthodes de génotypage (Hallin et al., 2012).** *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), MultiLocus Variable Number of Tandem Repeat Analysis (MLVA), Single Locus Sequencing Typing (SLST), MultiLocus Sequence Typing (MLST), Single Nucleotide Polymorphism (SNP).*

## **2. Méthodes de génotypage développées au sein du genre *Staphylococcus***

Nous décrivons ici l'application des méthodes de génotypage au sein du genre *Staphylococcus* en développant plus particulièrement :

- (1) les deux méthodes moléculaires qui ont été préalablement mises en oeuvre pour caractériser l'espèce *S. lugdunensis*, à savoir la MLST et la *multi-virulence locus sequence typing* (MVLST),
- (2) les bases moléculaires sur lesquelles reposent les méthodes que nous avons développées au cours de notre travail, à savoir la MLVA, la *tandem repeat sequence typing* (TRST) et la méthode de *single locus sequence typing* (SLST), le *fbl-typing*.

### **2.1. *Multilocus sequence typing* (MLST)**

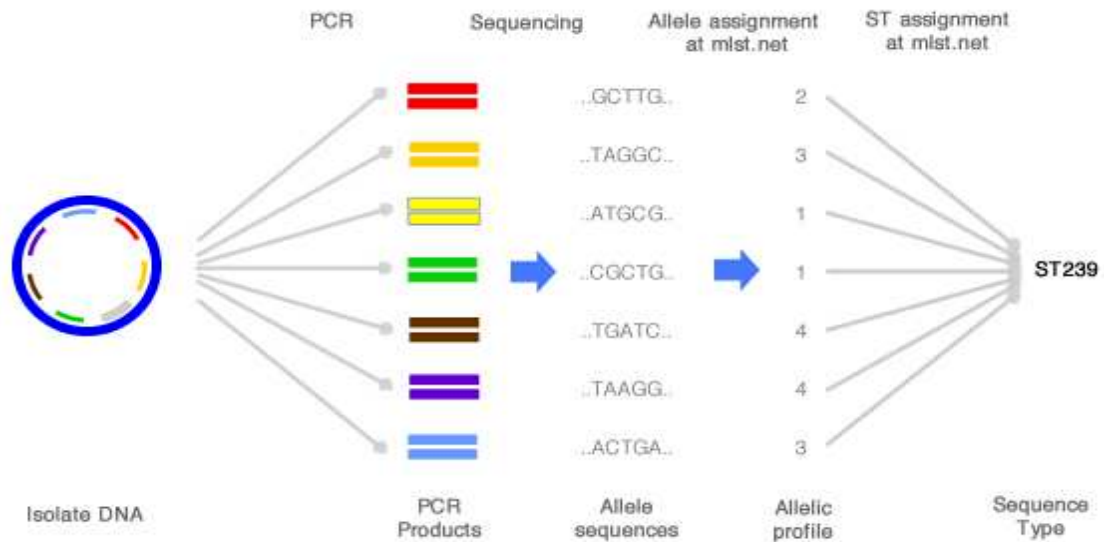
#### **2.1.1. Généralités**

La technique de MLST est une méthode dérivée d'une ancienne technique de typage phénotypique, la MLEE. Cette dernière reposait sur l'analyse des différences de migration électrophorétique d'enzymes codées par différents allèles d'un gène domestique donné (Maiden et al., 1998).

L'analyse MLST est une méthode basée sur la variation de la séquence nucléotidique de gènes domestiques (généralement sept) idéalement répartis sur le chromosome bactérien. Elle consiste à analyser le polymorphisme de fragments internes d'environ 450 à 500 pb de chaque gène, ceux-ci pouvant être séquencés avec précision sur les deux brins (Enright and Spratt, 1999; Maiden et al., 1998).

Chaque séquence de gènes correspond à un allèle (défini par un nombre arbitraire), et la combinaison des allèles permet de définir un profil allélique, ou **ST (Figure 51)**. Chaque isolat d'une espèce est donc caractérisé par son ST, correspondant à une série de sept nombres entiers. Les événements génétiques donnant lieu à un nouvel allèle peuvent être par exemple une mutation ponctuelle ou un phénomène de recombinaison homologue, mais aucune pondération n'est appliquée pour refléter le nombre de différences nucléotidiques entre les allèles.



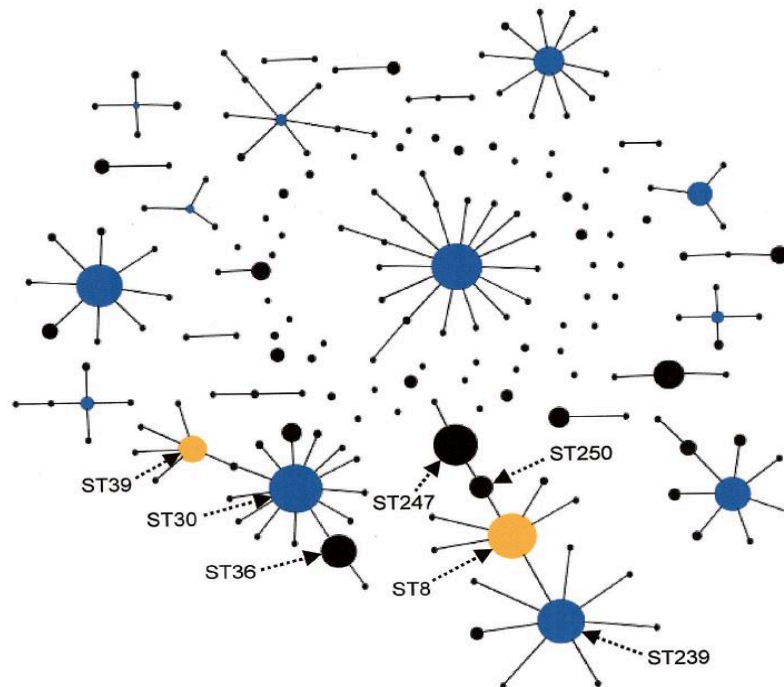


**Figure 51. Principe général de la technique de typage *multilocus sequence typing* (MLST).** Les fragments internes de sept gènes de ménage répartis sur le chromosome bactérien sont amplifiés et séquencés individuellement. Chaque séquence correspond à un allèle et la combinaison des allèles permet de définir un profil allélique à sept chiffres ou *sequence type* (ST) (<http://beta.mlst.net/Instructions/default.html>).

Les STs peuvent ensuite être regroupés en complexes clonaux (CCs). La première stratégie de regroupement repose sur la construction de dendrogrammes, qui constituent un moyen d'identifier des isolats dont le génotype est étroitement apparenté et qui peuvent ainsi être attribués au même complexe clonal. Cependant, ces dendrogrammes ne fournissent aucune information sur les modèles de descendance évolutive des isolats au sein d'un CC (Feil et al., 1999).

Plus récemment, a été développé l'algorithme eBURST, qui utilise un modèle simple d'évolution bactérienne, dans lequel un génotype ancestral (ou fondateur) est de plus en plus fréquent au sein d'une population (en conséquence d'un avantage de *fitness* ou d'une dérive génétique aléatoire) et se diversifie progressivement pour produire un groupe de génotypes apparentés regroupés au sein d'un CC (Feil et al., 2004). La définition des CCs peut varier selon les études, mais la plus admise est que chaque CC rassemble tous les STs présentant cinq *loci* identiques sur les sept. La représentation s'affiche sous forme d'un diagramme radial centré sur le ST ancestral, et les CCs sont en général nommés d'après ce ST présumé fondateur (ex : CC8 nommé après identification du ST8 en tant que fondateur présumé) (Figure 52). Au sein d'un CC, les isolats ne différant que par un seul des sept *loci* sont appelés *single locus variants* (SLVs), et ceux différant par deux *loci* sont appelés *double locus variants* (DLVs) (Feil et al., 2004). L'assignement de ces CCs est facilité par l'utilisation d'outils en ligne (<http://eburst.mlst.net/>).

Il est à noter que les grands CCs peuvent également contenir des sous-groupes et donc des fondateurs de sous-groupes. Par exemple, un variant SLV du génotype ancestral peut avoir augmenté en fréquence et s'être diversifié pour générer un certain nombre de ses propres SLVs (Figure 52). La définition la plus admise de ces fondateurs de sous-groupe est qu'ils présentent au moins trois liens vers d'autres STs, y compris le lien vers l'ancêtre supposé (Feil et al., 2004).



**Figure 52. Représentation de la population de *S. aureus* définie par analyse *multilocus sequence typing* (MLST) sous la forme d'un diagramme eBURST (Feil et al., 2004).** La totalité de la base de données MLST de *S. aureus* au moment de l'étude (2004) est affichée sous la forme d'un diagramme eBURST, où chaque rond représente un *sequence type* (ST). Les grappes de STs associés par des traits correspondent à des complexes clonaux (CCs). Les STs présumés fondateurs (en bleu) sont positionnés de manière centrale dans le CC, et les STs fondateurs de sous-groupes sont en jaune. Les principaux STs sont indiqués par des flèches en pointillés.

Le principal avantage de la MLST repose sur la production de données hautement reproductible non ambiguë, grâce à une nomenclature normalisée au niveau international (Maiden, 2006). Ainsi, les profils alléliques des isolats peuvent facilement être comparés à ceux d'une base de données centrale en ligne, comme la base PubMLST hébergée par l'Université d'Oxford (<https://pubmlst.org/databases.shtml>) ou la base MLST hébergée par l'Institut Pasteur (<https://bigsd.b.pasteur.fr/>).

Des inconvénients peuvent cependant être soulevés, notamment l'accessibilité limitée à cette méthode pour certains laboratoires du fait de la lourdeur de la technique et de son coût élevé lié au séquençage Sanger de plusieurs *loci* (Sabat et al., 2013).

La technique de MLST, initialement développée en 1998 chez *N. meningitidis* (Feil et al., 1999; Maiden et al., 1998), a ensuite été appliquée à de nombreux agents pathogènes. C'est la méthode de choix actuelle pour effectuer des études de dynamique des populations bactériennes, les gènes cibles étant d'évolution lente. Les bases de données en ligne offrent en outre une vue complète et continuellement mise à jour de l'épidémiologie mondiale et sur le long terme. Son implication semble plus limitée dans des études d'épidémiologie locale, les polymorphismes ciblés pouvant ne pas être suffisamment discriminants (Maiden, 2006).

### 2.1.2. MLST et *S. aureus*

#### *Développement du schéma MLST chez S. aureus*

En 2000, un schéma de MLST a été développé et validé pour *S. aureus*, par comparaison à la PFGE (Enright et al., 2000). Il s'est montré hautement discriminant et concordant avec la PFGE, des isolats de même ST produisant des profils de restriction très similaires. Cette étude *princeps* a permis de regrouper les isolats de MSSA et de MRSA en des clones distincts. La majorité des isolats de MSSA appartenait en effet au **ST30**, alors que la majorité des isolats de MRSA appartenait au **ST36**, dont le clone épidémique au sein des hôpitaux britanniques, EMRSA-16 (Enright et al., 2000).

#### *MLST et étude de la structure de population de S. aureus*

Par la suite, l'analyse phylogénétique Bayésienne des données de MLST a mis en évidence une structure de population de *S. aureus* fortement **clonale**. L'analyse de la diversification au sein des CCs suggérait que les mutations ponctuelles donnaient lieu à de nouveaux allèles au moins 15 fois plus fréquemment que la recombinaison (Feil et al., 2003). Ceci contraste avec les espèces naturellement transformables *N. meningitidis* et *S. pneumoniae*, pour lesquelles les allèles changent entre cinq et dix fois plus fréquemment par recombinaison que par mutation (Feil et al., 2000). Ainsi, bien que la recombinaison homologue contribue à l'évolution de *S. aureus* à long terme, ce phénomène a un impact négligeable sur la diversification du *core-genome* de cette espèce (Feil et al., 2003; Turner and Feil, 2007).

#### *Données épidémiologiques générées par MLST chez S. aureus*

Depuis la publication d'Enright et al., la MLST a été largement utilisée pour étudier l'évolution et la dynamique de population de *S. aureus* et effectuer un suivi épidémiologique mondial

(Lakhundi and Zhang, 2018). A ce jour, la base de données MLST en ligne de *S. aureus* répertorie 5349 STs (<https://pubmlst.org/saureus/>).

Bien que la MLST soit un outil précieux pour étudier la structure de population de *S. aureus*, les gènes de ménage analysés ne permettent pas d'identifier de lignées **virulentes** au sein de l'espèce. Par exemple, Feil et al. n'ont mis en évidence aucune différence significative dans la distribution des STs entre les souches isolées des porteurs sains et celles des patients atteints d'une infection (Feil et al., 2003). Ce phénomène peut être expliqué par le fait que les facteurs de virulence de *S. aureus* sont souvent codés par des éléments génétique mobiles, et ne sont donc pas explorés par MLST (Lindsay, 2010).

En revanche, la MLST combinée au typage **SCCmec** a fourni des informations importantes sur les relations évolutives entre les souches internationales de MRSA (Robinson and Enright, 2003). Ces méthodes ont notamment validé les données antérieures de PFGE, selon lesquelles la propagation des MRSA est principalement due à l'expansion clonale d'un nombre limité de lignées.

○ *Modèle évolutif de l'émergence et de la propagation des souches de MRSA*

Les MRSA ont tout d'abord disséminé en milieu hospitalier (*hospital-acquired/associated* MRSA [HA-MRSA]) à partir des années 1960, puis en milieu communautaire (*community-acquired/associated* [CA-MRSA]) dans les années 1990, et enfin ont été associés au bétail (*livestock-associated* [LA-MRSA]) dans les années 2000 (Stefani et al., 2012).

Des modèles ont montré que différentes cassettes **SCCmec** ont été acquises dans seulement 20 lignées différentes de MSSA épidémiques, et que leur transfert horizontal entre souches de *S. aureus* est un événement peu fréquent (Robinson and Enright, 2003). Sous la pression sélective des antibiotiques, ces cassettes **SCCmec** ont été maintenues dans certaines lignées, qui se sont propagées au niveau mondial. Bien que la répartition géographique diffère grandement entre les pays et les continents, cinq complexes clonaux ont été identifiés comme associés à ces clones pandémiques de MRSA: CC5, CC8 (dont le sous-groupe CC8-ST239), CC22, CC30 et CC45 (**Figure 53**) (Enright et al., 2002; Robinson and Enright, 2003).

Des études ont montré que les lignées des MSSA sont au contraire plus hétéroclonales que celles des MRSA, comportant une grande diversité de STs/CCs (Grundmann et al., 2010; Strommenger et al., 2008). En effet, bien que les CCs majoritaires identifiés chez les clones pandémiques de MRSA soient également prévalents chez les souches de MSSA, plusieurs

lignées de MSSA ont été observées dans le monde avec un fond génétique différent, tels que les CC7, CC9, CC12, CC15, CC25, CC51 et CC101 (Deurenberg and Stobberingh, 2008).

○ *Comparaison des souches de HA-MRSA et CA-MRSA*

De façon intéressante, les souches communautaires de CA-MRSA ont évolué indépendamment des souches hospitalières, et diffèrent ainsi phénotypiquement et génotypiquement. Alors que les isolats de HA-MRSA appartiennent à deux clones proches phylogénétiquement et dominants à travers le monde (CC5 et CC8), les clones de CA-MRSA sont au contraire plus divers, répartis dans différents CCs non proches phylogénétiquement (Lakhundi and Zhang, 2018).

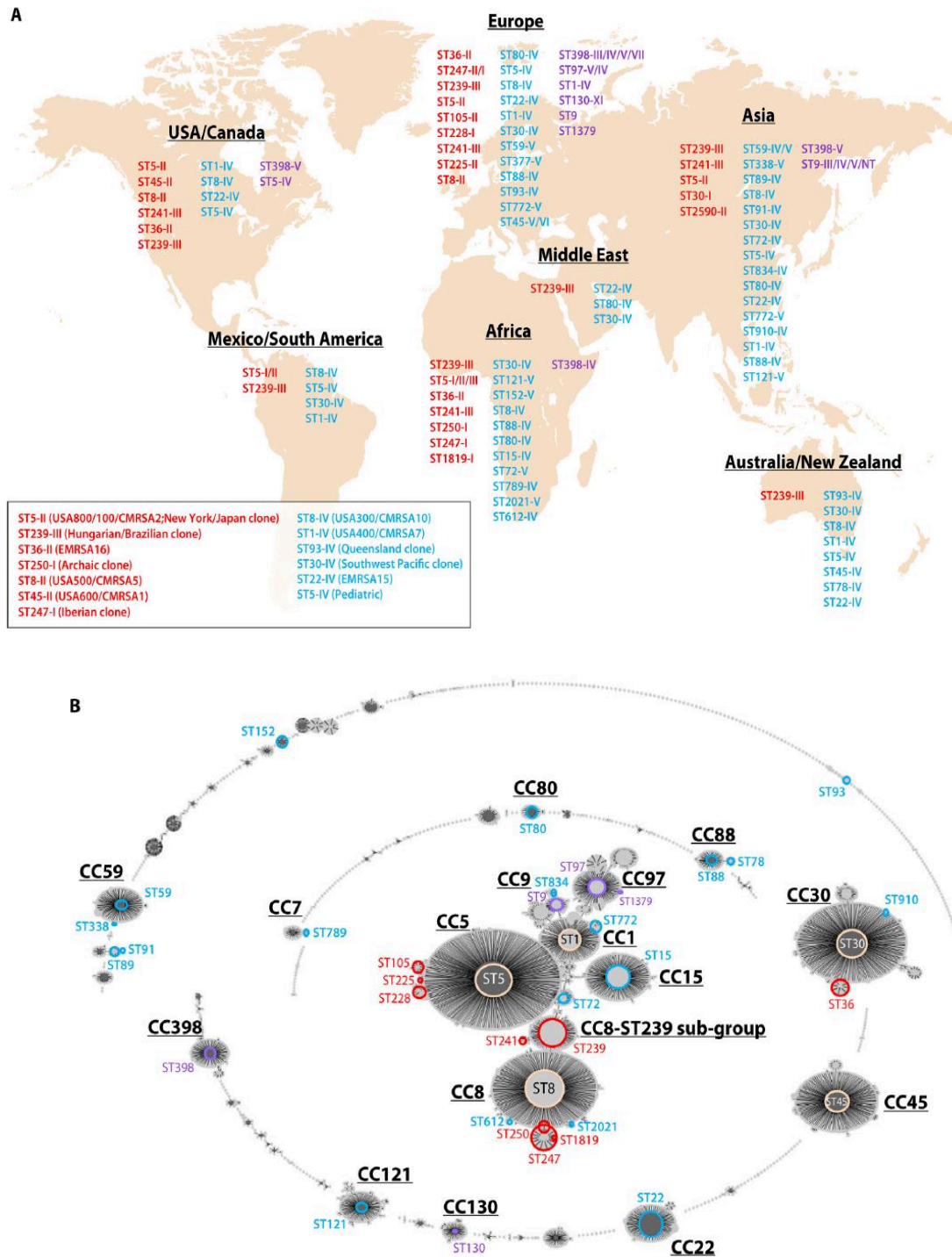
Les infections par les HA-MRSA sont par exemple principalement associées aux Etats-Unis au clone **USA100** (ST5, CC5) et au Royaume-Uni aux clones **EMRSA-15** (ST22, CC22) et **EMRSA-16** (ST36, CC30) (Figure 53).

Concernant les infections par les CA-MRSA, le clone **USA300** (ST8, CC8) est principalement retrouvé aux Etats-Unis (McDougal et al., 2003; O'Hara et al., 2016). Ce clone est de plus associé au SCCmec de type IV et à la présence du gène codant la PVL. Les souches appartenant au clone USA300 sont majoritairement responsables d'IPTM, mais peuvent également causer des infections plus sévères comme des pneumonies nécrosantes chez les enfants et l'adulte jeune en bonne santé, en lien avec la production de la PVL (Elston, 2007; Gillet et al., 2007). Ce clone n'a cependant pas diffusé en Europe. En effet, les infections à CA-MRSA en Europe n'ont pas la même place qu'aux Etats-Unis, et sont causées par des clones plus divers (le ST80, CC80 étant le clone prédominant) (Figure 53) (Lakhundi and Zhang, 2018).

Des études ont cependant mis en évidence le fait que les clones de CA-MRSA diffusent désormais également à l'hôpital, comme le ST8 (USA300) (Otter and French, 2011).

○ *Emergence des souches de LA-MRSA*

Les souches de MRSA isolées chez les animaux d'élevage (porcs et bovins) sont génétiquement distinctes des souches humaines. Elles appartiennent majoritairement au **ST398**, CC398 (Figure 53) (Witte et al., 2007). Ce clone est le plus répandu dans le monde, mais sa prévalence varie géographiquement. C'est ainsi le clone prédominant en Europe et en Amérique du Nord, et il a été détecté de façon sporadique en Asie et en Afrique.

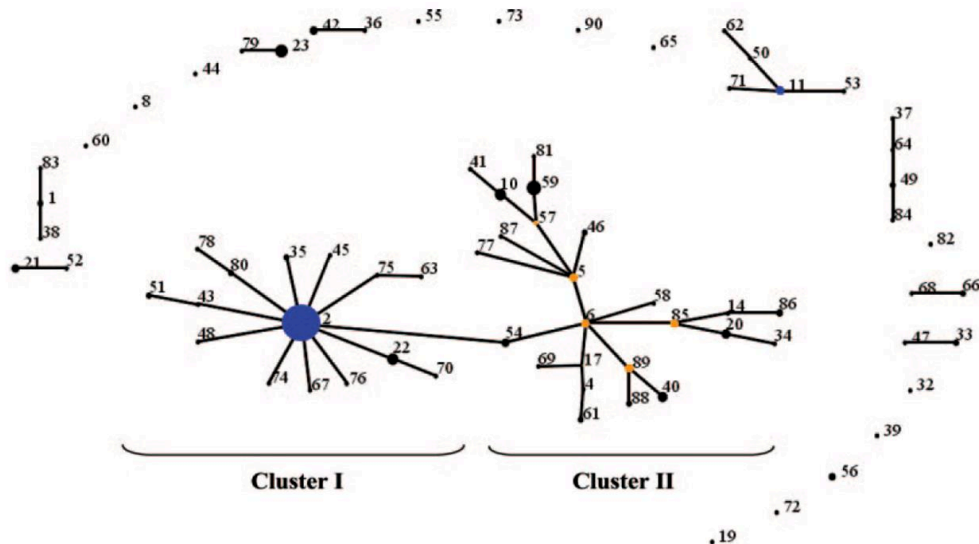


**Figure 53. Diversité génétique définie par *multilocus sequence typing* de la population mondiale des souches de *S. aureus* résistantes à la métilcilline (MRSA) (Lakhundi and Zhang, 2018). (A) Principaux *sequences types* (STs) et *SCCmec types* associés dans chaque continent ou région du monde. En rouge sont listés les STs associés aux clones hospitaliers de MRSA, en bleu ceux associés aux clones communautaires et en violet ceux associés aux animaux d'élevage. Bien qu'il existe une distribution mondiale des STs, de nombreux STs sont associés à une région. Les noms des souches épidémiques prédominantes se trouvent dans l'encadré. (B) Représentation de la population de *S. aureus* sous la forme d'un diagramme eBURST (base de données MLST du 31 janvier 2018). Les clones de MRSA décrits en (A) sont entourés avec le même code couleur (rouge, bleu et violet), la couleur pêche étant utilisée pour désigner des STs associés à la fois aux clones hospitaliers et communautaires.**

### 2.1.3. MLST et *S. epidermidis*

Trois schémas de MLST ont été publiés pour *S. epidermidis* (Thomas et al., 2007; Wang, 2003; Wisplinghoff et al., 2003), mais le schéma de Thomas et al. est celui qui fait consensus (Thomas et al., 2007). Celui-ci est hébergé dans la base PubMLST, et recense actuellement 820 STs (<https://pubmlst.org/sepidermidis/>).

Dans l'étude de Miragaia et al. en 2007, l'analyse MLST de 217 isolats nosocomiaux de *S. epidermidis* d'origines géographiques et cliniques diverses a montré un niveau élevé de diversité génétique de l'espèce (74 STs) (Miragaia et al., 2007). L'algorithme eBURST regroupait les STs en neuf CCs et 13 singletons. Il était à noter que le CC2 était très majoritaire (74% des isolats) et comprenait un nombre inhabituellement élevé de STs (Figure 54). Ce CC a par la suite été divisé en deux sous-groupes, CC2-I et CC2-II (Miragaia et al., 2008).



**Figure 54.** Application de l'algorithme eBURST aux données de *multilocus sequence typing* (MLST) de 217 isolats de *S. epidermidis* (Miragaia et al., 2007). Chaque rond représente un *sequence type* (ST), les bleus et jaunes correspondent respectivement aux fondateurs des groupes et des sous-groupes. Les grappes de STs associés par des traits correspondent à des complexes clonaux (CCs). Le CC2 a été subdivisé en deux groupes: le *cluster* I, comprenant le fondateur du CC (ST2), et le *cluster* II.

Bien que la valeur de  $I_a$  (0,29) était en faveur d'une structure de population clonale de l'espèce, l'analyse des séquences nucléotidiques des *loci* montrait que la recombinaison donnait lieu à de nouveaux allèles environ deux fois plus souvent que les mutations ponctuelles. Les auteurs ont ainsi suggéré une structure **épidémique** de la population nosocomiale de *S. epidermidis*, qui évolue rapidement grâce à la recombinaison et au transfert fréquent d'éléments génétiques

mobiles, y compris la cassette *SCCmec* qui aurait été acquise au moins 56 fois (Miragaia et al., 2007).

La MLST a par la suite confirmé la prévalence du **CC2** à travers le monde (Mendes et al., 2012; Widerström et al., 2012). En particulier, le ST2, appartenant au groupe CC2-I, représente la majorité des isolats mondiaux de *S. epidermidis* résistants à la pénicilline responsables d'IAS (Ahlstrand et al., 2014; Li et al., 2009a).

Dans l'objectif d'affiner la classification des isolats de *S. epidermidis*, des analyses Bayésiennes de regroupement des STs ont par la suite révélé une structure de population caractérisée par six *clusters* (Thomas et al., 2014a; Tolo et al., 2016). De façon intéressante, ces *clusters* reflètent l'écologie de l'espèce, certains étant prédictifs de l'origine hospitalière ou non hospitalière des isolats avec une précision de 80%, ou prédictifs du caractère pathogène ou non avec une précision de 45%. Par exemple, les isolats appartenant au *cluster* 5 (qui regroupe les isolats de ST2 notamment) sont presque exclusivement d'origine hospitalière, sont multi-résistants aux antibiotiques (résistance à la pénicilline, la clindamycine, la gentamicine et à l'association triméthoprim-sulfaméthoxazole), possèdent des marqueurs de virulence (*icaA*, IS256 et *sesD/bhp*), et présentent une capacité élevée à former du biofilm, suggérant un mode de vie adapté à l'environnement hospitalier (Thomas et al., 2014a).

Plus récemment, a été décrite l'émergence de clones de *S. epidermidis* résistants au linézolide en Grèce et en Allemagne appartenant au ST22 (CC5) (Karavasilis et al., 2015; Layer et al., 2018).

D'autres schémas de MLST hébergés sur la base de données PubMLST (<https://pubmlst.org/databases/>) ont été décrits pour d'autres espèces de SCN comme *S. haemolyticus* (Cavanagh et al., 2012), *S. hominis* (Zhang et al., 2013) ou *Staphylococcus pseudointermedius* (Solyman et al., 2013), mais ne seront pas détaillés ici.



#### **2.1.4. MLST et *S. lugdunensis***

La première méthode moléculaire de typage développée pour l'espèce *S. lugdunensis* a été la PFGE (van der Mee-Marquet et al., 2003). Cette méthode a ensuite été rapidement supplantée par la MLST, plus appropriée aux études macro-épidémiologiques et à la détermination de la structure de population.

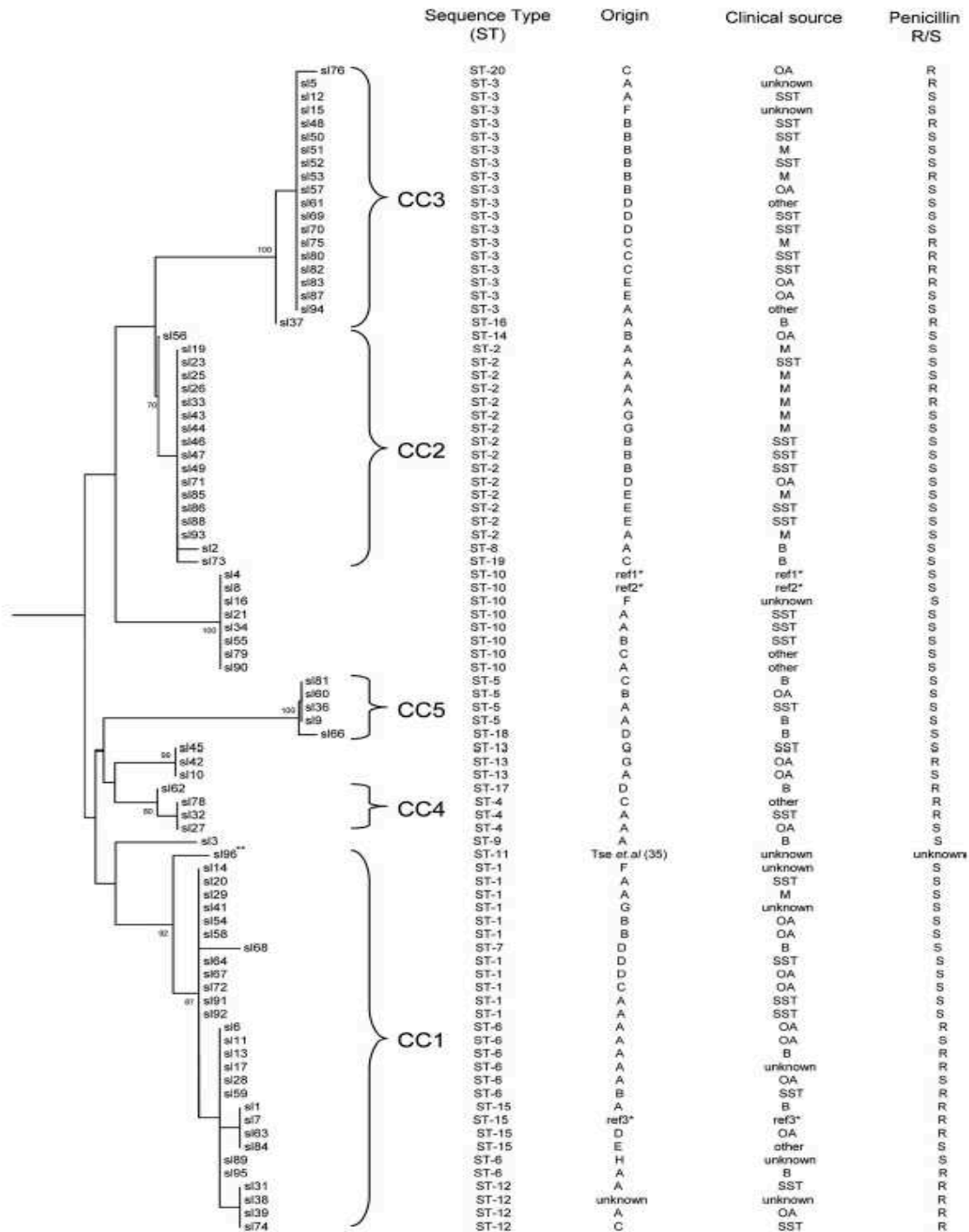
##### ***Développement du schéma MLST chez S. lugdunensis***

La MLST a été développée chez *S. lugdunensis* en 2012 par Chassain et al. (Chassain et al., 2012). Pour cela, 87 isolats issus de divers contextes cliniques d'infections (IPTM, IOA, bactériémies et infections sur matériel) et d'origines géographiques différentes ont été utilisés. Les sept gènes sélectionnés pour le schéma MLST étaient : *aroE* : shikimate dehydrogenase, *dat* : D-amino acid aminotransferase, *ddl* : D-alanine ligase, *gmk* : guanylate kinase, *ldh* : L-lactate dehydrogenase, *recA* : recombinaison, et *yqiL* : acetyl-coenzyme A acetyltransferase.

Le choix de ces gènes domestiques a été basé sur leur utilisation dans les schémas MLST de *S. aureus* (Enright et al., 2000), *S. epidermidis* (Thomas et al., 2007), *Listeria monocytogenes* (Ragon et al., 2008) et *C. difficile* (Griffiths et al., 2010; Lemee et al., 2004). Le nombre d'allèles pour chaque gène variait de quatre à neuf. Les ratios  $d_N/d_S$  étaient faibles (variant de 0 à 0,24 selon les gènes), ce qui suggérait que les mutations non-silencieuses étaient éliminées par sélection purificatrice.

Les profils alléliques ont permis la définition de 20 STs regroupés en cinq CCs (**Figure 55**). Le principal CC était le CC1 ( $n = 29$ ), suivi du CC3 ( $n = 20$ ) et du CC2 ( $n = 18$ ). Le polymorphisme allélique identifié chez *S. lugdunensis* apparaissait inférieur à celui de *S. aureus* (Grundmann et al., 2002) et *S. epidermidis* (Miragaia et al., 2007). Les analyses phylogénétiques ont indiqué une évolution principalement mutationnelle des gènes et une structure de population clonale de l'espèce. En effet, aucun phénomène de recombinaison n'a été détecté, et le calcul de l'index d'association a mis en évidence un déséquilibre de liaison entre les allèles ( $I_a = 1,88$ ).

Aucune corrélation n'a été observée entre la distribution des isolats au sein des lignées phylogénétiques et le contexte clinique, la production d'une pénicillinase ou encore l'origine géographique (Chassain et al., 2012).



**Figure 55.** Dendrogramme montrant les relations génétiques de 87 isolats de *S. lugdunensis* basé sur l'analyse multilocus sequence typing (MLST) (Chassain et al., 2012). L'arbre a été construit en utilisant les données des séquences concaténées des sept gènes de ménage et la méthode « neighbor-joining ». Les complexes clonaux (CCs) sont représentés par des accolades. L'enracinement du dendrogramme a été établi à l'aide de données de séquences homologues de *Staphylococcus haemolyticus* JCSC1435. L'origine géographique des isolats est indiquée par une lettre majuscule: A, Rouen; B, Nantes; C, Nancy; D, Bordeaux; E, Montpellier; F, Versailles; G, Louvain (Belgique); et H, Maribor (Slovénie). L'origine clinique des souches est indiquée par une abréviation: OA, infection ostéoarticulaire; SST, infection de la peau et des tissus mous; M, infection sur matériel; et B, bactériémie.

**Données épidémiologiques générées par MLST chez *S. lugdunensis***

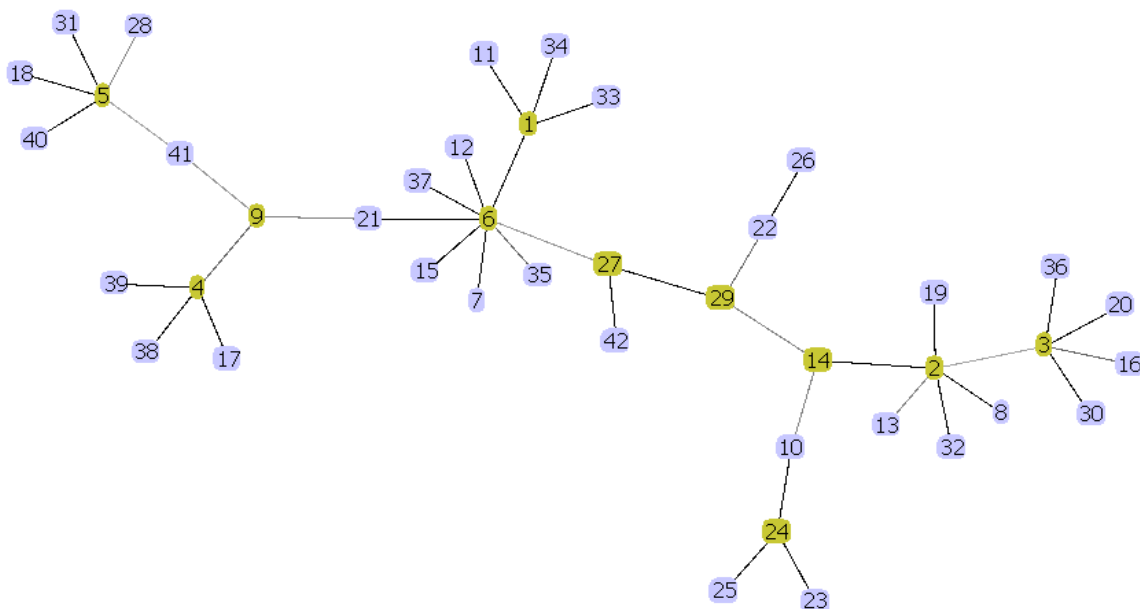
Depuis, quelques autres études ont utilisé la MLST pour le typage de souches cliniques de *S. lugdunensis*. Une première étude, menée par Ho et al. en 2015 (Ho et al., 2015), a analysé sur une période de quatre mois des souches d'écouvillonnages nasaux, axillaires et de l'aine prélevés chez 252 patients adultes atteints d'insuffisance rénale au stade terminal dans deux centres de néphrologie à Hong Kong. Le taux de portage de *S. lugdunensis* était de 51,6% (137 isolats correspondant à 130 patients), et le pourcentage d'isolats résistants à l'oxacilline de 8,3%. Le typage par PFGE des 137 isolats a identifié dix pulsotypes, dont le pulsotype majoritaire (nommé HKU1) représentait 51,8% (71/137) des isolats. Dix sept isolats, choisis pour être représentatifs des principaux pulsotypes, ont été analysés par MLST. Six STs ont été identifiés, dont deux nouveaux. De manière frappante, tous les isolats résistants à l'oxacilline, et la plupart de ceux résistants à la gentamicine et à la tétracycline, appartenaient à un clone identifié par PFGE (HKU1) et par MLST (**ST3, CC3**). Les auteurs ont alors postulé que l'expansion de ce clone pouvait traduire d'une part une forte capacité de colonisation et de transmission nosocomiale, et d'autre part une capacité d'acquisition de déterminants de résistance (Ho et al., 2015).

La même année, une étude rétrospective a été menée dans un hôpital de Taiwan entre 2003 et 2013 sur 118 isolats de *S. lugdunensis* isolés de sites normalement stériles (principalement des hémocultures) (Cheng et al., 2015). L'ensemble des isolats a été analysés par PFGE, mettant en évidence trois *clusters* majeurs. Le typage SCCmec mené pour les 35,6% des isolats résistants à l'oxacilline a identifié quatre SCCmec types (la moitié appartenait au type V, suivi du II, du VT et du IV). Huit isolats appartenant au SCCmec type II ont été sélectionnés pour une analyse MLST, qui a permis l'identification d'un clone appartenant au **ST6 (CC1)**, capable de persister dans le temps. En effet, ce clone a été isolé de manière continue chez différents patients et dans différents services de l'hôpital sur une période de 40 mois. Cette étude rapportait donc la possibilité de diffusion d'un clone de *S. lugdunensis* résistant à l'oxacilline dans un hôpital. Cependant, du fait du caractère rétrospectif de l'étude, il était difficile de savoir si ces isolats étaient d'origine communautaire ou associée aux soins.

En 2016, la même équipe a analysé rétrospectivement 129 isolats cliniques de *S. lugdunensis* responsables d'infections communautaires ( $n = 48$ ) et d'IAS ( $n = 81$ ) collectés entre 2003 et 2014 dans un autre hôpital de Taiwan (Yeh et al., 2016). Par analyse MLST, deux CCs majeurs ont été identifiés, le CC1 ( $n = 56$ ) composé de 4 STs, suivi du CC3 ( $n = 33$ ) composé uniquement du ST3. Le **ST6**, ST ancestral du CC1, était le ST le plus fréquemment retrouvé

dans l'étude ( $n = 40$ ). De façon intéressante, le **CC3** était composé d'une proportion significativement plus élevée d'isolats d'IAS (33,3%) que d'isolats communautaires (12,5%) ( $P = 0,009$ ), alors que cette différence n'était pas observée pour les autres CCs. De plus, 27 isolats (20%) étaient résistants à l'oxacilline, provenant presque exclusivement d'IAS. La majorité d'entre eux ( $n = 21$ ) appartenait au ST3 (CC3) (SCC*mec* type V principalement) et six au ST6 (CC1) (SCC*mec* type II).

A l'heure actuelle, la base de données MLST de *S. lugdunensis* hébergée sur le site Web de l'Institut Pasteur (<http://bigsd.b.pasteur.fr/staphlugdunensis/>) recense 42 STs regroupés en sept CCs (Figure 56)



**Figure 56.** Analyse eBURST de la population de *S. lugdunensis* (donnée personnelle, Mai 2019). La totalité de la base de données *multilocus sequence typing* (MLST) de *S. lugdunensis* est affichée sous la forme d'un diagramme eBURST unique, grâce au logiciel PHYLOViZ. Chaque nombre représente un *sequence type* (ST), les STs fondateurs sont indiqués en jaune.

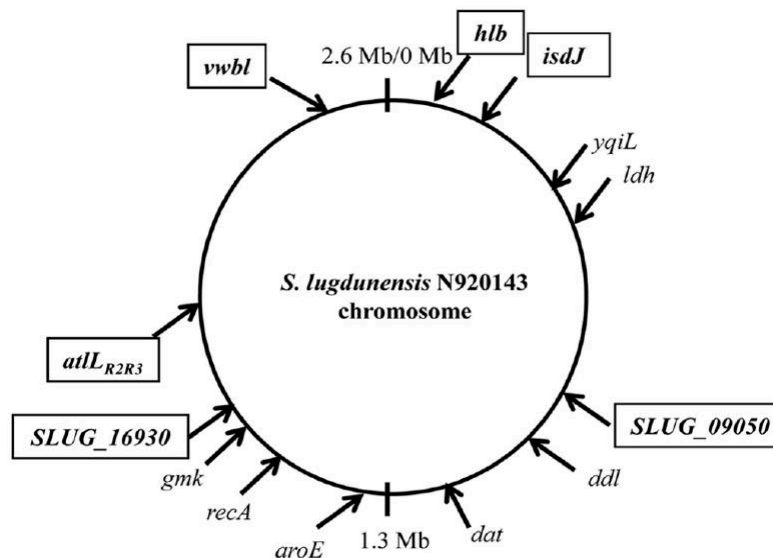
Ces différents travaux de MLST ont mis en évidence la structure de population fortement clonale de *S. lugdunensis*, sans établir de lien entre contextes cliniques d'isolement des souches et génotypes. Malgré le faible nombre d'études disponibles à ce jour, il ressort que les **CC1** et **CC3** sont les lignées phylogénétiques les plus représentées, en France comme en Asie. De plus, certains génotypes, pouvant être associés à une résistance à l'oxacilline, semblent avoir la capacité de persister et/ou se propager dans le milieu hospitalier. Cependant, la MLST étant une technique peu adaptée à l'épidémiologie locale, des techniques de typage plus discriminantes apparaissent nécessaires pour confirmer cette propagation clonale.

## 2.2. Multi-virulence locus sequence typing (MVLST)

La deuxième méthode développée pour le typage de *S. lugdunensis* a été la MVLST (Didi et al., 2014). Cette technique consiste en le séquençage de *loci* connus ou présumés associés à la virulence. En effet, du fait de leur exposition à de fréquents changements environnementaux, les gènes associés à la virulence peuvent évoluer plus rapidement que les gènes domestiques. Par conséquent, ces gènes peuvent présenter un pouvoir discriminant plus élevé pour des études épidémiologiques, comme montré pour *S. aureus* (Verghese et al., 2012), *L. monocytogenes* (Cai et al., 2002) et *Enterococcus faecalis* (Chowdhury et al., 2009).

Sept gènes ont été retenus pour le développement du schéma de MVLST de *S. lugdunensis* (Figure 57):

- *atIL<sub>R2</sub>* et *atIL<sub>R3</sub>*: codant les domaines répétés de l'autolysine bifonctionnelle AtIL;
- *hly*: codant une hémolysine putative ;
- *isdJ*: codant une protéine impliquée dans la capture du fer ;
- *SLUG\_09050*: codant l'hémolysine III putative ;
- *SLUG\_16930*: codant une protéine putative de liaison au fibrinogène et à la fibronectine, homologue de la protéine FbpA de *S. aureus* (Cheung et al., 1995);
- *vwbl*: codant la protéine de liaison au facteur von Willebrand vWbl.



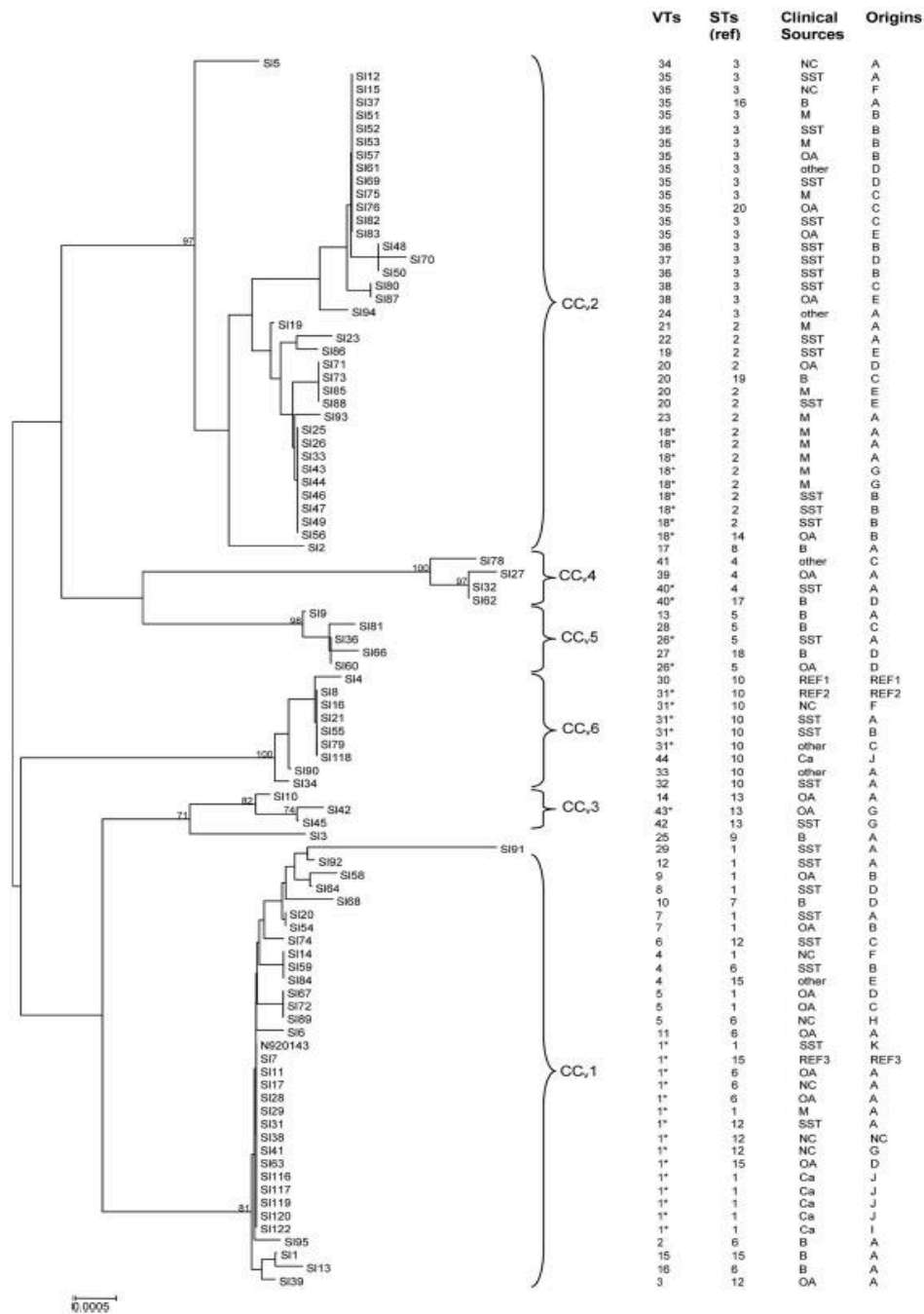
**Figure 57. Localisation des *loci* de multi-virulence locus sequence typing (MVLST) dans le génome de la souche *S. lugdunensis* N920143 (Didi et al., 2014).** Les sept *loci* potentiellement associés à la virulence sélectionnés pour le schéma de MVLST sont encadrés et en gras, et les sept gènes domestiques du schéma de *multilocus sequence typing* (MLST) sont indiqués en italique.

Le schéma de MVLST a été appliqué à 93 isolats de *S. lugdunensis* collectés de contextes cliniques et d'origines géographiques différents (Didi et al., 2014). Parmi ces isolats, 87 étaient responsables d'infections et avaient précédemment été utilisés pour le développement du schéma MLST (Chassain et al., 2012), et six isolats étaient en situation de portage. Le polymorphisme allélique de ces gènes était modéré (nombre d'allèles pour chaque gène variant de cinq à 14) et comparable à celui des gènes de ménage de MLST. Cependant, le schéma MVLST a permis l'identification de 43 *virulence types* (VTs) regroupés dans six CCs de virulence (CC<sub>vs</sub>) (Figure 58), comparativement à 20 STs identifiés par MLST. Le calcul des *DI* a confirmé que la MVLST ( $DI_{MVLST} = 0,943$ ) était nettement plus discriminante que la MLST ( $DI_{MLST} = 0,890$ ).

De façon intéressante, la MVLST et la MLST groupaient les souches de façon congruente. Cette congruence, associée au calcul de l'index d'association ( $I_a = 3,74$ ), confirment une structure de population clonale de *S. lugdunensis*, suggérant une fréquence faible voire une absence de recombinaison. Ces résultats étaient de plus en faveur d'une co-évolution des gènes putatifs de virulence et des gènes de ménage. Les *ratios*  $d_N/d_S$  ainsi que le test de neutralité de Tajima suggéraient que tous les *loci* associés à la virulence étaient soumis à une sélection négative, même pour *atlL<sub>R2</sub>* et *SLUG\_16930* pour lesquels les rapports  $d_N/d_S$  étaient plus élevés. De la même façon que pour la MLST, aucune lignée hypervirulente ou spécifique aux souches de portage n'a été identifiée par MVLST, avec la limite que seulement six souches de portage avaient été incluses dans cette étude.

La MVLST, en offrant une résolution plus élevée que la MLST, apparaît comme un outil fiable pour le typage de *S. lugdunensis* à des fins macro-épidémiologiques. En outre, un schéma simplifié basé sur l'analyse de trois *loci* seulement (*atlL<sub>R3</sub>*, *isdJ* et *SLUG\_16930*) s'est révélé tout aussi discriminant que la MLST ( $DI_{MVLST_{trilocus}} = 0,922$ ). Ce schéma *trilocus* peut ainsi être utilisé dans le cas d'études épidémiologiques à court terme (Didi et al., 2014).

Il existe donc à ce jour deux méthodes de typage basées sur le séquençage chez *S. lugdunensis*, produisant des résultats non ambigus et exportables. La **MLST** est considérée comme la technique de référence pour des analyses macro-épidémiologiques et de structure de population, tandis que la **MVLST** *trilocus* apparaît intéressante pour de l'épidémiologie locale. Ces techniques n'ont pas permis de mettre en évidence de lien entre génotypes et contexte clinique d'isolement des souches, probablement du fait de la structure de population clonale de cette espèce.



**Figure 58. Dendrogramme montrant les relations génétiques de 93 isolats de *S. lugdunensis* basé sur l'analyse multi-virulence locus sequence typing (MVLST) (Didi et al., 2014). L'arbre a été construit en utilisant les données de séquences concaténées des sept gènes potentiellement associés à la virulence par la méthode « neighbor-joining ». Les complexes clonaux de virulence (CC<sub>v</sub>s) sont représentés par des accolades. Les virulence types (VTs) obtenus par MVLST et les sequence types (STs) obtenus par multilocus sequence typing (MLST) sont indiqués sur la droite. L'origine géographique des isolats est indiquée par une lettre majuscule: A, Rouen; B, Nantes; C, Nancy; D, Bordeaux; E, Montpellier; F, Versailles; G, Louvain (Belgique); et H, Maribor (Slovénie); I, Tours; J, Kronoberg County (Suède); K, Lyon. L'origine clinique des souches est indiquée par une abréviation: OA, infection ostéoarticulaire; SST, infection de la peau et des tissus mous; M, infection sur matériel; B, bactériémie et Ca, portage.**

### 2.3. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis (MLVA)

Le développement du séquençage de génomes bactériens a mis en évidence que tous contenaient de multiples *loci* de répétitions en tandem (*tandem repeats* [TRs]), dont le nombre d'unités répétées peut être variable entre les souches d'une même espèce ; ils sont alors appelés *variable number of tandem repeats* (VNTRs). Ils peuvent être identifiés *in silico* grâce à l'utilisation de logiciels, comme *Tandem Repeats Finder* (Benson, 1999). Le génotypage par MLVA repose sur l'analyse du polymorphisme de taille de ces VNTRs dispersés sur le génome bactérien (van Belkum, 2007).

#### 2.3.1. Les VNTRs

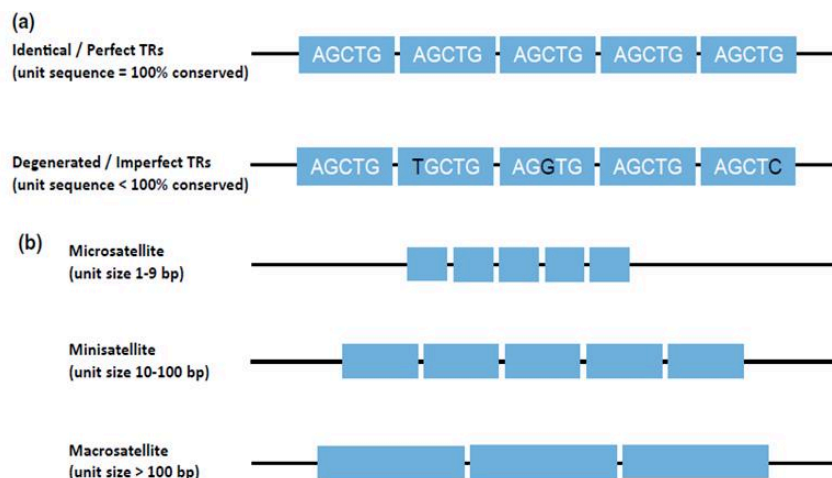
##### 2.3.1.1. Définition

Les VNTRs sont constitués d'unités de répétitions appelées TRs, qui sont des séquences nucléotidiques se répétant deux fois ou plus en « tête à queue ». En fonction de la conservation des séquences des TRs, ils sont classés en deux catégories (Figure 59a) (Zhou et al., 2014) :

- les TR identiques ou parfaits, si les séquences sont conservées à 100%,
- les TR dégénérés ou imparfaits, si des variations de séquences sont observées.

Par ailleurs, les TRs sont généralement classés en trois catégories en fonction de la taille de l'unité de répétition, bien qu'il n'y ait pas de définition consensuelle (Figure 59b) (Zhou et al., 2014) :

- les microsatellites (unité de répétition < 10 pb),
- les minisatellites (unité de répétition comprise entre 10 et 100 pb),
- les macrosatellites (unité de répétition > 100 pb).



**Figure 59.** Représentation des différents types de *tandem-repeats* (TR) (Zhou et al., 2014). (a) Classement en deux catégories selon la conservation ou non de la séquence de l'unité de répétition. (b) Classement en trois catégories selon la taille de l'unité de répétition.

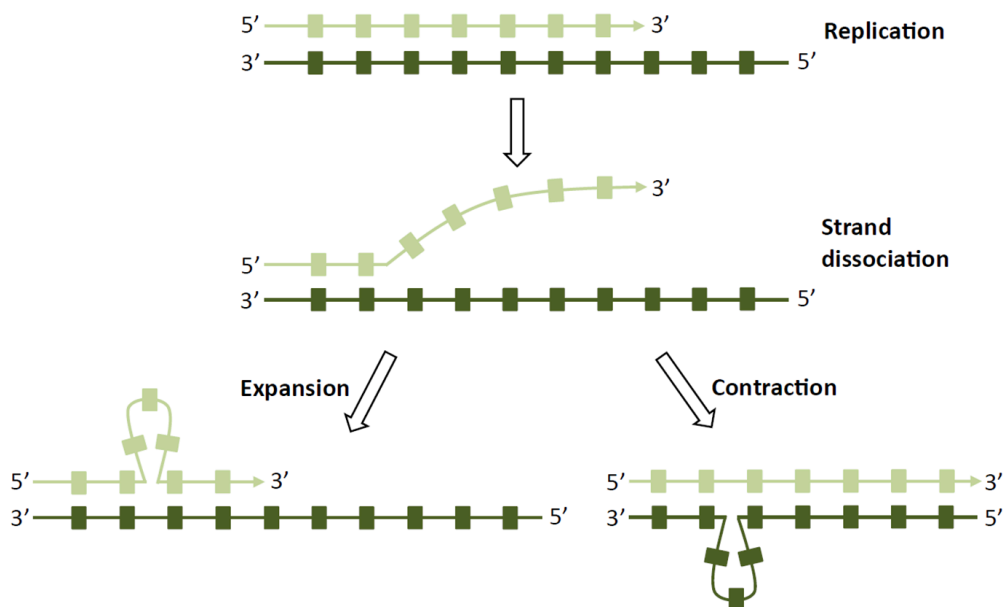


## 2.3.1.2. Mécanismes de la variabilité des VNTRs

La variabilité des VNTRs est l'un des moteurs de la plasticité génomique bactérienne. Les régions contenant des TRs sont potentiellement hypermutables par excision ou duplication d'unités de TRs. Deux mécanismes non-exclusifs sont actuellement largement décrits pour expliquer la variation du nombre d'unités de TRs : les erreurs de glissement de l'ADN polymérase III lors de la réplication bactérienne (*strand-slippage mispairing* [SSM]) et la recombinaison (Zhou et al., 2014).

***Le glissement de l'ADN polymérase (SSM)***

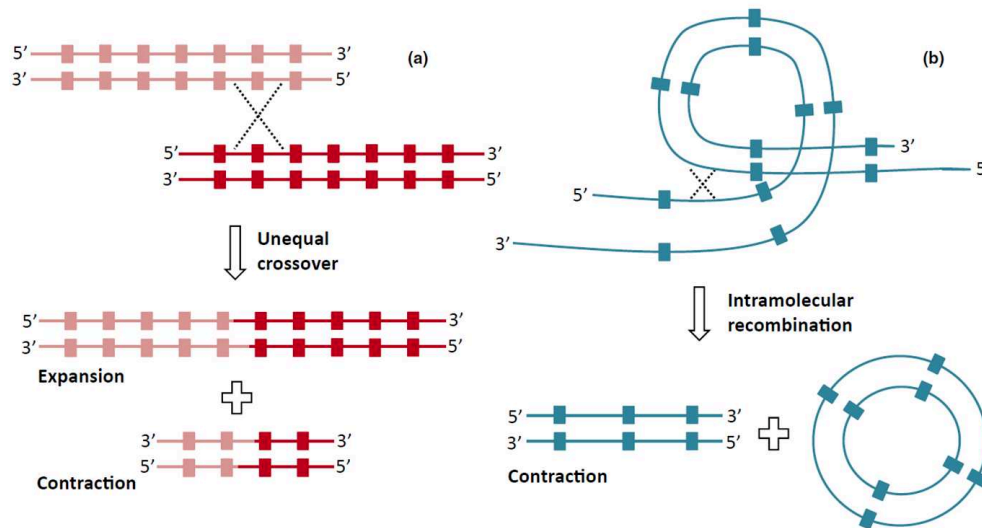
Ce processus est initié lors de la réplication, au cours de laquelle la région partiellement répliquée contenant des TRs subit une dissociation transitoire, puis une mauvaise réassociation des brins de par la formation d'une structure renflée (structure tige/boucle) de répétitions non appariées sur le brin matrice ou sur le brin naissant (**Figure 60**). Si le renflement est présent sur le brin brin naissant, une duplication de TRs se produira ; en revanche si le renflement se produit sur le brin matrice, il en résultera une excision de TRs sur le brin d'ADN nouvellement synthétisé. Le SSM est le mécanisme dominant sous-jacent à la variation des microsatellites (van Belkum et al., 1998; Zhou et al., 2014).



**Figure 60. Variabilité du nombre de *tandem-repeats* (TR) par mécanisme de glissement de l'ADN polymérase lors de la réplication (Zhou et al., 2014).** Les TRs sont représentés par des carrés sur les brins d'ADN naissant (vert clair) et matrice (vert foncé). La région des TRs partiellement répliquée subit une dissociation transitoire, puis une mauvaise réassociation des brins avec un renflement soit sur le brin naissant conduisant à la duplication de TRs, soit sur le brin matrice conduisant à l'excision de TRs.

### La recombinaison

En règle générale, le phénomène de recombinaison est plus important pour le réarrangement des TRs avec une longue unité de répétitions. Plusieurs modèles ont été proposés pour le mécanisme de recombinaison, tels que le *crossover* inégal qui se produit entre deux molécules d'ADN différentes, et la recombinaison intramoléculaire (Figure 61) (Zhou et al., 2014).



**Figure 61. Variabilité du nombre de *tandem-repeats* (TR) par mécanisme de recombinaison** (Zhou et al., 2014). Les TRs sont représentés par des carrés sur les brins d'ADN. **(a)** Modèle de *crossover* inégal. Lorsque des régions contenant des TRs de deux molécules d'ADN différentes sont mal alignées, un *crossover* inégal peut se produire, entraînant une insertion de TRs dans une molécule et une délétion dans l'autre. **(b)** Modèle de recombinaison intramoléculaire. La recombinaison se produit entre des TRs au sein d'une molécule d'ADN, et deux produits sont générés avec une délétion de TRs.

### Facteurs influençant la fréquence de réarrangement des VNTRs

La fréquence des événements de duplication ou d'excision des TRs varie en fonction de facteurs intrinsèques (structurels), extrinsèques (environnementaux) mais également de l'efficacité des systèmes de réparation de l'ADN (Zhou et al., 2014). En ce qui concerne les caractéristiques intrinsèques, une corrélation positive a par exemple été établie entre la fréquence de réarrangement et le nombre de répétitions des TRs, et entre la fréquence de mutation des TRs et la taille de l'unité de répétition. Concernant les conditions environnementales, des facteurs comme la température de croissance, la croissance dans du sang humain ou la carence nutritionnelle peuvent affecter la fréquence des réarrangements des TRs.

De plus, la fréquence des mutations au sein des VNTRs semble être influencée par le nombre de répétitions et la séquence encadrant les répétitions (Bricker et al., 2003). Ainsi, chaque *locus* de VNTRs sera caractérisé par un taux de variabilité qui lui est propre.

### 2.3.1.3. Rôles des VNTRS

L'instabilité des VNTRS, qu'ils soient situés dans des régions intergéniques ou codantes, est exploitée par les bactéries pour moduler de manière réversible l'expression de gènes et/ou la fonctionnalité de protéines. Cette stratégie de commutation d'un phénotype à un autre, appelée **variation de phase** (gain ou perte réversible, aléatoire et à haute fréquence d'un phénotype), permet aux bactéries de s'adapter rapidement à leur environnement (Gemayel et al., 2010). Les VNTRS sont ainsi par exemple impliqués dans des stratégies d'évasion immunitaire ou de tropisme tissulaire (Zhou et al., 2014).

#### ***Impact phénotypique des variations de TRs intragéniques***

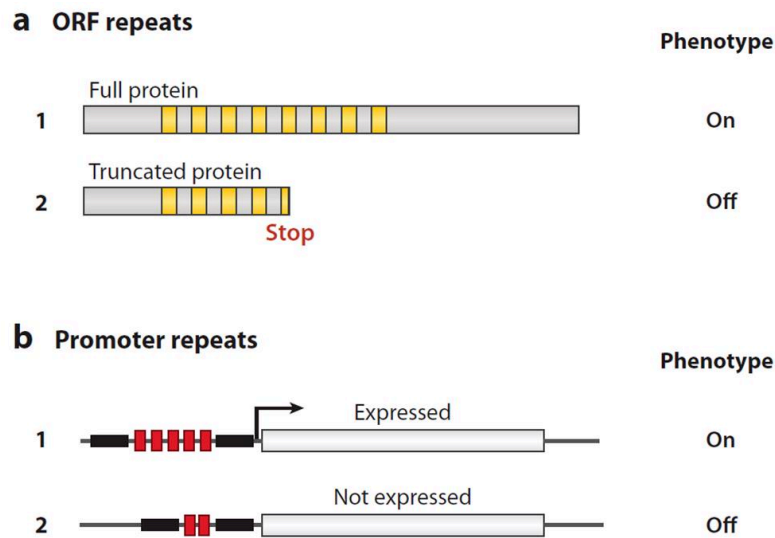
Les réarrangements de TRs intragéniques peuvent induire une variation de phase, les mécanismes sous-jacents dépendant de la taille de l'unité du TR. Si elle n'est pas un multiple de trois, les réarrangements sont en mesure d'induire un décalage du cadre de lecture et donc une protéine non fonctionnelle ou tronquée (variation de phase *On - Off*) (Figure 62a). Si la taille de l'unité du TR est un multiple de trois, l'effet peut être lié à des altérations structurelles et fonctionnelles de la protéine correspondante (Gemayel et al., 2010).

L'impact phénotypique des variations des TRs intragéniques a ainsi été décrit pour des gènes codant des structures de surface, des systèmes d'acquisition du fer ou encore des systèmes de restriction-modification (Zhou et al., 2014). Par exemple, la protéine Eap de *S. aureus* (cf paragraphe 3.3.1.1 de la partie 1) est une adhésine multifonctionnelle contenant des TRs, dont la taille de chaque unité de répétition n'est pas identique (93 à 110 acides aminés). Un minimum de deux répétitions dans le gène *eap* est nécessaire pour qu'Eap puisse provoquer une agglutination, une adhérence et une invasion aux cellules hôtes (fibroblastes et cellules endothéliales) par *S. aureus*. De plus, lorsque le nombre de répétitions augmente de deux à cinq, ces capacités sont considérablement améliorées, ce qui suggère que l'expansion du nombre de répétitions dans le gène *eap* favorise l'adaptation de *S. aureus* à son hôte (Hussain et al., 2008).

#### ***Impact phénotypique des variations de TRs intergéniques***

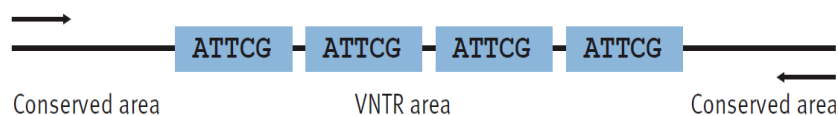
Les réarrangements des TRs situés dans des régions intergéniques, et plus particulièrement autour de la région promotrice, peuvent induire des variations de phase en modulant la transcription des gènes correspondants (Figure 62b) (Zhou et al., 2014). Selon la localisation des TRs (amont de la région -35, entre les régions -35 et -10 ou entre le site d'initiation de la transcription et le cadre ouvert de lecture), la variation du nombre de répétitions pourra affecter

l'initiation de la transcription en modifiant l'affinité de liaison de protéines régulatrices ou en altérant la distance des éléments du promoteur.



**Figure 62. Mécanisme de variation de phase entraîné par la variation du nombre de *tandem-repeats* (TR) (Gemayel et al., 2010).** (a) La variation des TRs situés dans la région codante du gène peut générer une protéine fonctionnelle (phénotype *On*) ou provoquer des décalages de cadre de lecture se traduisant par une protéine non fonctionnelle ou tronquée du fait de l'apparition d'un codon stop prématuré (phénotype *Off*). (b) La variation des TRs situés dans la zone promotrice du gène peut conduire à une expression (phénotype *On*) ou non (phénotype *Off*).

Les VNTRs sont ainsi considérés comme des marqueurs hautement polymorphes, du fait de la variabilité de leur taille mais également de leurs séquences nucléotidiques. La présence en amont et en aval de ces régions hypervariables de régions conservées (régions flanquantes) permet le développement d'amorces pour en étudier le dynamisme, et pour développer des méthodes de typage comme la MLVA (Figure 63) (Nadon et al., 2013).



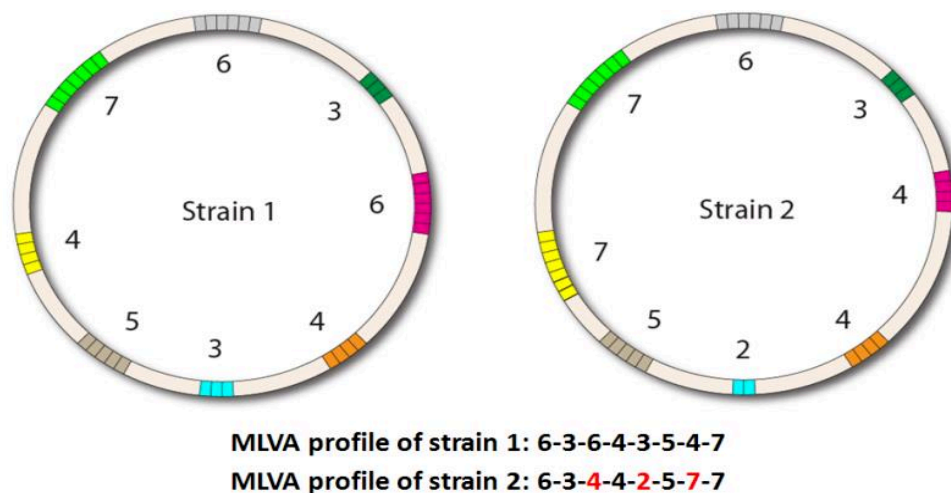
**Figure 63. Représentation de l'organisation d'un locus de VNTR.** Les flèches indiquent les amorces utilisées pour l'amplification par PCR dans la région conservée encadrant les répétitions (Nadon et al., 2013).

### 2.3.2. Principe de la MLVA

Le typage moléculaire basé sur l'analyse du nombre de répétitions de plusieurs *loci* de VNTRs est connu sous le nom de MLVA. En effet, il a été démontré que le nombre de répétitions par *locus* était spécifique d'un isolat pour une espèce bactérienne donnée (van Belkum, 2007).

La technique consiste à amplifier par PCR, à l'aide d'amorces situées dans les régions flanquantes (Figure 63), un certain nombre de *loci* de VNTRs sélectionnés et à évaluer pour chacun le nombre de répétitions. Le nombre de marqueurs analysés peut varier de six à huit, voire jusqu'à une quarantaine selon les schémas. Alors que l'électrophorèse sur gel d'agarose était initialement utilisée pour évaluer la taille des amplicons, l'électrophorèse capillaire sur un séquenceur automatique est aujourd'hui principalement réalisée. Cela permet en outre le développement de PCR multiplexe à l'aide d'amorces marquées par différents fluorochromes.

Le nombre exact de répétitions est ensuite déduit de la taille du produit de PCR, la longueur des unités de répétitions et des régions flanquantes étant connue. Une fois que le nombre de répétitions pour l'ensemble des *loci* de VNTRs est évalué pour un isolat bactérien, un profil numérique correspondant au nombre de motifs répétés pour chaque *locus* est attribué et constitue un *MLVA type* (MT) (Figure 64) (Nadon et al., 2013).



**Figure 64. Variation du nombre de répétitions en tandem dans huit *loci* de *variable number of tandem repeats* (VNTRs) afin de caractériser deux souches différentes.** Un profil numérique à huit chiffres (*MLVA type*) est attribué à chaque souche ; dans l'exemple, les deux souches diffèrent au niveau de trois *loci* de VNTRs (en rouge) <http://www.microtyping.nl/content/2011/11/MLVA>.

Le premier schéma MLVA a été appliqué à *Haemophilus influenzae* en 1997, basé sur des microsatellites (trois à six nucléotides) (van Belkum et al., 1997). Il est apparu que les vitesses évolutives des différents *loci* de VNTRs étaient variables, et que certains étaient mieux adaptés que d'autres aux études épidémiologiques. Ensuite, des schémas MLVA ont été développés pour la comparaison de souches chez pratiquement toutes les espèces bactériennes médicalement importantes, comme *S. aureus* (Sabat et al., 2003), *Salmonella* spp. (Larsson et al., 2009), *Mycobacterium tuberculosis* (Le Flèche et al., 2002) ou encore *Legionella pneumophila* (Sobral et al., 2011).

### **Avantages de la MLVA**

Les principaux avantages de la MLVA sont sa rapidité, son coût peu élevé et son fort pouvoir de discrimination. De plus, si les profils obtenus sont numériques, ils peuvent facilement être échangeables et stockables dans des bases de données en ligne pour des comparaisons entre laboratoires (Sabat et al., 2013). Une liste de sites *Web* hébergeant des bases de données MLVA pour un certain nombre d'agents pathogènes est par exemple disponible sur le site de l'Université Paris Sud « *Genomes and PolyMorphismS* » (<http://minisatellites.i2bc.paris-saclay.fr/>).

Un autre avantage de la MLVA est qu'elle est souvent considérée comme une technique modulaire, qui peut répondre à la fois à des questions micro- et macro-épidémiologiques. En effet, en situation **d'épidémie**, l'analyse MLVA peut rapidement distinguer les isolats responsables de l'épidémie (même profils) des autres (profils différents). La MLVA s'est ainsi révélée être une approche de typage particulièrement utile pour le suivi de la dissémination de souches épidémiques (Tenover et al., 2007; Vignaud et al., 2017; Wei et al., 2011). Cependant, deux éléments sont au préalable à prendre en compte dans ce contexte. Le premier est de connaître la prévalence du profil des isolats responsables de l'épidémie dans la population bactérienne globale avant d'appliquer la méthode. Un autre élément essentiel, en particulier en ce qui concerne les microsattellites, est le fait que des modifications du nombre de répétitions peuvent se produire si rapidement que le profil peut changer au cours d'une épidémie (van Belkum et al., 2007).

La MLVA peut également être utilisée pour des études de **structure de population**, comme cela a été mis en oeuvre pour les espèces *L. pneumophila* (Visca et al., 2011) ou *Brucella sp.* (Vergnaud et al., 2018). Une approche phylogénétique fréquemment appliquée pour l'analyse des profils MLVA est une implémentation du *minimum spanning tree*, basé sur les mêmes principes que l'algorithme eBURST (van Belkum, 2007). Cette approche permet de représenter les relations de parenté prédites entre les souches sur la base de SLVs (où les profils varient d'un *locus* de VNTR) et de DLVs (où les profils varient pour deux *loci* de VNTR). Dans cette approche, aucune pondération n'est appliquée en fonction de la différence de nombre de répétitions pour chaque *locus*. Les *MLVA types* peuvent alors être regroupés en **MLVA complexes** (MCs), un MC rassemblant par exemple tous les MTs présentant six *loci* identiques sur les sept (Schouls et al., 2009).

Cette **modularité** est cependant fortement conditionnée par le choix et le nombre des *loci* de VNTRs lors du développement de la méthode MLVA (Jiao et al., 2008; Le Flèche et al., 2006). En effet, les marqueurs évoluant lentement et présentant une diversité faible assigneront les *clusters* phylogénétiques, reflétant la structure de la population étudiée. Les marqueurs présentant une évolution rapide et ainsi une plus grande diversité permettront de distinguer les isolats au sein des *clusters*. Utilisés seuls, ces derniers pourront répondre à des questions micro-épidémiologiques mais ne témoigneront d'aucune valeur de *clustering*. Ainsi, l'association de marqueurs évoluant lentement et rapidement confère à la MLVA une modularité unique.

### ***Limites de la MLVA***

Cependant, la MLVA présente certaines limites. Tout d'abord, cette méthode n'est pas reproductible à 100%, et beaucoup de schémas publiés manquent de standardisation, rendant difficiles les comparaisons entre laboratoires (Lindstedt et al., 2013). Notamment, la détermination de la taille des fragments de PCR peut différer entre laboratoires, du fait de l'utilisation de séquenceurs ou de capillaires différents par exemple. Afin d'éviter de tels écueils, une calibration avec des *loci* de VNTRs de taille connue apparaît nécessaire avant de mettre en place cette technique.

De plus, la différence de taille dans un *locus* de VNTR peut ne pas toujours refléter le nombre réel de répétitions en tandem, car des insertions ou des délétions dans la région amplifiée peuvent survenir.

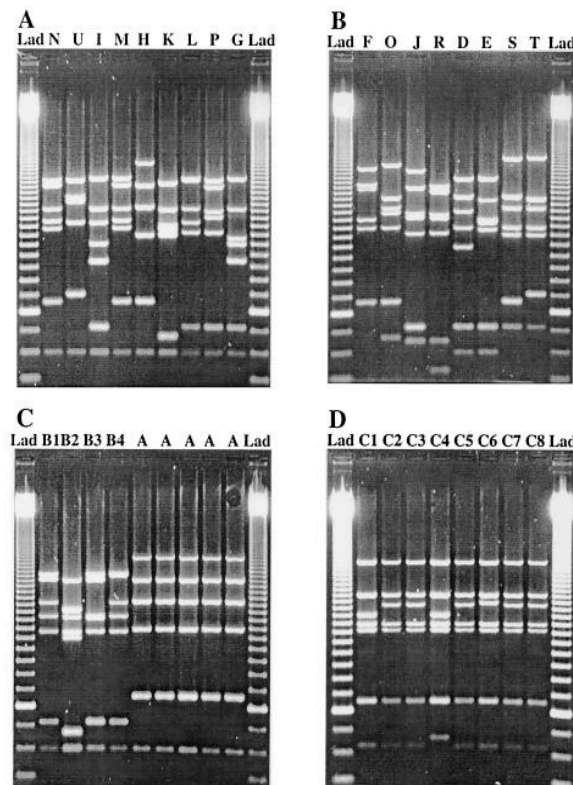
Enfin, un phénomène d'homoplasie peut en limiter le pouvoir discriminant, c'est-à-dire le fait que deux souches appartenant à des lignées différentes et ayant eu une évolution différente présentent un même nombre de répétitions de VNTRs (Estoup et al., 2002).

Afin de surmonter ces contraintes, l'approche peut être étayée par le séquençage des VNTRs, qui améliore considérablement la résolution et limite l'impact du phénomène d'homoplasie, mais en augmente le temps d'analyse et le coût. Le typage basé sur le séquençage des VNTRs est alors appelé TRST. Il a été appliqué à un certain nombre d'agents pathogènes comme *C. difficile* (ZaiSS et al., 2009) *L. pneumophila* (Visca et al., 2011) ou *Francisella noatunensis* (Brevik et al., 2011).

### 2.3.3. MLVA et *S. aureus*

#### *Schéma MLVA de Sabat et al. et dérivés*

Le premier schéma de MLVA proposé pour *S. aureus* a été développé à partir d'une collection de 34 isolats de MRSA et comparé à la technique PFGE (Sabat et al., 2003). Cinq loci de VNTRs (*sdrCDE*, *clfA*, *clfB*, *ssp* et *spa*) situés au sein de sept gènes ont été sélectionnés après analyse *in silico* de six génomes de *S. aureus* disponibles. La taille des unités de répétitions variait de neuf (*ssp*) à 24 (*spa*) nucléotides. Ces VNTRs étaient amplifiés par une PCR multiplexe, puis des profils de MLVA (profils de bandes) étaient établis après séparation en gel d'agarose (Figure 65). L'étude a mis en évidence 26 profils, les isolats épidémiologiquement liés présentant des profils identiques ou très similaires. Malgré le faible nombre de souches analysées, ce schéma de MLVA s'est montré aussi discriminant et aussi reproductible que la PFGE, malgré son inconvénient de ne pas produire de profils numériques.



**Figure 65.** Profils de bandes de *multiple-locus variable number tandem repeats analysis* (MLVA) de 34 isolats de *S. aureus* caractérisés en parallèle par *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) (Sabat et al., 2003). (A et B) isolats 18 à 34 (C) isolats 6 à 9 et 1 à 5 et (D) isolats 10 à 17. L'ordre de dépôt des isolats a été effectué en fonction des profils obtenus par PFGE (codes alphabétiques indiqués au-dessus), mettant en évidence la concordance de *clusterisation* des deux méthodes. Lad : marqueur de poids moléculaire, échelle de 50 pb; bande inférieure = 100 pb.



La même équipe a appliqué ce schéma à 59 isolats cliniques de *S. aureus* (dont 56 MRSA), et a comparé les résultats aux techniques de PFGE, mais également de MLST et *spa typing* (reposant sur le séquençage de la région répétée du gène *spa* codant la protéine A, cf paragraphe 2.4.2.1) (Malachowa et al., 2005). Comme dans l'étude précédente, la MLVA s'est avérée avoir un pouvoir discriminant élevé (40 profils identifiés), similaire à celui de la PFGE, tandis que la MLST et le *spa typing* présentaient une résolution plus faible. Les profils de MLVA étaient répartis au sein de huit *clusters*, qui correspondaient à ceux obtenus par les trois autres méthodes. Ces résultats suggéraient ainsi que la MLVA peut être une méthode fiable pour des études épidémiologiques chez *S. aureus* sur le court terme, présentant l'avantage d'être accessible pour des analyses microbiologiques de routine du fait de son faible coût, et de sa rapidité et facilité d'exécution. Cependant, ce schéma présentait toujours l'inconvénient de ne pas produire de profils numériques. De plus, certains VNTRs dont le motif répété était égal à neuf pb rendaient difficile une analyse précise des profils, et l'amplification de certains VNTRs conduisait à la production de produits de PCR anonymes (c'est-à-dire dont la taille ne correspondait à aucun VNTR).

La même année, François et al. ont développé un schéma de MLVA légèrement modifié basé sur l'étude de huit *loci* de VNTRs, codant des adhésines (*sdrCDE*, *clfA*, *clfB*, *fnBP* et *cna*), une protéase (*sspA*), une immunoglobuline G-binding protein (*spa*) et le gène de résistance à la pénicilline *mecA* (Francois et al., 2005). La taille des unités de répétitions variait de neuf (*spa*) à 560 (*cna*) nucléotides. Cette technique présentait l'avantage de reposer sur une seule PCR multiplexe suivie d'une électrophorèse microcapillaire permettant une analyse automatisée des profils et des *clusters*. La méthode a été évaluée vis-à-vis de 232 isolats cliniques de *S. aureus* d'origines cliniques diverses (infection ou portage), y compris un panel de souches « contrôles » précédemment caractérisées par PFGE. Les résultats obtenus en termes de pouvoir discriminant, de reproductibilité et de concordance avec les profils de PFGE étaient très satisfaisants, confirmant l'utilité de la MLVA pour le génotypage en temps réel des isolats de *S. aureus*. La même équipe a par la suite confirmé l'intérêt de ce schéma par une étude de 994 souches de *S. aureus* et montré que la MLVA fournit une base solide pour l'assignation des lignées génétiques chez cette espèce clonale (Melles et al., 2009).

### **Schéma MLVA de Schouls et al.**

D'autres schémas ont été décrits, comme celui proposé par Hardy et al. ou des dérivés, qui décrivaient l'utilisation de VNTR désignés comme « *staphylococcal interspersed repeat units* » (Hardy, 2004; Hardy et al., 2006; Ikawaty et al., 2008).

Mais aujourd'hui, le schéma MLVA qui fait le plus consensus est celui développé par Schouls et al. en 2009, validé par l'étude d'une vaste collection de 2525 isolats de *S. aureus* (Schouls et al., 2009). Pour cela, une analyse *in silico* de neuf génomes de *S. aureus* disponibles publiquement a tout d'abord permis d'identifier plus de 20 *loci* de VNTRs, pour lesquels des amorces ont été conçues. Ces VNTRs ont été testés sur un panel de 86 isolats génétiquement divers de *S. aureus* (panel « test ») préalablement analysés par PFGE. Les *loci* de VNTRs étaient considérés comme appropriés s'ils étaient amplifiables pour toutes les souches, si le nombre de répétitions variait entre les souches et s'il était compris entre trois et dix. Huit *loci* de VNTRs ont ainsi été sélectionnés pour établir ce nouveau schéma de MLVA, dont seulement trois étaient situés dans des régions codantes (*sspa*, *spa* et *coa*). Les unités de répétitions variaient de neuf (*sspa*) à 81 (*coa*).

Les VNTRs étaient amplifiés par deux PCR multiplexes, contenant chacune quatre marqueurs fluorescents. Les produits étaient ensuite analysés sur un séquenceur d'ADN automatisé, permettant une détermination précise de la taille des fragments et donc une évaluation du nombre de répétitions pour chaque *locus*. Ainsi, ce schéma permet l'attribution de MTs avec un profil numérique à huit chiffres.

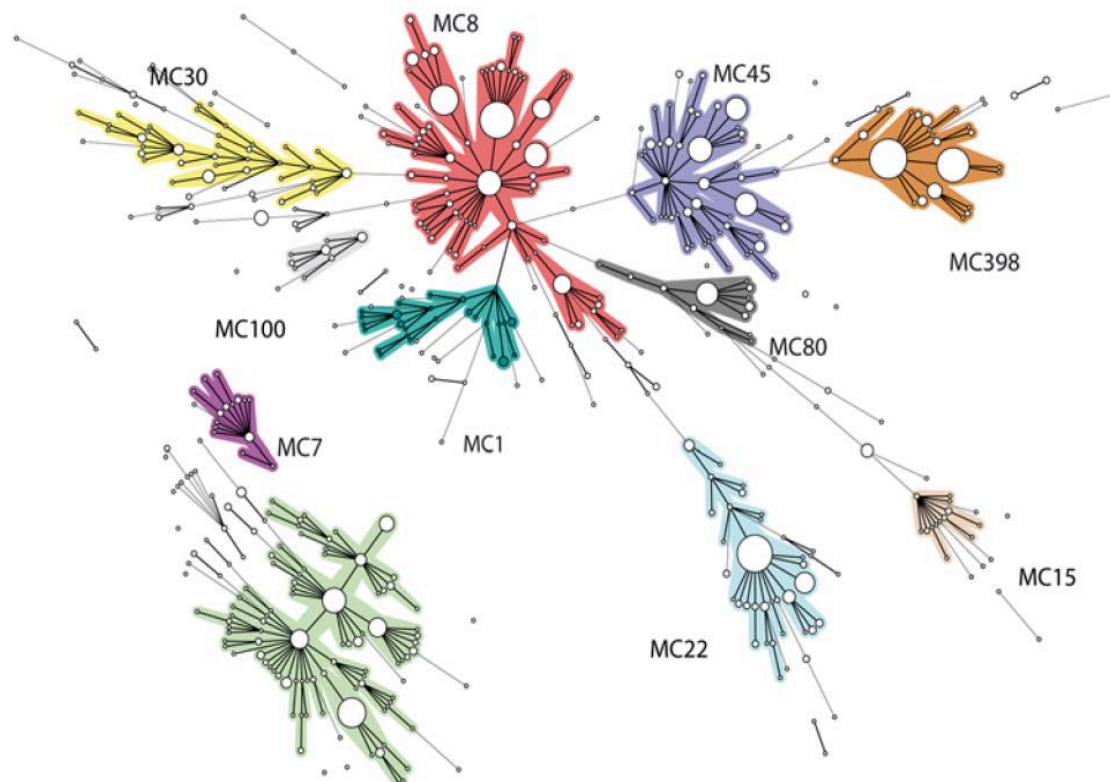
Ce schéma a ensuite été appliqué à une collection de 1681 isolats de *S. aureus* provenant de patients néerlandais (dont 87% étaient des MRSA) et de 100 isolats de MRSA provenant de porcs. Le nombre maximal de répétitions pour chaque *loci* variait fortement, allant de cinq à 25, générant des *DI* très différents dont le plus élevé était observé pour le gène *spa* (83%). Au total, 511 MTs ont été observés pour les 1681 isolats, regroupés en 11 MCs (**Figure 66**). De façon intéressante, certains de ces MCs étaient principalement constitués de MSSA, tandis que d'autres contenaient presque exclusivement des MRSA.

La comparaison de la MLVA avec d'autres techniques de typage a montré qu'elle était au moins aussi discriminante que la PFGE, et deux fois plus discriminante que le *spa typing*. En outre, il y avait une congruence considérable entre les complexes générés par la MLVA et ceux obtenus par le *spa typing* et la PFGE. L'analyse d'un ensemble de 40 isolats précédemment typés par MLST, ainsi que l'utilisation des données de *spa typing* qui permettent de prédire les CCs de

MLST (Ridom *Spa*-Server), a montré qu'il existait également une forte concordance entre les complexes de MLVA et ceux de MLST. Pour cette raison, les MCs ont été nommés par analogie aux CCs (par exemple, le MC8 est composé d'isolats appartenant au CC8 de MLST).

Enfin, un panel de 658 isolats de MRSA collectés dans le cadre de la surveillance nationale de *S. aureus* aux Pays-Bas et précédemment typés par *spa typing* a été utilisé pour évaluer le potentiel de la MLVA dans l'identification d'épidémies. Alors que le *spa typing* pouvait ne pas réussir à différencier certains isolats non épidémiologiquement liés, la MLVA était plus fiable dans l'identification d'isolats pouvant représenter une épidémie de MRSA. Ces résultats confirmaient l'utilité de la MLVA dans des études micro-épidémiologiques chez *S. aureus*.

Schouls et al. ont donc décrit un schéma de MLVA fournissant des données non ambiguës (profils numériques) utilisables pour des comparaisons interlaboratoires, représentant ainsi un outil prometteur pour l'épidémiologie hospitalière, nationale et internationale. Ce schéma MLVA est hébergé sur le site <https://www.mlva.net/>, qui recense les profils (5779 MTs et 62 MCs le 28/12/2018) et permet d'assigner en ligne les MTs.



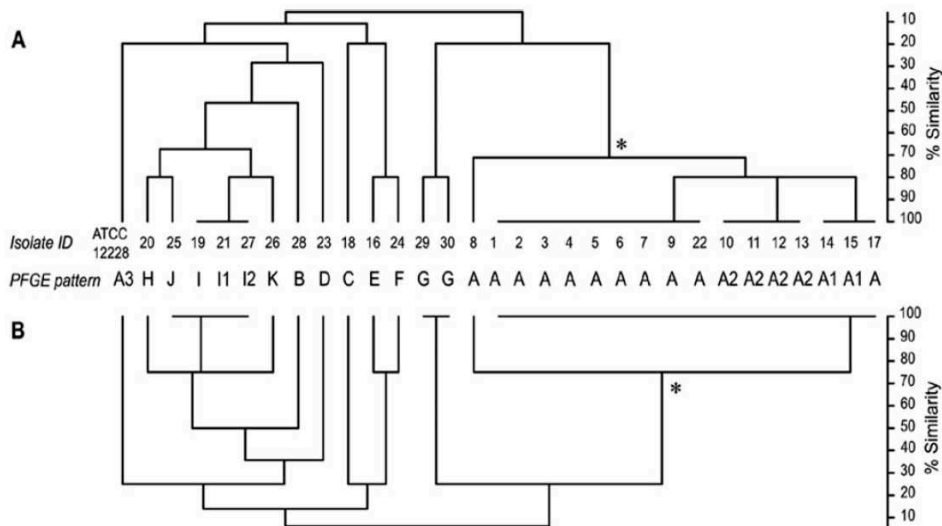
**Figure 66.** *Minimum spanning tree* des 1681 isolats de *S. aureus* typés par *multiple-locus variable number tandem repeats analysis* (MLVA) (Schouls et al., 2009). Les MLVA types (MTs) sont représentés sous forme de cercles, la taille de chaque cercle étant proportionnelle au nombre d'isolats. Les lignes noires connectent des MTs qui diffèrent par un seul *locus* de VNTRs, et les lignes grises par deux *loci*. La couleur des halos entourant les MTs désigne les MLVA complexes (MCs). Les MCs rassemblent au minimum cinq MTs ne différant pas par plus d'un *locus* de VNTR.

#### 2.3.4. MLVA et *S. epidermidis*

La MLVA a été développée pour le typage des souches de *S. epidermidis* en 2006 par Johansson et al. (Johansson et al., 2006). L'analyse *in silico* du génome de la souche de référence *S. epidermidis* ATCC 12228 a permis l'identification de 137 *loci* de VNTRs. Quatorze *loci* ont été retenus sur la base de leur localisation génomique, de la taille du motif répété (18 bp au minimum) et du nombre de répétitions ( $\geq$  deux). Ils ont été amplifiés par PCR pour dix souches de *S. epidermidis*, et les **cinq** *loci* (Se1 à Se5) présentant un polymorphisme de taille ont été sélectionnés pour le schéma MLVA. La taille des motifs répétés variait de 18 à 58 pb. Trois VNTRs (Se1, Se3 et Se5) étaient localisés dans des gènes prédits pour coder des protéines de surface liant le fibrinogène, et contenaient des motifs répétés de 18 pb codant des motifs de type serine-aspartate (SD).

L'analyse MLVA a ensuite été menée sur 30 isolats cliniques multirésistants de *S. epidermidis* collectés sur une année chez des patients hospitalisés dans différents services d'un hôpital universitaire en Suède. Les produits de PCR étaient séparés en gel d'agarose, et les tailles converties en nombre de répétitions pour obtenir un profil numérique. Le nombre de répétitions pour chaque *locus* variait de trois à neuf. Les résultats de MLVA étaient aussi discriminants que ceux obtenus par PFGE (16 profils identifiés au total pour chacune des méthodes), tout en regroupant les isolats de façon similaire (**Figure 67A**). Ainsi, bien que ces deux méthodes mesurent des événements évolutifs différents au niveau de plusieurs *loci* génomiques, la congruence des arbres phylogénétiques obtenus plaidait en faveur d'un faible voire d'une absence de transfert horizontal de ces gènes chez les souches étudiées. De façon intéressante, l'utilisation de seulement quatre *loci* (Se1 à Se4) conduisait à un regroupement très similaire des isolats, tout en ne diminuant que légèrement la capacité discriminatoire (**Figure 67B**) (Johansson et al., 2006).

L'analyse des génotypes a par ailleurs montré que de nombreux isolats provenant de services différents étaient étroitement liés, suggérant qu'un clone de *S. epidermidis* multirésistant a été maintenu dans l'environnement hospitalier pendant la période de l'étude et possédait la capacité de coloniser les patients. Ce génotype prédominant semblait plus fréquemment associé à des infections profondes du site opératoire et/ou à la présence de dispositifs médicaux, mais le faible nombre d'isolats analysés ne permettait pas de conclure à un lien entre les profils de MLVA et le type d'infections.



**Figure 67.** Analyse des *clusters* obtenus par typage *multiple-locus variable number tandem repeats analysis* (MLVA) de 31 souches de *S. epidermidis* (Johansson et al., 2006). (A) *Clusters* obtenus par la méthode MLVA à cinq *loci* (Se1 à Se5) et (B) à quatre *loci* (Se1 à Se4). Les codes alphabétiques indiquent les profils obtenus par électrophorèse en champ pulsé (PFGE) où A, A1, A2 et A3 indiquent des profils proches. Les *clusters* obtenus par MLVA et PFGE sont congruents. Un astérisque indique un groupe d'isolats proches phylogénétiquement, définis comme appartenant à un clone.

Ce schéma MLVA fournit ainsi une évaluation robuste des lignées phylogénétiques, autorisant son utilisation pour l'étude de la dynamique des populations hospitalières de *S. epidermidis*. Cependant, les limites de cette étude étaient son caractère monocentrique et l'inclusion d'un nombre restreint d'isolats (Johansson et al., 2006). Ce schéma a été appliqué dans d'autres études, comme celle de Cremniter et al. visant à analyser des souches de *S. epidermidis* résistantes aux glycopeptides, montrant que la MLVA peut subdiviser des STs fréquemment rencontrés à l'hôpital (à trois STs correspondaient 20 MTs) (Cremniter et al., 2013). L'étude d'Asadollahi et al. se focalisant sur 112 souches de *S. epidermidis* isolées d'hémocultures a montré une diversité génétique importante des souches, 102 MTs ayant été identifiés (Asadollahi et al., 2018a)

En 2008, un autre schéma de MLVA a été développé pour l'espèce *S. epidermidis* à la faveur de l'analyse de 88 isolats d'origines cliniques et géographiques diverses (Francois et al., 2008). Ce schéma, basé sur l'analyse de six *loci* de VNTRs et du gène *mecA*, permettait un génotypage rapide et à haut débit (électrophorèse microcapillaire) par utilisation d'une PCR multiplexe avec analyse automatisée des profils.

L'approche MLVA a également été développée pour d'autres espèces de SCN comme par exemple *S. hominis* (Szczyka et al., 2014) ou *S. haemolyticus* (Cavanagh et al., 2012).

## 2.4. Single locus sequence typing (SLST)

### 2.4.1. Généralités

Une alternative plus pratique et moins onéreuse à l'approche *multilocus* est le typage basé sur le séquençage d'un seul *locus*. La portion d'ADN séquencée étant limitée, le gène sélectionné se doit d'être hautement polymorphe. Les gènes candidats qui peuvent fournir une résolution génétique suffisante sont ceux codant les MSCRAMMs. En effet, ces gènes contiennent des VNTRs, et les protéines de surface qu'ils codent interagissent avec l'environnement et sont donc soumises à une pression de sélection. Ce type d'analyse est plutôt appliquée à des populations bactériennes d'évolution clonale chez lesquelles les phénomènes de recombinaison homologue sont rares, limitant ainsi la confusion des inférences phylogénétiques (ZaiSS et al., 2009).

L'utilisation d'un ou deux *loci* polymorphes a déjà été établie pertinente pour un certain nombre d'agents pathogènes, notamment *S. aureus* (*spa*) (Shopsin et al., 1999), *Campylobacter jejuni* (*fla*) (Mellmann et al., 2004), *Streptococcus pyogenes* (*emm*) (Beall et al., 1996), *N. meningitidis* (*porA*, *fetA*) (Elias et al., 2006), *L. monocytogenes* (*LmMT1*, *LmMT2*) (Edlind and Liu, 2015) ou encore *C. difficile* (TR6, TR10) (ZaiSS et al., 2009).

### 2.4.2. Schémas SLST chez *S. aureus*

Chez *S. aureus*, le schéma de SLST le plus utilisé est le *spa typing*, mais des schémas alternatifs de *clfA* et *clfB typing* ont également été décrits.

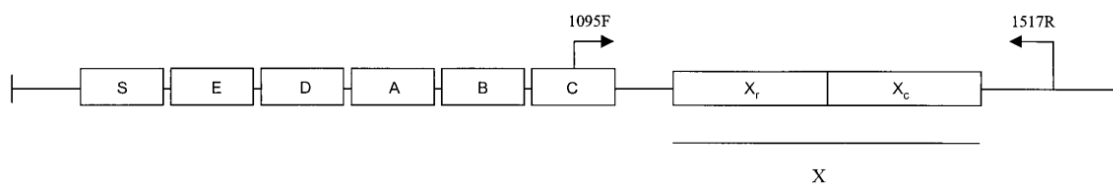
#### 2.4.2.1. *spa typing*

##### **Principe du *spa typing***

La méthode de typage SLST la plus largement utilisée est le *spa typing* développé pour *S. aureus* (Asadollahi et al., 2018b). Cette technique a été décrite pour la première fois en 1996 par Fréney et al., qui ont utilisé le séquençage de la région X du gène *spa* codant la protéine A de *S. aureus* pour typer 47 souches de MRSA (Fréney et al., 1996).

Son évaluation à plus grande échelle a ensuite été menée par Shopsin et al. en 1999, par analyse de 320 souches de *S. aureus* et comparaison avec la PFGE. Le *spa typing* s'est révélé efficace pour distinguer des isolats reliés ou non épidémiologiquement, tout en présentant des avantages considérables en termes de rapidité, de facilité d'utilisation, de facilité d'interprétation et de standardisation entre laboratoires (Shopsin et al., 1999).

La protéine A est une protéine de surface qui lie le fragment Fc des Ig, particulièrement les IgG, permettant l'échappement de la bactérie à la phagocytose. Le gène *spa*, composé d'environ 2150 pb, se compose de plusieurs régions fonctionnelles codant un peptide signal, la région de liaison au fragment Fc des IgG, la région X constituée de motifs répétés, et en région C-terminale une zone permettant l'attachement au PG (**Figure 68**) (Shopsin et al., 1999). Bien que sa fonction biologique ne soit pas connue, la région X pourrait servir à enchasser la partie N-terminale de liaison à l'IgG dans la paroi cellulaire (Hartford et al., 1997). L'existence de régions bien conservées flanquant la région X permet l'utilisation d'amorces pour l'amplification et le séquençage des répétitions (**Figure 68**) (Shopsin et al., 1999).



**Figure 68. Domaines composant le gène *spa* codant la protéine A de *S. aureus* (Shopsin et al., 1999).** Les encadrés indiquent les segments du gène codant le peptide signal (S), les régions de liaison à l'immunoglobuline G (A-D), une région homologue de A-D (E) et la région C-terminale (X) qui comprend des motifs répétés de 24 pb ( $X_r$ ) et la séquence d'ancrage à la paroi cellulaire ( $X_c$ ). Les amorces utilisées pour le *spa typing* sont indiquées au-dessus par des flèches.

Le *spa typing* est basé sur la variation du nombre (de deux à 15) et de la séquence de répétitions courtes (de 21 à 27 pb, principalement 24 pb) de la région  $X_r$ . Le degré élevé de polymorphisme dans ce *locus* de VNTR résulte de mutations ponctuelles, mais surtout de phénomènes de délétions, de duplications et d'insertions (Lakhundi and Zhang, 2018). Dans le typage par *spa typing*, chaque séquence de répétition individuelle est associée à un code unique. Un *spa type* est déduit de l'ordre spécifique des répétitions (ex : le *spa type* t001 correspond à l'enchaînement de dix répétitions dans l'ordre 26-30-17-34-17-20-17-12-17-16).

Toutefois, l'absence de consensus sur l'affectation de nouvelles séquences de répétitions individuelles et de nouveaux *spa types* a rapidement nécessité la mise en place de systèmes de nomenclatures standardisés. Aujourd'hui, deux systèmes de nomenclature majeurs existent pour assigner les *spa types* et sont largement utilisés à des fins de comparaison et d'échange de données entre laboratoires (Harmsen et al., 2003; Koreen et al., 2004) (**Figure 69**). Cependant, la comparaison entre les deux nomenclatures n'est possible qu'à l'aide d'outils informatiques, rendant parfois difficile la comparaison des données de typage publiées.

<i>spa</i> type	Repeats <sup>a</sup>							<i>spa</i> Repeat Code		
01	r26r30r17r34r17r20r17r12r17r16	AAA	GAA	GAC	AAC	AAC	AAA	CCT	GGC	D1
02	r26r23r17r34r17r20r17r12r17r16	AAA	GAA	GAC	AAC	AAA	AAA	CCT	GGC	A1
03	r26r17r20r17r12r17r17r16	AAA	GAA	GAC	AAT	AAC	AAA	CCT	GGC	H1
04	r09r02r16r13r13r17r34r16r34	AAA	GAA	GAC	AAC	AAC	AAA	CCT	GGC	F1
05	r26r23r13r23r31r05r17r25r17r25r16r28	AAA	GAA	GAC	AAC	AAA	AAA	CCT	GGC	C1
06	r26r23r13r23r31r05r17r17r25r16r28	AAA	GAA	GAC	AAC	AAA	AAA	CCT	AGC	F2*
08	r11r19r12r21r17r34r24r34r22r25	AAA	GAA	GAC	AAC	AAA	AAA	CCT	GGT	B1
09	r11r12r21r17r34r24r34r22r24r34r22r33r25	AAA	GAA	GAC	AAC	AAA	AAA	CCT	GGT	E1
10	r26r17r34r17r20r17r12r17r16	AAA	GAA	GAC	AAC	AAA	AAA	CCT	GGT	I1*
11	r08r16r02r25r34r24r25	AAA	GAA	GAC	AAC	AAA	AAA	CCT	GGT	Z2*
12	r15r12r16r02r16r02r25r17r24r24	AAA	GAA	GAC	AAC	AAC	AAA	CCT	GGT	G1
13	r26r30r17r34r17r20r17r12r17	AAA	GAA	GAC	AAT	AAC	AAA	CCT	GGT	C2
14	r26r17r20r17r12r17r17r16	AAA	GAA	GAC	AGC	AAC	AAA	CCT	GGC	E2
16	r26r23r13r23r31r05r17r25r16r16r28	AAA	GAA	GAC	GGC	AAA	AAA	CCT	GGC	J1
17	r15r12r16r16r02r16r02r25r17r24r24	AAA	GAA	GAC	GGC	AAA	AAA	CCT	GGC	G2
18	r15r12r16r02r16r02r25r17r24r24r24	AAA	GAA	GAT	GGC	AAC	AAA	CCT	GGC	N1
19	r08r16r02r16r02r25r17r24	AAA	GAA	GAC	GGC	AAC	AAA	CCT	GGC	L1
20	r26r23r31r29r17r31r29r17r25r17r25r16r28	AAA	GAA	GAT	GGC	AAC	AAA	CCT	GGC	P1
23	r26r37r17r12r17r16	AAA	GAA	GAT	GGT	AAC	AAA	CCT	GGC	R1
24	r11r12r21r17r34r24r34r22r25	AAA	GAA	GAT	GGC	AAC	AAA	CCT	GGT	O1
25	r26r23r23r13r23r29r17r31r29r17r25r17r25r16r28	AAA	GAA	GAC	GGC	AAC	AAA	CCT	GGT	K1
26	r08r16r34	AAA	GAA	GAC	GGC	AAC	AAA	CCT	GGT	M1
27	r26r17r13	AAA	GAA	GAT	AAC	AAC	AAA	CCT	GGT	Q1
		AAA	GAA	GAT	GGC	AAC	AAA	CCT	AGT	H2*
		AAA	GAA	GAT	AAC	AAC	AAA	CCT	GGT	B2*
		CAA	GAA	GAC	GGC	AAC	AAG	CCT	GGT	U2*
		CAA	GAA	GAC	AAC	AAC	AAG	CCT	GGT	V2*
		GAG	GAA	GAC	AAC	AAC	AAA	CCT	GGC	I2*
		GAG	GAA	GAC	AAC	AAA		CCT	GGC	Y2*
		GAG	GAA	GAC	AAT	AAC	AAG	CCT	GGC	Y1
		GAG	GAA	GAC	AAC	AAC	AAG	CCT	GGC	W1
		GAG	GAA	GAC	AAC	AAC	AAG	CCT	AGC	V1
		GAG	GAA	GAC	AAC	AAA	AAA	CCT	GGT	T1
		GAG	GAA	GAC	AAC	AAC	AAA	CCT	GGT	U1
		GAG	GAA	GAC	AAT	AAC	AAA	CCT	GGT	D2
		GAG	GAA	GAC	AAT	AAC	AAG	CCT	GGT	Z1
		GAG	GAA	GAC	AAC	AAC	AAG	CCT	GGT	X1
		GAG	GAA	GAC	GGC	AAC	AAA	CCT	GGT	A2

**Figure 69.** Comparaison des deux systèmes de nomenclature utilisés pour le *spa* typing de *S. aureus*. A gauche, le système développé par Harmsen et al. utilise un code numérique pour l’assignation des unités de répétitions (Harmsen et al., 2003) alors qu’à droite, le système développé par Koreen et al. utilise un code alphanumérique (Koreen et al., 2004).

Le principal système de nomenclature utilisé est celui développé par Harmsen et al. (Harmsen et al., 2003), nommé *Ridom StaphType*. Un logiciel, disponible à l’adresse <https://www.ridom.de/staphtype/>, permet une analyse semi-automatisée des séquences et une affectation des *spa* types en synchronisant les données via un serveur central. Ce serveur est couplé avec la base de données en ligne *Ridom SpaServer* (<https://spaserver.ridom.de/>) qui recense et propose au téléchargement la liste des répétitions et *spa* types. Le serveur est en outre géré par SeqNet.org ([www.seqnet.org](http://www.seqnet.org)) qui garantit une nomenclature universelle et une reproductibilité des données (Friedrich et al., 2006). Il est également possible de générer un système d’alerte pour la détection automatique d’épidémies de MRSA (Mellmann et al., 2006).

En 2006, le développement de l’algorithme BURP (*based upon repeat pattern*) (Sammeth et al., 2005) et son implémentation dans le logiciel *Ridom StaphType* a permis l’affectation automatisée et objective des *spa* types au sein de *spa* complexes (Strommenger et al., 2006, 2008). Les complexes de *spa* types obtenus par cet algorithme sont en outre très concordants avec ceux obtenus par PFGE et par MLST/eBURST, que ce soit pour des souches de MSSA comme de MRSA (Mellmann et al., 2007, 2008; Strommenger et al., 2006, 2008) (Figure 70). Cette concordance des *clusters* peut être expliquée par la structure de population clonale de *S. aureus* (Feil et al., 2003). L’assignation en ligne des *spa* types permet ainsi de définir l’appartenance à un *spa* complexe ou à un singleton, et de prédire le CC voire le ST de MLST.



Cependant, le *spa* typing étant basé sur un *locus* unique, certaines souches peuvent être mal classées en raison de phénomènes de recombinaison et/ou d'homoplasie (Sabat et al., 2013).

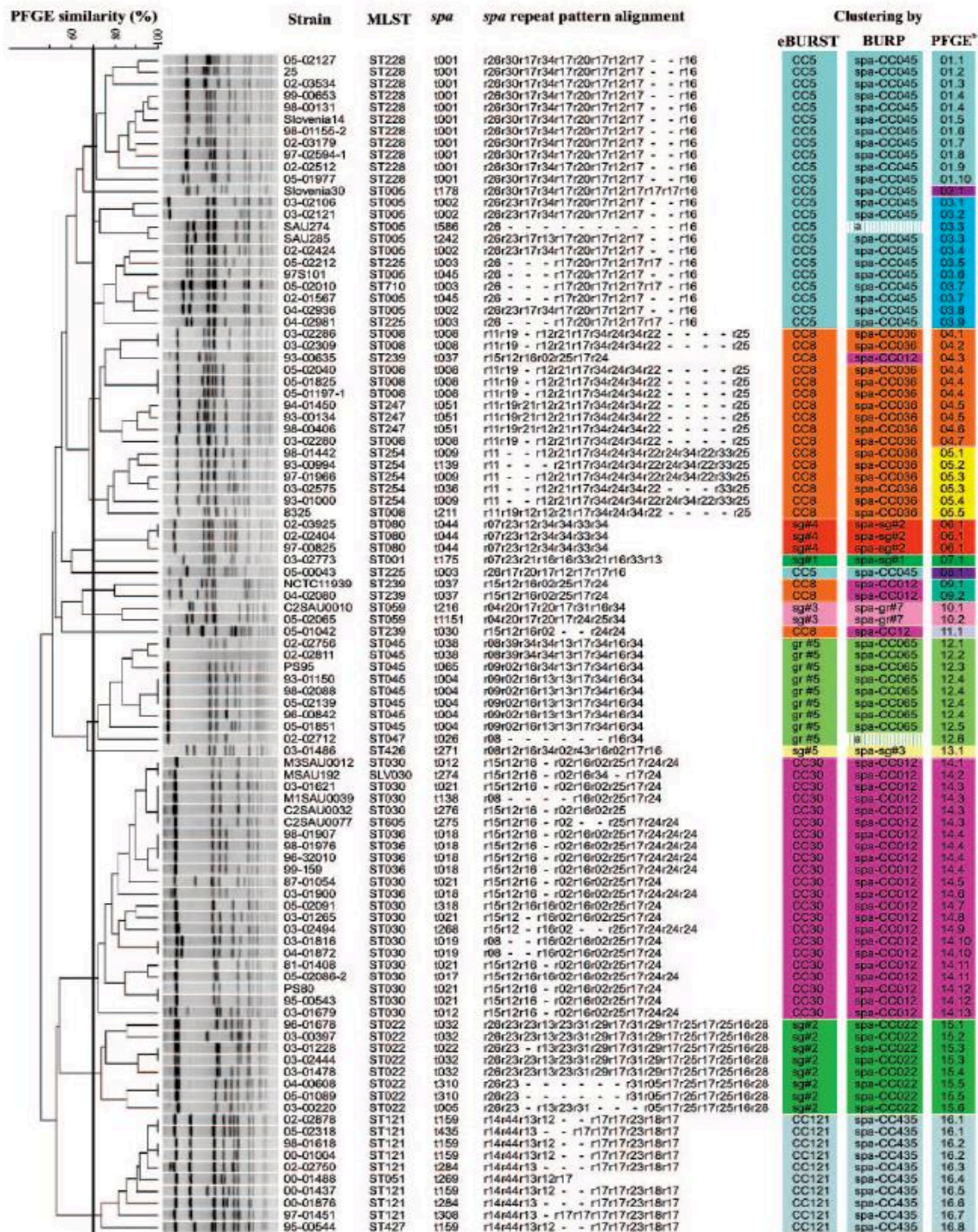


Figure 70. Résultats de typage obtenus par électrophorèse en champ pulsé (PFGE), multilocus sequence typing (MLST/eBURST) et *spa* typing (BURP) (Strommenger et al., 2006). Les résultats de PFGE sont visualisés par la méthode « unweighted-pair group » en utilisant un seuil de similarité de 70% indiqué par une ligne verticale. Les résultats des analyses de regroupement obtenus pour les trois méthodes sont comparés à droite, chaque groupe ayant un code couleur. Les couleurs identiques représentent des groupes concordants obtenus à partir des différentes méthodes. <sup>a</sup>, exclusion de la classification BURP pour cause de longueur insuffisante <sup>b</sup>, clusters de PFGE numérotés de un à 16.

### ***Données épidémiologiques générées par spa typing***

Malgré leur diversité, des complexes clonaux de *spa types* stables dans le temps ont été identifiés comme spécifiquement associés à des lignées de MRSA. Cette stabilité, associée à l'excellente congruence avec les regroupements obtenus par MLST, font du *spa typing* un outil précieux pour des études épidémiologiques globales à long terme, afin de suivre l'évolution des clones de *S. aureus* dans le temps et à travers le monde (Cookson et al., 2007; Faria et al., 2008; Hallin et al., 2007; Koreen et al., 2004; Mellmann et al., 2007; Strommenger et al., 2006).

De plus, le *spa typing* possède le pouvoir discriminant le plus élevé des méthodes de typage basées sur le séquençage Sanger de l'ADN chez *S. aureus* ( $DI_{spa\ typing} = 0,97$ ,  $DI_{MLST} = 0,93$ ) (Strommenger et al., 2006). Cette méthode apparaît ainsi également appropriée pour de l'épidémiologie locale et à court terme (Harmsen et al., 2003; Koreen et al., 2004). Notamment, au sein des lignées de MRSA qui sont de nature clonale par analyse MLST, le *spa typing* révèle un pouvoir discriminant plus élevé (O'Hara et al., 2016).

Cependant, il échoue parfois à discriminer des souches étroitement apparentées qui peuvent être différenciées par PFGE. Il est d'ailleurs souvent considéré comme inférieur à celle-ci en ce qui concerne la discrimination de la microvariation génétique s'accumulant rapidement (Koreen et al., 2004; Shopsin et al., 1999). Le *spa typing* est donc proposé comme outil de première intention au cours d'études épidémiologiques locales, mais il peut être important de combiner son utilisation à un autre *locus* pour discriminer des isolats de *spa types* identiques, comme la cassette *SCCmec*, lorsque la micro-résolution de souches est recherchée (Hallin et al., 2007; Strommenger et al., 2008).

### ***Distribution mondiale des spa types***

Du fait de sa simplicité d'exécution et d'interprétation, ainsi que de sa nomenclature standardisée, le *spa typing* a été largement utilisé à l'échelle mondiale, notamment depuis 2009 (Sabat et al., 2013).

De façon intéressante, certains clones de MRSA endémiques aux Etats Unis identifiés par MLST correspondent à des *spa types* et *spa complexes* particuliers. Par exemple, la lignée USA300 de CA-MRSA appartenant au ST8, CC8 de MLST est de *spa type* t008, CC008, tandis que la lignée USA100 de HA-MRSA appartenant au ST5, CC5 de MLST est de *spa type* t002, CC002 (O'Hara et al., 2016).

Une étude récente a effectué une revue de la littérature des *spa types* les plus communs à travers le monde, parmi des isolats cliniques d'infections comme de portage (Asadollahi et al., 2018b). Elle a montré que les *spa types* **t008** et **t002** sont les plus largement distribués, suivis des t037 et t044 (**Tableau 8**). Cependant, près de la moitié des *spa types* sont localisés à un pays donné. En Europe, le t032 est le plus répandu, principalement au Royaume-Uni et en Allemagne, alors que le t008 est prévalent en France et en Italie. La propagation endémique de certains de ces *spa types* très adaptés au milieu hospitalier peut par ailleurs conduire à une forte diminution de la discrimination dans des études épidémiologiques locales (Strommenger et al., 2008).

La majorité des *spa types* sont composés d'isolats de MSSA et MRSA, mais certains sont associés uniquement aux MRSA : t032 en Europe, t037 en Afrique et en Australie, et t437 en Australie (**Tableau 8**) (Asadollahi et al., 2018b). Lorsqu'il était disponible, le typage SCCmec a mis en évidence des corrélations différentes selon les continents ; en Europe et aux Etats-Unis les SCCmec types IV et II sont associés aux *spa types* les plus fréquents, alors qu'en Asie les *spa types* dominants appartiennent aux SCCmec types III et II. Cependant, toutes les études ne rapportaient pas le caractère de résistance à la méticilline. En outre, la plupart portait sur des isolats de MRSA en raison de leur importance en clinique. Des études à plus large échelle portant sur les MSSA doivent ainsi être menées pour compléter ces données épidémiologiques.

Continent	The most common <i>spa types</i> (No.): No. of MRSA and/or MSSA isolates		
Europe	t032 (1,250): 1250 MRSA	t008 (899): 510 MRSA, 229 MSSA, 90 uncertified	t002 (794): 450 MRSA, 100 MSSA, 244 uncertified
Asia	t030 (1,748): 1686 MRSA, 51 MSSA, 11 uncertified	t037 (1,467): 1415 MRSA, 51 MSSA, 1 uncertified	T002 (1,285): 8064 MRSA, 9 MSSA, 340 uncertified
America	t008 (2,100): 2151 MRSA, 56 MSSA, 107 uncertified	t002 (1,525): 855 MRSA, 80 MSSA, 857 uncertified	t242 (752): 478 MRSA, 274 uncertified
Africa	t037 (381): 381 MRSA	t084 (267): 217MSSA, 50 uncertified	t064 (123): 256 MRSA, 11 uncertified
Australia	t202 (50): 50 uncertified	t037 (32): 32 MRSA	t437 (19): 19 MRSA

MRSA, methicillin resistant Staphylococcus aureus; MSSA, methicillin sensitive Staphylococcus aureus; Uncertified, not mentioned in the studies whether the isolates were MRSA or MSSA.

**Tableau 8. Distribution des *spa types* les plus prévalents selon les continents (Asadollahi et al., 2018b).** Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre d'isolats de *S. aureus* identifiés d'après la revue de la littérature au sein des *spa types*. Le nombre d'isolats sensibles (MSSA) ou résistants (MRSA) à la méticilline est ensuite détaillé.

En conclusion, son rapport coût-efficacité, sa facilité d'utilisation, sa rapidité, sa stabilité *in vivo* et *in vitro*, sa nomenclature internationale normalisée et l'exportabilité complète des données via la base de données *Ridom SpaServer*, font du *spa typing* l'outil le plus utilisé pour caractériser les isolats de *S. aureus* aux niveaux local, national et international (Aires-de-Sousa et al., 2006; Grundmann et al., 2010; Harmsen et al., 2003). La base de données en ligne recense à ce jour 788 unités de répétitions différentes et 18772 *spa types*.

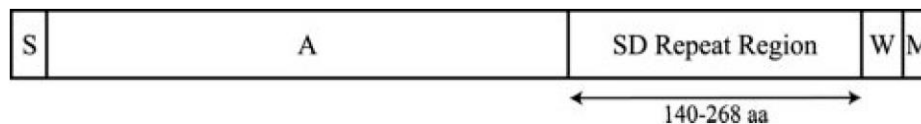
2.4.2.2. *clfA* et *clfB* typing

Malgré ses nombreux avantages, le *spa* typing reste moins discriminant que la PFGE. Cette limite peut entraver l'identification de nouveaux clones émergents et les enquêtes au cours d'épidémies dans les hôpitaux, les microvariations génétiques des répétitions au sein des clones épidémiques semblant se produire à une vitesse d'évolution assez lente. Afin de surmonter ce problème, d'autres *loci* capables de discriminer les souches au sein de groupes clonaux sont nécessaires. Dans cette perspective, des méthodes reposant sur le séquençage des régions répétées (domaines R) des gènes *clfA* et *clfB* ont été développées et évaluées.

***clfB* typing**

Le gène *clfB* de *S. aureus* code une protéine MSCRAMM qui se lie au fibrinogène et à la kératine, et facilite la colonisation nasale de *S. aureus* (O'Brien et al., 2002). Cette protéine a également été impliquée dans la pathogenèse d'endocardite chez le rat provoquée par *S. aureus* (Entenza et al., 2000).

Le *clfB* typing repose sur le séquençage de la région répétée de 18 pb du gène, codant un dipeptide SD (Figure 71). Il a été décrit en 2005, dans l'objectif d'évaluer sa capacité à indexer la microvariation génétique pour différencier des *spa* types identiques au sein de groupes de souches de *S. aureus* étroitement apparentées (Koreen et al., 2005).



**Figure 71. Organisation structurale de la protéine ClfB** (Koreen et al., 2005). La taille de la région répétée (SD Repeat Region) comprend entre 140 et 268 acides aminés. S, peptide signal; A, région de liaison à la kératine et au fibrinogène; W, région s'étendant dans le peptidoglycane; M, région transmembranaire.

L'analyse de Koreen et al. a porté sur 116 souches cliniques de *S. aureus* isolées de contextes cliniques d'infection ou de portage. La région répétée du gène *clfB* a été amplifiée par PCR et séquencée pour l'ensemble des isolats, le nombre de répétitions variant de 24 à 46 (420 à 804 pb). Du fait de mutations ponctuelles, 81 motifs répétés ont été identifiés, dont seulement neuf comportaient 12 pb. Au total, la combinaison de ces motifs répétés a conduit à l'identification de 37 *clfB* types. Dans un échantillon de 36 isolats génétiquement diversifiés bien caractérisés, le *clfB* typing a subdivisé des profils identiques de *spa* types et de PFGE, qui avaient été discriminés par micropuces à ADN construites sur le génome entier. Alors que le *clfB* typing seul ne semblait pas très discriminant ( $DI_{clfB} = 0,91$ ), la combinaison avec le *spa* typing

augmentait considérablement le pouvoir de résolution ( $DI_{clfB-spa} = 0,99$ ) (Koreen et al., 2005). De plus, le *clfB* typing a subdivisé des isolats appartenant au *spa* type t002, clone le plus répandu aux États-Unis, et qui avaient été différenciés par PFGE. Ainsi, au cours d'enquêtes d'épidémies hospitalières, si deux souches de même *spa* type ont des *clfB* types différents, il est probable qu'elles ne proviennent pas d'un même foyer épidémique. Le *clfB* typing a de plus démontré une stabilité *in vitro* et *in vivo* à long terme. Le *clfB* typing peut donc être considéré comme un marqueur très stable de la microvariation, pouvant servir d'alternative à la PFGE pour analyser des collections d'isolats dans des études épidémiologiques locales (isolats de *spa* types identiques pour lesquels une discrimination supplémentaire est nécessaire) mais également dans des études de population à long terme (Koreen et al., 2005).

Des résultats contradictoires ont été décrits au cours d'une étude allemande menée la même année sur des isolats épidémiques de MRSA, qui n'a pas démontré d'intérêt à la combinaison de l'étude des gènes *spa* et *clfB* (Harmsen, 2005). Trente-sept isolats provenant de deux hôpitaux et appartenant à cinq *spa* types représentatifs ont été analysés. Seulement quatre *clfB* types ont été identifiés, montrant que ce marqueur n'offrait pas de pouvoir discriminant supplémentaire. En outre, la taille élevée de la région répétée de *clfB* rendait son utilisation difficile dans le typage de routine de MRSA. Cependant, cette étude avait été menée sur un faible nombre d'isolats et de *spa* types.

Plus tard, Kuhn et al. ont démontré l'intérêt d'un schéma de typage basé sur des séquences de 500 pb des gènes *clfB* et *spa* en alternative à la PFGE (Kuhn et al., 2007). Pour cela, trois ensembles de 48 souches de MRSA ont été analysés, comprenant des isolats (i) génétiquement très diversifiés, (ii) génétiquement apparentés et (iii) obtenus à partir de porteurs au long cours. Les performances de quatre marqueurs hautement polymorphes de *S. aureus* (*clfA*, *clfB*, *fnbA* et *spa*) ont été analysées et comparées à la PFGE. Aucun des marqueurs à lui seul ne pouvait égaler le pouvoir discriminant de la PFGE (63 génotypes;  $DI_{PFGE} = 0,96$ ). Par contre, la combinaison des séquences en 3' d'environ 500 pb des marqueurs pouvait s'avérer utile, la meilleure performance étant obtenue avec la combinaison de *clfB* et *spa* (57 génotypes;  $DI_{clfB-spa} = 0,94$ ). De plus, aucune modification des séquences n'a été observée pour aucun des marqueurs sur une période de plus de 4 ans, alors que pour la PFGE des changements de profils étaient survenus après plusieurs mois.

Le séquençage de la région répétée du locus *clfB* a également été utilisé en association à la MLST dans des études de portage nasal de *S. aureus*, permettant d'augmenter le pouvoir

discriminant, mais ne permettant pas de distinguer les souches associées au portage nasal de celles associées à un contexte d'infection (Lamers et al., 2011; Muthukrishnan et al., 2013).

### ***clfA typing***

La région répétée du gène *clfA* a été évaluée comme potentiel outil de typage par Said et al., dans l'objectif de savoir si ce marqueur était capable de différencier des lignées spécifiques de l'hôte (Said et al., 2009, 2010). En effet, l'une des préoccupations de santé publique et de l'industrie laitière est l'émergence de souches virulentes de *S. aureus* responsables de mammites bovines, nécessitant la mise au point de méthodes permettant de suivre rapidement ces lignées.

La première étude a porté sur 55 souches de *S. aureus* : 24 responsables d'infections humaines, 19 de mammites bovines et 12 souches dont le génome était séquencé ou de souches de référence (Said et al., 2009). La région répétée a été amplifiée et séquencée pour toutes les souches, le nombre de répétitions variant de 36 à 73. Au total, 27 génotypes ont été identifiés, les souches humaines et bovines appartenant à des *clusters* distincts. De plus, les isolats humains étaient polymorphes (23 génotypes,  $DI = 0,97$ ), tandis que les isolats de mammites étaient clonaux (trois génotypes, dont un très dominant,  $DI = 0,30$ ), pouvant indiquer une sélection de ce clone dans la glande mammaire. Les répétitions restaient stables au cours de passages dans du lait, du bouillon nutritif et dans des tests *in vitro* d'invasion de lignées de cellules mammaires (Said et al., 2009).

La même équipe a ensuite typé par *clfA typing* 87 isolats de *S. aureus* responsables de mammites bovines isolés de quatre régions du Canada, et comparé les résultats aux méthodes de PFGE et *spa typing* (Said et al., 2010). Le *clfA typing* s'est révélé concordant avec les résultats de PFGE et de *spa typing* tout en étant aussi discriminant, permettant de mettre en évidence des sous-populations distinctes au sein des isolats clonaux responsables de mammites.

Ainsi, de par sa simplicité et sa reproductibilité, le *clfA typing* peut être utilisé comme outil de première ligne pour l'identification des lignées associées aux mammites, et comme méthode de typage complémentaire pour suivre la transmission, l'écologie et l'évolution de *S. aureus*.

Au cours des dernières années, les techniques de typage moléculaire ont donc été déterminantes en microbiologie clinique et en santé publique. L'automatisation des méthodes, l'amélioration de leur résolution, la conception d'outils bioinformatiques et de bases de données en ligne ont permis des études épidémiologiques chez presque toutes les espèces pathogènes (Sabat et al., 2013). Néanmoins, la plupart des infections sont causées par des souches appartenant à un nombre relativement restreint de lignées, comme cela a par exemple été montré pour *S.aureus* (Enright et al., 2002). Les méthodes décrites précédemment présentent l'inconvénient de ne s'intéresser qu'à quelques gènes ; elles peuvent ainsi parfois ne pas différencier des isolats très proches. Par conséquent, dans certaines situations, l'utilisation combinée de plusieurs méthodes peut s'avérer nécessaire pour une discrimination plus précise. L'avènement des technologies de NGS promet de pallier ce problème, proposant une épidémiologie génomique à haute résolution (Salipante et al., 2015).

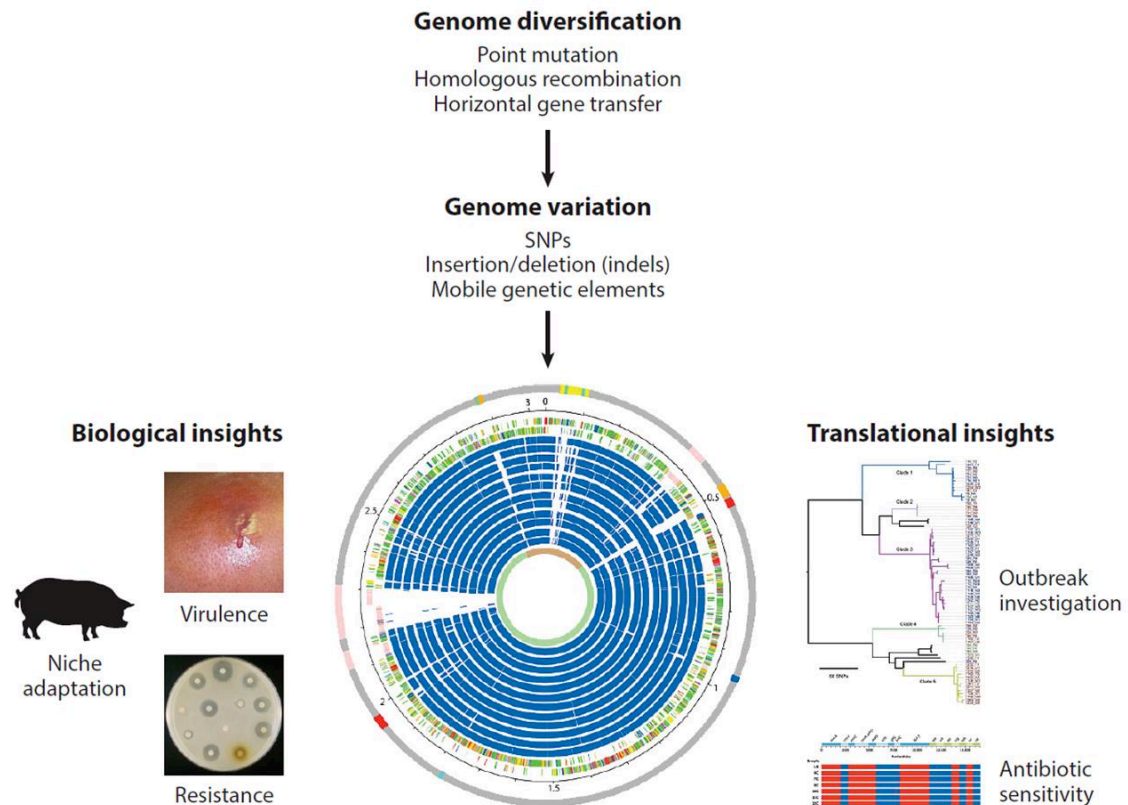
### **2.5. Next generation sequencing (NGS)**

L'émergence des technologies de NGS a rendu le séquençage du génome entier bactérien accessible à de nombreux laboratoires. Les coûts associés ne cessant de diminuer, le NGS apparaît comme un outil très attrayant, qui devrait prochainement remplacer les méthodes de typage actuellement utilisées en raison de sa résolution ultime (Lakhundi and Zhang, 2018; Sabat et al., 2003). Cette technologie permet en effet d'avoir accès à l'ensemble des modifications du génome : SNPs, insertions, délétions ou recombinaisons et éléments génétiques mobiles, permettant des études micro-épidémiologiques fines comme macro-épidémiologiques.

Cependant, une des questions est de savoir comment analyser les données du génome à des fins de caractérisation épidémiologique. Les informations obtenues peuvent être comparées avec les méthodes de typage traditionnelles comme la MLST, et le pouvoir discriminant beaucoup plus élevé du NGS peut permettre la discrimination d'isolats très proches qui relèvent du même ST par exemple. Les approches utilisées comprennent notamment le *core-genome* MLST (cgMLST), le *whole-genome* MLST (wgMLST), ou encore l'analyse *whole-genome* des SNPs (Schürch et al., 2018).

Au sein du genre *Staphylococcus*, les études de NGS ont essentiellement porté sur l'espèce *S. aureus*. Depuis les premiers génomes de *S. aureus* publiés, qui ont fourni un aperçu de la structure du génome et du contenu en gènes (Kuroda et al., 2001), des milliers de génomes provenant de souches d'origines cliniques et géographiques différentes ont été séquencés.

La comparaison de ces génomes a permis de mieux comprendre la structure de la population de l'espèce, son évolution, l'émergence et l'expansion de clones virulents et/ou résistants et les bases moléculaires de l'adaptation à une niche (**Figure 72**) (Fitzgerald and Holden, 2016). Ces analyses ont notamment confirmé la nature clonale de l'espèce avec un taux de recombinaison au sein du *core-genome* similaire à celui prédit par MLST, mais qui s'est révélé plus élevé au sein du génome accessoire (Castillo-Ramírez et al., 2012).



**Figure 72. Apports de la comparaison des génomes de *S. aureus*** (Fitzgerald and Holden, 2016).

De plus, les données génomiques peuvent être utilisées dans les **enquêtes au cours d'épidémies** pour contrôler et exclure les cas de transmissions de souches. Le NGS offre en effet le pouvoir de résolution suffisant pour réfuter des événements de transmission indiqués par les méthodes conventionnelles (même ST et *spa type* par exemple). Cependant, l'utilité du NGS dans ce contexte reste encore limitée, du fait d'un manque d'outils bioinformatiques dédiés à une analyse en routine. L'optimisation de ces outils pour convertir les flots de données en résultats exploitables rapidement est donc primordiale pour son implémentation (Durand et al., 2018; Eyre et al., 2012; Köser et al., 2012).





### **3. Travail personnel : développement de méthodes de génotypage à visée épidémiologique chez *S. lugdunensis***

#### **3.1. Publication n°2 : apport des méthodes MLVA et TRST dans le génotypage de *S. lugdunensis***

##### **3.1.1. Introduction**

###### *Contexte et objectifs de l'étude*

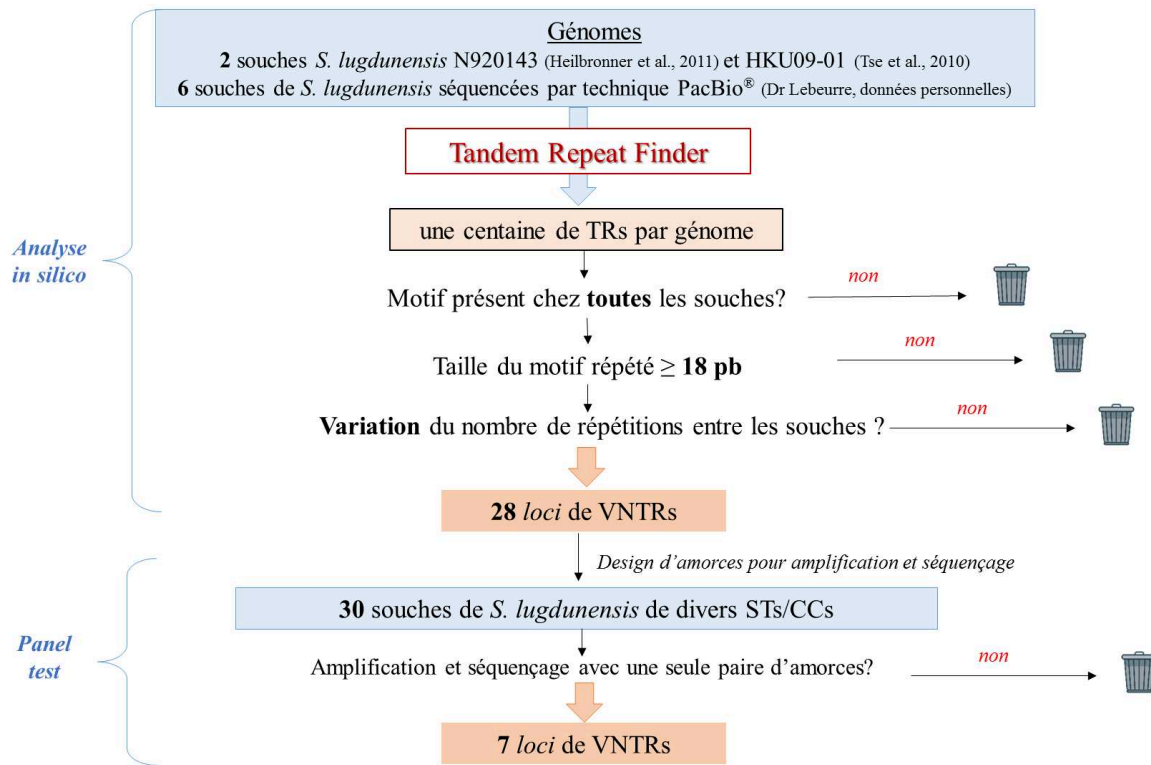
Les méthodes de génotypage précédemment développées pour *S. lugdunensis*, la MLST et la MVLST, ont révélé une structure de population fortement clonale de cette espèce, évoluant principalement par accumulation de mutations (Chassain et al., 2012; Didi et al., 2014). Aucune de ces deux méthodes n'a mis en évidence de lien entre lignées phylogénétiques et contexte clinique d'isolement des souches. La MVLST s'est révélée plus discriminante que la MLST, autorisant même un schéma de typage réduit à une analyse *trilocus*. Les quelques études épidémiologiques menées chez *S. lugdunensis* ont révélé que certaines lignées, et plus particulièrement certains génotypes, sont de large diffusion géographique, comme le ST6, CC1 (VT1) et le ST3, CC3 (VT35) (Ho et al., 2015; Yeh et al., 2016).

Dans ce contexte, il est apparu intéressant de mettre au point des techniques de typage potentiellement plus discriminantes pour suivre l'émergence et la diffusion de tels clones. Nous avons ainsi choisi d'étudier l'apport du polymorphisme génétique fourni par les VNTRs pour le typage de *S. lugdunensis*. En effet, l'évolution rapide du nombre de répétitions de ces marqueurs en font des outils intéressants pour des analyses micro-épidémiologiques, permettant la différenciation de souches au sein d'une population bactérienne clonale (van Belkum, 2007; Melles et al., 2009). De plus, les VNTRs accumulant des SNPs à une vitesse plus lente que celle affectant le nombre des répétitions, leur séquençage peut augmenter le pouvoir discriminant tout en reflétant la réalité structurelle de la population (ZaiSS et al., 2009).

Ainsi, les objectifs de cette étude étaient d'identifier pour la première fois chez *S. lugdunensis* des *loci* de VNTRs et de les séquencer afin (i) de développer deux nouvelles méthodes de typage basées sur l'étude du nombre de répétitions de ces VNTRs (MLVA) ainsi que sur la variabilité de leurs séquences (TRST), et (ii) d'évaluer leurs performances par rapport aux méthodes existantes de MLST et MVLST.

**Résultats**

La première étape de développement des méthodes de MLVA et TRST a consisté en l'analyse *in silico* de génomes de *S. lugdunensis* à l'aide de l'outil *Tandem Repeats Finder* (Benson, 1999), dans l'objectif d'identifier des VNTRs et de sélectionner les plus appropriés à des analyses phylogénétiques. La démarche est illustrée dans la **Figure 73**.



**Figure 73. Démarche de sélection des loci de variable number of tandem repeats (VNTRs) chez *S. lugdunensis*.**

Le pouvoir discriminant des **28 loci** de VNTRs identifiés *in silico* a été évalué par amplification et séquençage sur un panel de 30 isolats de *S. lugdunensis* préalablement caractérisés par MLST et MVLST. Ce panel était constitué d'isolats représentatifs de la diversité génétique de l'espèce (21 STs, 6 CCs), et contenait cinq paires d'isolats épidémiologiquement liés.

**Sept** VNTRs, nommés SLU1 à SLU7, ont ainsi été retenus pour les schémas MLVA/TRST. Quatre d'entre eux étaient situés dans des séquences codantes, et trois étaient intergéniques. La taille des unités de répétitions était comprise entre 24 et 58 pb. Les cinq paires d'isolats épidémiologiquement liés présentant un même ST appartenaient également à un même MT et un même TRST *type* (TRT) par MLVA et TRST respectivement, attestant de la concordance épidémiologique de ces méthodes.

Les techniques MLVA/TRST ont ensuite été appliquées à une collection de 98 souches cliniques de *S. lugdunensis* collectées entre 2013 et 2016 au CHU de Strasbourg, 82 isolées dans un contexte d'infections sévères issues de l'étude VISLISI (Argemi et al., 2017c) et 16 isolées en situation de portage. En parallèle, un typage par MLST et MVLST *trilocus* a été effectué sur ces souches.

L'analyse de l'ensemble de la collection (128 isolats) a montré que les techniques de MLVA et TRST étaient beaucoup plus discriminantes que les techniques de MLST et MVLST *trilocus*, tant en termes de génotypes identifiés que d'indice de diversité de Simpson. En effet, le typage par MLST et MVLST *trilocus* a permis d'identifier 25 STs ( $DI_{MLST} = 0,899$ ) et 21 VT<sup>T</sup>s ( $DI_{MVLST^T} = 0,845$ ) respectivement, tandis que la MLVA et la TRST ont permis l'identification de respectivement 55 MTs ( $DI_{MLVA} = 0,933$ ) et 69 TRTs ( $DI_{TRST} = 0,943$ ). La TRST affinait ainsi la classification obtenue par la MLVA, permettant d'identifier de nouveaux allèles pour un quart des MTs.

De façon intéressante, les regroupements phylogénétiques obtenus par les quatre méthodes étaient très congruents. En outre, les techniques de MLVA et TRST permettaient la discrimination de nouveaux génotypes dans les lignées phylogénétiques définies par la MLST, et notamment au sein des CCs particulièrement prévalents (CC1 et CC3). Aucun génotype spécifique à un contexte clinique n'a été identifié.

Enfin, l'analyse de la stabilité des sept *loci* de VNTR a révélé que, pour les deux souches testées, des profils identiques de MLVA et de TRST ont été obtenus pour les isolats parentaux et leurs 10ème, 20ème et 30ème sub-cultures, indiquant que ces VNTRs étaient stables dans le temps en termes de nombre de répétitions comme de séquences nucléotidiques.

Cette étude a donc fourni une description des deux premières méthodes basées sur les VNTRs pour le génotypage de *S. lugdunensis*. La MLVA et la TRST prédisent les CCs de MLST avec une grande précision, tout en discriminant des souches appartenant à certaines lignées. Basées sur des données non ambiguës et exportables, ces techniques représentent ainsi des outils prometteurs pour des études micro- comme macro-épidémiologiques chez *S. lugdunensis*.

Ce travail a fait l'objet d'une publication en Août 2018 dans la revue *Scientific Reports* (Dahyot et al., 2018), ainsi que de deux communications affichées (RICAI, Paris, 2016 ; ECCMID, Madrid, 2018).



**3.1.2. Publication n°2**


**Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) and Tandem Repeat Sequence Typing (TRST), helpful tools for subtyping *Staphylococcus lugdunensis*.**

Sandrine Dahyot, Jérémie Lebeurre, Xavier Argemi, Patrice François, Ludovic Lemée, Gilles Prévost, Martine Pestel-Caron. *Sci Rep.* 2018 Aug 3;8(1):11669.

DOI [10.1038/s41598-018-30144-y](https://doi.org/10.1038/s41598-018-30144-y)



# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

## Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) and Tandem Repeat Sequence Typing (TRST), helpful tools for subtyping *Staphylococcus lugdunensis*

Sandrine Dahyot<sup>1</sup>, Jérémie Lebeurre<sup>2</sup>, Xavier Argemi<sup>3,4</sup>, Patrice François<sup>5</sup>, Ludovic Lemée<sup>1</sup>, Gilles Prévost<sup>3</sup> & Martine Pestel-Caron<sup>1</sup>

*Staphylococcus lugdunensis* is an emergent virulent coagulase-negative *Staphylococcus* that is increasingly responsible for severe infections. In an attempt to generate informative sequence data for subtyping *S. lugdunensis*, we selected and sequenced seven polymorphic variable number of tandem repeats (VNTRs) to develop two new methods: a classic length-based multiple-locus VNTR analysis (MLVA) method and a tandem repeat sequence typing (TRST) method. We assessed their performances compared to two existing methods, multilocus sequence typing (MLST) and multivirulence-locus sequence typing (MVLST) for 128 isolates from diverse clinical settings and geographical origins. The clustering achieved by the four methods was highly congruent, with MLVA discriminating within clonal complexes as defined by MLST. Indeed, MLVA was highly discriminant compared to MLST and MVLST in terms of number of genotypes as well as diversity indexes. Sequencing of the seven VNTRs showed that they were stable, and analysis of sequence polymorphisms provided superior discriminatory power. The typeability, reproducibility, and epidemiological concordance of these new methods were excellent. Of note, no link between clustering and clinical settings was identified. This study demonstrates that MLVA and TRST provide valuable information for molecular epidemiological study of *S. lugdunensis*, and represent promising tools to distinguish between strains of homogenous lineages in this clonal species.

*Staphylococcus lugdunensis* is a coagulase-negative *Staphylococcus* (CoNS) belonging to the normal human skin microbiota<sup>1,2</sup> that is increasingly recognized as a virulent pathogen in both community-acquired and healthcare associated infections<sup>3,4</sup>. This commensal bacterium has mainly been associated with serious infections, such as skin and soft tissue infections<sup>5,6</sup>, bone and joint infections<sup>7,8</sup>, but also bacteremia and endocarditis<sup>9,10</sup>. Thus, the pathogenicity of *S. lugdunensis* is closer to that of *S. aureus* than that of other CoNS; it may be related to virulence factors such as a fibrinogen binding protein<sup>11</sup>, a von Willebrand factor-binding protein<sup>12</sup>, synergistic hemolysins<sup>13</sup> or a metalloprotease<sup>14</sup>.

Several molecular typing methods are currently available for *S. lugdunensis* strains such as macrorestriction analysis using pulsed-field gel electrophoresis<sup>15</sup> and multilocus sequence typing (MLST)<sup>16</sup>. The latter is considered as the gold standard method for epidemiological typing and population genetic study of *S. lugdunensis*.

<sup>1</sup>Normandie Univ, UNIROUEN, GRAM EA2656, Rouen University Hospital, F-76000, Rouen, France. <sup>2</sup>Normandie Univ, UNIROUEN, GRAM EA2656, F-76000, Rouen, France. <sup>3</sup>Université de Strasbourg, CHRU de Strasbourg, VBP EA7290, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Institut de Bactériologie, 3 rue Koeberlé, F-67000, Strasbourg, France. <sup>4</sup>Hôpitaux Universitaires, Maladies Infectieuses et Tropicales, F-67000, Strasbourg, France. <sup>5</sup>University of Geneva Hospitals, Genomic Research Laboratory, Service of Infectious Diseases, Geneva, Switzerland. Sandrine Dahyot and Jérémie Lebeurre contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to S.D. (email: [sandrine.dahyot@chu-rouen.fr](mailto:sandrine.dahyot@chu-rouen.fr))



Recently, we developed a multivirulence-locus sequence typing (MVLST) method, based on the sequence data of seven known or putative virulence-associated loci<sup>17</sup>. MVLST was significantly more discriminant than MLST, even allowing a trilocus sequence typing method for microepidemiological purposes. Phylogenetic analyses by MLST and MVLST revealed a clonal population structure, a mutational evolution of this pathogen, and a lack of hypervirulent lineages.

An interesting source of genetic polymorphism is provided by tandemly repeated sequences, known as variable number of tandem repeats (VNTRs), whose number of repetitions varies at different rates depending on the different loci and even alleles<sup>18</sup>. Molecular typing based on the analysis of repeat copy number at multiple VNTR loci, known as multiple-locus VNTR analysis (MLVA), is a genotyping method that is being used for strain comparison, and can also provide insights into population structure<sup>19</sup>. This method has already been successfully applied to many other bacterial species and showed a high level of discrimination<sup>19–23</sup>. Especially, measuring repeat polymorphisms in clonal microorganisms can provide a solid basis for genetic type assignment<sup>24</sup>. In addition, to increase the discriminatory power of MLVA, sequencing repeated sequences that display internal variability can be performed<sup>25</sup>.

The aims of this study were to identify VNTR loci and to sequence them in order (i) to develop the first length-based MLVA method and a sequence-based MLVA (tandem repeat sequence typing) method for *S. lugdunensis*, and (ii) to evaluate and compare the added value of these new methods with the existing methods MLST and MVLST in terms of *S. lugdunensis* strain discrimination within clonal groups.

## Results

**MLST and MVLST genotyping.** To determine their diversity and whether they belong to major clonal complexes, we analyzed 128 *S. lugdunensis* clinical isolates by MLST and MVLST. Data for 20 isolates were derived from our previous studies<sup>16,17</sup>, while we performed MLST and MVLST analysis of 108 additional clinical isolates for the purposes of the present study.

MLST analysis on the 128 isolates identified 25 sequence types (STs). Two new STs, designated ST31 and ST32, were incorporated in the online database (<http://bigsd.db.web.pasteur.fr/staphlugdunensis>). ST3 was the most common ST (n = 29), followed by ST2 (n = 15) and ST24 (n = 15). The 25 STs were distributed over 7 clonal complexes (CC1 to 7) and 2 singletons, as shown in the minimum spanning tree (Fig. 1). The main clonal complex was CC1 (n = 38), consisting of 5 STs (1, 6, 7, 12 and 15, with ST6 as the primary founder) followed by CC3 (n = 31) with 3 STs (3, 16 and 20 with ST3 as the primary founder).

MVLST performed on the 128 isolates revealed that the number of individual alleles for each of the three genes ranged from 10 (for SLUG\_16930 and *atLL<sub>R3</sub>*) to 11 (for *isdJ*). Twenty-one trilocus virulence types (VT<sup>T</sup>s) were assigned; 3 major VT<sup>T</sup>s (VT<sup>T</sup>1, VT<sup>T</sup>15 and VT<sup>T</sup>16) were shared by 81 isolates. Five new VT<sup>T</sup> were identified (VT<sup>T</sup>34 to 38). The clustering obtained by MVLST was similar to that observed by MLST. For instance, VT<sup>T</sup>15 and VT<sup>T</sup>16 corresponded to ST2 and ST3 respectively, VT<sup>T</sup>1 clustered into 4 STs (ST1, ST6, ST12 and ST15) from CC1 and 3 linked VT<sup>T</sup>s (VT<sup>T</sup>13, VT<sup>T</sup>34 and VT<sup>T</sup>37) belonged to ST24.

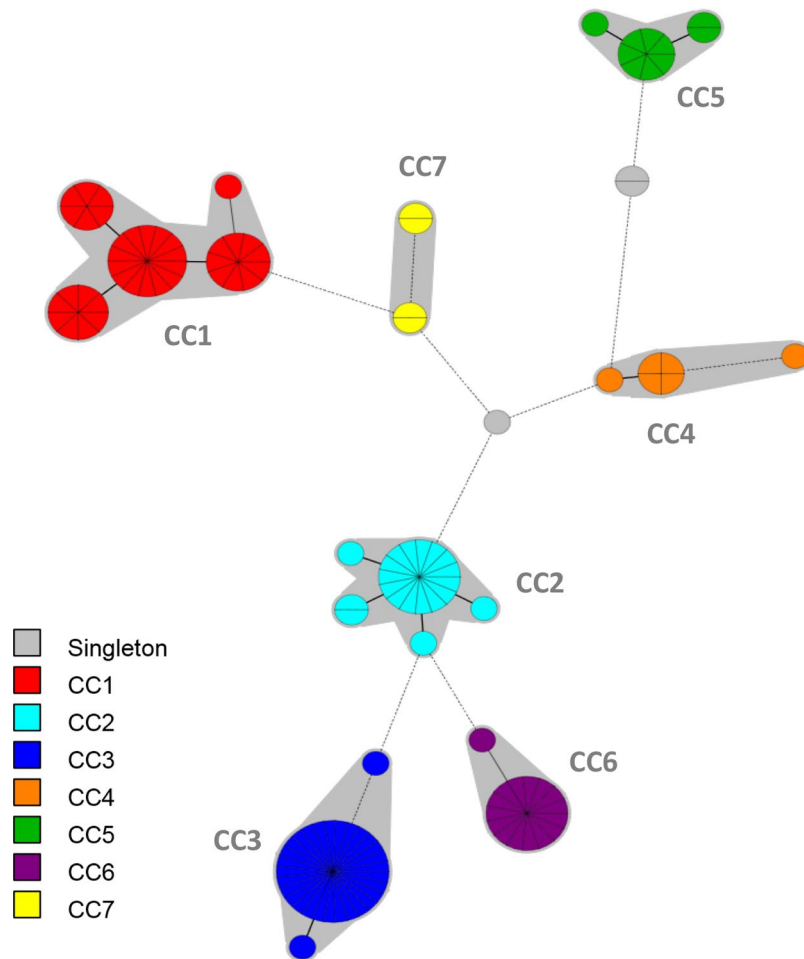
No correlation was found between genotype and clinical origin; for example, CC1 was shared by isolates from 8 different clinical contexts. Isolates recovered from hematogenic infections (blood or osteoarticular isolates) or from skin and soft tissue infections did not cluster in separate lineages. Nevertheless, an interesting trend was observed: 4 of 5 device-associated infection isolates belonged to CC3 (VT<sup>T</sup>16). Pathogenic and carriage isolates overlapped in their genotype distribution, with 4 of 7 CCs containing isolates from both sources. However, although carriage isolates did not cluster in a unique lineage, 59% (10/17) belonged to CC3 and 53% (9/17) belonged to VT<sup>T</sup>16.

**MLVA genotyping and clustering.** Based on the *S. lugdunensis* genomes available in GenBank database, 7 VNTR loci were selected and evaluated on the validation panel of 30 isolates. Four VNTR loci were located in open reading frames; SLU2, SLU3 and SLU6 were located in genes encoding hypothetical proteins while SLU7 was located in a gene encoding an AraC family transcriptional regulator. Three VNTRs (SLU1, SLU4 and SLU5) were located in non-coding regions. The tandem repeat (TR) unit size of the 7 VNTRs was between 24 and 58 bp (Table 1), while the number of TRs ranged from 1 to 11. MLVA discriminated 19 MLVA types (MTs) among the 30 isolates. The 5 pairs of isolates considered as clonal by MLST were also found to be clonal by MLVA, attesting the epidemiological concordance of the method.

The MLVA assay was then applied to the analysis of an expanded panel of 98 *S. lugdunensis* clinical isolates from highly diverse clinical situations. The 7 VNTR loci were amplified and sequenced for all 98 isolates. Diversity in the number of TRs varied among the various VNTR loci. The largest observed variation in VNTR size was found for SLU3 and spanned from 3 to 11 repeats (Table 1). MLVA discriminated 42 MTs among the 98 isolates. Four MTs were represented by more than 5 isolates: MT1 (n = 23), MT2 (n = 12), MT3 (n = 7) and MT4 (n = 6). Twenty-nine MTs were represented by only 1 isolate.

Finally, the 7 selected VNTRs enabled identification of 55 different MTs for the overall panel of 128 isolates tested in this study. A complete overview of these allelic profiles is presented in Table S4. Simpson's diversity index (DI) was calculated for each of the 7 loci to evaluate their discriminatory power. The SLU3 locus showed the highest DI value (0.679), with the highest number of TR; the lowest DI value was observed for the SLU7 locus (0.090) (Table 1). MLVA combined 2 markers (SLU7 and SLU5) with a low discriminatory power (DI < 0.5) with 5 highly discriminant markers.

The genetic relationships of the 128 isolates were deduced by the construction of an unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) tree (Fig. 2) and a minimum spanning tree (Fig. 3). For the minimum spanning tree analysis, MLVA complexes (MCs) were created if 6 of the 7 VNTR loci were identical. This analysis defined 6 different MCs (MC1 to 6) and 10 singletons (Fig. 3a). Two of the MCs, MC1 (30 isolates) and MC2 (54 isolates), were predominant. Of the 128 isolates analyzed in the study, 91% were part of an MC. With the UPGMA



**Figure 1.** Minimum spanning tree of the 128 *S. lugdunensis* isolates typed by multilocus sequence typing (MLST). The MLST sequences were concatenated and analyzed in BioNumerics. Clustering of MLST profiles was done using a categorical coefficient. The colors used are based on clonal complexes (CCs). Each circle represents a sequence type and its size is proportional to the number of strains. Thick, short lines connecting two types denote types differing in a single locus; thin, longer lines connect double-locus variants; and dashed lines indicate the most likely connection between two types differing in more than two loci. Gray zones around circles delineate CCs. CCs are also indicated in characters e.g. CC1 denotes MLST complex 1.

algorithm, an MLVA cluster was defined by a cutoff value of 67% similarity (Fig. 2). Eight MLVA clusters (cluster I to VIII), each containing more than 2 isolates, and 7 singletons were identified. The predominant cluster, cluster I, included 51 isolates. Overall, clusters were highly congruent with the 2 algorithms, UPGMA and minimum spanning tree.

The distribution of the isolates did not allow us to identify any correlation between MCs and clinical settings. However, 12 of 17 (70%) carriage isolates and 4 of the 5 device-associated infection isolates clustered into MC2 (Fig. 3b), as observed with MLST and MVLST.

Compared to MLST, MLVA resulted in a higher differentiation of the *S. lugdunensis* isolates as 55 MTs were clustered into 6 MCs as opposed to 25 STs into 7 CCs. Interestingly, MLVA efficiently subdivided some CCs such as CC1 and CC5 (Table 2). On the contrary, isolates of CC2, represented by 5 STs, were less discriminated by MLVA with only 3 MTs. Despite obvious differences, there was considerable congruence between the clustering results obtained by the 2 typing methods, as shown by the MLVA-based minimum spanning tree (Fig. 3a). Especially, the CC1 isolates clustered into 2 linked MCs (MC1 and MC3), and the CC4 and CC5 isolates clustered into MC6 and MC5, respectively.

**Tandem repeat sequence typing (TRST).** Sequencing of the alleles of the 7 VNTRs was performed to determine their internal variability and size homoplasy. Sequencing led to the identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the TRs of all loci, and showed that no insertion or deletion was present in flanking sequences. For each VNTR, alleles defined for the overall panel of 128 isolates ranged from 4 (SLU7) to 27 (SLU3) (Table 1). The Simpson's DI calculated for the 7 VNTRs based on TRST ranged from 0.120 for SLU7 to 0.889 for SLU3 (Table 1).

Analysis of the 7 VNTR sequences revealed a total of 21 TRST types (TRTs) among the 30 panel test isolates; epidemiologically-related isolates belonged to the same TRT, which is in favor of an *in vivo* stability of the VNTR

VNTR name	Primer sequences (5'–3')	Annealing temperature	Genome coordinates <sup>a</sup>	Putative function	Repeat size (bp)	Copy no. range	MLVA method		TRST method		
							DI <sup>b</sup>	CI <sup>c</sup> 95%	No. of alleles	DI <sup>b</sup>	CI <sup>c</sup> 95%
SLU1	F: ATCTCAGGTAAGGATATTCGCATTG R: CACAATGTTTCGTATTGAATGGCTT	56 °C	2201528 2201881	Non-coding	57	1–3	0.531	0.500–0.562	6	0.656	0.609–0.702
SLU2	F: TTTATCCCACAATCATTCTTGGC R: GTTCCAGTCTCTGTCAATTAGTTT	55 °C	2247710 2248186	Hypothetical protein	58	1–4	0.595	0.523–0.667	21	0.801	0.745–0.856
SLU3	F: CACAAGACAATAGTAACCGAAAG R: CTTTATATTTGGTTGATTCGTTGG	55 °C	1080477 1080983	Hypothetical protein	48	3–11	0.679	0.615–0.743	27	0.889	0.859–0.918
SLU4	F: ATATTTCGTATTGTGGCTCG R: GAAGCGCATAGTGTAGATGA	53 °C	569800 569359	Non-coding	57	1–6	0.666	0.617–0.715	14	0.757	0.706–0.808
SLU5	F: TTAAACATCATTGCAGGTCG R: CAGCAGAATACCATTCAATTACA	53 °C	2497844 2497405	Non-coding	57	2–5	0.479	0.393–0.566	19	0.849	0.819–0.879
SLU6	F: TACATTAAGCTAGTTTGCAG R: AAATAAGTGAAGGACGTGATG	60 °C	2115216 2115837	Hypothetical protein	58	1–5	0.566	0.503–0.629	18	0.850	0.819–0.880
SLU7	F: CAATGATGATGCCTAACCCG R: AATTATGGATTATATCGAGCG	58 °C	2254827 2255435	AraC family transcriptional regulator	24	2–3	0.090	0.022–0.158	4	0.120	0.043–0.197

**Table 1.** Primers used for MLVA and TRST methods and characteristics of the 7 variable number of tandem repeat (VNTR) loci. <sup>a</sup>Nucleotide coordinates in the reference strains *S. lugdunensis* N920143 chosen for primer design. <sup>b</sup>DI: Simpson's diversity index. <sup>c</sup>CI: confidence interval.

sequences. A total of 69 TRTs were identified for all the 128 isolates, suggesting that TRST is slightly more discriminant than MLVA (55 MTs). A complete overview of these allelic profiles is presented in Table S4. TRT1 was the most common ( $n = 26$ ), followed by TRT2 ( $n = 16$ ) and TRT3 ( $n = 7$ ). Sixty-one TRTs were represented by only 1 isolate. A TRST cluster was defined by a cutoff value of 91% similarity with the UPGMA algorithm (Fig. S2). Nine TRST clusters (cluster I to IX), each containing more than 2 isolates were identified. The largest TRST cluster (cluster I) comprised 51 isolates represented by 11 TRTs. As illustrated by the UPGMA tree, these isolates belonged to the MC2 (Fig. S2).

Figure 4 illustrates the distribution of the distinct CCs onto the TRST diversity, similar to that obtained by MLST. Notwithstanding, as MLVA, TRST showed a variable level of discrimination according to CCs (Table 2). For example, TRST was highly discriminant for CC1 (28 TRTs *versus* 5 STs) and for CC6 (2 STs *versus* 10 TRTs).

As for MLVA, no correlation was observed between TRTs and clinical settings, but the majority of carriage ( $n = 11$ ) and device-associated infection ( $n = 4$ ) isolates remained clustered (TRST cluster I). Of note, 23 isolates collected from Strasbourg University Hospital between November 2013 and March 2016 could not be distinguished by both MLST (ST3) and MLVA/TRST (MT1/TRT1). As a fact, they could be considered as a clone. Interestingly, 14 isolates from 7 different clinical settings and 9 of the 16 carriage isolates belonged to this clone.

**Discriminatory power and concordance between typing methods.** To assess the respective discriminatory power of the MLST, MVLST, MLVA and TRST methods, we excluded 5 of the 10 isolates that were isolated from the same patient and that were shown to be identical by all typing methods<sup>26</sup>. Simpson's DI calculated on the basis of the 123 remaining unrelated isolates showed that MLVA ( $DI_{MLVA} = 0.933$ ) was more discriminatory than MLST ( $DI_{MLST} = 0.898$ ) and MVLST ( $DI_{MVLST} = 0.845$ ) (Table 3). Moreover, discriminatory power contributed by the sequencing of the VNTR loci ( $DI_{TRST} = 0.943$ ) was higher than the analysis of the size of the VNTRs.

Table 2 shows Simpson's DI of the different methods according to the CCs defined by MLST. The higher level of discrimination of MLVA and TRST was particularly observed within the CC1 isolates, with DI of 0.949 and 0.962 respectively, compared to MLST ( $DI = 0.737$ ). Conversely, MVLST had a limited discriminatory power ( $DI = 0.206$ ) for isolates of CC1.

The adjusted Wallace coefficient (AW) of MLVA, compared with that of MLST and MVLST, showed that MLVA had high congruence with MLST ( $AW = 0.826$ ) and MVLST ( $AW = 0.815$ ) (Table 4). This indicates that isolates from a given MT will have an 83% probability of sharing the same ST. Conversely, the congruency of MLST with MLVA indicates that isolates from a given ST will have only a 52% probability of belonging to the same MT. This confirmed that MLVA was more discriminatory than MLST. Moreover, the predictive ability of TRST for *S. lugdunensis* clustering was highly congruent with MLVA typing, and the probability that a pair of isolates with the same MT also shared identical TRT was 84% (Table 4).

**Stability of VNTR loci.** Examination of VNTR loci stability revealed that, for each isolate, identical MLVA profiles (in terms of TR number and sequences) were generated for the original isolates and their 10<sup>th</sup>, 20<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> subcultures, indicating that the 7 VNTRs were stable.

**Linkage disequilibrium.** A quantitative analysis of the linkage between alleles from the 7 VNTR loci was performed by calculating the standardized index of association ( $I_A^S$ ). The linkage disequilibrium was shown to be significant in the LIAN 3.7 analysis, indicating a clonal population structure for the *S. lugdunensis* isolates.  $I_A^S$  was calculated at 0.1819 for MLVA and 0.4639 for TRST at a significance of  $P < 1.00 \times 10^{-5}$ .



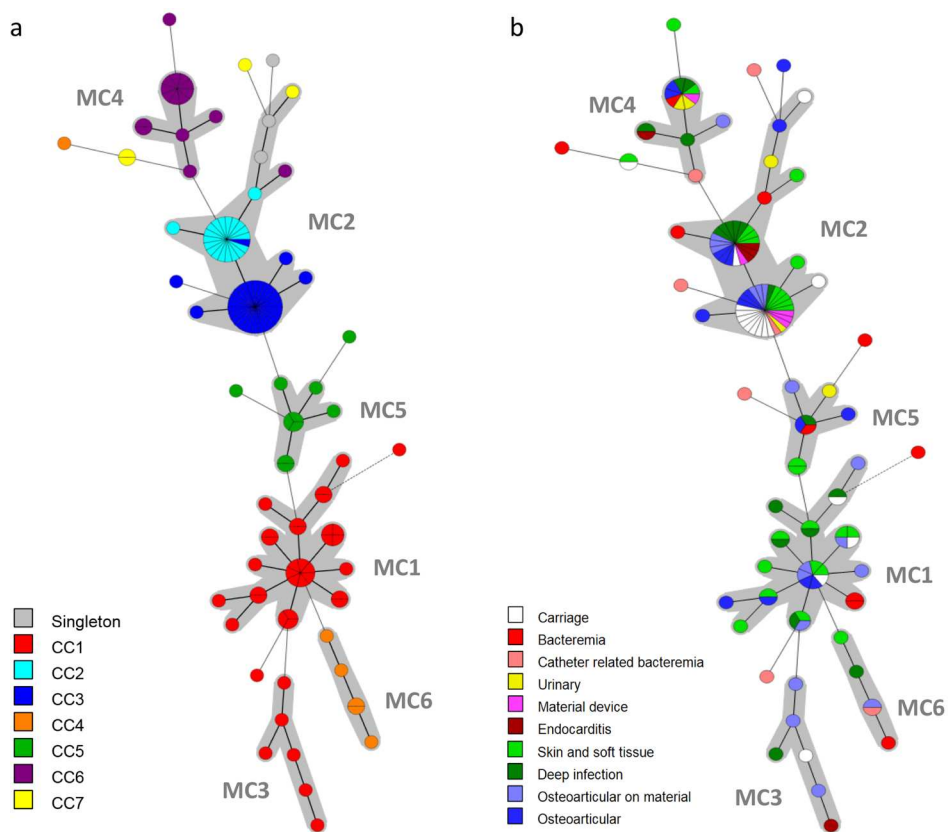
**Figure 2.** Multiple-locus VNTR analysis (MLVA) clustering of the 128 isolates of *S. lugdunensis* by the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) method. The names of isolates, MLST sequence type (ST), MLST clonal complex (CC), MVLST trilocus virulence type (VT<sup>T</sup>), MLVA type (MT), TRST type (TRT), the clinical sources and the city of isolates are shown on the right. A cutoff value of 67% similarity was applied to define MLVA clusters (named MLVA cluster I to VIII). The colors used are based on MLVA complexes (MCs).

### Discussion

Because *S. lugdunensis* is more virulent than other CoNS<sup>27</sup>, MLST and MVLST were developed to characterize the links between within-species genetic variations and characteristics, such as pathogenic potential, virulence, and epidemiology. To further delineate the lineages and clonal groups previously described by these typing methods,

CC (no. of isolates)	MLST		MVLST		MLVA		TRST	
	No. of STs	DI <sup>a</sup>	No. of VT <sup>1</sup> s	DI <sup>a</sup>	No. of MTs	DI <sup>a</sup>	No. of TRTs	DI <sup>a</sup>
1 (37)	5	0.737	4	0.206	22	0.949	28	0.962
2 (18)	5	0.405	3	0.307	3	0.216	5	0.405
3 (30)	3	0.131	2	0.067	6	0.310	6	0.310
4 (6)	3	0.600	3	0.600	5	0.933	6	1.000
5 (10)	3	0.511	2	0.200	7	0.911	8	0.956
6 (15)	2	0.133	3	0.257	7	0.724	10	0.914
7 (4)	2	0.667	2	0.667	3	0.833	3	0.833
Total	25	0.898	21	0.845	55	0.933	69	0.943

**Table 2.** Abilities of the four typing methods to discriminate isolates within major *S. lugdunensis* clonal complexes (CCs) defined by MLST. <sup>a</sup>DI: Simpson's diversity index.



**Figure 3.** Minimum spanning tree of the 128 *S. lugdunensis* isolates typed by multiple-locus VNTR analysis (MLVA). The MLVA data were analyzed in BioNumerics. Clustering of MLVA profiles was done using a categorical coefficient. The colors used are based (a) on clonal complexes (CCs) defined by MLST and (b) on clinical contexts. Each circle represents an MLVA type. Thick, short lines connecting two types denote types differing in a single locus; thin, longer lines connect double-locus variants; and dashed lines indicate the most likely connection between two types differing in more than two loci. Gray zones around circles delineate MLVA complexes (MCs). MCs are also indicated in characters e.g. MC1 denotes MLVA complex 1.

MLVA has attracted intense interest. In this study, we developed a classic seven loci MLVA typing method and a sequence-based MLVA method (TRST), and compared them with MLST as a reference method and with the virulence-associated trilocus method (MVLST). The relevance of these new molecular tools was investigated against a genetically diverse set of 128 *S. lugdunensis* isolates collected from various clinical settings and geographical origins.

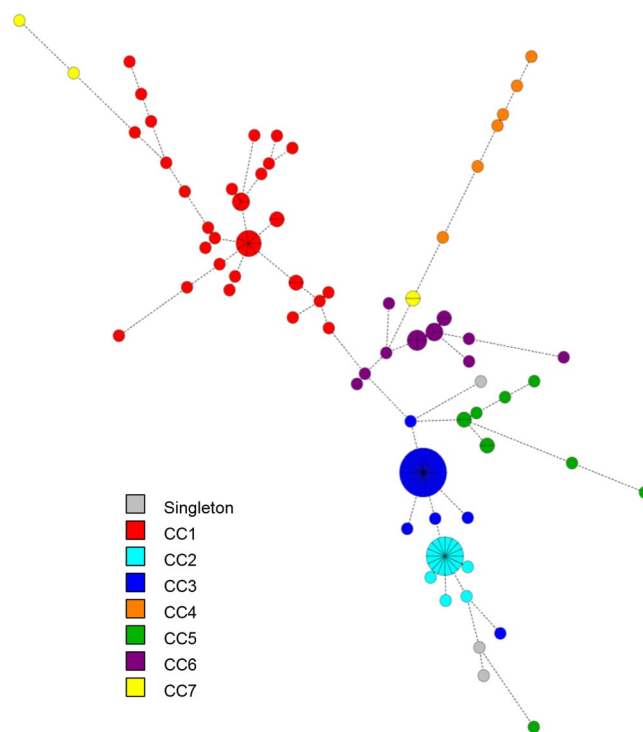
One hundred TR sequences contained in the *S. lugdunensis* genomes available in GenBank database were initially identified *in silico*. Finally, seven VNTRs were selected because they met the preconditions described in the methods section and for their discriminatory power. PCR amplification and sequencing of the seven VNTRs were achieved for all the 128 isolates tested representing a typeability of 100%. MLVA proposes here a set of

Typing method	Number of types	DI <sup>a</sup>	CI <sup>b</sup> 95%
MLST	25	0.898	0.871–0.925
MVLT	21	0.845	0.809–0.880
MLVA	55	0.933	0.905–0.961
TRST	69	0.943	0.915–0.971

**Table 3.** Simpson's diversity index of the four typing methods. <sup>a</sup>DI: Simpson's diversity index. <sup>b</sup>CI: confidence interval.

	MLST	MVLT	MLVA	TRST
MLST		0.858 (0.756–0.959)	0.524 (0.407–0.641)	0.482 (0.368–0.597)
MVLT	0.531 (0.445–0.618)		0.320 (0.228–0.412)	0.289 (0.199–0.380)
MLVA	0.826 (0.736–0.916)	0.815 (0.677–0.953)		0.838 (0.755–0.922)
TRST	0.906 (0.834–0.979)	0.878 (0.742–1.000)	1.000 (1.000–1.000)	

**Table 4.** Adjusted Wallace coefficients and 95% confidence interval of the four typing methods.



**Figure 4.** Minimum spanning tree of the 128 *S. lugdunensis* isolates typed by tandem repeat sequence typing (TRST). The VNTR sequences were combined into a composite dataset and analyzed in BioNumerics. Clustering of MLVA profiles was done using a categorical coefficient. Each circle represents a TRST type. The colors used are based on clonal complexes (CCs) defined by MLST. Thick, short lines connecting two types denote types differing in a single locus; thin, longer lines connect double-locus variants; and dashed lines indicate the most likely connection between two types differing in more than two loci.

markers with different DIs (0.090 to 0.679). Markers with a moderate DI (<0.5), presumably reflecting their slow rate of evolution, define clusters. Conversely, VNTRs displaying more diversity and more rapid evolution reflect variability within clusters. Our MLVA method is similar to those proposed for *S. aureus*<sup>20</sup> or *S. epidermidis*<sup>21</sup>, in terms of number of VNTRs and diversity indexes. Of note, 5 of the 7 VNTRs presented similarities (80 to 90% Blast identity) with other staphylococci, including *S. aureus* and *S. haemolyticus*, but the 7 primers are specific to the species *S. lugdunensis* excluding the possibility of false positive amplifications.

In the midst of all VNTRs identified with Tandem Repeats Finder software, some have been eliminated because fragments were too long to be amplified and sequenced in standard PCR conditions. For example, some were located in genes encoding putative surface-exposed proteins, like *sls* genes, as described by Heilbronner *et al.*<sup>28</sup>. However, these VNTRs could be attractive because the number of repeats is possibly more subjected to

selective pressure. Indeed, previous MLVA studies of *Staphylococcus*<sup>21,29</sup> and *Streptococcus agalactiae*<sup>22</sup> found high variability in genes encoding Sdr adhesins and FbsA surface protein, respectively. Thus, these targets would be interesting to include in an MLVA method based on a whole genome sequencing approach.

We compared MLVA with the widely used MLST and the alternative trilocus MVLST. This latter method allowed us to define nearly the same number of profiles as MLST and was consistent with MLST, as unique STs or their single locus variants (SLVs) and double locus variants (DLVs) were found in each VT<sup>T</sup> group. Thus, this comparison confirms the coevolution of virulence-associated loci studied with housekeeping genes as shown previously<sup>17</sup>, and validates the use of the trilocus method as a good epidemiological tool while significantly reducing costs.

Analysis of the seven VNTRs on the overall panel of isolates revealed that MLVA was highly discriminant compared to MLST in terms of number of profiles as well as discriminatory index. This could be explained by the fact that VNTRs evolve more rapidly than housekeeping genes, limiting the MLST resolution. However, although these two methods measure different evolutionary mechanisms at multiple genomic loci, similar clustering was obtained, probably due to the rarity of recombination among *S. lugdunensis* isolates<sup>16</sup>. Thus, our findings suggest that the loci targeted by MLVA provide a robust measure of genetic relationships. The greater discriminatory index of MLVA made it possible to distinguish between isolates within CCs defined by MLST, but this appeared highly CC-dependent. Indeed, some clones, especially CC1, showed a significant diversity with many genotypes identified by MLVA and TRST. On the contrary, CC2 was less discriminated by these methods, suggesting that CC2 has emerged more recently than CC1. The higher discriminatory power of MLVA in some lineages defined as clonal by MLST has previously been described for several other species such as *Listeria monocytogenes*<sup>23</sup> and *Streptococcus agalactiae*<sup>22</sup>.

On the other hand, MLVA is generally considered as an unreliable phylogenetic method because of the high frequency of the independent evolution of the same repeat array sizes in different isolates (*i.e.* size homoplasy)<sup>30,31</sup>. Thus, sequencing was selected not only as a method for repeat number verification, but also to detect single nucleotide polymorphisms in addition to allele size, SNPs being less prone to homoplasy<sup>32</sup>. It allowed us to propose a TRST method, which proved more discriminating than MLVA. Indeed, 55 MTs were identified by analyzing repeat array sizes, whereas 69 TRTs were identified by sequencing, indicating that a quarter of these alleles were misclassified by conventional MLVA. Considering that the growing use of whole genome sequencing, with its continuously decreasing costs and increased rapidity<sup>33</sup>, the present TRST method offers an additional tool for a worldwide traceable picture of *S. lugdunensis* clones. New alleles and TRST types will be certainly identified by *in silico*-TRST analysis as new genome sequences become available, contributing to a global evaluation of *S. lugdunensis* epidemiology.

MLVA and TRST have strong potential for inter-laboratory comparisons, providing accurate and reproducible data that can easily be exchanged. We have proved that the VNTRs studied were stable during laboratory subcultures, in terms of number of repeats as well as nucleotide sequences, and found complete reproducibility. Furthermore, the epidemiological concordance of the related strains has been validated. Thus, our new MLVA and TRST methods fulfill a number of criteria recognized as important for the successful implementation of a typing method and the interpretation of its results<sup>26</sup>. Here, the use of seven VNTRs resulted in high discriminatory capacity. Interestingly, the combination of only five markers (SLU1, SLU2, SLU3, SLU4 and SLU6) resulted in a highly similar clustering of isolates (44 MTs) while slightly decreasing the discriminatory capacity (DI = 0.920). This simpler version of the MLVA method could allow potential future use of multiplex PCR assays with fluorescent primers and determination of allele size by capillary electrophoresis.

In this study, no strong correlation was observed between genotypes and clinical settings of the 128 isolates. This could suggest that host susceptibility plays an important role in the propensity of isolates to cause disease, and/or that the virulence potential of isolates is not reflected by MLST or MLVA data. This has been described for *S. aureus*, for which MLST data do not provide any information regarding the pathogenicity of isolates, because changes in virulence correspond primarily to changes in the accessory, rather than core genome<sup>34</sup>. Like *S. aureus*, *S. lugdunensis* evolution is predominantly clonal<sup>16,17</sup>, therefore the study of the accessory genome could contribute to a better understanding of the genetic basis of these different clinical behaviors. On the other hand, the majority of carriage isolates and those collected from device-associated infections of this work were distributed in one complex whatever the typing method. Thus, it would be interesting to analyze a larger number of worldwide invasive and carriage *S. lugdunensis* isolates to measure the ratio of pathogenic to carrier strains for the various lineages. This ratio, combined with the study of the accessory genome, would help to investigate the existence of successful commensal clones.

As previously reported in other studies<sup>4,16</sup>, CC1 (n = 31) and CC3 (n = 26) were the most common clonal complexes identified by MLST for the 98 isolates collected at Strasbourg University Hospital. Within these CCs, the most prevalent STs were the primary founders of these complexes, ST6 (n = 14) and ST3 (n = 26) respectively. Interestingly, a particularly prevalent clone (n = 23), including virulent and carriage isolates, was identified by both MLST (ST3) and MLVA/TRST analysis (MT1/TRT1), even if the discriminatory power of these latter typing methods is high. Thus, whole genome (wg) sequencing, and particularly wgMLST, wgTRST and/or virulome determination, would be useful to identify markers to distinguish between such isolates. On the other hand, the fact that these isolates have been regularly identified from different patients and different hospital wards over a 24-month period suggests that this could be a clone capable of long-term persistence. While ST3 has already been identified<sup>4,16</sup>, this present study is the first to describe it as a persistent clone. This has already been described by Cheng *et al.*<sup>35</sup>, who identified a major endemic ST6 clone of oxacillin-resistant *S. lugdunensis* in a tertiary medical center in Taiwan. However, unlike Cheng *et al.*, ST3 isolates are not multiresistant to antibiotics, so their persistence cannot be directly related to antibiotic pressure; it could be linked to a higher fitness under certain environmental or clinical conditions. In the light of these results and that of Kassem *et al.*<sup>36</sup>, who showed that clinical

surfaces are frequently contaminated by *S. lugdunensis*, further investigations are needed to explore the mode of transmission and environmental reservoirs of this species.

In conclusion, this work provides a description of the first two VNTR-based methods for *S. lugdunensis* typing. MLVA and TRST are the most discriminant typing methods available to date. Furthermore, the analysis of the polymorphism of seven VNTRs in terms of variations in copy number of repeats, as well as internal sequence, allowed us to predict CCs with high accuracy while distinguishing strains belonging to some lineages. Sequence-based MLVA may prove particularly useful because it yields unambiguous data that can easily be exchanged and used for inter-laboratory comparisons. Resolving phylogenetic diversity to a high level in this clonal species, MLVA and TRST represent promising tools which could help to elucidate the global epidemiology and evolution of *S. lugdunensis* as well as to identify outbreaks.

## Methods

**Bacterial isolates.** A total of 128 *S. lugdunensis* human isolates were used in this study (see Table S1 in the supplemental material). A first set of 30 isolates collected from five French regions and Sweden was used for an initial validation of two new typing methods. Among them, 20 epidemiologically unrelated isolates were used, including the reference strain ATCC 43809, 18 clinical isolates (bacteremia [n = 8], bone and joint infections [n = 4], skin and soft tissue infections [n = 3], medical device [n = 2] and other [n = 1]) as well as a carriage isolate. All 20 isolates were representative of the main clusters previously defined by MLST<sup>16</sup> and MVLST<sup>17</sup>. To evaluate the epidemiological concordance of MLVA, we also included 5 pairs of isolates from patients at time intervals ranging from 0 to 17 days. Second, to assess the performances of MLVA, 82 clinical isolates (bone and joint infections [n = 28], skin and soft tissue infections [n = 23], bacteremia [n = 9], urinary tract infections [n = 5], medical device [n = 4] and other [n = 13]), collected during the VISLISI trial (Virulence of *Staphylococcus lugdunensis* in Severe Infections)<sup>14</sup>, and 16 carriage isolates (isolated from various anatomical locations not associated with infection) were included. These 98 isolates were collected from November 2013 to March 2016 at Strasbourg University Hospital, France. All the 128 isolates were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer.

**DNA extraction and PCR amplification.** Isolates (stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  before use) were grown overnight at  $37^{\circ}\text{C}$  on tryptic soy agar with 5% horse blood agar plate. DNA was extracted using the InstaGene Matrix kit (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) according to the manufacturer's recommendations. PCRs were performed on a Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a final volume of 25  $\mu\text{l}$  containing 12.5  $\mu\text{l}$  GoTaq G2 Green Master Mix (Promega, Charbonnières-Les-Bains, France), 0.50  $\mu\text{M}$  each primer and 5  $\mu\text{l}$  of extracted DNA.

**MultiLocus Sequence Typing (MLST).** MLST genotyping was performed by sequencing seven gene loci (*aroE*, *dat*, *ddl*, *gmk*, *ldh*, *recA* and *yqiL*) as previously described<sup>16</sup>, except that the PCR products were purified and sequenced by GATC Biotech SARL (Konstanz, Germany). Allelic profiles and corresponding sequence types (STs) were assigned with BioNumerics software (Version 7.6, Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). The sequences of all new alleles and the new STs identified were entered into the international MLST database (<http://bigsdw.web.pasteur.fr/staphlugdunensis/>). STs were clustered into clonal complexes (CCs) when they shared at least five identical alleles (single [SLV] or double locus variants [DLV]) with another member of the group, by using the eBURST V3 program (<http://eburst.mlst.net>).

**MultiVirulence-Locus Sequence Typing (MVLST).** MVLST genotyping was based on the sequence determination of the intragenic regions of three virulence-associated loci, *atlLR3*, *isdJ*, and SLUG\_16930 as previously described<sup>17</sup>, except that the PCR products were purified and sequenced by GATC Biotech SARL (Konstanz, Germany). Sequences of the three loci were analyzed using BioNumerics software (Version 7.6, Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) to determine allelic profiles and trilocus virulence type (VT<sup>T</sup>).

**Multiple-Locus VNTR Analysis (MLVA) assay development.** The genome sequences of *S. lugdunensis* isolates N920143<sup>28</sup> and HKU09-01<sup>37</sup> were screened *in silico* for the presence of tandem repeats (TRs) by using Tandem Repeats Finder software, version 4.07b<sup>38</sup>. Primers flanking 28 potential VNTR loci were designed using the OLIGO Primer Design software (Molecular Biology Insights, USA); their specificity was evaluated by Blastn. Primers were tested on the panel of 30 genetically diverse *S. lugdunensis* isolates to assess amplification ability, repeatability and the level of polymorphism of these loci. A VNTR was validated as a good candidate for MLVA typing if the locus (i) was present in all isolates, (ii) exhibited a minimum size of 18 bp for an individual TR, and (iii) required a single primer pair for amplification and sequencing of the internal fragment. Of the 28 VNTRs tested, seven fulfilled the above mentioned criteria, and were named SLU (for *S. lugdunensis*) followed by a number.

The primers used for VNTR amplification and sequencing are presented in Table 1. VNTR loci were amplified in simplex PCRs using the following steps: denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 min, followed by 35 cycles of amplification including denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 30 s, annealing at a temperature depending on the primer pair for 30 s, and extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 30 s. A final extension step was performed at  $72^{\circ}\text{C}$  for 5 min. All PCR products were visualized using gel-electrophoresis, purified, and sequenced by GATC Biotech SARL (Konstanz, Germany).

The number of TRs of each VNTR was determined with BioNumerics software (Version 7.6, Applied Maths, Saint-Martens-Latem, Belgium) by using the "polymorphic VNTR typing" plugin. To check that the entire repeat array had been sequenced, the flanking sequences (start and stop pattern) were spotted but were not included as typing information. For incomplete repeats, the TR copy number was rounded down to the nearest complete copy number, in accordance with the guidelines published by Nadon *et al.*<sup>39</sup>. The numbers of TRs at each locus were combined and listed in the order SLU1-SLU2-SLU3-SLU4-SLU5-SLU6-SLU7 e.g. 1-2-10-4-3-2-2. Each unique combination was converted into a distinct MLVA type (MT).



**Tandem Repeat Sequence Typing (TRST) of VNTR loci.** Sequences of TR were determined for each VNTR, and each unique repeat sequence was identified by the name of the VNTR in lower case, followed by a number (Table S2); for example repeat sequence slu1\_01 (Fig. S1). Each unique combination of TR sequences defined an allele (Table S3). Each allele was named by a number, corresponding to the number of TRs, followed by a lowercase letter, corresponding to the combination of the different TR sequences of the VNTR, e.g. SLU1\_2a (slu1\_00-slu1\_01) (for ease of viewing, the allele does not include the lowercase “vntr” for each repeat; e.g. 00–01) (Fig. S1). The assignment of VNTR alleles was performed with BioNumerics software (Version 7.6, Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium), based on the successive occurrence of user-defined TR sequences. Each unique combination of alleles defined an allelic profile (with VNTRs listed in the same order as MLVA profiles), converted into a distinct TRST type (TRT).

**Data analysis.** All typing data were uploaded into the BioNumerics software (Version 7.6, Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) and clustered using the appropriate settings. Two different techniques were used to represent the relationships between isolates. A dendrogram was generated based on the categorical coefficient provided by the BioNumerics software and the algorithm of unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA). Cutoff values of 67% and 91% similarity were applied to define respectively MLVA and TRST clusters. Minimum spanning trees were constructed using the categorical coefficient and the priority rule to first link types that have the highest number of single locus variants. MTs were grouped into MLVA complexes (MCs) if they differed by no more than a single VNTR. To generate a minimum spanning tree based on TRST data, a composite dataset was constructed using BioNumerics software, based on a multiple alignment of each VNTR allele.

The discriminatory ability as well as the congruence of the results obtained by using the different typing methods and/or their combination were evaluated. To this aim, both the Simpson's diversity index (DI)<sup>40</sup> and adjusted Wallace coefficients (AW)<sup>41</sup> (plus confidence intervals (CI) as described by Grundmann *et al.*<sup>42</sup>) were calculated by resorting to the online tool at <http://www.comparingpartitions.info/?link=Tool>.

The standardized index of association ( $I_A^S$ ) between alleles was calculated to test for linkage disequilibrium between alleles of MLVA and TRST using the LIAN Linkage Analysis 3.7 online tool (<http://guanine.evolbio.mpg.de>) as described by Haubold and Hudson<sup>43</sup>. The null hypothesis of linkage equilibrium,  $I_A^S = 0$ , was tested with 100000 Monte Carlo simulations.

**Test of VNTR stability.** Since VNTR regions are considered to be one of the fastest evolving sequences of a genome, it was important to test the stability of the selected VNTR regions. To determine this stability, two isolates were subcultured on tryptic soy agar for 30 consecutive days by streaking a single colony from each strain on agar plates. The original culture, subculture numbers 10, 20 and 30 were used for DNA extraction and the total DNA was subjected to the MLVA and TRST assays.

## References

- Bieber, L. & Kahlmeter, G. *Staphylococcus lugdunensis* in several niches of the normal skin flora. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**, 385–388 (2010).
- van der Mee-Marquet, N. *et al.* *Staphylococcus lugdunensis* infections: high frequency of inguinal area carriage. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 1404–1409 (2003).
- Frank, K. L., del Pozo, J. L. & Patel, R. From clinical microbiology to infection pathogenesis: how daring to be different works for *Staphylococcus lugdunensis*. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 111–133 (2008).
- Yeh, C.-F. *et al.* Clinical features, outcomes, and molecular characteristics of community- and health care-associated *Staphylococcus lugdunensis* infections. *J. Clin. Microbiol.* **54**, 2051–2057 (2016).
- Bocher, S., Tønning, B., Skov, R. L. & Prag, J. *Staphylococcus lugdunensis*, a common cause of skin and soft tissue infections in the community. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 946–950 (2009).
- Heldt Manica, L. A. & Cohen, P. R. *Staphylococcus lugdunensis* infections of the skin and soft tissue: a case series and review. *Dermatol. Ther.* **7**, 555–562 (2017).
- Shah, N. B. *et al.* Laboratory and clinical characteristics of *Staphylococcus lugdunensis* prosthetic joint infections. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 1600–1603 (2010).
- Argemi, X. *et al.* *Staphylococcus lugdunensis* small colony variant conversion resulting in chronic prosthetic joint infection. *Médecine Mal. Infect.* **47**, 498–501 (2017).
- Liu, P.-Y. *et al.* *Staphylococcus lugdunensis* infective endocarditis: a literature review and analysis of risk factors. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **43**, 478–484 (2010).
- Kyaw, H., Shaikh, A. Z., Yaratha, G. & Deepika, M. Septic embolic stroke resulting from *Staphylococcus lugdunensis* endocarditis. *Ochsner J.* **17**, 184–188 (2017).
- Mitchell, J. Characterization of the fibrinogen-binding surface protein Fbl of *Staphylococcus lugdunensis*. *Microbiology* **150**, 3831–3841 (2004).
- Nilsson, M. *et al.* A von Willebrand factor-binding protein from *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **234**, 155–161 (2004).
- Donvito, B. *et al.* Synergistic hemolytic activity of *Staphylococcus lugdunensis* is mediated by three peptides encoded by a non-agricultural locus. *Infect. Immun.* **65**, 95–100 (1997).
- Argemi, X. *et al.* VISLISI trial, a prospective clinical study allowing identification of a new metalloprotease and putative virulence factor from *Staphylococcus lugdunensis*. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **23**, 334.e1–334.e8 (2017).
- Yeh, C.-F. *et al.* Molecular characteristics of disease-causing and commensal *Staphylococcus lugdunensis* Isolates from 2003 to 2013 at a tertiary hospital in Taiwan. *PLOS ONE* **10**, e0134859 (2015).
- Chassain, B. *et al.* Multilocus sequence typing analysis of *Staphylococcus lugdunensis* implies a clonal population structure. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 3003–3009 (2012).
- Didi, J., Lemee, L., Gibert, L., Pons, J.-L. & Pestel-Caron, M. Multi-virulence-locus sequence typing of *Staphylococcus lugdunensis* generates results consistent with a clonal population structure and is reliable for epidemiological typing. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 3624–3632 (2014).
- García-Yoldi, D. *et al.* Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with other PCR-based methods for typing *Brucella suis* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 4070–4072 (2007).
- Visca, P. *et al.* Investigation of the population structure of *Legionella pneumophila* by analysis of tandem repeat copy number and internal sequence variation. *Microbiology* **157**, 2582–2594 (2011).

20. Schouls, L. M. *et al.* Multiple-locus variable number tandem repeat analysis of *Staphylococcus aureus*: comparison with pulsed-field gel electrophoresis and spa-typing. *PLoS ONE* **4**, e5082 (2009).
21. Johansson, A., Koskiniemi, S., Gottfridsson, P., Wistrom, J. & Monsen, T. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for typing of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 260–265 (2006).
22. Haguenoer, E. *et al.* A multi locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) scheme for *Streptococcus agalactiae* genotyping. *BMC Microbiol.* **11**, 171 (2011).
23. Chenal-Francisque, V. *et al.* Optimized multilocus variable-number tandem-repeat analysis assay and its complementarity with pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing for *Listeria monocytogenes* clone identification and surveillance. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 1868–1880 (2013).
24. Melles, D. C. *et al.* High-throughput typing of *Staphylococcus aureus* by amplified fragment length polymorphism (AFLP) or multi-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) reveals consistent strain relatedness. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **28**, 39–45 (2009).
25. Brevik, Ø. J., Ottem, K. F. & Nylund, A. Multiple-locus, variable number of tandem repeat analysis (MLVA) of the fish-pathogen *Francisella noatunensis*. *BMC Vet. Res.* **7**, 5 (2011).
26. van Belkum, A. *et al.* Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**(Suppl 3), 1–46 (2007).
27. Argemi, X., Hansmann, Y., Riegel, P. & Prévost, G. Is *Staphylococcus lugdunensis* significant in clinical samples? *J. Clin. Microbiol.* **55**, 3167–3174 (2017).
28. Heilbronner, S. *et al.* Genome sequence of *Staphylococcus lugdunensis* N920143 allows identification of putative colonization and virulence factors: *Staphylococcus lugdunensis* genome sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* **322**, 60–67 (2011).
29. Sabat, A. *et al.* Distribution of the serine-aspartate repeat protein-encoding *sdr* genes among nasal-carriage and invasive *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 1135–1138 (2006).
30. Estoup, A., Jarne, P. & Cornuet, J.-M. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Mol. Ecol.* **11**, 1591–1604 (2002).
31. Reyes, J. F., Chan, C. H. S. & Tanaka, M. M. Impact of homoplasy on variable numbers of tandem repeats and spoligotypes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* **12**, 811–818 (2012).
32. Pearson, T. *et al.* Phylogenetic discovery bias in *Bacillus anthracis* using single-nucleotide polymorphisms from whole-genome sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 13536–13541 (2004).
33. Sabat, A. J. *et al.* Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Eurosurveillance* **18**, 20380 (2013).
34. Turner, K. M. E. & Feil, E. J. The secret life of the multilocus sequence type. *Int. J. Antimicrob. Agents* **29**, 129–135 (2007).
35. Cheng, C. *et al.* Persistence of a major endemic clone of oxacillin-resistant *Staphylococcus lugdunensis* sequence type 6 at a tertiary medical centre in northern Taiwan. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* **36**, 72–77 (2015).
36. Kassem, I. I., Esseili, M. A. & Sigler, V. Detection and differentiation of staphylococcal contamination of clinical surfaces using denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Hosp. Infect.* **78**, 187–193 (2011).
37. Tse, H. *et al.* Complete genome sequence of *Staphylococcus lugdunensis* strain HKU09-01. *J. Bacteriol.* **192**, 1471–1472 (2010).
38. Benson, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **27**, 573–580 (1999).
39. Nadon, C. A. *et al.* Development and application of MLVA methods as a tool for inter-laboratory surveillance. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* **18**, 20565 (2013).
40. Hunter, P. R. & Gaston, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 2465–2466 (1988).
41. Severiano, A., Pinto, F. R., Ramirez, M. & Carriço, J. A. Adjusted Wallace coefficient as a measure of congruence between typing methods. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 3997–4000 (2011).
42. Grundmann, H., Hori, S. & Tanner, G. Determining confidence intervals when measuring genetic diversity and the discriminatory abilities of typing methods for microorganisms. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 4190–4192 (2001).
43. Haubold, B. & Hudson, R. R. LIAN 3.0: detecting linkage disequilibrium in multilocus data. *Linkage Analysis. Bioinforma. Oxf. Engl.* **16**, 847–848 (2000).

## Acknowledgements

This study was supported by an educational grant for Jérémie Lebeurre from the Charles Nicolle Foundation. The authors would like to thank Estelle Bilak-Jumas and Simon Le Hello for helpful discussion. The authors are grateful to Nikki Sabourin-Gibbs, Rouen University Hospital, for her help in editing the manuscript.

## Author Contributions

S.D., J.L., X.A. and M.P.C. designed the study. X.A. and G.P. provided the VISLISI clinical isolates. S.D. and J.L. performed all manipulations and analyzed the data. S.D., J.L. and M.P.C. wrote the manuscript. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

## Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30144-y>.

**Competing Interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

## Supplementary Information

### Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) and Tandem Repeat Sequence Typing (TRST), helpful tools for subtyping *Staphylococcus lugdunensis*

Sandrine Dahyot, Jérémie Lebeurre, Xavier Argemi, Patrice François, Ludovic Lemée, Gilles Prévost, Martine Pestel-Caron.

**Supplementary Table S1. 128 *S. lugdunensis* isolates included in this study.**

Isolate ID	City	Clinical sources	MLST		MVLST	MLVA			TRST	
			Sequence type (ST)	Clonal Complex (CC)	Trilocus Virulence type (VT <sup>T</sup> )	MLVA type (MT)	MLVA complexe (MC)	MLVA cluster (67%)	TRST type (TRT)	TRST cluster (91%)
SL_V01	Strasbourg	Deep infection	5	5	23	7	5	IV	10	IV
SL_V02	Strasbourg	Osteoarticular on material	1	1	1	17	3	V	41	VII
SL_V03	Strasbourg	Skin and soft tissue	3	3	16	1	2	I	1	I
SL_V04	Strasbourg	Material device	3	3	16	1	2	I	1	I
SL_V05	Strasbourg	Deep infection	1	1	1	42	3	V	40	VII
SL_V06	Strasbourg	Deep infection	2	2	15	2	2	I	2	I
SL_V07	Strasbourg	Deep infection	6	1	1	12	1	II	8	V
SL_V08	Strasbourg	Skin and soft tissue	15	1	1	6	1	II	47	II
SL_V09	Strasbourg	Skin and soft tissue	6	1	1	12	1	II	8	V
SL_V10	Strasbourg	Material device	3	3	16	1	2	I	1	I

<b>SL_V11</b>	Strasbourg	Skin and soft tissue	5	5	23	8	5	IV	7	IV
<b>SL_V12</b>	Strasbourg	Skin and soft tissue	5	5	23	8	5	IV	7	IV
<b>SL_V13</b>	Strasbourg	Osteoarticular on material	12	1	1	4	1	II	3	II
<b>SL_V14</b>	Strasbourg	Catheter related bacteremia	24	6	13	32	4	III	22	III
<b>SL_V15</b>	Strasbourg	Osteoarticular on material	2	2	15	2	2	I	16	I
<b>SL_V16</b>	Strasbourg	Skin and soft tissue	12	1	1	44	1	II	45	II
<b>SL_V17</b>	Strasbourg	Osteoarticular	6	1	1	29	1	II	21	II
<b>SL_V18</b>	Strasbourg	Deep infection	24	6	13	3	4	III	4	III
<b>SL_V19</b>	Strasbourg	Osteoarticular on material	2	2	15	2	2	I	2	I
<b>SL_V20</b>	Strasbourg	Skin and soft tissue	24	6	34	27			30	III
<b>SL_V21</b>	Strasbourg	Catheter related bacteremia	3	3	16	1	2	I	1	I
<b>SL_V22</b>	Strasbourg	Endocarditis	24	6	13	9	4	III	24	III
<b>SL_V23</b>	Strasbourg	Osteoarticular on material	24	6	13	28	4	III	26	
<b>SL_V24</b>	Strasbourg	Osteoarticular on material	12	1	1	6	1	II	46	II
<b>SL_V25</b>	Strasbourg	Osteoarticular on material	5	5	23	20	5	IV	12	IV
<b>SL_V26</b>	Strasbourg	Skin and soft tissue	3	3	16	22	2	I	13	I
<b>SL_V27</b>	Strasbourg	Osteoarticular on material	12	1	1	35	1	II	33	II
<b>SL_V28</b>	Strasbourg	Material device	24	6	13	3	4	III	5	III
<b>SL_V29</b>	Strasbourg	Urinary	24	6	13	3	4	III	5	III
<b>SL_V30</b>	Strasbourg	Catheter related bacteremia	31	5	23	19		IV	25	
<b>SL_V31</b>	Strasbourg	Urinary	3	3	16	1	2	I	1	I

<b>SL_V32</b>	Strasbourg	Skin and soft tissue	6	1	1	4	1	II	3	II
<b>SL_V33</b>	Strasbourg	Deep infection	6	1	1	39	1	II	28	V
<b>SL_V34</b>	Strasbourg	Skin and soft tissue	4	4	29	36	6	VI	48	VI
<b>SL_V35</b>	Strasbourg	Catheter related bacteremia	1	1	1	40			42	
<b>SL_V36</b>	Strasbourg	Osteoarticular	12	1	1	4	1	II	3	II
<b>SL_V37</b>	Strasbourg	Endocarditis	1	1	1	30	3	V	18	VIII
<b>SL_V38</b>	Strasbourg	Osteoarticular on material	6	1	1	33	1	II	20	V
<b>SL_V39</b>	Strasbourg	Skin and soft tissue	24	6	13	3	4	III	5	III
<b>SL_V40</b>	Strasbourg	Osteoarticular on material	1	1	1	41	3	V	43	VII
<b>SL_V41</b>	Strasbourg	Skin and soft tissue	3	3	16	1	2	I	1	I
<b>SL_V42</b>	Strasbourg	Urinary	24	6	13	3	4	III	4	III
<b>SL_V43</b>	Strasbourg	Osteoarticular	24	6	13	3	4	III	4	III
<b>SL_V44</b>	Strasbourg	Osteoarticular	6	1	1	4	1	II	3	II
<b>SL_V45</b>	Strasbourg	Osteoarticular	24	6	13	3	4	III	4	III
<b>SL_V46</b>	Strasbourg	Deep infection	24	6	37	9	4	III	27	III
<b>SL_V47</b>	Strasbourg	Osteoarticular	3	3	16	1	2	I	1	I
<b>SL_V48</b>	Strasbourg	Deep infection	4	4	29	37	6	VI	49	VI
<b>SL_V49</b>	Strasbourg	Osteoarticular	2	2	15	2	2	I	2	I
<b>SL_V50</b>	Strasbourg	Osteoarticular on material	3	3	16	1	2	I	1	I
<b>SL_V51</b>	Strasbourg	Osteoarticular	6	1	1	10	1	II	35	II
<b>SL_V52</b>	Strasbourg	Osteoarticular on material	1	1	1	31	3	V	19	VIII
<b>SL_V53</b>	Strasbourg	Osteoarticular	2	2	15	2	2	I	2	I
<b>SL_V54</b>	Strasbourg	Osteoarticular	5	5	23	18	5	IV	23	
<b>SL_V55</b>	Strasbourg	Osteoarticular	31	5	23	7	5	IV	11	IV
<b>SL_V56</b>	Strasbourg	Material device	3	3	16	2	2	I	17	I

<b>SL_V57</b>	Strasbourg	Deep infection	1	1	1	6	1	II	44	II
<b>SL_V58</b>	Strasbourg	Catheter related bacteremia	4	4	29	14	6	VI	50	VI
<b>SL_V59</b>	Strasbourg	Osteoarticular on material	3	3	16	1	2	I	1	I
<b>SL_V60</b>	Strasbourg	Skin and soft tissue	2	2	15	2	2	I	2	I
<b>SL_V61</b>	Strasbourg	Osteoarticular on material	3	3	16	1	2	I	1	I
<b>SL_V62</b>	Strasbourg	Skin and soft tissue	15	1	1	5	1	II	36	II
<b>SL_V63</b>	Strasbourg	Deep infection	2	2	15	2	2	I	2	I
<b>SL_V64</b>	Strasbourg	Skin and soft tissue	6	1	1	34	1	II	32	II
<b>SL_V65</b>	Strasbourg	Osteoarticular	28		36	26	2	VIII	15	IX
<b>SL_V66</b>	Strasbourg	Osteoarticular on material	12	1	1	4	1	II	3	II
<b>SL_V67</b>	Strasbourg	Skin and soft tissue	3	3	16	1	2	I	1	I
<b>SL_V68</b>	Strasbourg	Deep infection	2	2	15	2	2	I	2	I
<b>SL_V69</b>	Strasbourg	Urinary	28		36	23	2	VIII	14	IX
<b>SL_V70</b>	Strasbourg	Skin and soft tissue	27	7	35	13		VII	9	
<b>SL_V71</b>	Strasbourg	Skin and soft tissue	2	2	15	2	2	I	2	I
<b>SL_V72</b>	Strasbourg	Skin and soft tissue	3	3	16	1	2	I	1	I
<b>SL_V73</b>	Strasbourg	Urinary	5	5	23	21	5	IV	38	IV
<b>SL_V74</b>	Strasbourg	Bacteremia	2	2	15	24	2	I	51	I
<b>SL_V75</b>	Strasbourg	Skin and soft tissue	2	2	15	2	2	I	2	I
<b>SL_V76</b>	Strasbourg	Deep infection	3	3	16	1	2	I	1	I
<b>SL_V77</b>	Strasbourg	Catheter related bacteremia	26	7	38	38			39	
<b>SL_V78</b>	Strasbourg	Skin and soft tissue	3	3	16	1	2	I	1	I
<b>SL_V79</b>	Strasbourg	Deep infection	6	1	1	11	1	II	31	V
<b>SL_V80</b>	Strasbourg	Osteoarticular on material	6	1	1	5	1	II	6	II

<b>SL_V81</b>	Strasbourg	Skin and soft tissue	6	1	1	5	1	II	6	II
<b>SL_V82</b>	Strasbourg	Skin and soft tissue	1	1	1	10	1	II	34	II
<b>SL_C01</b>	Strasbourg	Carriage	3	3	16	1	2	I	1	I
<b>SL_C02</b>	Strasbourg	Carriage	6	1	1	11	1	II	29	V
<b>SL_C03</b>	Strasbourg	Carriage	3	3	16	1	2	I	1	I
<b>SL_C04</b>	Strasbourg	Carriage	3	3	16	1	2	I	1	I
<b>SL_C05</b>	Strasbourg	Carriage	3	3	14	1	2	I	1	I
<b>SL_C06</b>	Strasbourg	Carriage	3	3	16	25	2	I	37	I
<b>SL_C07</b>	Strasbourg	Carriage	26	7	38	43	2	VIII	52	
<b>SL_C08</b>	Strasbourg	Carriage	3	3	16	1	2	I	1	I
<b>SL_C09</b>	Strasbourg	Carriage	12	1	1	4	1	II	3	II
<b>SL_C10</b>	Strasbourg	Carriage	6	1	1	5	1	II	6	II
<b>SL_C11</b>	Strasbourg	Carriage	2	2	15	2	2	I	2	I
<b>SL_C12</b>	Strasbourg	Carriage	27	7	35	13		VII	9	
<b>SL_C13</b>	Strasbourg	Carriage	3	3	16	1	2	I	1	I
<b>SL_C14</b>	Strasbourg	Carriage	3	3	16	1	2	I	1	I
<b>SL_C15</b>	Strasbourg	Carriage	3	3	16	1	2	I	1	I
<b>SL_C16</b>	Strasbourg	Carriage	3	3	16	1	2	I	1	I
<b>SL_T01</b>	Rouen	Osteoarticular	13		27	49			60	
<b>SL_T02</b>	Kronoberg	Carriage	1	1	1	52	3	V	61	VIII
<b>SL_T03</b>	Rouen	Endocarditis	8	2	9	2	2	I	58	I
<b>SL_T04</b>	Rouen	Deep infection	10	6	13	53	4	III	62	III
<b>SL_T05</b>	Rouen	Osteoarticular on material	4	4	28	14	6	VI	67	VI
<b>SL_T06</b>	Rouen	Bacteremia	9	4	11	55		VII	68	
<b>SL_T07</b>	Rouen	Catheter related bacteremia	16	3	16	50			59	I
<b>SL_T08</b>	Nantes	Material device	3	3	16	1	2	I	1	I
<b>SL_T09</b>	Nantes	Osteoarticular	14	2	15	2	2	I	2	I

<b>SL_T10</b>	Nantes	Skin and soft tissue	6	1	2	15	1	II	64	II
<b>SL_T11</b>	Bordeaux	Bacteremia	17	4	29	51	6	VI	66	VI
<b>SL_T12</b>	Bordeaux	Bacteremia	18	5	24	7	5	IV	10	IV
<b>SL_T13</b>	Bordeaux	Bacteremia	7	1	4	54			65	
<b>SL_T14</b>	Nancy	Bacteremia	19	2	17	47	2	I	56	I
<b>SL_T15</b>	Nancy	Skin and soft tissue	12	1	5	4	1	II	3	II
<b>SL_T16</b>	Nancy	Osteoarticular	20	3	16	48	2	I	57	I
<b>SL_T17</b>	Montpellier	Deep infection	15	1	2	15	1	II	69	II
<b>SL_T18</b>	Montpellier	Osteoarticular on material	2	2	17	2	2	I	2	I
<b>SL_T19</b>	Rouen	Bacteremia	5	5	23	46			53	
<b>SL_AP1</b>	Rouen	Osteoarticular	3	3	16	1	2	I	1	I
<b>SL_AP2</b>	Rouen	Osteoarticular	3	3	16	1	2	I	1	I
<b>SL_CB1</b>	Rouen	Bacteremia	15	1	1	16	1	II	55	II
<b>SL_CB2</b>	Rouen	Bacteremia	15	1	1	16	1	II	55	II
<b>SL_CJ1</b>	Rouen	Deep infection	24	6	13	3	4	III	63	III
<b>SL_CJ2</b>	Rouen	Bacteremia	24	6	13	3	4	III	63	III
<b>SL_DJ1</b>	Rouen	Endocarditis	32	2	15	2	2	I	2	I
<b>SL_DJ2</b>	Rouen	Endocarditis	32	2	15	2	2	I	2	I
<b>SL_DSM</b>		Skin and soft tissue	24	6	13	45	2	I	54	
<b>SL_LJ1</b>	Rouen	Deep infection	2	2	15	2	2	I	2	I
<b>SL_LJ2</b>	Rouen	Deep infection	2	2	15	2	2	I	2	I



**Supplementary Table S2. Individual TR sequences identified from 128 *S. lugdunensis* isolates used in the study.**

SLU1	TR sequences
>slu1_01	GGGGCCCCAACAAAGAGAAATGCGAAAAGCATTTACCAAGCAAAGCAAGTTGGGGT
>slu1_02	GGGGCCCCAACAAAGAGAAATGCGAAAAGCATTTGCCAAGCAAAGCAAGTTGGGGT
>slu1_03	GGGGCCCCAACAAAGAGAAATGCGAAAAACATTTACCAAGCAAAGCAAGTTGGGGT

SLU2	TR sequences
>slu2_00	GGGGCCCCAGCACAGAGAAATGCAACAAACATTTCTACGTGCAACGCAAGCTGGGGTG
>slu2_01	GGGGCCTCAGCACAGAGAAATGCACCAAGCATTTCTACGGACAACGCAAGCTGGGGTG
>slu2_02	GGGGCCTCAGCACAAAGAAATGCACCAAGCATTTCTACGGACAATGCAAGCTGGGGTG
>slu2_03	GGGGCCCCAGCACAAAGAAATGCACCAAGCATTTCTACGTGCAACGCAAGCTGGGGTG
>slu2_04	GGGGCCCCAGCACAAAGAAATGCACCAAGCATTTCTACGTGCAACGCAAGCTGGGGTG
>slu2_05	GGGGCCTCAGCACAGAGAAATGCAACAAACATTTCTACGTGCAACGCAAGCTGGGGTG
>slu2_06	GGGGCCTCAGCACAGAGAAATGCACCAAGCATTTCTACGGACAACGCAAGCTGGGGTG
>slu2_07	GGGGCCTAAGCACAGAGAAATGCACCAAGCATTTCTACGGACAACGCAAGCTGGGGTG
>slu2_08	GGGGCCCCAGCACAGAGAAATGCACCAAGCATTTCTACGGACAACGCAAGCTGGGGTG
>slu2_09	GGGGCCCCAGCACAAAGAAATGCGACAAACATTTCTACGGACAACGCAAGCTGGGGTG
>slu2_10	GGGGCCTCAGCACAGAGAAATGCAACAAACATTTCTACAGACAACGCAAGCTGGGGTG
>slu2_11	GGGGCCCCAGCACGTAGAAATGCACCAAGCATTTCTACGTGCAACGCAAGCTGGGGTG
>slu2_12	GGGGCCCCAGCACAAAGAAATGCACCAAGCATTTCTACGGACAACGCAAGCTGGGGTG
>slu2_13	GGGGCCCCAGCACAGAGAAATGCACCAAGCATTTCTACGGACAACGCAAGCTGGGGTG
>slu2_14	GGGGCCCCAGCACAGAGAAATGCAACAAACATTTCTACGTGCAACGCAAGCTGGGGT

SLU3	TR sequences
>slu3_00	ACAATGAAGGCAAAGACAACAGACCAAATAAGCCATCGGATGGTACGG
>slu3_01	ACAATGAAGGCAAAGACAACAAGCCAAACAAGCCATCAGATGGTACAG
>slu3_02	ATAACGGAGGCAAAGATAACAAGCCAAACAACCATCAGATGGCACGG
>slu3_03	ATAACGGAGGCAAAGATAACAGGCCAAACAACCATCAGATGGCACGG
>slu3_04	ATAACGGAGGCAAAGATAACAGGCCAAACAACCATCGGATGGTACGG
>slu3_05	ATAACGGAGGCAAAGATAACAGGCCAAACAACCATCGAATGGTACGG
>slu3_06	ATAACGGAGGCAAAGATAACAGGCCAAACAACCATCAGATGGCATGG
>slu3_07	ATAACGTAGGCAAAGATAACAAGCCAAACAACCATCAGATGGCACGG
>slu3_08	ACAATGAAGGCAAAGATAACAAGCCAAACAACCATCGGATGGCACGG
>slu3_09	ACCATGGAGGTAAAGATAACAAGCCAAACAACCATCAGATGGCACGG
>slu3_10	ACCATGGAGGCAAAGACAACAGACCAAATAAGCCATCGGATGGTACGG
>slu3_11	ACCACGGAGGCAAAGATAACAAGCCAAACAACCATCGGATGGCACAG
>slu3_12	ACCACGGAGGCAAAGATAACAAGCCAAACAACCATCAGATGGTACGG
>slu3_13	ACCATGGAGGTAAAGACAACAAGCCA
>slu3_14	ATAACGGAGGCAAAGACAACAAGCCAAACAAGCCATCGGATGGTACGG
>slu3_15	ATAACGGAGGCAAAGATAACAAGCCAAACAACCATCAGATGGTACGG
>slu3_16	ATAATGGAGGCAAAGATAACAACAACCAAACAAGCCATCGGATGGCACGG
>slu3_17	ATAACGGAGGCAAAGATAACAGGCCAAACAACCATCGGATGGTACGA

>slu3_18	ATAACGGAGGCAAAGATAACAAGCCAAACAAGCCATCGGATGGTACGG
>slu3_19	ATAACGGAGGCAAAGATAACAAGCCAAACAACCATCGGATGGTACGG
>slu3_20	ATAACGGAGGTAAAGATAACAAGCCA
>slu3_21	ACCATGGAGGTAAAGATAACAAGCCAAACAAGCCATCAGATGGCACGG
>slu3_22	ATCATGGAGGTAAAGACAACAAGCCA
>slu3_23	ACAATGAAGGCAAAGACAACAAGCCAAACAAGCCATCAGATGGTACGG
>slu3_24	ATAATGGAGGCAAAGATAACAACCAACAAGCCATCGGATGGTACGG
>slu3_25	ACAATGAAGGCAAAGACAACAAGCCAAACAAGCCATCGGATGGTACGG
>slu3_26	ATAACGGAGGCAAAGATAACAACCAACAACCATCAGATGGTACGG
>slu3_27	ATAACGGAGGCAAAGATAACAAGCCAAACAACCATCTGATGGCACGG
>slu3_28	ACAATGAAGGCAAAGATAACAGGCCAAACAACCATCAGATGGCACGG
>slu3_29	ACAATGAAGGCAAAGATAACAAGCCAAACAAGCCATCGGATGGTACGG
>slu3_30	ATAACGGAGGCAAAGATAACAAGCCAAACAACCATCGGATGGCACGG
>slu3_31	ATAACGGAGGCAAAGACAACAAGCCAAACAACCATCGGATGGCACAG
>slu3_32	ACCATGGAGGCAAAGACAACAAGCCAAACAAGCCATCAGATGGTACAG
>slu3_33	ATAACGGAGGCAAAGATAACAACCAACAAGCCATCGGATGGCACGG
>slu3_34	ATAACGGAGGCAAAGACAACAAGCCAAACAAGCCATCAGATGGTACAG

SLU4	TR sequences
>slu4_00	CACCCCAGCTTGC GTTGTACGTAGAAATGCTTTTCGCATTCTCTTTGCTGGGGCCCC
>slu4_01	CACCCCAGCTTGC GTTGTACGTAGAAAGTCTTATCGTATTCTCGTTGCTTGGCCCT
>slu4_02	CACCCCAGCTTGC GTTGTACGTAGAAAGTCTTATCGTATTCTCTTTGCTTGGCCCT
>slu4_03	CACCCCAGCTTGC GTTGTACGTAGAAATGCTTTTCGCATTCTCTTTGCTTGGCCCT
>slu4_04	CATCCCAGCTTGC TTTGT
>slu4_05	CACCCCAGCTTGC TTTGT
>slu4_06	CACCCCAGCTTGC GTTGT
>slu4_07	CACCCCAGCTTGC GTTGTACGTAGAAATGCTTTTCGTATTCTCTTTGCTTGGCCCT

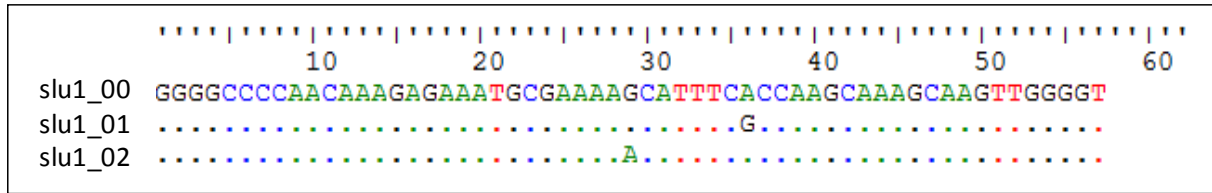
SLU5	TR sequences
>slu5_00	TTCACCAAGCAAAGCAAGTTGGAGTGGGGCCCCAACACAGAGAATTTGAAAAGAAA
>slu5_01	TTCACCAAGCAAAGCAAGTTGGGGTGGGGCCCCAACACAGAGAATTTGAAAAGAAA
>slu5_02	TTCACCAAGCAAAGCAAGTTGGGGTGGGGCCCCAACACAGAGGCTTTGAAAGCGAAA
>slu5_03	TTCACCAAGCAAAGCAAGTTGGGGTGGGGCCCCAACACAGAGGCTTTGAA
>slu5_04	GGCAACGGACAACGCAAGTTGGGGTGAGGCCCAA
>slu5_05	TTCACCAAGCAAAGCAAGTTGGGGTGAGGCCCAA
>slu5_06	TTCACCAAGCAAAGCAAGTTGGGGTGGGGCCCCAACAAAGAGGCTTTGAAAGCGAAA
>slu5_07	TTCACCAAGCAAAGCAAGTTGGGGTGGGGCCCCAACACAGAGAATTTGAAAAGAAA
>slu5_08	GGCAACGGACAACGCAAGTTGGGGTGAGGCCCAA
>slu5_09	GGCAACGGACAACGCAAGTTGGGGTGAGGCTCAA
>slu5_10	TTCACCAAGCAAAGCAAGTTGGAGTGGGGCCCCAACACAGAGGTTTTGAAAGCGAAA
>slu5_11	TTCACCAAGCAAAGCAAGTTGGAGTGGGGCCCCAACACAGAGGCTTTGAAAGCGAAA
>slu5_12	TTCACCAAGCAAAGCAAGTTGGATTGGGGCCCCAACACAGAGAATTTGAAAAGAAA
>slu5_13	TTCACCAAGCAAAGCAAGTTGGATTGGGGCCCCAACACAGAGGCTTTGAAAGCGAAA
>slu5_14	GGCAACGGACAACGCAAGTTGGGGTGGGGCCCCAACACAGAGGCTTTGAAAGCGAAA

SLU6	TR sequences
>slu6_00	CCCACCCCAACTTGCATTGTTTGTGAAATGCTTGGCGCATTCTTTTTGTTGGGGCC
>slu6_01	CCCACCCCAACTTGCATTGTTTGTGAAAGTGCTTGGCGCATTCTTTTTGTTGGGGCC
>slu6_02	CCCACCCCAACTTGCATTGTTTGTGAAAGTGCTTGGCGCATTCTTTTTGTTGGGGCC
>slu6_03	CCCACCCCAACTTGCATTGTTTGTGAAATGCTTGGCGCATTCTTTTTGTTGGGGCCCC
>slu6_04	CCCACCCCAACTTGCATTGTTTGTGAAAGTGCTTGGCGCATTCTTTTTGTTGGGGCC
>slu6_05	CCACCCCAACTTGCATTGTTTGTGAAATGCTTGGCGCATTCTTTTTGTTGGGGCC
>slu6_06	CCCACCCCAACTTGCATTGTTTGTGAAAGTGCTTGGCGCATTCTTTTTGTTGGGGCCCC
>slu6_07	CCACCCCAACTTGCATTGTTTGTGAAATGCTTGGCGCATTCTTTTTGTTGGGGCCCC
>slu6_08	CCCACCCCAACTTGCATTGTTTGTGAAAGTGCTTGGCGCATTCTTTTTGTTGGGGCCCC
>slu6_09	CCACCCCAACTTGCATTGTTTGTGAAATGCTTGGCGCATTCTTTTTGTTGGGGCCCC
>slu6_10	CCCACCCCAACTTGCATTGTTTGTGAAAGTGCTTGGCGCATTCTTTTTGTTGGGGCC
>slu6_11	CCCACCCCAACTTGCATTGTTTGTGAAATGCTTGGCGCATTCTTTTTGTTGGGGCCCC
>slu6_12	ACCCCAACTTGCATTGTTTGTGAAAGTGCTTGGCGCATTCTTTTTGTTGGGGCC
>slu6_13	GCCCCACCCCAACTTGCATTGTTTGTGAAATGCTTGGCGCATTCTTTTTGTTGGGGCCCC

SLU7	TR sequences
>slu7_00	TATTTAAAAATTGGTGGTTCTCTA
>slu7_01	TATTTAAAAAT

**Supplementary Figure S1. Alignment of the three TRs sequences and alleles for SLU1 among study isolates.**

Existing TR sequences for SLU1 (57 bp):



List of alleles for SLU1:

Allele name	Number of TRs	Combination of TR sequences
SLU1_1a	1	slu1_01
SLU1_1b		slu1_00
SLU1_1c		slu1_02
SLU1_2a	2	slu1_00-slu1_01
SLU1_2b		slu1_00-slu1_00
SLU1_3a	3	slu1_00-slu1_00-slu1_01

**Supplementary Table S3. List of TRST alleles identified from 128 *S. lugdunensis* isolates used in the study.**

SLU1	Alleles
SLU1_1a	1
SLU1_1b	0
SLU1_1c	2
SLU1_2a	0-1
SLU1_2b	0-0
SLU1_3a	0-0-1

SLU2	Alleles
SLU2_1a	4
SLU2_1b	8
SLU2_2a	0-1
SLU2_2b	0-6
SLU2_2c	4-1
SLU2_2d	3-9
SLU2_2e	11-1
SLU2_2f	12-13
SLU2_2g	4-7
SLU2_2h	14-0
SLU2_3a	0-1-1
SLU2_3b	0-6-1
SLU2_3c	0-10-2
SLU2_3d	11-1-1
SLU2_3e	14-0-1
SLU2_4a	0-1-1-1
SLU2_4b	0-6-1-1
SLU2_4c	0-5-6-1

SLU3	Alleles
SLU3_3a	0-4-20
SLU3_4a	0-7-9-13
SLU3_4b	0-18-18-20
SLU3_4c	0-15-9-13
SLU3_5a	0-6-1-2-13
SLU3_7a	0-6-1-2-12-9-13
SLU3_8a	0-3-1-2-8-12-9-13
SLU3_8b	0-6-1-2-8-12-9-13
SLU3_8c	0-4-1-15-14-16-21-22
SLU3_9a	25-3-1-2-11-10-26-9-13
SLU3_9b	25-3-1-27-11-10-26-9-13
SLU3_9c	28-29-30-15-31-32-33-21-22

SLU3_9d	0-4-1-34-30-11-10-33-13
SLU3_9e	1-2-8-11-10-2-9-9-13
SLU3_10a	0-4-1-4-1-15-14-16-21-22
SLU3_10b	0-4-1-4-23-14-24-16-21-22
SLU3_10c	0-5-1-2-8-11-10-7-9-13
SLU3_10d	0-4-1-2-8-11-10-7-9-13
SLU3_11a	0-17-18-19-18-19-18-18-18-20
SLU3_11b	0-6-1-2-8-12-9-8-12-9-13
SLU3_11c	0-4-1-2-8-11-10-7-9-9-13
SLU3_11d	0-6-1-2-8-12-9-8-12-21-13

SLU4	Alleles
SLU4_1a	6
SLU4_2a	0-5
SLU4_2b	3-4
SLU4_3a	0-2-4
SLU4_3b	0-1-4
SLU4_3c	0-7-4
SLU4_4a	0-0-1-4
SLU4_4b	0-0-2-4
SLU4_5a	0-0-0-1-4
SLU4_5b	0-0-0-2-4
SLU4_6a	0-0-0-0-2-4

SLU5	Alleles
SLU5_2a	0-3
SLU5_2b	0-5
SLU5_2c	2-4
SLU5_2d	10-4
SLU5_2e	11-4
SLU5_2f	6-8
SLU5_2g	13-4
SLU5_3a	1-2-4
SLU5_3b	0-2-4
SLU5_3c	0-6-4
SLU5_3d	0-6-8
SLU5_3e	0-1-5
SLU5_3f	12-11-4
SLU5_4a	0-1-1-5
SLU5_4b	0-1-2-4
SLU5_4c	0-7-2-4
SLU5_4d	0-1-2-9
SLU5_5a	13-14-14-14-4

SLU6	Alleles
SLU6_1a	13
SLU6_2a	4-11
SLU6_2b	4-3
SLU6_2c	4-7
SLU6_2d	0-8
SLU6_2e	4-9
SLU6_3a	4-0-11
SLU6_3b	4-5-6
SLU6_3c	4-5-7
SLU6_3d	0-1-8
SLU6_3e	4-2-3
SLU6_3f	4-12-11
SLU6_4a	4-2-2-3
SLU6_5a	4-2-2-10-3

SLU7	Alleles
SLU7_2a	0-1
SLU7_3a	0-0-1
SLU7_4a	0-0-0-1

**Supplementary Table S4. MLVA types and TRST types of the 128 *S. lugdunensis* isolates used in the study**

MLVA types

MLVA type (MT)	MLVA complexe (MC)	SLU1	SLU2	SLU3	SLU4	SLU5	SLU6	SLU7
1	2	1	2	10	4	3	2	2
2	2	1	2	10	4	3	3	2
3	4	2	2	10	2	3	4	2
4	1	2	3	8	3	4	2	2
5	1	2	3	8	3	3	2	2
6	1	2	4	8	3	4	2	2
7	5	1	1	11	3	3	2	2
8	5	1	1	11	3	4	2	2
9	4	2	2	10	2	3	2	2
10	1	2	3	8	3	2	2	2
11	1	2	3	11	3	3	2	2
12	1	2	3	11	3	4	2	2
13		3	2	9	2	3	3	2
14	6	2	3	9	1	3	3	2
15	1	2	2	8	3	4	2	2
16	1	1	3	8	3	4	2	2
17	3	2	4	8	4	4	3	3
18	5	1	1	3	3	3	2	2
19		1	1	4	6	3	2	2
20	5	1	1	11	4	3	2	2
21	5	1	1	11	5	3	2	2
22	2	1	2	8	4	3	2	2
23	2	1	2	9	4	2	3	2
24	2	1	2	10	4	2	3	2
25	2	1	2	10	4	3	1	2
26	2	1	3	9	4	2	3	2
27		2	1	11	2	3	4	2
28	4	2	2	4	2	3	5	2
29	1	2	2	8	3	2	2	2
30	3	2	2	8	3	3	3	3
31	3	2	2	8	4	3	3	3
32	4	2	2	10	2	3	3	2
33	1	2	2	11	3	3	2	2
34	1	2	3	5	3	4	2	2
35	1	2	3	7	3	4	2	2
36	6	2	3	9	1	4	2	2
37	6	2	3	9	1	4	3	2



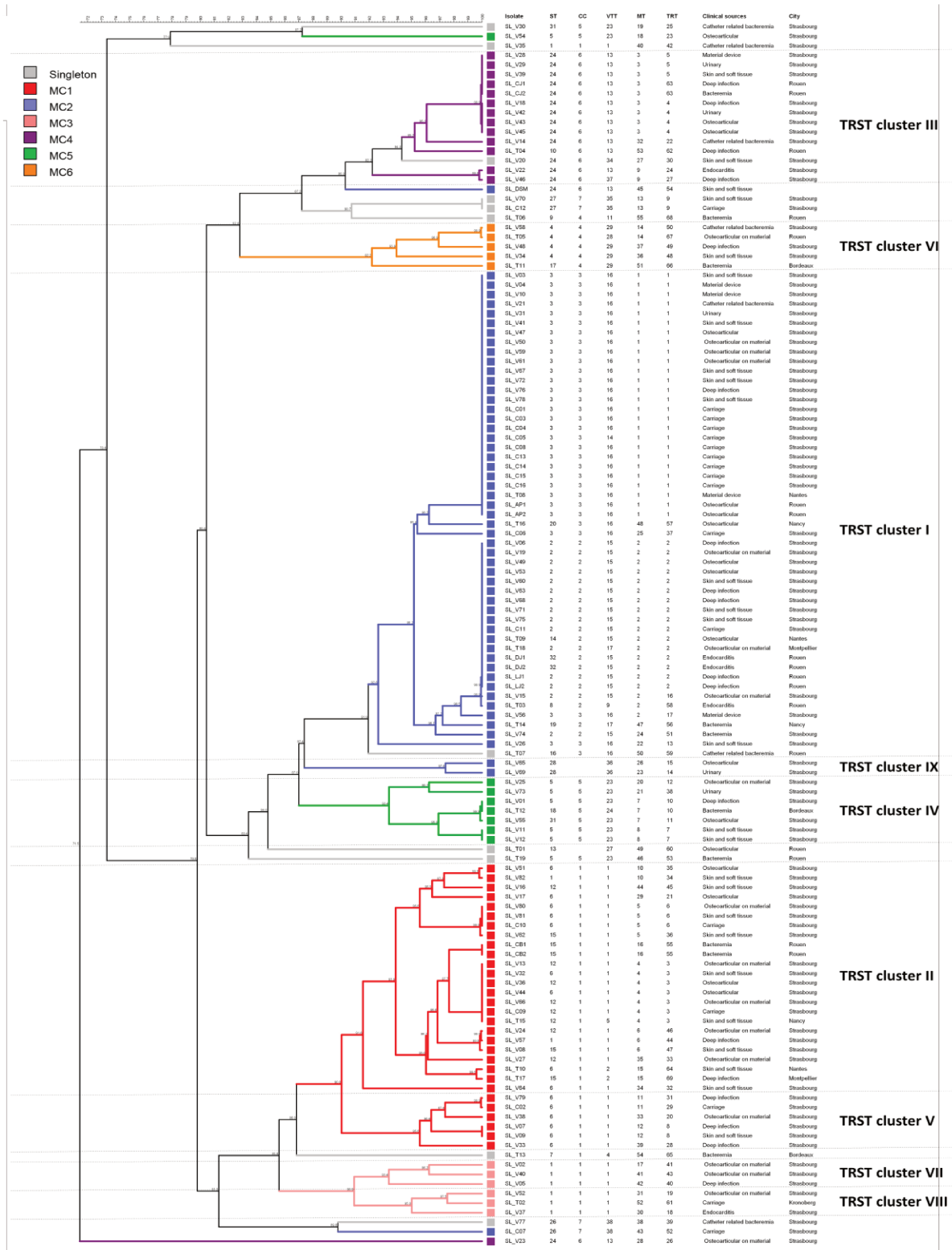
<b>38</b>		2	3	9	4	5	3	2
<b>39</b>	<b>1</b>	2	3	11	3	2	2	2
<b>40</b>		2	4	4	5	4	2	2
<b>41</b>	<b>3</b>	2	4	8	3	4	3	3
<b>42</b>	<b>3</b>	2	4	8	4	2	3	3
<b>43</b>	<b>2</b>	3	3	9	4	2	3	2
<b>44</b>	<b>1</b>	2	4	8	3	2	2	2
<b>45</b>	<b>2</b>	1	2	10	2	2	3	2
<b>46</b>		1	1	9	5	2	2	2
<b>47</b>	<b>2</b>	1	1	10	4	3	3	2
<b>48</b>	<b>2</b>	1	2	10	3	3	2	2
<b>49</b>		1	3	9	3	3	3	2
<b>50</b>		1	3	10	4	2	2	2
<b>51</b>	<b>6</b>	2	1	9	1	3	3	2
<b>52</b>	<b>3</b>	2	2	8	4	4	3	3
<b>53</b>	<b>4</b>	2	2	10	2	3	5	2
<b>54</b>		2	4	7	3	3	1	2
<b>55</b>		3	1	9	2	3	2	2

TRST types

TRST type (TRT)	SLU1	SLU2	SLU3	SLU4	SLU5	SLU6	SLU7
1	1b	2d	10a	4b	3c	2c	2a
2	1b	2d	10b	4b	3d	3b	2a
3	2a	3b	8b	3b	4b	2d	2a
4	2a	2c	10c	2a	3b	4a	2a
5	2a	2c	10d	2a	3b	4a	2a
6	2a	3b	8b	3b	3b	2d	2a
7	1a	1b	11a	3a	4c	2e	2a
8	2a	3b	11b	3b	4b	2d	2a
9	3a	2f	9d	2b	3f	3a	2a
10	1a	1b	11a	3a	3b	2e	2a
11	1a	1b	11a	3c	3b	2e	2a
12	1a	1b	11a	4b	3b	2e	2a
13	1b	2d	8c	4b	3c	2c	2a
14	1b	2h	9c	4a	2e	3b	2a
15	1b	3e	9c	4a	2e	3b	2a
16	1c	2d	10b	4b	3d	3b	2a
17	1b	2d	10a	4b	3c	3c	2a
18	2a	2a	8a	3b	3e	3d	3a
19	2a	2a	8a	4a	3e	3d	3a
20	2a	2b	11b	3b	3e	2d	2a
21	2a	2b	8b	3b	2c	2d	2a
22	2a	2c	10c	2a	3b	3e	2a
23	1a	1b	3a	3a	3b	2e	2a
24	2a	2c	10d	2a	3b	2b	2a
25	1a	1b	4b	6a	3b	2e	2a
26	2a	2c	4a	2a	3b	5a	2a
27	2a	2e	10c	2a	3b	2b	2a
28	2a	3b	11b	3b	2c	2d	2a
29	2a	3b	11b	3b	3e	2d	2a
30	2a	1a	11c	2a	3b	4a	2a
31	2a	3b	11d	3b	3e	2d	2a
32	2a	3b	5a	3b	4b	2d	2a
33	2a	3b	7a	3b	4b	2d	2a
34	2a	3b	8a	3b	2c	2d	2a
35	2a	3b	8b	3b	2d	2d	2a
36	2a	3b	8b	3b	3a	2d	2a
37	1b	2d	10a	4b	3c	1a	2a
38	1a	1b	11a	5b	3b	2e	2a
39	2a	3d	9e	4a	5a	3e	2a
40	2a	4a	8a	4a	2b	3d	3a

<b>41</b>	2a	4a	8a	4a	4a	3d	3a
<b>42</b>	2a	4b	4c	5a	4d	2d	2a
<b>43</b>	2a	4b	8a	3b	4a	3d	3a
<b>44</b>	2a	4b	8a	3b	4b	2d	2a
<b>45</b>	2a	4b	8b	3b	2c	2d	2a
<b>46</b>	2a	4b	8b	3b	4b	2d	2a
<b>47</b>	2a	4c	8b	3b	4b	2d	2a
<b>48</b>	2b	3c	9a	1a	4c	2x	2a
<b>49</b>	2b	3c	9a	1a	4c	3f	2a
<b>50</b>	2b	3c	9b	1a	3b	3f	2a
<b>51</b>	1b	2d	10b	4b	2f	3b	2a
<b>52</b>	3a	3d	9e	4a	2g	3e	2a
<b>53</b>	1a	1b	9g	5c	2e	2e	2c
<b>54</b>	1a	2c	10d	2a	2c	3e	2a
<b>55</b>	1a	3b	8b	3b	4b	2d	2a
<b>56</b>	1b	1c	10b	4b	3d	3b	2a
<b>57</b>	1b	2d	10a	3a	3c	2c	2a
<b>58</b>	1b	2d	10e	4b	3d	3b	2a
<b>59</b>	1b	3b	10a	4b	2h	2c	2a
<b>60</b>	1b	3f	9f	3d	3g	3g	2b
<b>61</b>	2a	2a	8a	4a	4a	3d	3a
<b>62</b>	2a	2c	10d	2a	3b	5b	2a
<b>63</b>	2a	2g	10d	2a	3b	4a	2a
<b>64</b>	2a	2i	8b	3b	4b	2d	2a
<b>65</b>	2a	4b	7b	3b	3b	1b	2a
<b>66</b>	2b	1c	9b	1a	3b	3f	2a
<b>67</b>	2b	3c	9a	1a	3b	3f	2a
<b>68</b>	3a	1d	9h	2c	3b	2f	2a
<b>69</b>	2a	2d	8b	3b	4b	2d	2a

**Supplementary Figure S2. TRST clustering of the 128 isolates of *S. lugdunensis* by the UPGMA method.** The names of isolates, MLST sequence type (ST), MLST clonal complex (CC), MVLST trilocus virulence type (VT<sup>T</sup>), MLVA type (MT), TRST type (TRT), the clinical sources and the city of strains are shown on the right. A cutoff value of 91% similarity was applied to define TRST clusters (named TRST cluster I to IX). The colors used are based on MLVA complexes (MCs).





### **3.2. Publication n°3 : *fbl*-typing, un outil de première ligne pour l'épidémiologie des infections à *S. lugdunensis*, mais non prédictif de la capacité de liaison des souches au fibrinogène**

#### **3.2.1. Introduction**

##### *Contexte et objectifs de l'étude*

Bien que les méthodes MLVA et TRST se soient avérées très discriminantes pour le typage de *S. lugdunensis*, elles présentent l'inconvénient de reposer sur l'analyse de sept *loci* de VNTRs, et donc d'être relativement coûteuses et chronophages. Nous avons alors cherché à développer une méthode de typage alternative à l'approche *multilocus*, basée sur un seul *locus* hautement polymorphe. Cette approche apparaît particulièrement intéressante chez *S. lugdunensis* car, lors de l'analyse d'un *locus* chez une population bactérienne clonale, les inférences phylogénétiques sont rarement erronées du fait de recombinaison homologue (ZaiSS et al., 2009). Ce type d'approche a été appliqué à de nombreuses espèces bactériennes, et notamment à *S. aureus* chez lequel les régions répétées des gènes *spa*, *clfA* ou encore *clfB* ont été utilisées pour développer des méthodes de typage très discriminantes (Koreen et al., 2005; Said et al., 2009; Shopsin et al., 1999).

Au cours de l'analyse *in silico* des génomes de *S. lugdunensis* à la recherche de VNTRs, la région répétée (domaine R) du gène *fbl* est apparue comme un candidat particulièrement intéressant. Le gène *fbl* est en effet prévalent chez *S. lugdunensis*, tandis que la taille de la région R varie selon les souches (Mitchell et al., 2004). Le gène *fbl* code la protéine de liaison au fibrinogène Fbl, étroitement apparentée à la protéine ClfA de *S. aureus*. Cependant, la région R de Fbl, qui comporte un motif hexapeptidique DSDSDA, diffère légèrement de celle de ClfA (répétitions SD uniquement) (Mitchell et al., 2004). La région répétée de ClfA recouvrirait la couche épaisse de peptidoglycane pour présenter le domaine de liaison au fibrinogène à la surface de la cellule. Il a par ailleurs été montré que le nombre de répétitions affecte l'adhésion des souches de *S. aureus* au fibrinogène (Hartford et al., 1997).

Dans ce contexte, les objectifs de notre étude étaient (i) de développer une méthode de typage fondée sur le polymorphisme de la région R du gène *fbl* (*fbl*-typing), (ii) de comparer ses performances avec celles des techniques de MLST et TRST et (iii) de déterminer l'impact potentiel du polymorphisme du gène *fbl* sur la capacité des isolats de *S. lugdunensis* à se lier au fibrinogène *in vitro*.

## Résultats

L'amplification et le séquençage de la région R du gène *fbl* ont été menés pour 240 isolats de *S. lugdunensis* d'origines clinique et géographique différentes. Le premier panel comprenait les 128 isolats de *S. lugdunensis* précédemment typés par MLVA et TRST (Dahyot et al., 2018), le deuxième panel était composé de 106 isolats cliniques (de contextes d'infection ou de colonisation) provenant d'une étude rétrospective menée au CHU de Rouen en 2016. Enfin, six isolats dont le génome était disponible dans notre laboratoire, ont été inclus.

Toutes les répétitions, quelle que soit leur longueur, ont été séquencées par la méthode Sanger et assemblées avec succès par le logiciel BioNumerics® v7.6 (plugin « polymorphic VNTR typing »). Le nombre de répétitions variait entre neuf et 52, et l'analyse des séquences a conduit à l'identification de 54 séquences répétées uniques de 18 pb. Les séquences en acides aminés déduites ont permis d'identifier 13 motifs de six acides aminés, le plus fréquent étant DSDSDA ( $d_N/d_S = 0,045$ ) (Figure 74). L'organisation des répétitions (nombre et ordre) a conduit à l'identification de 92 *fbl-types*, distribués dans 10 *clusters* définis par BioNumerics®. Les deux *clusters* majoritaires, à savoir le *cluster* 1 (57 isolats) et le *cluster* 2 (52 isolats), regroupaient 45% des souches.

Vis-à-vis des 128 isolats typés précédemment par MLST et TRST, la MLST était la technique la moins discriminante ( $DI_{MLST} = 0,899$ ), alors que le *fbl-typing* et la TRST montraient toutes deux un pouvoir discriminant comparable élevé ( $DI_{fbl} = 0,964$  et  $DI_{TRST} = 0,943$ ). Les cinq paires d'isolats épidémiologiquement apparentés considérés comme identiques par MLST et TRST appartenaient aux mêmes types *fbl-types*, attestant de la concordance épidémiologique des méthodes.

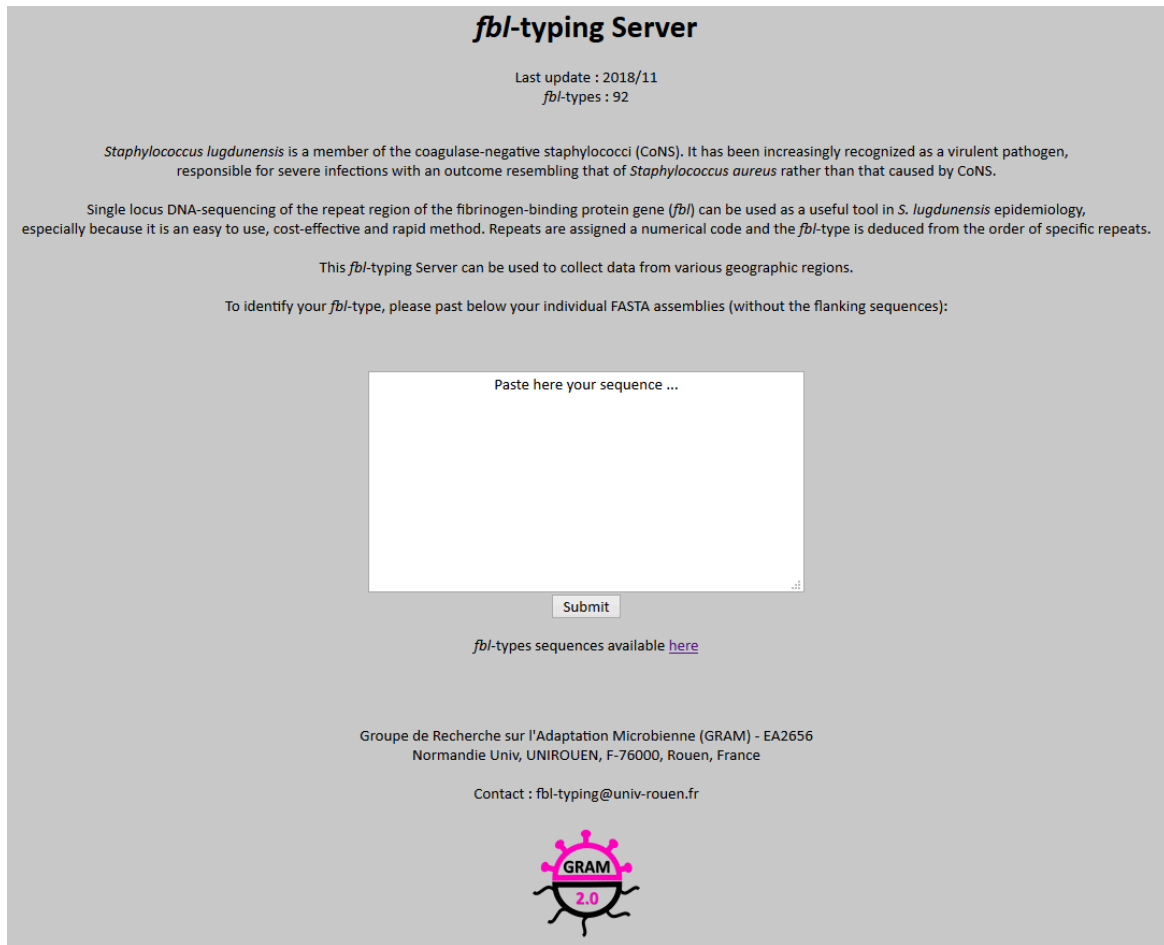
Le regroupement phylogénétique obtenu par *fbl-typing* était similaire au regroupement trouvé par MLST. L'un des faits les plus notables était que chaque *fbl-type* était associé à un seul CC de MLST. Ainsi, le *fbl-typing* permettait de prédire le CC avec 100% de probabilité. De plus, le *fbl-typing* distinguait de nouveaux géotypes au sein de six des sept CCs définis par MLST.

Afin de faciliter l'identification de ces *fbl-types*, nous avons développé et validé un serveur Web accessible au public, le « *fbl-typing Server* » (<http://fbl-typing.univ-rouen.fr/>) (Figure 75). Cet outil permet, à partir des données de séquençage assemblées et enregistrées au format FASTA, l'assignation en ligne des *fbl-types*.









**fbl-typing Server**

Last update : 2018/11  
fbl-types : 92

*Staphylococcus lugdunensis* is a member of the coagulase-negative staphylococci (CoNS). It has been increasingly recognized as a virulent pathogen, responsible for severe infections with an outcome resembling that of *Staphylococcus aureus* rather than that caused by CoNS.

Single locus DNA-sequencing of the repeat region of the fibrinogen-binding protein gene (*fbl*) can be used as a useful tool in *S. lugdunensis* epidemiology, especially because it is an easy to use, cost-effective and rapid method. Repeats are assigned a numerical code and the *fbl*-type is deduced from the order of specific repeats.

This *fbl*-typing Server can be used to collect data from various geographic regions.

To identify your *fbl*-type, please past below your individual FASTA assemblies (without the flanking sequences):


Paste here your sequence ...

Submit

*fbl*-types sequences available [here](#)

Groupe de Recherche sur l'Adaptation Microbienne (GRAM) - EA2656  
Normandie Univ, UNIROUEN, F-76000, Rouen, France

Contact : [fbl-typing@univ-rouen.fr](mailto:fbl-typing@univ-rouen.fr)



**Figure 75.** Page d'accueil du *fbl-typing Server* disponible à l'adresse <http://fbl-typing.univ-rouen.fr/>. Ce serveur permet l'assignation en ligne des *fbl-types* à partir des données de séquences au format FASTA.

En examinant les séquences complètes du gène *fbl* à partir des 21 génomes de *S. lugdunensis* dont nous disposons, nous avons découvert une délétion de quatre pb survenant à la position 12 du codon *start* pour deux souches. Une analyse *in silico* a suggéré que cette délétion entraînait un décalage du cadre de lecture, menant à un arrêt prématuré de la traduction de Fbl (L22STOP). Nous avons recherché par séquençage Sanger la présence de cette mutation pour tous les isolats typés par MLST ( $n = 146$ ), et l'avons identifiée chez 27 isolats. Tous, sauf un, appartenaient au CC1, avec une distribution variable selon les STs.

Ensuite, la capacité de liaison au fibrinogène humain immobilisé a été testée pour 55 isolats en collaboration avec l'équipe du Dr Patrice François de l'Université de Genève. Ces isolats ont été choisis pour être représentatifs des différents *fbl-types* et de la présence ou non de la délétion à l'extrémité 5' du gène. Le niveau de liaison au fibrinogène variait considérablement selon les isolats cliniques testés (de 0 à 133%, la liaison de la souche de contrôle positif *S. aureus* 8325-

4 étant considérée égale à 100%). Six se liaient de manière significative au fibrinogène (+++) par rapport au témoin négatif (*S. aureus* DU5925- $\Delta$ clfA $\Delta$ fnbp). Les analyses statistiques ont montré que le groupe des isolats présentant la délétion en 5' du gène était significativement associé à une capacité plus faible de liaison au fibrinogène que le groupe des isolats n'ayant pas cette délétion ( $P < 0,001$ ). De plus, les isolats avec au moins 43 répétitions dans la région R de *fbl* se liaient significativement plus fortement au fibrinogène que ceux avec moins de 43 répétitions ( $P < 0,001$ ).

Aucune corrélation significative n'a été observée dans notre étude entre le *fbl*-type, le contexte clinique d'isolement des souches ou le phénotype de liaison au fibrinogène.

Enfin, le niveau d'expression du gène *fbl* a été déterminé par qRT-PCR pour cinq isolats ne liant pas le fibrinogène et cinq isolats liant le fibrinogène. Les isolats présentaient une variabilité dans l'expression relative de *fbl* mais il n'y avait pas de différence significative dans le niveau d'expression du gène entre les deux groupes ( $P > 0,05$ ).

En conclusion, la région répétée du gène *fbl* est suffisamment polymorphe pour fournir une cible intéressante de SLST. Elle prédit les CCs définis par MLST dans 100% des cas. Le *fbl*-typing peut ainsi être proposé comme méthode de typage de première ligne pour des études micro- et macro-épidémiologiques chez *S. lugdunensis*. Le développement d'un outil d'identification et de stockage en ligne des *fbl*-types permettra en outre une surveillance internationale de la diffusion des lignées de *S. lugdunensis*. Enfin, la variabilité de l'adhésion au fibrinogène humain immobilisé des isolats cliniques de *S. lugdunensis* peut être en partie expliquée par des polymorphismes génétiques de *fbl*.

Ce travail a fait l'objet d'une publication en Mai 2019 dans la revue *Frontiers in Microbiology* (Dahyot et al., 2019), ainsi que d'une communication affichée (ECCMID, Amsterdam, 2019).

**3.2.2. Publication n°3**

***fbl*-typing of *Staphylococcus lugdunensis*: a frontline tool for epidemiological studies, but not predictive of fibrinogen binding ability**

Sandrine Dahyot, Jérémie Lebeurre, Floriane Laumay, Xavier Argemi, Charline Dubos, Ludovic Lemée, Gilles Prévost, Patrice François, Martine Pestel-Caron. *Front. Microbiol.* 2019 May.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01109>





# *fbl*-Typing of *Staphylococcus lugdunensis*: A Frontline Tool for Epidemiological Studies, but Not Predictive of Fibrinogen Binding Ability

Sandrine Dahyot<sup>1\*</sup>, Jérémie Lebeurre<sup>2†</sup>, Floriane Laumay<sup>3</sup>, Xavier Argemi<sup>4,5</sup>, Charline Dubos<sup>1</sup>, Ludovic Lemée<sup>1</sup>, Gilles Prévost<sup>4</sup>, Patrice François<sup>3</sup> and Martine Pestel-Caron<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UNIROUEN, GRAM EA2656, Rouen University Hospital, Normandie Université, Rouen, France, <sup>2</sup> UNIROUEN, GRAM EA2656, Normandie Université, Rouen, France, <sup>3</sup> Genomic Research Laboratory, Service of Infectious Diseases, University of Geneva Hospitals, Geneva, Switzerland, <sup>4</sup> VBP EA7290, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Institut de Bactériologie, Centre Hospitalier Régional Universitaire, Université de Strasbourg, Strasbourg, France, <sup>5</sup> Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Dennis C. Ko,  
Duke University, United States

### Reviewed by:

Timothy J. Foster,  
Trinity College Dublin, Ireland  
Muzaffar Hussain,  
Universitätsklinikum Münster,  
Germany

### \*Correspondence:

Sandrine Dahyot  
sandrine.dahyot@chu-rouen.fr

† These authors have contributed  
equally to this work

### Specialty section:

This article was submitted to  
Evolutionary and Genomic  
Microbiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

Received: 11 February 2019

Accepted: 01 May 2019

Published: 17 May 2019

### Citation:

Dahyot S, Lebeurre J, Laumay F, Argemi X, Dubos C, Lemée L, Prévost G, François P and Pestel-Caron M (2019) *fbl*-Typing of *Staphylococcus lugdunensis*: A Frontline Tool for Epidemiological Studies, but Not Predictive of Fibrinogen Binding Ability. *Front. Microbiol.* 10:1109. doi: 10.3389/fmicb.2019.01109

*Staphylococcus lugdunensis* is increasingly recognized as a potent pathogen, responsible for severe infections with an outcome resembling that of *Staphylococcus aureus*. Here, we developed and evaluated a tool for *S. lugdunensis* typing, using DNA sequence analysis of the repeat-encoding region (R-domain) in the gene encoding the fibrinogen (Fg)-binding protein Fbl (*fbl*-typing). We typed 240 *S. lugdunensis* isolates from various clinical and geographical origins. The length of the R-domain ranged from 9 to 52 repeats. *fbl*-typing identified 54 unique 18-bp repeat sequences and 92 distinct *fbl*-types. The discriminatory power of *fbl*-typing was higher than that of multilocus sequence typing (MLST) and equivalent to that of tandem repeat sequence typing. *fbl*-types could assign isolates to MLST clonal complexes with excellent predictive power. The ability to promote adherence to immobilized human Fg was evaluated for 55 isolates chosen to reflect the genetic diversity of the *fbl* gene. We observed no direct correlation between Fg binding ability and *fbl*-types. However, the lowest percentage of Fg binding was observed for isolates carrying a 5'-end frameshift mutation of the *fbl* gene and for those harboring fewer than 43 repeats in the R-domain. qRT-PCR assays for some isolates revealed no correlation between *fbl* gene expression and Fg binding capacity. In conclusion, this study shows that *fbl*-typing is a useful tool in *S. lugdunensis* epidemiology, especially because it is an easy, cost-effective, rapid and portable method (<http://fbl-typing.univ-rouen.fr/>). The impact of *fbl* polymorphism on the structure of the protein, its expression on the cell surface and in virulence remains to be determined.

**Keywords:** *Staphylococcus lugdunensis*, *fbl*-typing, epidemiology, phylogeny, fibrinogen adhesion

**Abbreviations:** AW, adjusted Wallace coefficient; CC, clonal complex; CI, confidence interval; CoNS, coagulase-negative *Staphylococcus*; DI, Simpson's diversity index; Fg, fibrinogen; MLST, multilocus sequence typing; MLVA, multiple-locus VNTR analysis; MVLST, multivirulence-locus sequence typing; PBS, phosphate-buffered saline; ST, sequence type; TRST, tandem repeat sequence typing; TRT, TRST type; VNTR, variable number of tandem repeat.

## INTRODUCTION

*Staphylococcus lugdunensis* is a member of the coagulase-negative staphylococci (CoNS). It belongs to the normal human skin flora, colonizing several distinct niches such as perineal and inguinal areas (Bieber and Kahlmeter, 2010) but is increasingly recognized as a potent human pathogen (Frank et al., 2008). The behavior of *S. lugdunensis* is similar in many ways to that of *Staphylococcus aureus*, exhibiting higher virulence than other CoNS (Frank et al., 2008). *S. lugdunensis* can cause various types of infections, ranging from localized to systemic diseases (Zinkernagel et al., 2008; Heldt Manica and Cohen, 2017). It has mainly been reported in skin and soft tissue infections (Papapetropoulos et al., 2013), but it is also responsible for catheter-related bloodstream infections, bone and joint infections (Argemi et al., 2017) and severe infective endocarditis (Non and Santos, 2017). Unlike *S. aureus*, very few pathogenicity factors have been characterized (Heilbronner et al., 2011). Some *in vitro* studies have suggested the existence of several virulence factors, including hemolysins, adhesion proteins [Fg-binding protein Fbl (Mitchell et al., 2004) and von Willebrand factor-binding protein vWbl (Nilsson et al., 2004b)] and iron-regulated surface determinant proteins (Heilbronner et al., 2016).

A variety of molecular typing methods have been developed for *S. lugdunensis* characterization, including pulsed-field gel electrophoresis (Yeh et al., 2015), MLST (Chassain et al., 2012), and MVLST (Didi et al., 2014). Phylogenetic analyses by MLST and MVLST have shown the clonal population structure, the mutational evolution of this pathogen, and the absence of hypervirulent lineages. MLST has become the method of choice for unambiguous clonal definition (Aanensen and Spratt, 2005), however, there is a need for a portable tool with greater discriminatory power than MLST for micro-evolution based epidemiology.

Another method involves the typing of multiple, rapidly evolving *loci* containing repeated sequences, known as VNTRs. These markers can be used to build allelic profiles in MLVA systems, in order to discriminate between clonal bacterial populations (Van Belkum et al., 2007). Recently, we developed the first two VNTR-based schemes for *S. lugdunensis* typing: a classic length-based MLVA method and a sequence-based MLVA method known as the TRST method (Dahyot et al., 2018). These typing methods were more discriminating than MLST and MVLST, and represent promising tools for molecular epidemiological studies of *S. lugdunensis*.

A more practical alternative to the multilocus approach is the sequence-based typing of one or two highly polymorphic *loci*. Indeed, when analyzing clonal populations, phylogenetic inferences are rarely confounded *via* homologous genetic recombination (Zaiß et al., 2009). This approach was previously developed for a number of pathogens, including *S. aureus* (*spa*) (Shopsin et al., 1999), *Streptococcus pyogenes* (*emm*) (Beall et al., 1996), and *Clostridium difficile* (TR6, TR10) (Zaiß et al., 2009). Currently, *S. aureus* protein A (*spa*) gene is one of the most widely used single genetic markers for *S. aureus* typing (Asadollahi et al., 2018). *spa*-typing is an established method based on the evaluation of number and sequence variation in mainly 24-bp

repeats at the X-region of *spa* (Frenay et al., 1996). *spa*-typing was shown to be highly concordant with other typing methods such as MLST or pulsed-field gel electrophoresis (Shopsin et al., 1999; Harmsen et al., 2003; Golding et al., 2008). Due to the clonal population structure of *S. aureus*, *spa*-typing is considered as a highly discriminating method for outbreak investigation and for the assignment of strains to phylogenetic lineages in population studies (Koreen et al., 2004; Strommenger et al., 2008). Like *spa*-typing, a method using the *clfA* R-domain (18-pb repeats) of clumping factor ClfA was shown to be useful for *S. aureus* typing and grouping host-specific lineages (Said et al., 2009, 2010). This repeat region acts as a flexible stalk to extend the Fg binding domain from the cell surface (Hartford et al., 1997). The *clfA* R-domain varies in size among different *S. aureus* strains (McDevitt and Foster, 1995; Said et al., 2009). Moreover, repeat copy number has been shown to affect adherence and clumping titers of *S. aureus* strains (Hartford et al., 1997; Risley et al., 2007).

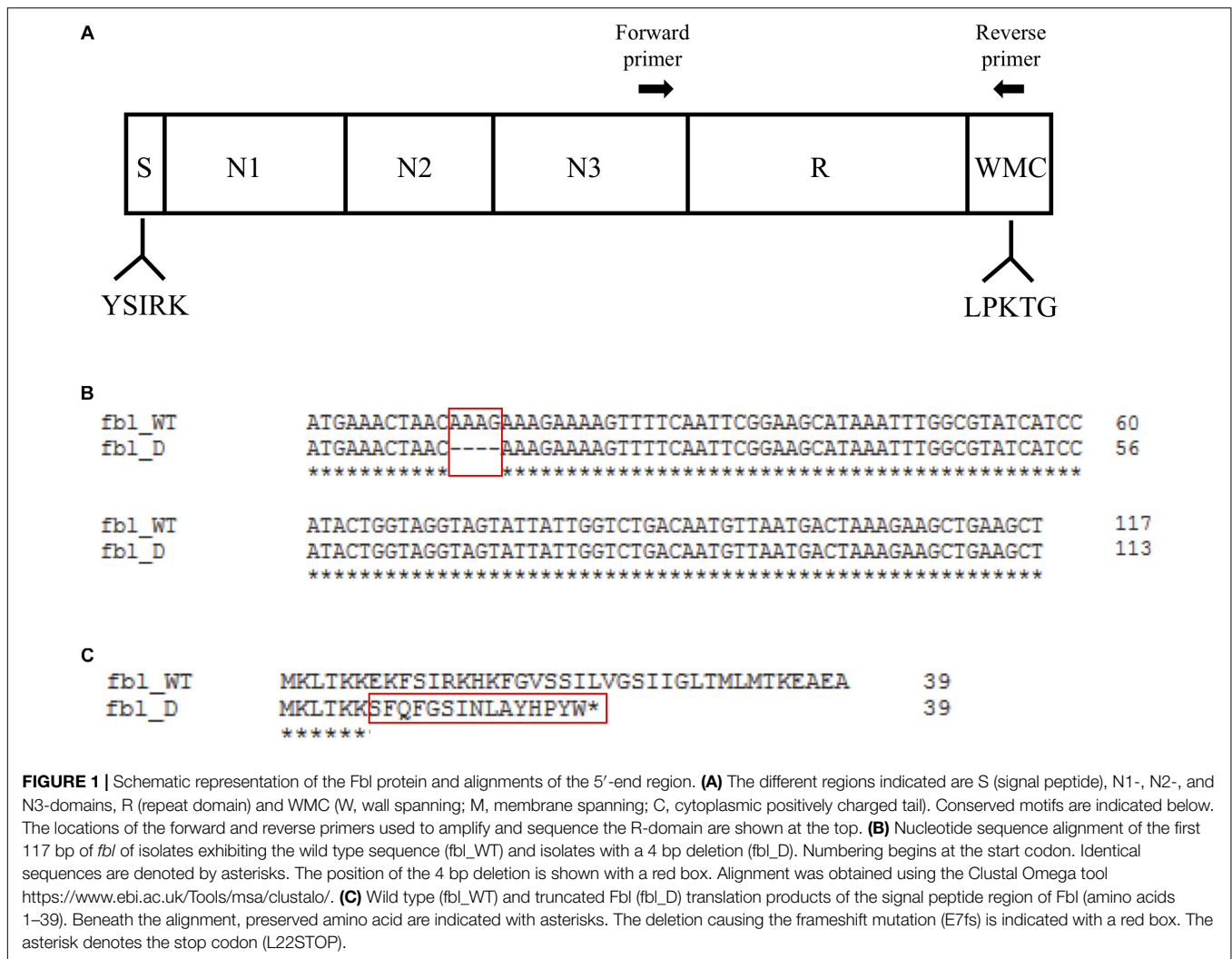
Interestingly, the Fbl protein coded by the *fbl* gene of *S. lugdunensis* is closely related to the ClfA of *S. aureus*, showing 62% amino acid identity in the Fg-binding region (Mitchell et al., 2004; Nilsson et al., 2004a). However, the R-domain of Fbl (SDSDSA hexapeptide motif) is slightly different to that of ClfA (SD repeats only). It is encoded by a variable number of 18-bp repeats located immediately upstream of the region coding the C-terminal cell wall attachment sequence (Figure 1A). The size of the R-domain of *fbl* varies according to the strains (Mitchell et al., 2004). In this context, the analysis of the *fbl* R-domain could be a potential useful marker for *S. lugdunensis* typing.

Therefore, the objectives of this study were (i) to develop and evaluate the use of an *fbl* R-domain repeat-based system to type diverse *S. lugdunensis* isolates, (ii) to compare its typing performance with MLST and TRST, and (iii) to determine the potential impact of *fbl* polymorphism on the ability of isolates to bind to Fg *in vitro*.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial Isolates

A total of 240 *S. lugdunensis* human isolates recovered from 230 patients were used in this study (Supplementary Table S1). Among them, ten pairs of isolates were collected from ten patients at time intervals ranging from 0 to 17 days. A first panel, the “TRST panel,” included 128 *S. lugdunensis* isolates previously characterized by MLST and TRST and collected from five regions of France and from Sweden (Dahyot et al., 2018). A further set of 106 clinical isolates recovered from 101 patients was collected at Rouen University Hospital in France from January 2016 to December 2016. Lastly, six clinical isolates whose complete genome sequence was available in our laboratory were included in this study. Overall, the 240 isolates were recovered from skin and soft tissue infections ( $n = 50$ ), bone and joint infections ( $n = 41$ ), deep infections ( $n = 22$ ), bacteremia ( $n = 12$ ), endocarditis ( $n = 9$ ), medical device infections ( $n = 8$ ), other infections ( $n = 12$ ), carriage ( $n = 79$ ), and from undocumented origin ( $n = 7$ ). All 240 isolates were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass.



## DNA Extraction and PCR Amplification

Isolates were grown overnight at 37°C on tryptic soy agar with 5% horse blood agar plate. DNA was extracted using the InstaGene Matrix kit (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) according to the manufacturer's recommendations. PCRs were performed on a Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, United States) in a final volume of 25 µl containing 12.5 µl GoTaq G2 Green Master Mix (Promega, Charbonnières-Les-Bains, France), 0.50 µM of each primer and 5 µl of DNA.

## PCR Amplification and DNA Sequencing of the *fbl* Gene

The *fbl* gene of the 15 genomes of *S. lugdunensis* available in the GenBank database and of six complete genomes sequenced by our laboratory was aligned using clustal multiple sequence alignment<sup>1</sup>. Primers *fbl*\_R\_F and *fbl*\_R\_R were designed for the *fbl*-typing assay development to flank the *fbl* R-domain (Table 1 and Figure 1A). Primers *fbl*\_N\_F and *fbl*\_N\_R were designed

<sup>1</sup><https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

**TABLE 1** | Primers used in this study.

Target	Name of primer	Primer sequence (5'-3')	References
<i>fbl</i> R-domain amplification and sequencing by conventional PCR	<i>fbl</i> _R_F	TGGCATGGGATAATGAAGTAG	This study
	<i>fbl</i> _R_R	CCACTCCCGTATAGTAACT	
<i>fbl</i> Nter-domain amplification and sequencing by conventional PCR	<i>fbl</i> _N_F	TTGCCTGTATAATGCTATCTT	This study
	<i>fbl</i> _N_R	TTTGACAAATTACGCTCCx	
<i>fbl</i> gene expression by qRT-PCR	<i>fbl</i> _qRT_F	AATAGCGAGGCACAAGCAATA	This study
	<i>fbl</i> _qRT_R	GCAGGTGATACATCGGTGG	
16S rRNA gene expression by qRT-PCR	Q3	GAGGAAGGIGGAGACGT	Tseng et al., 2003
	Q4	AGICCCGIGAACGTATTAC	

in the 5' part of the gene to amplify and sequence a 264 bp fragment corresponding to the region upstream the *fbl* gene and its first 125 bp (Table 1). All primers were designed using



OLIGO Primer Design software (Molecular Biology Insights, United States). Sequences were BLAST checked for homologous regions. The PCR conditions were as follows: denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of amplification including denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s, and extension at 72°C for 30 s. A final extension step at 72°C for 5 min was performed. All PCR products were separated on 1% agarose gel by electrophoresis, purified, and sequenced in both forward and reverse directions by Eurofins GATC Biotech SARL (Konstanz, Germany).

## Identification of *fbl*-Types and Cluster Analysis

The number and the sequence of *fbl* repeats were determined with BioNumerics software (Version 7.6, Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) using the “polymorphic VNTR typing” plugin. To check that the entire repeat array had been sequenced, the flanking sequences were spotted but were not included as typing information. Each unique 18-bp repeat sequence was identified by a numeric code, known as the “repeat code.” Each unique combination of repeat sequences defined an “*fbl*-type,” with a number followed by a lowercase letter, where the number corresponds to the number of repeats and the letter to the combination of the different repeat sequences, e.g., fbl42a. Hence, each *fbl*-type denotes a collection of specific repeat units arranged in a precise pattern.

Cluster analysis of *fbl* sequences was performed using the “polymorphic VNTR typing” plugin of BioNumerics software. With this plugin, sequences are compared and aligned using an algorithm based on the DSI (duplications, substitutions, and indels) model for pairwise alignment of repeats (Benson, 1997). A minimum spanning tree was generated from the similarity matrix with the root node assigned to the ST with the greatest number of related types. Default software parameters were used for analysis with a bin distance of 1%, i.e., two entries having a similarity of 99–100% will have a distance of 0 and two entries that have a similarity of 98–99% will have a distance of 1. For cluster analysis, only *fbl*-types separated by a minimum spanning tree distance of  $\leq 2$  (i.e., if they were  $\geq 97\%$  similar) were considered closely related and assigned to the same cluster.

## Data Analysis

The discriminatory ability and the congruence of the results obtained using the different typing methods were evaluated. Simpson’s diversity index (DI) (Hunter and Gaston, 1988) and AWs (Severiano et al., 2011) [plus CIs as described by Grundmann et al. (2001)] were calculated using the online tool at <http://www.comparingpartitions.info/?link=Tool>. If the CI of any two methods overlaps, they may have similar discriminatory powers at a 95% confidence level. The ratio of non-synonymous to synonymous substitutions ( $d_N/d_S$ ) was calculated with MEGA version 7 software using the Maximum Likelihood analysis of natural selection codon-by-codon. A ratio of  $>1$  indicates positive selection, a ratio of 1 indicates no selection pressure and a ratio of  $<1$  indicates purifying selection.

## Test of *fbl* Stability

To determine the stability of the *fbl* R-domain, two isolates were subcultured on tryptic soy agar for 30 consecutive days by streaking a single colony from each isolate on agar plates. The original culture and subcultures 10, 20, 30 were used for DNA extraction and the total DNA was subjected to the *fbl* assay.

## Construction and Validation of an *fbl*-Typing Server

An *fbl* allele database was created to store all identified *fbl*-types in FASTA format. Perfect identity hits report the corresponding *fbl*-type whereas imperfect hits report an “unknown” *fbl*-type, and the user is encouraged to contact the curator to update the database with this new variant. The Web tool has been made publicly available and is hosted by Rouen Normandy University<sup>2</sup>. Individual FASTA assemblies of the paired Sanger sequences of 92 isolates identified with BioNumerics software were analyzed with this newly developed Web tool, and output results were compared.

## Rapid Slide Latex Agglutination Tests

A rapid latex agglutination test was performed on all isolates using the commercial *S. aureus* agglutination kit Pastorex<sup>TM</sup> Staph Plus (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) according to the manufacturer’s instructions.

## Adherence of Bacterial Cells to Immobilized Fibrinogen

Bacterial adhesion to solid phase-adsorbed human Fg was assessed in a 96-well plate format. Flat-bottom microtiter plates were coated for 1 h at 37°C with 50  $\mu$ l per well of 10  $\mu$ g/ml human Fg or PBS. The plates were washed three times with PBS and incubated at 37°C for 1 h after addition of 250  $\mu$ l of 2% human serum albumin. The plates were washed three times with PBS prior to the inoculation of bacterial suspension prepared as follows. Bacterial isolates were inoculated in Mueller Hinton broth and incubated overnight at 37°C under constant agitation. A volume of 100  $\mu$ l of suspension was inoculated in fresh broth (10 ml) and incubated at 37°C for 3 h. Bacteria were washed twice with PBS and adjusted to an  $OD_{600\text{ nm}} = 0.9$ . Fifty microliters of adjusted bacterial suspension were added per well and after 1 h 30 min of incubation at 37°C, the wells were rinsed three times with PBS. Adherent bacteria were fixed for 30 min at 60°C, stained with 95  $\mu$ l of 0.5% crystal violet in 0.5% ethanol for 15 min and air-dried after washings. Crystal violet staining was solubilized into 100  $\mu$ l of dimethyl sulfoxide and the absorbance measured at  $OD_{595\text{ nm}}$  using a microplate reader. Adherence of isolates was evaluated in at least five wells, and the experiment was performed at least twice. *S. aureus* DU5925-mutant of the main Fg-binding adhesin was used as a negative control (non-adherent); *S. aureus* 8325-4 and 8325-4 pCF4 were used as positive controls in all experiments (adherent and hyper-adherent, respectively). Adherence of isolates was expressed relative to that of 8325-4 (100%). All results were

<sup>2</sup><http://fbl-typing.univ-rouen.fr/>

expressed as mean percentages  $\pm$  standard error of mean. After suppression of significant outliers ( $P < 0.05$ , online tool<sup>3</sup>), adherence of isolates was compared to that of DU5925 using Dunnett's multiple comparisons test, and the global difference was analyzed using ordinary one-way ANOVA (GraphPad Prism statistical analysis). When the percentage of binding to solid-phase Fg was significantly different to that of the negative control strain it was categorized as “+++” and when it was lower it was interpreted as “–”. Strains that did not belong to the two previous categories were considered as “+”. The impact of *fbl* genetic diversity (presence of the 5'-end frameshift mutation or number of repeats in the R-domain) on adherence was evaluated using a non-parametric analysis of variance test (Kruskal–Wallis) on R software (version 3.5.1). A  $P$ -value of  $<0.05$  was regarded as significant.

### Total RNA Extraction

Cells were grown in trypticase soy broth at 37°C in a shaking incubator set at 150 rpm to mid-exponential phase ( $OD_{600\text{ nm}} = 1$ ), and 1 ml was centrifuged (5 min at  $8,000 \times g$ , 4°C). Pellets were resuspended in 200  $\mu$ l TE Buffer (10 mM Tris–HCl pH 8 and 1 mM EDTA) containing 2.1 mg lysozyme (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States) and 10  $\mu$ g lysostaphin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States). Samples were vortexed for 30 s, incubated at 37°C for 10 min, and lysed using the RA1 lysis buffer provided in the NucleoSpin<sup>®</sup> RNA kit (Macherey Nagel, Hoerd, France) supplemented with  $\beta$ -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States). Next, a bead-beating procedure alternating 1 min cycles of beating with incubation on ice was performed. RNA was isolated using the NucleoSpin<sup>®</sup> RNA kit according to the manufacturer's instructions. The amount of RNA yielded was assessed with a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Montigny-le Bretonneux, France). RNA samples were then treated by TURBO DNA-free<sup>™</sup> kit (Ambion, Austin, TX, United States) according to the manufacturer's instructions.

### Quantitative Real-Time PCR

The cDNA synthesis was performed using the Omniscript<sup>®</sup> RT kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. A total of 2  $\mu$ g of RNA was reverse transcribed in a 20  $\mu$ l volume reaction using random primers (Promega, Madison, WI, United States) and RNase inhibitor (40 U/ $\mu$ l) (Invitrogen, Carlsbad, CA, United States). The quantitative RT-PCR (qRT-PCR) primers listed in **Table 1** were used in 20  $\mu$ l PCR mixtures which included SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) and 1  $\mu$ l of diluted cDNA template (1:10 for *fbl* and 1:100 for 16S rRNA). A CFX96 real-time PCR detection system (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) was used for qRT-PCR with the following PCR amplification program: initial denaturation step at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of amplification including denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s, and extension at 72°C for 30 s. Melting curve analysis was used to identify specific products increasing in 0.5°C increment every 5 s from 55 to 95°C.

<sup>3</sup><https://www.graphpad.com/quickcalcs/grubbs2/>

Relative *fbl* expression levels for each isolate were quantified using the gene expression analysis module of CFX Manager<sup>™</sup> software ( $2^{-\Delta CT}$  method), with 16S rRNA gene as reference to normalize the results. All *S. lugdunensis* isolates were assayed as triplicates in each experimental run, and three independent biological assays were performed. The statistical significance of *fbl* gene expression differences between the groups of Fg-binding-negative (–) and Fg-binding-positive (+++) *S. lugdunensis* isolates was determined based on Mann–Whitney–Wilcoxon measurements. A  $P$ -value of  $< 0.05$  was regarded as significant.

## RESULTS

### *fbl* R-Domain Polymorphism

Two hundred and forty *S. lugdunensis* isolates from various clinical and geographical backgrounds were characterized by *fbl*-typing. The sequencing and assembling of all repeats was successful, irrespective of length. The number of repeats varied between 9 and 52, as identified by sequencing PCR products ranging from 586 to 1360 bp in length. The mean number of repeats in R-domain was 42 per isolate. Sequence analysis identified 54 unique 18-bp repeat sequences, each given a numeric code (**Supplementary Table S2**). The deduced amino acid sequences of the repeats allowed identification of 13 types of 6-amino-acid units (**Supplementary Table S2**). The most frequent pattern was DSDSDA. Polymorphism resulted in synonymous substitutions for most repeats, with a ratio of non-synonymous to synonymous substitutions of 0.045, suggesting a potential role of environmental selective pressure in their evolution.

### *fbl*-Typing Results

The organization of the repeats of the *fbl* R-domain (composition, number and order of repeats) from each of the isolates was represented as an *fbl*-type repeat code. Ninety-two distinct *fbl*-types were defined for the 240 isolates, designated fbl9a to fbl52a. **Supplementary Table S3** provides a complete overview of the profiles. The most common *fbl*-types were fbl47b ( $n = 43$ ), fbl45f ( $n = 24$ ) and fbl41a ( $n = 13$ ). There were 68 unique *fbl*-types (represented by only one patient). *fbl*-type was not accurately predicted by the length of the variable region, as the number of repeats was the same for many of the types (for example, 15 unique *fbl*-types had 45 repeat elements). To assess the discriminatory power of *fbl*-typing, we included only one isolate per patient as all the isolate pairs had the same *fbl*-type. Simpson's DI calculated from the 230 remaining unrelated isolates was 0.946 (**Table 2**).

### *fbl* Clustering

A minimum spanning tree was constructed for the 240 isolates in order to visualize the relationships among the *fbl*-types (**Figure 2A**). The 92 unique *fbl*-types were distributed over 10 clusters (cluster 1–10), each containing more than 2 isolates, and 46 singletons. *fbl* clustering allowed the grouping of isolates that had similar repeat organizations. The main cluster was cluster 1 (57 isolates) consisting of 20 *fbl*-types, then cluster 2 (52 isolates)

**TABLE 2** | Discriminatory power of the three typing methods for unrelated isolates.

Typing method	All isolates (n = 230)			TRST panel (n = 123)		
	No. of genotypes	DI <sup>a</sup>	CI <sup>b</sup> 95%	No. of genotypes	DI <sup>a</sup>	CI <sup>b</sup> 95%
fbl-typing	92	0.946	0.929–0.964	60	0.964	0.949–0.979
MLST	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	25	0.899	0.872–0.926
TRST	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	69	0.943	0.915–0.971

<sup>a</sup>DI, Simpson's diversity index. <sup>b</sup>CI, confidence interval. <sup>c</sup>ND, not determined.

with 6 *fbl*-types. These two largest *fbl* clusters comprised 45% of all the isolates. Eighty-one % of the 240 isolates analyzed in the study were part of a cluster.

The distribution of the isolates failed to identify any correlation between *fbl*-types and clinical settings (**Figure 2B**).

### Discriminatory Power and Concordance Between Typing Methods

*fbl*-typing results were compared with those of MLST and TRST for 128 isolates representative of the genetic diversity of *S. lugdunensis* (Dahyot et al., 2018). Twenty-five STs belonging to 7 CCs, 69 TRTs, and 60 *fbl*-types were identified for these isolates (**Table 2**). Simpson's DI for 123 of these 128 isolates (only one genotype was included per patient to avoid any bias) was calculated at 0.964 for *fbl*-typing, 0.899 for MLST and 0.943 for TRST (**Table 2**). Thus, MLST showed the lowest discriminatory power, whereas *fbl*-typing and TRST showed comparable high discriminatory power. The five pairs of epidemiologically related isolates considered as clonal by MLST and TRST belonged to the same *fbl*-types. This supports the *in vivo* stability of the *fbl* R-domain, and attests the epidemiological concordance of the method.

The clustering by both *fbl*-typing and MLST was similar, as shown by the minimum spanning tree analysis (**Figure 2A**). For example, isolates of *fbl* clusters 1 and 2 belonged to CC1 and CC3, respectively. One of the most noticeable findings was that each *fbl*-type was associated with only a single CC. Thus, *fbl*-typing provided CC assessment for all the isolates (**Supplementary Table S3**). This was confirmed by the calculation of the AW of *fbl*-typing (**Table 3**). If any two isolates shared the same *fbl*-type, they had a 100% probability of belonging to the same CC. **Supplementary Table S3** is provided as a preliminary guideline for correspondence between *fbl*-types and MLST CCs.

However, *fbl*-typing was less able to predict ST (AW = 0.680) (**Table 3**), as an *fbl*-type could correspond to several STs. Conversely, some STs could contain up to 11 different *fbl*-types, like ST2 and ST3. On the other hand, the low AW coefficients between *fbl*-typing and TRST showed that *fbl*-types was able to predict TRTs with a 35% probability (**Table 3**).

Therefore, *fbl*-typing further discriminated new genotypes in the MLST CCs on multiple occasions (for six of the seven CCs analyzed) (**Table 4**). For instance, 12 *fbl*-types were identified for the CC2 isolates whereas only five STs and five TRTs were described for these isolates by MLST and TRST, respectively. Isolates of CC1 encompassed 20 unique *fbl*-types

while MLST only distinguished 5 STs whereas TRST allowed the identification of 28 TRTs.

### Stability of *fbl* R-Domain

The stability of the *fbl* R-domain was examined, showing that, for each isolate, *fbl*-types were identical between the original isolates and their 10th, 20th, and 30th subcultures, indicating that the R-domain of *fbl* was stable.

### Construction and Validation of an “*fbl*-Typing Server”

An *fbl*-typing server was constructed to perform *fbl*-typing using sequencing data saved in a FASTA format. It is a free access Web-based service hosted by Rouen Normandy University (see text footnote 2). The server contains data on the 92 *fbl*-types available at the time of the study. The *fbl*-typing Web tool was evaluated and identified *fbl*-types correctly with a 100% identity match.

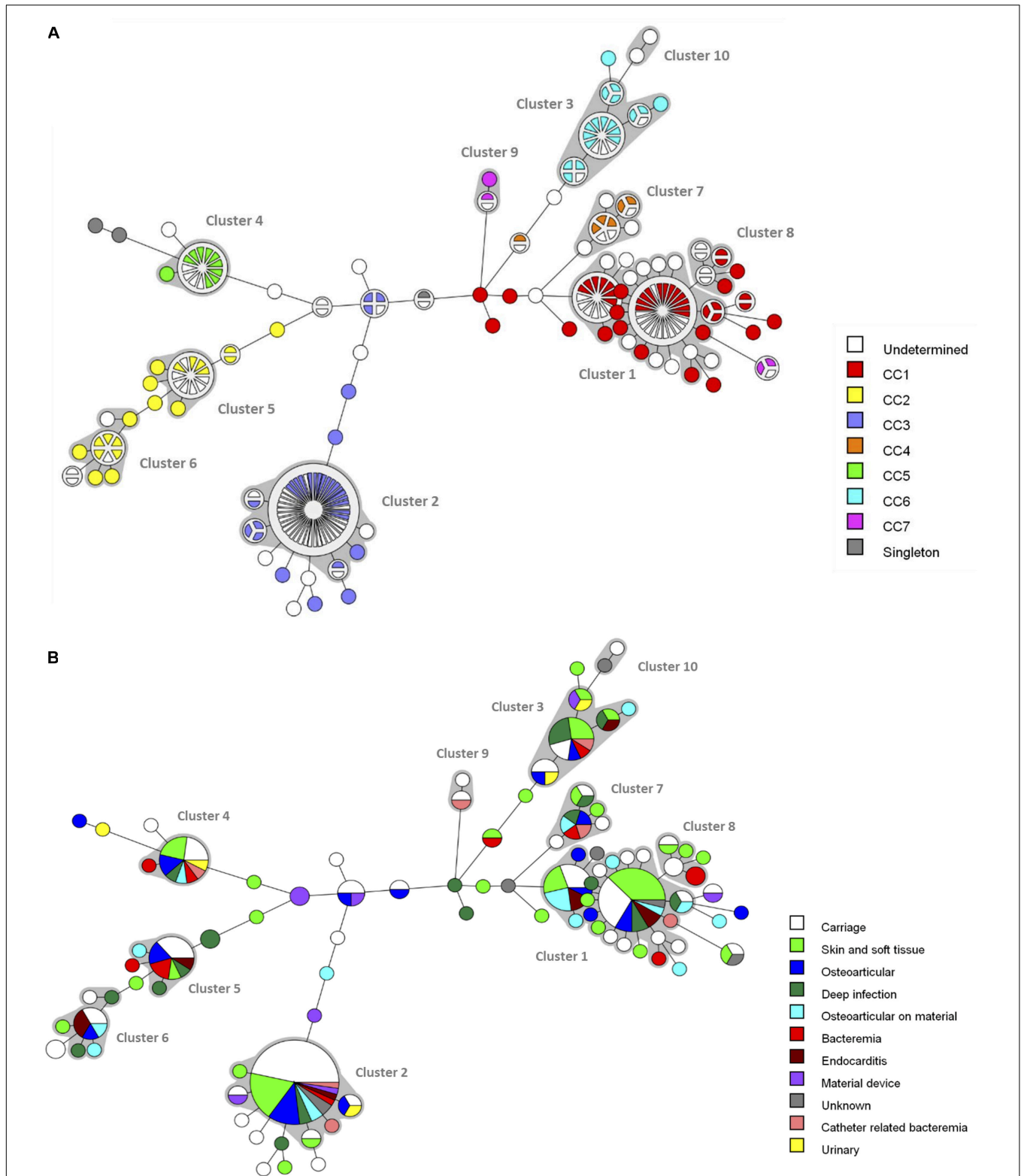
### *fbl* 5'-End Polymorphism

We examined the complete sequence variation of the *fbl* gene in published *S. lugdunensis* genomes, and discovered a 4 bp deletion occurring at position 12 from the start codon for two isolates (**Figure 1B**). *In silico* analysis suggested that this deletion caused a frameshift mutation leading to a premature translational stop (L22STOP) (**Figure 1C**). One hundred and forty-six isolates were screened for this deletion by Sanger sequencing. The deletion was found in 27 isolates, belonging to different *fbl*-types (**Supplementary Table S1**). Twenty-six of the 27 isolates belonged to CC1, with a distribution that varied according to the ST. All isolates characterized as ST12 ( $n = 8$ ) and ST15 ( $n = 6$ ) had this deletion, whereas isolates belonging to ST1 ( $n = 12$ ) and ST7 ( $n = 1$ ) did not. Within ST6 (CC1), 11 of the 15 isolates (73%) had the deletion. The only isolate that had the deletion and was not from CC1 belonged to ST3 (CC3).

### Fibrinogen Binding

The 240 isolates were first tested with rapid latex agglutination test which yielded positive results for 77 isolates (32%) (**Table 5**). Then, the ability to bind to immobilized human Fg was tested for 55 isolates with different *fbl* gene characteristics in terms of *fbl*-types and presence or absence of the 5'-end deletion. The level of bacterial binding to immobilized Fg varied considerably between the clinical isolates tested (0 to 133% of the positive control strain) (**Supplementary Figure S1**). Six of the 55 isolates significantly bound to solid-phase Fg (++++) and ten adhered poorly (+) (**Table 5**). Thirty-nine isolates did not bind to solid-phase Fg (–).

Statistical comparisons of the ability of isolates to bind to Fg showed that the group of 19 isolates with the 5'-end deletion of the *fbl* gene was significantly associated with a lower ability to bind to Fg (6.47%) than the group of 36 isolates without the deletion (25.43%) ( $P < 0.001$ ). Moreover, within the group of isolates without the *fbl* deletion, the isolates with  $\geq 43$  repeats bound significantly more strongly to Fg (37.64%) than those with  $< 43$  repeats (6.23%) ( $P < 0.001$ ). All isolates that significantly adhered to solid-phase Fg were tested positive in the agglutination test. Only three isolates reacted in the agglutination



**FIGURE 2 |** Minimum spanning tree analysis of the 240 *S. lugdunensis* isolates based on *fbI*-types. Cluster analysis was performed using the polymorphic VNTR typing plugin of BioNumerics. *fbI*-types separated by a minimum spanning tree distance of  $\leq 2$  (i.e., if they were  $\geq 97\%$  similar) were considered closely related and assigned to the same cluster. Each circle represents an *fbI*-type and its size is proportional to the number of isolates. The length of the branches expressed the minimum spanning tree distance between two *fbI*-types. Gray zones around circles delineate *fbI* clusters. The colors used are based **(A)** on clonal complexes (CCs) defined by MLST, undetermined, unknown CC (isolates non-characterized by MLST) and **(B)** on clinical contexts.

**TABLE 3** | Adjusted Wallace coefficients and 95% confidence intervals for the 123 unrelated isolates typed by multilocus sequence typing (MLST), tandem repeat sequence typing (TRST), and *fbl*-typing.

	CC (MLST)	ST (MLST)	TRST type	<i>fbl</i> -type
CC		0.477	0.257	0.158
(MLST)		(0.398–0.555)	(0.176–0.339)	(0.089–0.226)
ST	1.000		0.487	0.225
(MLST)	(1.000–1.000)		(0.371–0.602)	(0.126–0.324)
TRST type	1.000	0.901		0.215
	(1.000–1.000)	(0.828–0.974)		(0.076–0.353)
<i>fbl</i> -type	1.000	0.680	0.351	
	(1.000–1.000)	(0.521–0.840)	(0.202–0.500)	

CC, clonal complex; ST, sequence type.

**TABLE 4** | Ability of the three typing methods to discriminate the 123 unrelated isolates within major *S. lugdunensis* clonal complexes (CCs) defined by multilocus sequence typing (MLST).

CC	MLST		TRST		<i>fbl</i> -typing	
	No. of isolates	No. of STs	No. of TRTs	DI <sup>a</sup>	No. of <i>fbl</i> -types	DI <sup>a</sup>
1 (37)	5	0.752	28	0.962	20	0.896
2 (18)	5	0.405	5	0.405	12	0.922
3 (30)	3	0.131	6	0.310	11	0.710
4 (6)	3	0.600	6	1	3	0.733
5 (10)	3	0.511	8	0.956	2	0.200
6 (15)	2	0.133	10	0.914	6	0.810
7 (4)	2	0.667	3	0.833	3	0.833
Singleton (3)	2	0.667	3	1	3	1
Total	25	0.899	69	0.943	60	0.964

ST, sequence type; TRT, tandem repeat sequence typing type. <sup>a</sup>DI, Simpson's diversity index.

test but did not bind to solid-phase Fg (Table 5). No difference in Fg-binding phenotypes was observed according to the type of clinical specimen.

### *fbl* Gene Expression Analysis

The level of *fbl* gene transcript in mid-exponential phase cells was determined by real-time qRT-PCR for ten isolates selected to represent five Fg-binding-negative and five Fg-binding-positive isolates. Isolates displayed variability in the relative *fbl* expression, ranging from 0.002 to 0.382. However, there was no significant difference ( $P > 0.05$ ) in *fbl* expression level between the two groups ( $0.015 \pm 0.011$  for Fg-binding-negative isolates and  $0.130 \pm 0.172$  for Fg-binding-positive isolates).

## DISCUSSION

*Staphylococcus lugdunensis* is a significant human pathogen with distinct clinical and microbiological characteristics compared to other CoNS (Frank et al., 2008; Becker et al., 2014). To better understand the genetic background and population structure of *S. lugdunensis*, several sequence-based methods have been developed, such as MLST, MVLST and more

recently TRST (Chassain et al., 2012; Didi et al., 2014; Dahyot et al., 2018). Phylogenetic analysis has shown the clonal population structure and the mutational evolution of this species. Therefore, single locus DNA sequencing of the repeated regions of the gene could be a reliable method for the accurate typing of *S. lugdunensis*, as described for *S. aureus* (Shopsin et al., 1999).

The *fbl* R-domain appears to be a reliable marker for typing as it encodes SD-repeat motif. SD repeats have been explored for *S. aureus* genotyping because of their polymorphism in both copy number and sequence (Koreen et al., 2005; Said et al., 2009, 2010). In the present study, we have developed and evaluated a new typing system for *S. lugdunensis* based on the DNA sequencing of the *fbl* R-domain as an alternative technique in clinical and research settings.

Our isolate collection fulfilled van Belkum's criteria (Van Belkum et al., 2007) for validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology because it included a large "test population" of isolates representative of the genetic diversity of *S. lugdunensis* as well as a set of clinical isolates with well-defined inclusion criteria. Unambiguous *fbl*-types were determined for all the 240 isolates analyzed. The comparison of *fbl*-typing with previously obtained MLST and TRST typing data revealed that *fbl*-typing was highly discriminating compared to MLST, not only in terms of genotypes but also for discriminatory index. In particular, *fbl*-typing showed extensive polymorphism in some clonal groups defined by MLST, like CC1. Moreover, we have shown that there was an excellent correlation between the clustering of isolates by *fbl*-typing and MLST. The success rate of *fbl*-types to predict MLST CCs was 100%, which has allowed us to provide a preliminary guideline for assigning CC from *fbl*-type (Supplementary Table S3). Typing data from future studies could be used to expand our knowledge of *fbl*-MLST mappings, which would be extremely useful in the daily typing of *S. lugdunensis*. Notably, this could be particularly useful to detect putative clonal dissemination of methicillin resistant clones, as described in a tertiary medical center in Taiwan (Cheng et al., 2015).

The fact that *fbl*-typing can group isolates in congruence with MLST indicates that the *fbl* locus is non-recombinogenic in a clonal background. This region is not only variable enough to provide adequate strain discrimination but is also stable enough to group related strains and to be used as a typing tool. Analysis showed that repeat composition and organization, rather than the number of repeats, allowed a correlation between *fbl*-typing and MLST clustering, as described for *spa*-typing of *S. aureus* (Koreen et al., 2004). *fbl*-typing could represent a valuable tool able to simultaneously index genetic variations that accumulate both rapidly (repeat number variations) and slowly (point mutations) by two independent mechanisms. Thus, it could be useful in both long- and short-term epidemiological outbreaks and in population-based studies. Interestingly, *fbl*-typing had the same discriminatory power as TRST, while analyzing a single VNTR. This is probably because *fbl* repeats are more prone to duplication and deletion via slipped-strand mispairing as they are smaller (18-bp repeats) than those used for TRST (50 bp on average) (Dahyot et al., 2018).

**TABLE 5** | Bacterial adherence to immobilized fibrinogen.

Clinical isolate	fbl-type	Premature stop codon in fbl gene	MLST CC	Binding to solid-phase fibrinogen	Agglutination test	Clinical source	City
SL_T29	43g	–	1	+++****	Positive	Material device infection	Rouen
SL_R30	45l	–	ND	+++**	Positive	SSTI	Rouen
SL_V03	47b	–	3	+++**	Positive	SSTI	Strasbourg
SL_V74	45b	–	2	+++*	Positive	Bacteremia	Strasbourg
SL_T117	45f	–	1	+++*	Positive	Carriage	Kronoberg
SL_V51	45h	–	1	+++*	Positive	BJI	Strasbourg
SL_T118	40b	–	6	+	Negative	Carriage	Kronoberg
SL_T122	43g	–	1	+	Positive	Carriage	Tours
SL_V06	45c	–	2	+	Negative	Deep infection	Strasbourg
SL_R34	45f	–	ND	+	Positive	SSTI	Rouen
SL_V05	45g	–	1	+	Positive	Deep infection	Strasbourg
SL_V35	45i	–	1	+	Positive	Catheter related bacteremia	Strasbourg
SL_R44	47b	–	ND	+	Negative	Carriage	Rouen
SL_V34	52a	–	4	+	Positive	SSTI	Strasbourg
SL_V07	21a	L22STOP	1	+	Negative	Deep infection	Strasbourg
SL_V24	44a	L22STOP	1	+	Negative	BJI on material	Strasbourg
SL_C47	13a	–	3	–	Negative	Carriage	Strasbourg
SL_R59	13a	–	ND	–	Negative	BJI	Rouen
SL_R87	18a	–	ND	–	Negative	Carriage	Rouen
SL_V50	24a	–	3	–	Negative	BJI on material	Strasbourg
SL_R74	37a	–	ND	–	Negative	Carriage	Rouen
SL_DSM	41b	–	6	–	Positive	SSTI	Unknown
SL_T55	41b	–	6	–	Negative	SSTI	Nantes
SL_V70	41c	–	7	–	Negative	SSTI	Strasbourg
SL_C35	42a	–	3	–	Negative	Carriage	Strasbourg
SL_C72	42d	–	3	–	Negative	Carriage	Strasbourg
SL_R72	42f	–	ND	–	Negative	Deep infection	Rouen
SL_V78	43a	–	3	–	Negative	SSTI	Strasbourg
SL_R41	45b	–	ND	–	Negative	SSTI	Rouen
SL_V77	45d	–	7	–	Positive	Catheter related bacteremia	Strasbourg
SL_R29	45d	–	ND	–	Positive	Carriage	Rouen
SL_C42	45e	–	7	–	Positive	Carriage	Strasbourg
SL_V31	47a	–	3	–	Negative	Urinary infection	Strasbourg
SL_V10	47c	–	3	–	Negative	Material device infection	Strasbourg
SL_V21	47d	–	3	–	Negative	Catheter related bacteremia	Strasbourg
SL_V48	52a	–	4	–	Negative	Deep infection	Strasbourg
SL_R99	9a	–	ND	–	Negative	Carriage	Rouen
SL_T10	9a	–	Singleton	–	Negative	BJI	Rouen
SL_V81	30a	L22STOP	1	–	Negative	SSTI	Strasbourg
SL_V08	40c	L22STOP	1	–	Negative	SSTI	Strasbourg
SL_C60	43c	L22STOP	1	–	Negative	Carriage	Strasbourg
SL_V13	43c	L22STOP	1	–	Negative	BJI on material	Strasbourg
SL_V27	43c	L22STOP	1	–	Negative	BJI on material	Strasbourg
SL_V36	43c	L22STOP	1	–	Negative	BJI	Strasbourg
SL_V66	43c	L22STOP	1	–	Negative	BJI on material	Strasbourg
SL_T13	45f	L22STOP	1	–	Negative	Endocarditis	Rouen
SL_V09	45f	L22STOP	1	–	Negative	SSTI	Strasbourg
SL_V32	45f	L22STOP	1	–	Negative	SSTI	Strasbourg
SL_V64	45f	L22STOP	1	–	Negative	SSTI	Strasbourg
SL_V79	45f	L22STOP	1	–	Negative	Deep infection	Strasbourg

(Continued)

TABLE 5 | Continued

Clinical isolate	fbl-type	Premature stop codon in fbl gene	MLST CC	Binding to solid-phase fibrinogen	Agglutination test	Clinical source	City
SL_R15	45k	L22STOP	ND	–	Negative	Carriage	Rouen
SL_V38	46a	L22STOP	1	–	Negative	BJI on material	Strasbourg
SL_C62	46b	L22STOP	1	–	Negative	Carriage	Strasbourg
SL_V62	46c	L22STOP	1	–	Negative	SSTI	Strasbourg
SL_V33	45a	L22STOP	1	–	Negative	Deep infection	Strasbourg

The fibrinogen (Fg) binding analysis was performed in two independent experiments measured in at least five wells. Statistical differences compared to *S. aureus* DU5925 (negative control) used Dunnett's multiple comparisons test ( $P < 0.05$ ). "+++": *S. lugdunensis* strains that bound significantly to solid-phase Fg (ordinary one-way ANOVA: \*\*\*\* $P < 0.0001$ , \*\* $P < 0.001$ , and \* $P < 0.05$ ), "–": strains with binding inferior to the negative control and "+": others strains. CC, clonal complex; ND, not determined; SSTI, skin and soft tissue infection; BJI, bone and joint infection.

The major advantage of *fbl*-typing is that a single locus allows the retrieval of adequate typing information, relative to MLST and TRST, which require combined allelic information from seven loci. The use of a single locus marker is less costly, less time-consuming, and less error prone compared to multilocus techniques. Moreover, another advantage of *fbl*-typing is the unambiguity and portability of the sequence data obtained. We have developed an Internet Web site which facilitates information exchange between laboratories and the creation of a large-scale database to evaluate global (such as the study of internationally circulating clones) and local (such as transmission from patient to patient) epidemiology.

However, *fbl*-typing has some limitations. First, from a technical point of view *fbl*-typing may be more difficult than *spa*-typing, even though sequencing technology is improving, due to the large mean size of the amplified region (1180 bp), compared to that of *spa* (556 bp) (Shopsin et al., 1999). Moreover, for some clonal lineages, like CC1 and CC3, we have observed that although they span a wide variety of *fbl*-types, only a few of them seem able to spread efficiently in hospitals. For example, fbl47b was the most predominant *fbl*-type at Strasbourg University Hospital and at Rouen University Hospital, over different study periods. This was also demonstrated in a previous study by alternative typing methods such as TRST (Dahyot et al., 2018). The same phenomenon was described for *S. aureus* with the endemic spread of highly successful *spa* types, resulting in a potential lack of discrimination in local hospital epidemiology (Strommenger et al., 2008). However, the rapid expansion of whole genome sequencing will certainly overcome these limitations. A study has shown that *spa* typing by whole genome sequencing can reliably replace Sanger sequencing (Bartels et al., 2014). Thus, future *fbl*-types of worldwide *S. lugdunensis* isolates will certainly be identified by *in silico* analysis, with the advantage that other genes of interest can easily be analyzed, including genes used for typing like MLST and TRST genes, alternative polymorphic regions, virulence genes and resistance genes. These additional markers could be considered to improve the discriminatory ability of predominant *fbl*-types.

Since Fbl has been shown to be the major Fg-binding protein of *S. lugdunensis* (Marlinghaus et al., 2012), we sought to determine whether the genetic variability of *fbl* observed was

related to the ability of the isolates to bind to Fg. Some strains of *S. lugdunensis* could be misidentified as *S. aureus* using agglutination-based kits (Shin et al., 2007). Hence in our study, all isolates were first tested by latex agglutination assay. A positive clumping reaction was observed for 32% of the isolates, which was comparable to that obtained by one study (Szabados et al., 2011), but lower than that reported by others [64.7% (Mateo et al., 2005) and 83.7% (Iorio et al., 2007)]. As previously shown, these differences can be explained by the use of different commercial assays (Personne et al., 1997). Furthermore, even if Fbl was shown as the only Fg-binding surface protein of *S. lugdunensis* (Marlinghaus et al., 2012), other Fg-binding proteins could cross-react in these assays. Indeed, other genes encoding proteins potentially involved in Fg-binding have been described, as a putative Fg/fibronectin binding adhesin which is homologous to FbpA of *S. aureus* (Heilbronner et al., 2011; Szabados et al., 2011; Didi et al., 2014), AtLL (Hussain et al., 2015), and SlsD that has putative structural similarity to the Fg-binding domain of SdrG of *S. epidermidis* (Heilbronner et al., 2011). The ability of 55 isolates to promote adherence to immobilized human Fg showed that binding greatly varied according to the isolates, as described for *S. aureus* (Ythier et al., 2010). These differences in Fg-binding may be explained by several factors.

Our first hypothesis is based on the observation that some isolates revealed a key genetic difference in the 5'-end of the *fbl* gene. A deletion of 4 bp was observed, resulting in a frameshift mutation which potentially radically truncates the Fbl protein from 881 to 21 amino acids. Frameshift mutations tend to occur at repetitive DNA sequences when a misalignment produces either addition or deletion of nucleotides (Lovett, 2004). Here, the deletion occurred in the repeat motif AAAG (Figure 1B). We showed that isolates with this deletion bound to Fg significantly less strongly than the group of isolates without the deletion ( $P < 0.001$ ). To confirm these results, the expression of Fbl at the protein level should be performed by Western-blot analysis from both cellular and supernatant fractions. We predict that for isolates containing a frameshift mutation no Fbl protein will be detected in any cellular fraction. Furthermore, this deletion appeared interestingly to be highly CC-dependent, since it was observed only within CC1 except for one isolate. Most of the isolates belonging to ST6, which is the predicted founder of CC1, presented the deletion. Of note, the deletion was not found for

isolates belonging to ST1 and ST7 whereas ST12 and ST15 clones were uniformly associated with the deletion, all four STs evolving from ST6. Therefore, we can assume that this particular event might have arisen in some ST6 strains and has been “transmitted” to ST12 and ST15, constituting a special feature of these STs. This finding has to be confirmed in a larger collection of isolates.

A second explanation could be that the copy number of repeats in the *fbl* R-domain would affect the Fg-binding capacity. This region is thought to span the thick peptidoglycan layer of the cell wall and to allow exposure of the ligand-binding domain at the cell surface by analogy with other Sdr proteins (Hartford et al., 1997). Of note, although major variation exists at the DNA level, the R-domain is mainly constituted of the motif DSDSDA suggesting positive environmental selective pressure and the critical role of serine, aspartate, and alanine in the functionality of the protein. Moreover, many SD repeats are known to be required for functional expression of the ligand-binding domain of ClfA on the cell surface (Hartford et al., 1997). By analogy, it is possible that the length of the repeat domain within *fbl* is critical for protein function. Our findings show that isolates displaying fewer than 43 repeats were significantly weakly adherent to Fg. To confirm this trend and to determine the minimum length required to span the entire cell wall and to display the Fg-binding domain, it would be necessary to construct variants of Fbl with truncated R-domains.

However, some Fg-binding-negative isolates carried more than 43 repeats and did not have the deletion. These results could be explained by the loss or insufficient expression of the *fbl* gene. However, qRT-PCR results were not in favor of this hypothesis. Further analysis should be performed on a larger number of isolates. The last hypothesis is that the production of an extracellular matrix such as a capsule could mask the accessibility of the surface protein (Frank et al., 2008). Risley et al. (2007) described the inhibition of *S. aureus* ClfA-mediated binding to Fg and platelets by capsular polysaccharide expression, which cannot be overcome by a full length repeat region.

The genetic diversity of the *fbl* gene could make it an important target for adaptive evolution through host specialization and other environmental factors. Thus, it could influence the pathogenicity of *S. lugdunensis* by increasing fitness to colonize host surfaces or inducing infective endocarditis. Neither *fbl*-types nor Fg adherence phenotypes predicted clinical contexts. Notably, an infectious endocarditis isolate did not display Fg adhesion while a carrier isolate exhibited very strong adhesion. In *S. aureus*, ClfA was observed to be critical for valve colonization in rats with experimental endocarditis as well as septic arthritis in mice (Josefsson et al., 2001; Que et al., 2005). Conversely, the Fg-binding ability of *S. aureus* strains did not predict the outcome in a rat model of infective endocarditis (Ythier et al., 2010). Authors explained this apparent paradox by a possible differential gene expression *in vivo*, human host factors or adhesin redundancy. In a previous study, it was demonstrated that an *S. lugdunensis* mutant defective in the surface protein Fbl was not significantly less virulent than the wild-type strain in a rat endocarditis model, although a trend toward reduced virulence was observed (Heilbronner et al., 2013). However, only one clinical isolate, that caused a milder course of disease than

an *S. aureus* strain, was tested. Therefore, the virulence of other clinical isolates of *S. lugdunensis* and their *fbl* mutants should be compared in animal models of endocarditis but also in murine nasal colonization assays to study the implication of Fbl in adhesion to host surfaces.

## CONCLUSION

In conclusion, we have demonstrated that the repeat region of *fbl* is polymorphic enough to provide a useful target for the development of a single *locus* genotyping assay. *fbl*-typing is highly discriminating compared to MLST and equivalent to TRST even if only one *locus* is analyzed. Predicting CCs with high accuracy, *fbl*-typing could be a frontline tool for typing *S. lugdunensis* strains in both basic and applied research. The development of a free access Web tool to identify *fbl*-types enables the valuable exchange of information that can be used both in local epidemiology and in international multicenter surveillance of *S. lugdunensis* lineages. Moreover, we have shown that *S. lugdunensis* isolates displayed natural variability in their adherence to immobilized human Fg, which could be partly explained by some genetic variations in the *fbl* gene. It still remains to be determined whether *fbl* polymorphism influences the expression of Fbl protein on the cell surface and has an impact on the colonization of the host tissue and the subsequent development of infection.

## DATA AVAILABILITY

All datasets generated for this study are included in the manuscript and/or the **Supplementary Files** (<http://fbl-typing.univ-rouen.fr/>).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

SD, JL, PF, and MP-C designed the study. XA and GP provided the VISLISI clinical isolates. SD, JL, CD, and FL performed the experiments. SD and JL analyzed the data. SD, JL, and MP-C wrote the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

## FUNDING

This study was supported by an educational grant for JL from the Charles Nicolle Foundation.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the “Service Informatique de l’UFR Santé” of Rouen Normandy University (Florence Charles and Raphaël Chauvin) and Amandine Paulay for development



of the Web tool, Agnès Cottalorda for statistical analyses, and Eve-Julie Bonetti (GRL, Hospital of Geneva) for her contribution to adhesion experiments. The authors are grateful to Nikki Sabourin-Gibbs, Rouen University Hospital, for her help in editing the manuscript.

## REFERENCES

- Aanensen, D. M., and Spratt, B. G. (2005). The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Res.* 33, W728–W733. doi: 10.1093/nar/gki415
- Argemi, X., Prévost, G., Riegel, P., Provot, C., Badel-Berchoux, S., Jehl, F., et al. (2017). Kinetics of biofilm formation by *Staphylococcus lugdunensis* strains in bone and joint infections. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 88, 298–304. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.05.002
- Asadollahi, P., Farahani, N. N., Mirzaii, M., Khoramrooz, S. S., van Belkum, A., Asadollahi, K., et al. (2018). Distribution of the most prevalent spa types among clinical isolates of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* around the world: a review. *Front. Microbiol.* 9:163. doi: 10.3389/fmicb.2018.00163
- Bartels, M. D., Petersen, A., Worning, P., Nielsen, J. B., Larner-Svensson, H., Johansen, H. K., et al. (2014). Comparing whole-genome sequencing with sanger sequencing for spa typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 52, 4305–4308. doi: 10.1128/JCM.01979-14
- Beall, B., Facklam, R., and Thompson, T. (1996). Sequencing emm-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 34, 953–958.
- Becker, K., Heilmann, C., and Peters, G. (2014). Coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 870–926. doi: 10.1128/CMR.00109-13
- Benson, G. (1997). Sequence alignment with tandem duplication. *J. Comput. Biol.* 4, 351–367. doi: 10.1089/cmb.1997.4.351
- Bieber, L., and Kahlmeyer, G. (2010). *Staphylococcus lugdunensis* in several niches of the normal skin flora. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 385–388. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02813.x
- Chassain, B., Lemeé, L., Didi, J., Thiberge, J.-M., Brisse, S., Pons, J.-L., et al. (2012). Multilocus sequence typing analysis of *Staphylococcus lugdunensis* implies a clonal population structure. *J. Clin. Microbiol.* 50, 3003–3009. doi: 10.1128/JCM.00988-12
- Cheng, C., Liu, T., Yeh, C., Lee, M., Chang, S., and Lu, J. (2015). Persistence of a major endemic clone of oxacillin-resistant *Staphylococcus lugdunensis* sequence type 6 at a tertiary medical centre in northern Taiwan. *Int. J. Infect. Dis.* 36, 72–77. doi: 10.1016/j.ijid.2015.05.022
- Dahyot, S., Lebeurre, J., Argemi, X., François, P., Lemée, L., Prévost, G., et al. (2018). Multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) and Tandem repeat sequence typing (TRST), helpful tools for sub-typing *Staphylococcus lugdunensis*. *Sci. Rep.* 8:11669. doi: 10.1038/s41598-018-30144-y
- Didi, J., Lemeé, L., Gibert, L., Pons, J.-L., and Pestel-Caron, M. (2014). Multi-virulence-locus sequence typing of *Staphylococcus lugdunensis* generates results consistent with a clonal population structure and is reliable for epidemiological typing. *J. Clin. Microbiol.* 52, 3624–3632. doi: 10.1128/JCM.01370-14
- Frank, K. L., del Pozo, J. L., and Patel, R. (2008). From clinical microbiology to infection pathogenesis: how daring to be different works for *Staphylococcus lugdunensis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 111–133. doi: 10.1128/CMR.00036-07
- Frenay, H. M. E., Bunschoten, A. E., Schouls, L. M., Van Leeuwen, W. J., Vandenbroucke-Grauls, C., Verhoef, J., et al. (1996). Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15, 60–64.
- Golding, G. R., Campbell, J. L., Spreitzer, D. J., Veyhl, J., Surynicz, K., Simor, A., et al. (2008). A preliminary guideline for the assignment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to a Canadian pulsed-field gel electrophoresis epidemic type using spa typing. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 19, 273–281.
- Grundmann, H., Hori, S., and Tanner, G. (2001). Determining confidence intervals when measuring genetic diversity and the discriminatory abilities of typing methods for microorganisms. *J. Clin. Microbiol.* 39, 4190–4192. doi: 10.1128/JCM.39.11.4190-4192.2001
- Harmsen, D., Claus, H., Witte, W., Rothganger, J., Claus, H., Turnwald, D., et al. (2003). Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5442–5448. doi: 10.1128/JCM.41.12.5442-5448.2003
- Hartford, O., Francois, P., Vaudaux, P., and Foster, T. J. (1997). The dipeptide repeat region of the fibrinogen-binding protein (clumping factor) is required for functional expression of the fibrinogen-binding domain on the *Staphylococcus aureus* cell surface. *Mol. Microbiol.* 25, 1065–1076.
- Heilbronner, S., Hanses, F., Monk, I. R., Speziale, P., and Foster, T. J. (2013). Sortase A promotes virulence in experimental *Staphylococcus lugdunensis* endocarditis. *Microbiology* 159(Pt 10), 2141–2152. doi: 10.1099/mic.0.070292-0
- Heilbronner, S., Holden, M. T. G., van Tonder, A., Geoghegan, J. A., Foster, T. J., Parkhill, J., et al. (2011). Genome sequence of *Staphylococcus lugdunensis* N920143 allows identification of putative colonization and virulence factors. *FEMS Microbiol. Lett.* 322, 60–67. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02339.x
- Heilbronner, S., Monk, I. R., Brozyna, J. R., Heinrichs, D. E., Skaar, E. P., Peschel, A., et al. (2016). Competing for iron: duplication and amplification of the *isd* locus in *Staphylococcus lugdunensis* HKU09-01 provides a competitive advantage to overcome nutritional limitation. *PLoS Genet.* 12:e1006246. doi: 10.1371/journal.pgen.1006246
- Heldt Manica, L. A., and Cohen, P. R. (2017). *Staphylococcus lugdunensis* infections of the skin and soft tissue: a case series and review. *Dermatol. Ther.* 7, 555–562. doi: 10.1007/s13555-017-0202-5
- Hunter, P. R., and Gaston, M. A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26, 2465–2466.
- Hussain, M., Steinbacher, T., Peters, G., Heilmann, C., and Becker, K. (2015). The adhesive properties of the *Staphylococcus lugdunensis* multifunctional autolysin AtlL and its role in biofilm formation and internalization. *Int. J. Med. Microbiol.* 305, 129–139. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.11.010
- Iorio, N. L. P., Ferreira, R. B. R., Schuenck, R. P., Malvar, K. L., Brillhante, A. P., Nunes, A. P. F., et al. (2007). Simplified and reliable scheme for species-level identification of *Staphylococcus* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2564–2569. doi: 10.1128/JCM.00679-07
- Josefsson, E., Hartford, O., O'Brien, L., Patti, J. M., and Foster, T. (2001). Protection against experimental *Staphylococcus aureus* arthritis by vaccination with clumping factor A, a novel virulence determinant. *J. Infect. Dis.* 184, 1572–1580.
- Koreen, L., Ramaswamy, S. V., Graviss, E. A., Naidich, S., Musser, J. M., and Kreiswirth, B. N. (2004). spa typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. *J. Clin. Microbiol.* 42, 792–799. doi: 10.1128/JCM.42.2.792-799.2004
- Koreen, L., Ramaswamy, S. V., Naidich, S., Koreen, I. V., Graff, G. R., Graviss, E. A., et al. (2005). Comparative sequencing of the serine-aspartate repeat-encoding region of the clumping factor B Gene (*clfB*) for resolution within clonal groups of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 3985–3994. doi: 10.1128/JCM.43.8.3985-3994.2005
- Lovett, S. T. (2004). Encoded errors: mutations and rearrangements mediated by misalignment at repetitive DNA sequences: replication slippage. *Mol. Microbiol.* 52, 1243–1253. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04076.x
- Marlinghaus, L., Becker, K., Korte, M., Neumann, S., Gatermann, S. G., and Szabados, F. (2012). Construction and characterization of three knockout mutants of the *fbl* gene in *Staphylococcus lugdunensis*. *APMIS* 120, 108–116. doi: 10.1111/j.1600-0463.2011.02819.x
- Mateo, M., Maestre, J.-R., Aguilar, L., Cafini, F., Puente, P., Sánchez, P., et al. (2005). Genotypic versus phenotypic characterization, with respect to susceptibility and identification, of 17 clinical isolates of *Staphylococcus lugdunensis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 287–291. doi: 10.1093/jac/dki227

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01109/full#supplementary-material>

- McDevitt, D., and Foster, T. J. (1995). Variation in the size of the repeat region of the fibrinogen receptor (clumping factor) of *Staphylococcus aureus* strains. *Microbiology* 141, 937–943.
- Mitchell, J., Tristan, A., and Foster, T. J. (2004). Characterization of the fibrinogen-binding surface protein Fbl of *Staphylococcus lugdunensis*. *Microbiol. Read. Engl.* 150, 3831–3841. doi: 10.1099/mic.0.273737-0
- Nilsson, M., Bjerketorp, J., Guss, B., and Frykberg, L. (2004a). A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 241, 87–93. doi: 10.1016/j.femsle.2004.10.008
- Nilsson, M., Bjerketorp, J., Wiebensjö, Å, Ljungh, Å, Frykberg, L., and Guss, B. (2004b). A von willebrand factor-binding protein from *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 234, 155–161. doi: 10.1111/j.1574-6968.2004.tb09527.x
- Non, L. R., and Santos, C. A. Q. (2017). The occurrence of infective endocarditis with *Staphylococcus lugdunensis* bacteremia: a retrospective cohort study and systematic review. *J. Infect.* 74, 179–186. doi: 10.1016/j.jinf.2016.10.003
- Papapetropoulos, N., Papapetropoulou, M., and Vantarakis, A. (2013). Abscesses and wound infections due to *Staphylococcus lugdunensis*: report of 16 cases. *Infection* 41, 525–528. doi: 10.1007/s15010-012-0381-z
- Personne, P., Bes, M., Lina, G., Vandenesch, F., Brun, Y., and Etienne, J. (1997). Comparative performances of six agglutination kits assessed by using typical and atypical strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1138–1140.
- Que, Y.-A., Haefliger, J.-A., Piroth, L., François, P., Widmer, E., Entenza, J. M., et al. (2005). Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis. *J. Exp. Med.* 201, 1627–1635. doi: 10.1084/jem.20050125
- Risley, A. L., Loughman, A., Cywes-Bentley, C., Foster, T. J., and Lee, J. C. (2007). Capsular polysaccharide masks clumping factor a-mediated adherence of *Staphylococcus aureus* to fibrinogen and platelets. *J. Infect. Dis.* 196, 919–927. doi: 10.1086/520932
- Said, K. B., Ismail, J., Campbell, J., Mulvey, M. R., Bourgault, A.-M., Messier, S., et al. (2010). Regional profiling for determination of genotype diversity of mastitis-specific *Staphylococcus aureus* lineage in Canada by use of clumping factor A, pulsed-field gel electrophoresis, and spa typing. *J. Clin. Microbiol.* 48, 375–386. doi: 10.1128/JCM.01768-09
- Said, K. B., Ramotar, K., Zhu, G., and Zhao, X. (2009). Repeat-based subtyping and grouping of *Staphylococcus aureus* from human infections and bovine mastitis using the R-domain of the clumping factor A gene. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 63, 24–37. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.09.004
- Severiano, A., Pinto, F. R., Ramirez, M., and Carriço, J. A. (2011). Adjusted wallace coefficient as a measure of congruence between typing methods. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3997–4000. doi: 10.1128/JCM.00624-11
- Shin, J. H., Jung, H. J., Lee, H. R., Kim, J. H., Kim, H. R., and Lee, J. N. (2007). Prevalence, identification, and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus lugdunensis* from various clinical specimens in Korea. *Jpn. J. Infect. Dis.* 60, 312–313.
- Shopsin, B., Gomez, M., Montgomery, S. O., Smith, D. H., Waddington, M., Dodge, D. E., et al. (1999). Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3556–3563.
- Strommenger, B., Bräulke, C., Heuck, D., Schmidt, C., Pasemann, B., Nubel, U., et al. (2008). spa Typing of *Staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing. *J. Clin. Microbiol.* 46, 574–581. doi: 10.1128/JCM.01599-07
- Szabados, F., Nowotny, Y., Marlinghaus, L., Korte, M., Neumann, S., Kaase, M., et al. (2011). Occurrence of genes of putative fibrinogen binding proteins and hemolysins, as well as of their phenotypic correlates in isolates of *S. lugdunensis* of different origins. *BMC Res. Notes* 4:113. doi: 10.1186/1756-0500-4-113
- Tseng, C.-P., Cheng, J.-C., Tseng, C.-C., Wang, C., Chen, Y.-L., Chiu, D. T.-Y., et al. (2003). Broad-range ribosomal RNA real-time PCR after removal of DNA from reagents: melting profiles for clinically important bacteria. *Clin. Chem.* 49, 306–309.
- Van Belkum, A., Tassios, P. T., Dijkshoorn, L., Haegman, S., Cookson, B., Fry, N. K., et al. (2007). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 13, 1–46.
- Yeh, C.-F., Liu, T.-P., Cheng, C.-W., Chang, S.-C., Lee, M.-H., and Lu, J.-J. (2015). molecular characteristics of disease-causing and commensal *Staphylococcus lugdunensis* isolates from 2003 to 2013 at a tertiary hospital in Taiwan. *PLoS One* 10:e0134859. doi: 10.1371/journal.pone.0134859
- Ythier, M., Entenza, J. M., Bille, J., Vandenesch, F., Bes, M., Moreillon, P., et al. (2010). Natural variability of *in vitro* adherence to fibrinogen and fibronectin does not correlate with *in vivo* infectivity of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 78, 1711–1716. doi: 10.1128/IAI.01274-09
- Zaiß, N. H., Rupnik, M., Kuijper, E. J., Harmanus, C., Michielsen, D., Janssens, K., et al. (2009). Typing clostridium difficile strains based on tandem repeat sequences. *BMC Microbiol.* 9:6. doi: 10.1186/1471-2180-9-6
- Zinkernagel, A. S., Zinkernagel, M. S., Elzi, M. V., Genoni, M., Gubler, J., Zbinden, R., et al. (2008). Significance of *Staphylococcus lugdunensis* bacteremia: report of 28 cases and review of the literature. *Infection* 36, 314–321. doi: 10.1007/s15010-008-7287-9

**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 © 2019 Dahyot, Lebeurre, Laumay, Argemi, Dubos, Lemée, Prévost, François and Pestel-Caron. 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.

## Supplementary Material

### ***fbl*-typing of *Staphylococcus lugdunensis*: a frontline tool for epidemiological studies, but not predictive of fibrinogen binding ability**

Sandrine Dahyot\*, Jérémie Lebeurre, Floriane Laumay, Xavier Argemi, Charline Dubos,  
Ludovic Lemée, Gilles Prévost, Patrice François, Martine Pestel-Caron.

\*Corresponding author: [sandrine.dahyot@chu-rouen.fr](mailto:sandrine.dahyot@chu-rouen.fr)

**Table S1. Characteristics of the 240 *S. lugdunensis* isolates included in this study.**

ND: not determined. <sup>a</sup> N: negative, P: positive

Isolate ID	City	Clinical source	MLST		TRST	<i>fbl</i> -type	Premature stop codon in <i>fbl</i> gene	Agglutination test <sup>a</sup>
			Sequence type (ST)	Clonal complex (CC)	TRST type (TRT)			
<b>"TRST panel" (n = 128)</b>								
SL_V01	Strasbourg	Deep infection	5	5	10	41a	–	N
SL_V02	Strasbourg	Osteoarticular on material	1	1	41	45g	–	P
SL_V03	Strasbourg	Skin and soft tissue	3	3	1	47b	–	P
SL_V04	Strasbourg	Material device	3	3	1	47b	–	N
SL_V05	Strasbourg	Deep infection	1	1	40	45g	–	P
SL_V06	Strasbourg	Deep infection	2	2	2	45c	–	N
SL_V07	Strasbourg	Deep infection	6	1	8	21a	L22STOP	N
SL_V08	Strasbourg	Skin and soft tissue	15	1	47	40c	L22STOP	N
SL_V09	Strasbourg	Skin and soft tissue	6	1	8	45f	L22STOP	N
SL_V10	Strasbourg	Material device	3	3	1	47c	–	N
SL_V11	Strasbourg	Skin and soft tissue	5	5	7	41a	–	N
SL_V12	Strasbourg	Skin and soft tissue	5	5	7	41a	–	N
SL_V13	Strasbourg	Osteoarticular on material	12	1	3	43c	L22STOP	N
SL_V14	Strasbourg	Catheter related bacteremia	24	6	22	41b	–	P
SL_V15	Strasbourg	Osteoarticular on material	2	2	16	38a	–	N
SL_V16	Strasbourg	Skin and soft tissue	12	1	45	43c	L22STOP	N
SL_V17	Strasbourg	Osteoarticular	6	1	21	45f	–	P
SL_V18	Strasbourg	Deep infection	24	6	4	41b	–	P
SL_V19	Strasbourg	Osteoarticular on material	2	2	2	38b	–	N
SL_V20	Strasbourg	Skin and soft tissue	24	6	30	39a	–	P
SL_V21	Strasbourg	Catheter related bacteremia	3	3	1	47d	–	N
SL_V22	Strasbourg	Endocarditis	24	6	24	42b	–	N
SL_V23	Strasbourg	Osteoarticular on material	24	6	26	42c	–	N
SL_V24	Strasbourg	Osteoarticular on material	12	1	46	44a	L22STOP	N
SL_V25	Strasbourg	Osteoarticular on material	5	5	12	41a	–	N
SL_V26	Strasbourg	Skin and soft tissue	3	3	13	47b	–	N
SL_V27	Strasbourg	Osteoarticular on material	12	1	33	43c	L22STOP	N
SL_V28	Strasbourg	Material device	24	6	5	43b	–	P
SL_V29	Strasbourg	Urinary	24	6	5	43b	–	P
SL_V30	Strasbourg	Catheter related bacteremia	31	5	25	41a	–	N
SL_V31	Strasbourg	Urinary	3	3	1	47a	–	N
SL_V32	Strasbourg	Skin and soft tissue	6	1	3	45f	L22STOP	N
SL_V33	Strasbourg	Deep infection	6	1	28	45a	L22STOP	N
SL_V34	Strasbourg	Skin and soft tissue	4	4	48	52a	–	P
SL_V35	Strasbourg	Catheter related bacteremia	1	1	42	45i	–	P
SL_V36	Strasbourg	Osteoarticular	12	1	3	43c	L22STOP	N
SL_V37	Strasbourg	Endocarditis	1	1	18	45f	–	P
SL_V38	Strasbourg	Osteoarticular on material	6	1	20	46a	L22STOP	N
SL_V39	Strasbourg	Skin and soft tissue	24	6	5	43b	–	P
SL_V40	Strasbourg	Osteoarticular on material	1	1	43	39b	–	P
SL_V41	Strasbourg	Skin and soft tissue	3	3	1	47b	–	N
SL_V42	Strasbourg	Urinary	24	6	4	40b	–	P
SL_V43	Strasbourg	Osteoarticular	24	6	4	40b	–	N
SL_V44	Strasbourg	Osteoarticular	6	1	3	39c	–	P
SL_V45	Strasbourg	Osteoarticular	24	6	4	41b	–	P
SL_V46	Strasbourg	Deep infection	24	6	27	41b	–	N
SL_V47	Strasbourg	Osteoarticular	3	3	1	47a	–	N
SL_V48	Strasbourg	Deep infection	4	4	49	52a	–	N
SL_V49	Strasbourg	Osteoarticular	2	2	2	38a	–	N
SL_V50	Strasbourg	Osteoarticular on material	3	3	1	24a	–	N
SL_V51	Strasbourg	Osteoarticular	6	1	35	45h	–	P

SL_V52	Strasbourg	Osteoarticular on material	1	1	19	35a	–	P
SL_V53	Strasbourg	Osteoarticular	2	2	2	45b	–	N
SL_V54	Strasbourg	Osteoarticular	5	5	23	41a	–	N
SL_V55	Strasbourg	Osteoarticular	31	5	11	41a	–	N
SL_V56	Strasbourg	Material device	3	3	17	13a	–	N
SL_V57	Strasbourg	Deep infection	1	1	44	21b	–	P
SL_V58	Strasbourg	Catheter related bacteremia	4	4	50	49a	–	N
SL_V59	Strasbourg	Osteoarticular on material	3	3	1	47b	–	N
SL_V60	Strasbourg	Skin and soft tissue	2	2	2	36a	–	N
SL_V61	Strasbourg	Osteoarticular on material	3	3	1	47b	–	N
SL_V62	Strasbourg	Skin and soft tissue	15	1	36	46c	L22STOP	N
SL_V63	Strasbourg	Deep infection	2	2	2	34a	–	N
SL_V64	Strasbourg	Skin and soft tissue	6	1	32	45f	L22STOP	N
SL_V65	Strasbourg	Osteoarticular	28	Singleton	15	48a	–	P
SL_V66	Strasbourg	Osteoarticular on material	12	1	3	43c	L22STOP	N
SL_V67	Strasbourg	Skin and soft tissue	3	3	1	45j	–	N
SL_V68	Strasbourg	Deep infection	2	2	2	38c	–	N
SL_V69	Strasbourg	Urinary	28	Singleton	14	48b	–	P
SL_V70	Strasbourg	Skin and soft tissue	27	7	9	41c	–	N
SL_V71	Strasbourg	Skin and soft tissue	2	2	2	23a	–	N
SL_V72	Strasbourg	Skin and soft tissue	3	3	1	47b	–	N
SL_V73	Strasbourg	Urinary	5	5	38	41a	–	P
SL_V74	Strasbourg	Bacteremia	2	2	51	45b	–	P
SL_V75	Strasbourg	Skin and soft tissue	2	2	2	40a	–	N
SL_V76	Strasbourg	Deep infection	3	3	1	47b	–	N
SL_V77	Strasbourg	Catheter related bacteremia	26	7	39	45d	–	P
SL_V78	Strasbourg	Skin and soft tissue	3	3	1	43a	–	N
SL_V79	Strasbourg	Deep infection	6	1	31	45f	L22STOP	N
SL_V80	Strasbourg	Osteoarticular on material	6	1	6	45f	–	P
SL_V81	Strasbourg	Skin and soft tissue	6	1	6	30a	L22STOP	N
SL_V82	Strasbourg	Skin and soft tissue	1	1	34	25a	–	P
SL_C08	Strasbourg	Carriage	3	3	1	47b	–	N
SL_C18	Strasbourg	Carriage	6	1	29	45f	L22STOP	N
SL_C21	Strasbourg	Carriage	3	3	1	47a	–	N
SL_C22	Strasbourg	Carriage	3	3	1	47b	–	N
SL_C27	Strasbourg	Carriage	3	3	1	47b	L22STOP	N
SL_C35	Strasbourg	Carriage	3	3	37	42a	–	N
SL_C42	Strasbourg	Carriage	26	7	52	45e	–	P
SL_C47	Strasbourg	Carriage	3	3	1	13a	–	N
SL_C60	Strasbourg	Carriage	12	1	3	43c	L22STOP	N
SL_C62	Strasbourg	Carriage	15	1	6	46b	L22STOP	N
SL_C68	Strasbourg	Carriage	2	2	2	38a	–	N
SL_C71	Strasbourg	Carriage	27	7	9	41c	–	N
SL_C72	Strasbourg	Carriage	3	3	1	42d	–	N
SL_C75	Strasbourg	Carriage	3	3	1	47b	–	P
SL_C77	Strasbourg	Carriage	3	3	1	47b	–	P
SL_C85	Strasbourg	Carriage	3	3	1	13a	–	N
SL_T02	Rouen	Endocarditis	8	2	58	45b	–	N
SL_T03	Rouen	Bacteremia	9	4	68	23b	–	P
SL_T09	Rouen	Bacteremia	5	5	53	42e	–	N
SL_T10	Rouen	Osteoarticular	13	Singleton	60	9a	–	N
SL_T119	Kronoberg	Carriage	1	1	61	45g	–	P
SL_T21	Rouen	Deep infection	10	6	62	42b	–	N
SL_T27	Rouen	Osteoarticular on material	4	4	67	49a	–	P
SL_T37	Rouen	Catheter related bacteremia	16	3	59	47b	–	N
SL_T53	Nantes	Material device	3	3	1	39d	–	N
SL_T56	Nantes	Osteoarticular	14	2	2	45b	–	P
SL_T59	Nantes	Skin and soft tissue	6	1	64	45f	L22STOP	P
SL_T62	Bordeaux	Bacteremia	17	4	66	49a	–	P

SL_T66	Bordeaux	Bacteremia	18	5	10	41a	–	N
SL_T68	Bordeaux	Bacteremia	7	1	65	44c	–	P
SL_T73	Nancy	Bacteremia	19	2	56	42h	–	N
SL_T74	Nancy	Skin and soft tissue	12	1	3	43c	L22STOP	P
SL_T76	Nancy	Osteoarticular	20	3	57	47b	–	P
SL_T84	Montpellier	Deep infection	15	1	69	45f	L22STOP	N
SL_T85	Montpellier	Osteoarticular on material	2	2	2	45o	–	N
SL_AP1	Rouen	Osteoarticular	3	3	1	47b	–	N
SL_AP2	Rouen	Osteoarticular	3	3	1	47b	–	P
SL_CB1	Rouen	Bacteremia	15	1	55	46d	L22STOP	N
SL_CB2	Rouen	Bacteremia	15	1	55	46d	L22STOP	N
SL_CJ1	Rouen	Deep infection	24	6	63	41b	–	P
SL_CJ2	Rouen	Bacteremia	24	6	63	41b	–	P
SL_DJ1	Rouen	Endocarditis	32	2	2	38a	–	N
SL_DJ2	Rouen	Endocarditis	32	2	2	38a	–	N
SL_LJ1	Rouen	Deep infection	2	2	2	41d	–	N
SL_LJ2	Rouen	Deep infection	2	2	2	41d	–	N
SL_DSM		Skin and soft tissue	24	6	54	41b	–	P

**Other isolates (n = 112)**

SL_T117	Kronoberg	Carriage	1	1	ND	45f	–	P
SL_T118	Kronoberg	Carriage	10	6	ND	40b	–	N
SL_T122	Tours	Carriage	1	1	ND	43g	–	P
SL_T13	Rouen	Endocarditis	6	1	ND	45f	L22STOP	N
SL_T29	Rouen	Material device	1	1	ND	43g	–	P
SL_T55	Nantes	Skin and soft tissue	10	6	ND	41b	–	N
SL_R01	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	43c	ND	N
SL_R02	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	43c	ND	P
SL_R03	Rouen	Endocarditis	ND	ND	ND	43c	ND	N
SL_R04	Rouen	Endocarditis	ND	ND	ND	43c	ND	P
SL_R05	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	45b	ND	N
SL_R06	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	45b	ND	P
SL_R07	Rouen	Material device	ND	ND	ND	14a	ND	N
SL_R08	Rouen	Material device	ND	ND	ND	14a	ND	N
SL_R09	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	30b	ND	N
SL_R10	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	30b	ND	N
SL_R11	Rouen	Bacteremia	ND	ND	ND	47b	–	P
SL_R12	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	44f	ND	P
SL_R13	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	44d	ND	P
SL_R14	Rouen	Skin and soft tissue	ND	ND	ND	45f	ND	N
SL_R15	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	45k	L22STOP	N
SL_R16	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	44e	ND	N
SL_R17	Rouen	Unknown	ND	ND	ND	41e	ND	P
SL_R18	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	45b	ND	N
SL_R19	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	47b	ND	N
SL_R20	Rouen	Skin and soft tissue	ND	ND	ND	47b	ND	N
SL_R21	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	45f	ND	N
SL_R22	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	24b	ND	N
SL_R23	Rouen	Osteoarticular	ND	ND	ND	49a	ND	P
SL_R24	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	43c	ND	N
SL_R25	Rouen	Osteoarticular	ND	ND	ND	47b	ND	N
SL_R26	Rouen	Skin and soft tissue	ND	ND	ND	49b	ND	P
SL_R27	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	41a	ND	P
SL_R28	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	42g	ND	N
SL_R29	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	45d	–	P
SL_R30	Rouen	Skin and soft tissue	ND	ND	ND	45l	–	P
SL_R31	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	38a	ND	N
SL_R32	Rouen	Unknown	ND	ND	ND	41c	ND	N
SL_R33	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	45f	ND	P
SL_R34	Rouen	Skin and soft tissue	ND	ND	ND	45f	–	P

SL_R35	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	49c	ND	P
SL_R36	Rouen	Unknown	ND	ND	ND	43d	ND	P
SL_R37	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	41a	ND	N
SL_R38	Rouen	Skin and soft tissue	ND	ND	ND	48c	ND	N
SL_R39	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	47b	ND	N
SL_R40	Rouen	Skin and soft tissue	ND	ND	ND	41b	ND	P
SL_R41	Rouen	Skin and soft tissue	ND	ND	ND	45b	–	N
SL_R42	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	47b	ND	N
SL_R43	Rouen	Unknown	ND	ND	ND	29a	ND	N
SL_R44	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	47b	–	N
SL_R45	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	47b	ND	P
SL_R46	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	47c	ND	N
SL_R47	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	47b	ND	N
SL_R48	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	46e	ND	N
SL_R49	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	41a	ND	N
SL_R50	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	47b	ND	N
SL_R51	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	45m	ND	P
SL_R52	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	46e	ND	N
SL_R53	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	47b	ND	N
SL_R54	Rouen	Unknown	ND	ND	ND	45f	ND	P
SL_R55	Rouen	Unknown	ND	ND	ND	47b	ND	N
SL_R56	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	47b	ND	N
SL_R57	Rouen	Skin and soft tissue	ND	ND	ND	47b	ND	N
SL_R58	Rouen	Skin and soft tissue	ND	ND	ND	47b	ND	N
SL_R59	Rouen	Osteoarticular	ND	ND	ND	13a	–	N
SL_R60	Rouen	Skin and soft tissue	ND	ND	ND	45f	ND	P
SL_R61	Rouen	Skin and soft tissue	ND	ND	ND	46f	ND	N
SL_R62	Rouen	Skin and soft tissue	ND	ND	ND	42b	ND	N
SL_R63	Rouen	Skin and soft tissue	ND	ND	ND	43c	ND	N
SL_R64	Rouen	Skin and soft tissue	ND	ND	ND	41a	ND	N
SL_R65	Rouen	Skin and soft tissue	ND	ND	ND	36b	ND	P
SL_R66	Rouen	Deep infection	ND	ND	ND	49a	ND	N
SL_R67	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	49d	ND	P
SL_R68	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	44b	ND	P
SL_R69	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	40b	ND	P
SL_R70	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	45f	ND	P
SL_R71	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	45b	ND	N
SL_R72	Rouen	Deep infection	ND	ND	ND	42f	–	N
SL_R73	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	47b	ND	N
SL_R74	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	37a	–	N
SL_R75	Rouen	Deep infection	ND	ND	ND	45b	ND	P
SL_R76	Rouen	Skin and soft tissue	ND	ND	ND	47b	ND	N
SL_R77	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	47b	ND	N
SL_R78	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	46f	ND	N
SL_R79	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	45j	ND	N
SL_R80	Rouen	Skin and soft tissue	ND	ND	ND	45f	ND	N
SL_R81	Rouen	Osteoarticular	ND	ND	ND	43e	ND	N
SL_R82	Rouen	Endocarditis	ND	ND	ND	47b	ND	N
SL_R83	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	41b	ND	P
SL_R84	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	45f	ND	N
SL_R85	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	33a	ND	N
SL_R86	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	45f	ND	N
SL_R87	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	18a	–	N
SL_R88	Rouen	Skin and soft tissue	ND	ND	ND	20a	ND	N
SL_R89	Rouen	Skin and soft tissue	ND	ND	ND	45f	ND	P
SL_R90	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	47b	ND	N
SL_R91	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	47b	ND	N
SL_R92	Rouen	Deep infection	ND	ND	ND	47b	ND	N
SL_R93	Rouen	Carriage	ND	ND	ND	52a	ND	N

<b>SL_R94</b>	Rouen	Carriage	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	47b	<i>ND</i>	N
<b>SL_R95</b>	Rouen	Carriage	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	43f	<i>ND</i>	N
<b>SL_R96</b>	Rouen	Unknown	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	47b	<i>ND</i>	N
<b>SL_R97</b>	Rouen	Carriage	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	47b	<i>ND</i>	N
<b>SL_R98</b>	Rouen	Carriage	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	41b	<i>ND</i>	P
<b>SL_R99</b>	Rouen	Carriage	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	9a	–	N
<b>SL_R100</b>	Rouen	Carriage	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	41f	<i>ND</i>	N
<b>SL_R101</b>	Rouen	Skin and soft tissue	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	45n	<i>ND</i>	N
<b>SL_R102</b>	Rouen	Skin and soft tissue	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	23b	<i>ND</i>	N
<b>SL_R103</b>	Rouen	Osteoarticular	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	47b	<i>ND</i>	N
<b>SL_R104</b>	Rouen	Skin and soft tissue	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	41g	<i>ND</i>	N
<b>SL_R105</b>	Rouen	Bacteremia	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	45b	<i>ND</i>	P
<b>SL_R106</b>	Rouen	Osteoarticular	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	45f	<i>ND</i>	N

---



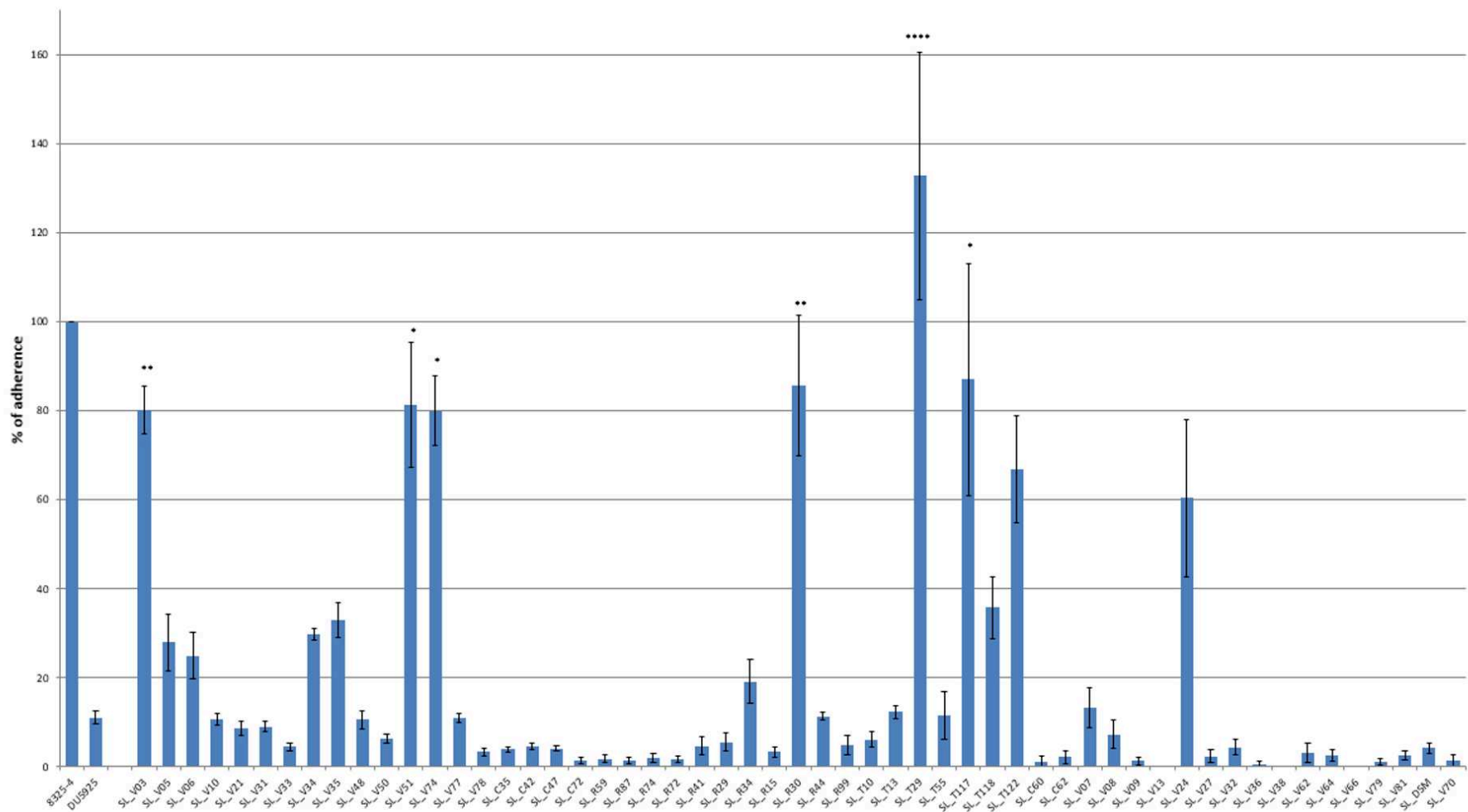
**Table S2. DNA and amino acid sequences of the 54 individual *fbl* repeats and their numeric codes identified from the 240 *S. lugdunensis* isolates studied.**

Repeat code	DNA sequence	Amino Acid Sequence	Repeat code	DNA sequence	Amino Acid Sequence
0	GATTCCGATAGTGATGCA	DSDSDA	27	GACTCCGACAGTGACGCG	DSDSDA
1	GACTCCGATAGTGATGCA	DSDSDA	28	TATTCCGATAGCGACGCA	YSDSDA
2	GATTCCGACAGTGATGCA	DSDSDA	29	GATTCCGACAGTGACGCA	DSDSDA
3	GATTCCGATAGTGACGCA	DSDSDA	30	GAATCAGATAGCGATGCA	ESDSDA
4	GATTCCGATAGCGATGCA	DSDSDA	31	GACTCCGATAGCGATGCA	DSDSDA
5	GACTCCGATAGTGACGCA	DSDSDA	32	GACTCCGACAGTGATGCA	DSDSDA
6	GATTCCGATAGCGACGCA	DSDSDA	33	GACTTAGATAGTGACGCA	DLSDSA
7	GATTCCGACAGCGATGCA	DSDSDA	34	GATTCCGACAGTGATGCG	DSDSDA
8	GATTCCGACAGCGACGCA	DSDSDA	35	GATTCCGATAGTGATTCA	DSSDS
9	GACTCCGACAGCGATGCA	DSDSDA	36	GACTCTGACAGTGACGCA	DSDSDA
10	GACTCCGACAGCGACGCA	DSDSDA	37	GACTCCGATAGTAATGCG	DSDSNA
11	GATTCCGATAGTGATGCG	DSDSDA	38	GACTCTGACAGCGATGCG	DSDSDA
12	GACTCCGATAGTGATGCG	DSDSDA	39	GACTCCGATAGTGACGCG	DSDSDA
13	GACTCCGACAGTGATGCG	DSDSDA	40	GATTCAGACAGCGATGCA	DSDSDA
14	GATTCCGACAGCGATGCG	DSDSDA	41	GATTCTGACAGCGACACA	DSSDT
15	GATTCAGACAGCGATGCG	DSDSDA	42	GACTCCGACAGCGATGTG	DSSDV
16	GATTCTGACAGTGATGCG	DSDSDA	43	GACTCTGACAGCGACGCA	DSDSDA
17	GACTCTGACAGTGATGCG	DSDSDA	44	GACTCAGATAGTGATTCA	DSSDS
18	GACTCAGATAGTGACGCA	DSDSDA	45	GATTCTGACAGCAATTCC	DSDNS
19	GACTCAGATAGCGATGCA	DSDSDA	46	GGTCCGACAGCAATGTG	GSNSV
20	GACTCAGATAGCGACGCA	DSDSDA	47	GACTCAGACAGCGACGCA	DSDSDA
21	GATTCTGACAGCGACGCA	DSDSDA	48	GACTCAGATAGCGATGCG	DSDSDA
22	GATTCAGACAGCGACGCA	DSDSDA	49	GACACAGATAGTGACGCA	DTSDA
23	GACTCCGACAGCGATGCG	DSDSDA	50	AATTCCGATAGTGATGCA	NSSDA
24	GACTCCGACAGTGACGCA	DSDSDA	51	GAGTCAGATAGCGATGCA	ESDSDA
25	GACTCAGATAGTGATGCA	DSDSDA	52	GATTCCGACAGTGACGCG	DSDSDA
26	GACTCCGATAGCGACGCA	DSDSDA	53	GCATGGGATAGTGATGCA	AWSDA

**Table S3. List of the 92 *fbl*-types identified from the 240 *S. lugdunensis* isolates studied, and preliminary guideline for the assignment of MLST clonal complexes (CCs) using *fbl*-typing.**  
 CC\*: CC predicted from the repeat alignment of the *fbl*-types.  
 ST: sequence type

<i>fbl</i> -type	<i>fbl</i> cluster	Repeat succession	CC	ST
<i>fbl21a</i>	–	0-6-13-1-7-18-2-11-17-12-13-5-14-10-0-30-6-45-46-44	CC1	ST6
<i>fbl21b</i>	–	0-6-13-1-7-18-2-11-17-12-13-5-14-18-16-20-9-6-45-46-44	CC1	ST1
<i>fbl25a</i>	–	0-6-13-1-7-18-2-11-17-12-13-5-14-10-0-19-6-11-8-0-9-6-45-46-44	CC1*	ST1
<i>fbl29a</i>	–	0-6-13-1-7-18-2-11-17-12-13-5-14-10-0-19-6-11-8-0-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC1*	–
<i>fbl30a</i>	–	0-6-13-1-7-18-2-11-38-10-0-19-6-11-8-0-9-6-21-0-10-19-18-16-20-9-6-45-46-44	CC1*	–
<i>fbl35a</i>	–	0-6-13-1-7-18-2-11-17-12-13-5-14-10-0-19-6-21-0-10-19-18-16-20-16-19-15-19-22-2-3-4-18-16-44	CC1	ST1
<i>fbl39b</i>	–	0-6-13-1-7-1-7-18-14-10-0-19-6-11-8-0-9-6-21-0-10-19-18-16-20-16-19-15-19-8-2-18-16-20-9-6-45-46-44	CC1	ST1
<i>fbl39c</i>	–	0-7-18-2-11-17-12-13-5-14-10-19-18-16-20-16-20-0-9-19-18-16-20-16-19-15-19-22-2-3-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC1	ST6
<i>fbl40c</i>	–	0-11-17-12-13-5-14-10-0-19-6-11-8-0-9-6-21-0-10-19-18-16-20-16-19-15-19-22-2-3-4-18-16-20-16-19-6-45-46-44	CC1	ST15
<i>fbl41c</i>	1	0-6-13-1-7-18-34-12-13-5-14-10-0-19-6-11-10-0-9-6-21-0-10-19-18-16-19-15-19-22-2-3-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC1*	–
<i>fbl41g</i>	1	0-6-13-1-7-18-2-11-17-12-13-5-14-10-0-19-6-11-8-0-9-6-21-0-10-19-18-16-20-16-19-15-19-22-3-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC1*	–
<i>fbl43c</i>	1	0-6-13-1-7-18-2-11-17-12-13-5-14-10-0-19-6-11-8-0-9-6-21-0-10-19-18-16-19-15-19-22-2-3-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC1	ST12
<i>fbl43e</i>	1	0-6-13-1-7-18-2-11-17-12-13-5-14-10-0-19-6-11-8-0-9-6-21-0-10-19-18-16-19-15-19-22-2-3-10-18-16-20-9-6-45-46-44	CC1*	–
<i>fbl43g</i>	–	0-6-13-5-18-2-11-17-12-13-5-14-10-0-19-6-11-8-0-9-6-21-1-10-19-18-16-20-16-19-15-19-22-2-3-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC1	ST1
<i>fbl44a</i>	1	0-6-13-1-7-18-2-11-17-12-13-5-14-10-0-19-6-11-8-0-9-6-21-0-10-19-18-16-19-15-19-22-2-3-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC1	ST12
<i>fbl44b</i>	1	0-6-13-1-7-18-2-11-17-13-5-14-10-0-19-6-11-10-0-9-6-21-0-10-19-18-16-20-16-19-15-19-22-2-3-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC1*	–
<i>fbl44c</i>	1	0-6-13-1-7-18-2-11-0-13-5-14-10-0-19-6-11-8-0-9-6-21-0-10-19-18-16-20-16-19-15-19-22-2-3-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC1	ST7
<i>fbl44d</i>	1	0-6-13-1-7-18-2-11-12-13-5-14-10-0-19-6-11-8-0-9-6-21-0-10-19-18-16-20-16-19-15-19-22-2-3-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC1*	–
<i>fbl44e</i>	1	0-6-13-1-7-18-2-11-17-12-13-5-14-10-0-6-11-8-0-9-6-21-0-10-19-18-16-20-16-19-15-19-22-2-3-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC1*	–
<i>fbl44f</i>	1	6-13-1-7-18-2-11-17-12-13-5-14-10-0-19-6-11-8-0-9-6-21-0-10-19-18-16-20-16-19-15-19-22-2-3-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC1*	–
<i>fbl45a</i>	1	0-6-13-1-7-18-2-11-17-13-5-14-10-0-19-6-11-8-0-9-6-21-0-10-19-18-16-20-16-19-15-19-22-2-3-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC1	ST6
<i>fbl45f</i>	1	0-6-13-1-7-18-2-11-17-12-13-5-14-10-0-19-6-11-8-0-9-6-21-0-10-19-18-16-20-16-19-15-19-22-2-3-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC1	ST1, ST6, ST15
<i>fbl45g</i>	1	0-6-13-1-7-18-2-11-17-12-13-5-14-10-0-19-6-11-8-0-9-6-21-1-10-19-18-16-20-16-19-15-19-22-2-3-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC1	ST1
<i>fbl45h</i>	1	0-6-13-1-7-18-2-11-17-12-13-5-14-43-0-19-6-11-8-0-9-6-21-0-10-19-18-16-20-16-19-15-19-22-2-3-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC1	ST6
<i>fbl45i</i>	1	0-6-13-1-7-18-2-11-17-12-13-5-14-10-0-19-6-11-8-0-9-6-21-0-10-19-18-16-20-16-19-15-19-22-2-3-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC1	ST1
<i>fbl45j</i>	1	0-6-13-1-7-49-2-11-17-12-13-5-14-10-0-19-6-11-8-0-9-6-21-0-10-19-18-16-20-16-19-15-19-22-2-3-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC1*	–
<i>fbl45l</i>	1	0-6-13-1-7-18-2-11-17-12-13-5-14-10-0-19-6-11-8-0-9-6-21-0-10-19-18-16-20-16-19-15-19-22-2-5-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC1*	–
<i>fbl45m</i>	1	0-6-13-1-7-18-2-11-17-12-13-5-14-10-0-19-6-11-8-0-9-6-21-0-10-19-18-16-20-16-19-15-19-8-2-3-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC1*	–
<i>fbl45n</i>	–	0-6-13-1-7-18-2-11-17-12-13-5-14-10-0-31-6-11-8-0-9-6-21-0-10-19-18-16-20-16-19-15-19-22-2-3-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC1*	–
<i>fbl46a</i>	1	0-6-13-1-7-18-2-11-17-12-13-5-14-10-0-19-6-11-8-0-9-6-21-0-10-19-18-16-20-16-19-15-19-22-2-3-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC1	ST6
<i>fbl46b</i>	1	0-6-13-1-7-18-2-11-17-12-13-5-14-10-0-19-6-11-8-0-9-6-21-0-10-19-18-16-20-16-19-15-19-22-2-3-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC1	ST15
<i>fbl46c</i>	8	0-6-13-1-7-18-2-11-17-12-13-5-14-10-0-19-6-13-8-0-9-6-21-0-10-19-18-16-20-16-19-15-19-22-2-3-4-18-16-20-16-19-6-45-46-44	CC1	ST15
<i>fbl46d</i>	8	0-6-13-1-7-18-2-11-17-12-13-5-14-10-0-19-6-11-8-0-9-6-21-0-10-19-18-16-20-16-19-15-19-8-2-3-4-18-16-20-16-19-6-45-46-44	CC1	ST15
<i>fbl46e</i>	8	0-6-13-1-7-18-2-11-17-12-13-5-14-10-0-19-6-11-8-0-9-6-21-0-10-19-18-16-20-16-19-15-19-22-2-3-4-18-16-20-16-19-6-45-46-44	CC1*	–
<i>fbl46f</i>	8	0-6-13-1-7-18-2-11-17-12-13-5-14-10-0-19-6-11-10-0-9-6-21-0-10-19-18-16-20-16-19-15-19-22-2-3-4-18-16-20-16-19-6-45-46-44	CC1*	–
<i>fbl23a</i>	–	0-28-20-23-1-7-5-7-11-26-12-0-6-20-23-9-11-13-13-26-45-46-44	CC2	ST2
<i>fbl20b</i>	–	0-28-20-23-1-7-26-23-12-1-7-18-7-11-13-18-23-10-0-19-8-19-9-11-13-13-26-45-46-44	CC2*	–
<i>fbl33a</i>	6	0-28-20-23-12-1-7-18-7-11-13-18-23-10-0-19-3-0-27-29-0-18-27-7-8-19-9-11-13-26-45-46-44	CC2*	–
<i>fbl34a</i>	6	0-28-20-23-12-1-7-18-7-11-13-18-23-10-0-19-3-0-27-29-0-18-7-7-8-19-9-11-13-13-26-45-46-44	CC2	ST2
<i>fbl36a</i>	6	0-28-20-23-1-7-26-23-12-1-7-18-7-11-13-18-23-10-0-19-3-0-27-29-0-18-7-8-19-9-11-13-26-45-46-44	CC2	ST2
<i>fbl38a</i>	6	0-28-20-23-1-7-26-23-12-1-7-18-7-11-13-18-23-10-0-19-3-0-27-29-0-18-7-7-8-19-9-11-13-13-26-45-46-44	CC2	ST2, ST32
<i>fbl38b</i>	6	0-28-20-23-1-7-26-23-12-1-7-18-7-11-13-18-23-10-0-19-3-0-27-29-0-33-7-7-8-19-9-11-13-13-26-45-46-44	CC2	ST2
<i>fbl38c</i>	6	0-7-26-23-1-7-26-23-12-1-7-18-7-11-13-18-23-10-0-19-3-0-27-29-0-18-7-7-8-19-9-11-13-13-26-45-46-44	CC2	ST2
<i>fbl40a</i>	5	0-28-20-23-26-12-0-6-20-23-12-1-7-18-7-11-13-18-23-10-0-19-3-0-27-29-0-18-7-7-8-19-9-11-13-13-26-45-46-44	CC2	ST2
<i>fbl41d</i>	–	0-28-20-23-1-7-5-7-11-26-12-0-6-20-23-12-1-7-18-23-10-0-19-3-0-27-29-0-18-7-7-8-19-9-11-13-13-26-45-46-44	CC2	ST2
<i>fbl42h</i>	–	0-28-20-23-1-7-5-7-11-26-12-0-6-20-23-12-1-7-18-7-11-13-18-23-10-0-19-3-0-27-29-7-7-8-19-9-11-13-26-45-46-44	CC2	ST19
<i>fbl45b</i>	5	0-28-20-23-1-7-5-7-11-26-12-0-6-20-23-12-1-7-18-7-11-13-18-23-10-0-19-3-0-27-29-0-18-7-7-8-19-9-11-13-13-26-45-46-44	CC2	ST2, ST8, ST14
<i>fbl45c</i>	5	0-28-20-23-1-7-5-7-11-26-12-0-6-20-23-12-1-7-18-7-11-13-18-23-10-0-19-3-0-27-29-0-18-7-7-8-19-9-11-13-13-26-45-46-44	CC2	ST2
<i>fbl45o</i>	–	0-28-20-23-1-7-18-7-11-26-12-0-6-20-23-12-1-7-18-7-11-13-18-23-10-0-19-3-0-27-29-0-18-7-8-19-9-11-13-13-26-45-46-44	CC2	ST2
<i>fbl13a</i>	–	0-6-20-23-12-1-7-20-7-18-14-26-44	CC3	ST3
<i>fbl18a</i>	–	0-6-20-23-12-1-7-20-7-11-13-18-14-10-0-11-26-44	CC3*	–
<i>fbl24a</i>	–	0-6-18-7-8-20-23-25-7-8-20-23-25-7-8-19-23-25-7-7-18-14-26-44	CC3	ST3
<i>fbl24b</i>	–	50-6-20-23-12-1-7-20-7-8-20-23-25-7-8-19-23-25-7-7-18-14-26-44	CC3*	–
<i>fbl37a</i>	–	0-6-20-23-12-1-7-20-7-11-13-18-14-10-0-11-9-11-8-0-23-1-27-21-1-18-7-8-20-23-25-7-7-18-14-26-44	CC3*	–
<i>fbl39d</i>	–	0-6-20-23-12-1-7-20-7-11-13-18-14-10-0-52-21-1-18-7-8-20-23-25-7-8-20-23-25-7-8-19-23-25-7-7-18-14-26-44	CC3	ST3
<i>fbl42a</i>	–	0-6-20-23-12-1-7-20-7-11-13-18-14-10-0-11-9-20-27-21-1-18-7-8-20-23-25-8-20-23-25-7-8-19-23-25-7-7-18-14-26-44	CC3	ST3
<i>fbl42b</i>	–	0-6-20-23-12-1-7-20-7-11-13-18-14-10-0-11-9-11-8-0-23-1-27-21-1-18-7-8-20-23-25-7-8-20-23-25-7-8-19-23-26-44	CC3	ST3
<i>fbl42f</i>	–	0-6-20-23-12-1-7-20-7-11-13-18-14-10-0-11-9-11-8-0-23-1-27-21-1-25-7-8-20-23-25-7-8-19-23-25-7-7-18-14-26-44	CC3*	–
<i>fbl42g</i>	–	0-6-20-7-11-13-18-14-10-0-11-9-11-8-0-23-1-27-21-1-18-7-8-20-23-25-7-8-20-23-25-7-8-19-23-25-7-7-18-14-26-44	CC3*	–
<i>fbl43a</i>	–	0-6-20-23-12-1-7-20-7-11-13-18-14-10-0-11-9-11-8-0-23-1-27-21-1-18-7-8-20-23-25-7-8-19-23-25-7-7-18-14-26-44	CC3	ST3
<i>fbl45j</i>	2	0-6-20-23-12-1-7-20-7-11-13-18-14-10-0-11-9-11-8-0-23-1-27-21-1-18-7-8-20-23-25-7-8-20-23-25-7-8-19-23-25-7-7-26-44	CC3	ST3
<i>fbl47a</i>	2	0-6-20-23-12-1-7-20-7-11-13-18-14-10-0-11-9-11-8-0-23-1-27-21-1-18-7-8-20-14-25-7-8-20-23-25-7-8-19-23-25-7-7-18-14-26-44	CC3	ST3
<i>fbl47b</i>	2	0-6-20-23-12-1-7-20-7-11-13-18-14-10-0-11-9-11-8-0-23-1-27-21-1-18-7-8-20-23-25-7-8-20-23-25-7-8-19-23-25-7-7-18-14-26-44	CC3	ST3, ST16, ST20
<i>fbl47c</i>	2	0-6-20-23-12-1-7-20-7-11-13-18-14-10-0-11-9-11-8-0-23-1-27-21-1-18-7-8-20-23-25-7-8-20-23-1-7-8-19-23-25-7-7-18-14-26-44	CC3	ST3
<i>fbl47d</i>	2	0-6-20-10-11-7-18-20-7-11-13-18-14-10-0-11-9-11-8-0-23-1-27-21-1-18-7-8-20-23-25-7-8-20-23-25-7-8-19-23-25-7-7-18-14-26-44	CC3	ST3
<i>fbl48c</i>	2	0-6-20-23-12-1-7-20-7-11-13-18-14-10-0-11-9-11-8-0-23-1-27-21-1-18-7-8-20-23-25-7-8-20-23-25-7-8-19-23-25-7-7-18-14-26-44	CC3*	–
<i>fbl23b</i>	–	53-23-1-9-11-13-12-13-5-14-10-0-31-6-14-1-27-2-11-20-45-46-44	CC4	ST9
<i>fbl49a</i>	7	0-6-23-1-7-18-7-11-13-13-12-5-14-10-0-19-6-11-8-0-23-1-27-2-11-20-21-1-8-19-34-19-7-21-11-19-9-21-2-3-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC4	ST4, ST17
<i>fbl49b</i>	7	0-6-23-1-7-18-7-11-13-13-12-5-14-10-0-19-6-11-8-0-23-1-27-2-0-20-21-1-8-19-34-19-7-21-11-19-9-21-2-3-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC4*	–
<i>fbl49c</i>	7	0-6-23-1-7-18-7-11-13-13-12-5-14-10-0-51-6-11-8-0-23-1-27-2-11-20-21-1-8-19-34-19-7-21-11-19-9-21-2-3-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC4*	–
<i>fbl49d</i>	7	0-6-23-1-7-18-7-11-13-13-12-5-14-10-0-19-6-11-8-0-23-1-27-2-11-20-21-1-8-19-34-19-7-21-11-19-9-21-2-3-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC4*	–
<i>fbl52a</i>	7	0-6-23-1-6-23-1-7-18-7-11-13-13-12-5-14-10-0-19-6-11-8-0-23-1-27-2-11-20-21-1-8-19-34-19-7-21-11-19-9-21-2-3-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC4	ST4
<i>fbl14a</i>	–	0-6-20-23-1-14-20-9-11-13-26-45-46-44	CC5*	–
<i>fbl20a</i>	–	0-11-20-24-0-18-8-20-23-25-7-8-19-9-11-13-26-45-46-44	CC5*	–
<i>fbl1a</i>	4	0-6-20-23-1-14-20-9-11-13-5-14-10-0-19-6-7-8-14-13-5-7-11-20-24-0-18-8-20-23-25-7-8-19-9-11-13-26-45-46-44	CC5	ST5, ST18, ST31
<i>fbl41f</i>	–	0-6-20-23-1-14-20-9-11-13-5-14-10-0-25-6-4-7-4-13-5-7-11-20-24-0-18-8-20-23-25-7-8-19-9-11-13-26-45-46-44	CC5*	–
<i>fbl42e</i>	4	0-6-20-23-1-14-20-9-11-13-5-14-10-0-19-6-7-8-14-13-5-7-11-20-24-0-18-8-20-23-25-7-8-19-9-11-13-26-45-46-44	CC5	ST5
<i>fbl36b</i>	–	0-6-23-31-6-11-8-0-23-1-9-11-13-12-13-5-14-10-0-31-6-14-32-27-2-11-20-21-1-8-20-31-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC6*	–
<i>fbl39a</i>	–	0-6-23-31-6-11-8-0-42-1-9-11-13-13-5-14-10-0-31-6-14-32-27-2-11-20-21-1-8-20-31-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC6	ST24
<i>fbl40b</i>	3	0-6-23-31-6-11-8-0-23-1-9-11-13-12-13-5-14-10-0-31-6-14-32-27-2-11-20-21-1-8-20-31-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC6	ST10, ST24
<i>fbl41b</i>	3	0-6-23-31-6-11-8-0-23-1-9-11-13-12-13-5-14-10-0-31-6-14-32-27-2-11-20-21-1-8-20-31-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC6	ST10, ST24
<i>fbl42c</i>	3	0-6-23-31-6-11-8-0-23-1-9-11-13-12-13-5-14-10-0-31-6-14-32-27-2-11-20-21-1-8-20-31-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC6	ST10, ST24
<i>fbl42d</i>	3	0-6-23-31-6-11-8-0-23-1-9-11-32-12-13-5-14-10-0-31-6-14-32-27-2-11-20-21-1-8-20-31-4-18-16-20-9-6-45-46-44	CC6	ST24
<i>fbl43b</i>	3	0-6-23-31-6-11-8-6-11-8-0-23-1-9-11-13-13-5-14-10-0-31-6-14		

**Figure S1. Adherence of 55 *S. lugdunensis* isolates to immobilized fibrinogen.** *S. aureus* 8325-4 was used as positive control (adherent); *S. aureus* DU5925 was used as a negative one (non-adherent). Adherence of isolates was expressed relative to that of 8325-4 (100%). Results were expressed as mean percentages +/- standard error of mean. Statistical differences compared to DU5925 used Dunnett's multiple comparisons test ( $P < 0.05$ ). Ordinary one-way ANOVA:  $P < 0.0001$  \*\*\*\*.



### 3.3. Discussion et perspectives

Dans l'objectif de mieux comprendre la structure de population de *S. lugdunensis* et le lien entre lignées phylogénétiques et virulence, deux méthodes de typage basées sur le séquençage ont été précédemment développées par l'équipe GRAM EA2656, la MLST et la MVLST (Chassain et al., 2012; Didi et al., 2014). Les analyses phylogénétiques ont révélé une structure de population clonale de cette espèce et la présence de lignées dominantes. Des méthodes permettant de discriminer les clones prévalents identifiés par MLST, tout en afférant les isolats aux CCs déjà caractérisés, sont apparues nécessaires.

Les VNTRs sont de bons candidats pour développer ce type d'approche. En effet, ces *loci* sont connus pour présenter une évolution rapide, et la mesure des polymorphismes dans ces régions répétées chez des micro-organismes clonaux peut constituer une base solide pour l'affectation à des lignées phylogénétiques connues (van Belkum, 2007; Melles et al., 2009). Ainsi, nous avons développé et évalué deux approches de typage basées sur l'analyse de *loci* de VNTRs :

- Une première approche *multilocus*, au cours de laquelle sept VNTRs ont été séquencés, permettant la mise au point de la méthode classique de **MLVA** basée sur l'évaluation du nombre de répétitions des *loci* de VNTRs, mais également la méthode plus innovante de **TRST** basée sur l'analyse des séquences nucléotidiques de ces VNTRs.
- Une approche de séquençage d'un seul *locus* hautement polymorphe : le ***fbl*-typing**, basée sur l'analyse du domaine R du gène *fbl*.

Nous discuterons en parallèle le développement de ces nouvelles méthodes de typage, leurs performances ainsi que leurs apports dans l'épidémiologie moléculaire des infections à *S. lugdunensis*.

#### 3.3.1. Développement et validation des méthodes de typage

Pour développer ces nouvelles méthodes, nous nous sommes conformés aux recommandations générales émises par van Belkum et al. sur le développement et l'application d'une méthode de typage (van Belkum et al., 2007), ainsi qu'aux recommandations de Nadon spécifiques au développement de méthodes MLVA (Nadon et al., 2013).

### **Choix du soucier**

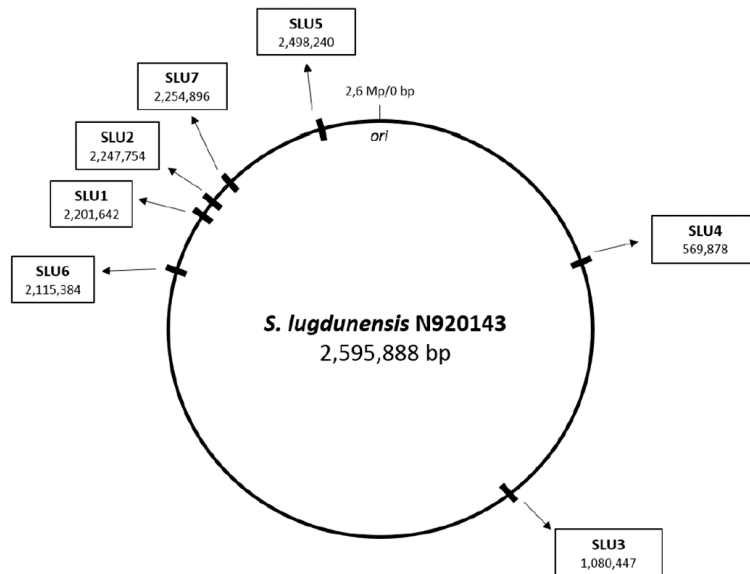
Lors du développement de nouvelles méthodes de typage, il est en premier lieu essentiel de bien choisir la population bactérienne à tester. Cette population doit comporter deux panels ([van Belkum et al., 2007](#); [Nadon et al., 2013](#)).

Un premier panel, appelé « **panel test** », permet d'évaluer la typabilité, le pouvoir discriminant et la concordance épidémiologique de la méthode de typage. Cette population doit comporter des souches caractérisées phylogénétiquement au préalable et représentatives de la diversité génétique de l'espèce. Elle doit comprendre des souches non liées épidémiologiquement ainsi que des isolats liés épidémiologiquement. Nous avons ainsi sélectionné 30 isolats préalablement caractérisés par MLST et MVLST représentatifs des principaux STs, CCs et VTs. Ne disposant pas de souches responsables d'épidémies hospitalières, nous avons choisi comme isolats liés épidémiologiquement des paires d'isolats collectées chez cinq patients à des intervalles de temps allant de zéro à 17 jours. Sur la base de cette population test, nous avons établi que les méthodes MLVA/TRST et *fbl-typing* répondaient bien aux critères *sus*-cités.

La méthode développée doit ensuite être appliquée à une collection plus **large** d'isolats cliniques, avec des critères d'inclusion bien définis. Pour le développement de la MLVA/TRST, 98 isolats cliniques de *S. lugdunensis* collectés prospectivement entre 2013 et 2016 au CHU de Strasbourg ([Argemi et al., 2017c](#)) ont été analysés, auxquels ont été ajoutés pour le développement du *fbl-typing* 106 isolats collectés rétrospectivement chez 101 patients au CHU de Rouen en 2016. Six souches, qui avaient été séquencées par la technologie *Pacific Biosciences* dans notre laboratoire, ont également été incluses. Au total, 128 isolats ont été typés par MLST, MVLST *trilocus*, MLVA/TRST et *fbl-typing*, et 112 autres n'ont été typés que par *fbl-typing*. Nous avons ainsi pu évaluer le pouvoir discriminant de chaque méthode et comparer les regroupements phylogénétiques obtenus.

### **Sélection des loci de VNTRs**

La première étape de développement d'un schéma de MLVA est l'identification et la sélection des VNTRs. Une centaine de *loci* de TRs par souche a tout d'abord été identifié *in silico* sur la base des génomes de *S. lugdunensis* disponibles. Au final, sept VNTRs (SLU1 à SLU7) ont été sélectionnés pour le développement des schémas de MLVA/TRST, répartis sur le génome de *S. lugdunensis* (**Figure 76**).



**Figure 76.** Localisation des *loci* de *variable number of tandem repeats* (VNTRs) utilisés dans le schéma *multiple-locus VNTR analysis* (MLVA) dans le génome de la souche *S. lugdunensis* N920143.

De façon intéressante, le schéma MLVA propose un ensemble de VNTRs avec des DI très différents (de 0,090 à 0,679). Les marqueurs avec un *DI* modéré ( $< 0,5$ ) définissent les *clusters*, alors que les VNTRs affichant une plus grande diversité et une évolution plus rapide reflètent la variabilité au sein des *clusters*.

En outre, ce schéma est proche de ceux développés chez *S. aureus* (Schouls et al., 2009) et *S. epidermidis* (Johansson et al., 2006) en termes de nombre de *loci* de VNTRs et d'indices de diversité. Cependant, la taille des motifs répétés est globalement assez homogène dans notre schéma (environ 50 pb), alors qu'elle est plus hétérogène chez *S. aureus* (de neuf à 81) et *S. epidermidis* (18 à 58 pb). De plus, chez *S. epidermidis*, le schéma MLVA développé par Johansson et al. comprend trois VNTRs ayant un motif répété de 18 pb (Johansson et al., 2006), pouvant expliquer le fort pouvoir discriminant de ce schéma lorsqu'il a été appliqué dans des études ultérieures (Asadollahi et al., 2018a; Cremeniter et al., 2013). En effet, les *loci* de VNTRs comportant un motif répété de petite taille sont plus sujets aux variations du nombre de répétitions *via* le mécanisme SSM (cf paragraphe 2.3.1.2) (van Belkum et al., 1998; Koreen et al., 2004). Un *locus* de VNTR de notre schéma (SLU7) était particulièrement peu discriminant, en MLVA comme en TRST, malgré un motif répété de seulement 24 pb. Cela pourrait être expliqué par le fait qu'il est situé dans un gène codant le régulateur transcriptionnel putatif AraC, et donc potentiellement soumis à une forte pression de sélection purificatrice.

Lors de l'analyse des génomes de *S. lugdunensis*, un *locus* de VNTR particulièrement polymorphique a été identifié : le domaine R du gène *fbl*. Nous avons choisi de l'exclure du schéma MLVA/TRST afin de proposer un schéma de typage basé sur ce seul *locus*, le *fbl-typing*. Fbl appartient à la famille des Sdr, constituant une sous-famille des MSCRAMMs. Les VNTRs situés dans des gènes codant des protéines de surface sont attrayants car ces protéines interagissant avec l'environnement sont potentiellement plus variables (Zhou et al., 2014). Ils ont été explorés pour le génotypage d'autres espèces en raison de leurs polymorphismes à la fois dans le nombre de copies et dans la séquence des répétitions ; ils sont par exemple à la base des méthodes de *spa*, *clfA* et *clfB typing* chez *S. aureus* (Koreen et al., 2005; Said et al., 2010; Shopsin et al., 1999) et *sdrG typing* chez *S. epidermidis* (Monk and Archer, 2007).

Parmi les VNTRs identifiés *in silico*, certains n'ont pas été retenus du fait de leur trop grande taille pour permettre une amplification et un séquençage dans des conditions « classiques ». Parmi eux, figuraient notamment les régions répétées des gènes *sls* codant des protéines de surface putatives (cf paragraphe 3.1.3 de la partie 1). Ces VNTRs pourraient être intéressants à inclure dans de futurs schémas de TRST basés sur des approches NGS. D'autre part, les VNTRs dont la taille était inférieure ou égale à 18 pb n'ont pas été retenus pour notre schéma MLVA, pour éviter une trop grande instabilité. Cependant, des VNTRs avec des motifs répétés <18 pb, et en particulier des microsatellites, pourraient être intéressants à implémenter dans notre schéma MLVA pour gagner en discrimination, comme dans le schéma de typage proposé pour *Brucella sp.* reposant sur 15 marqueurs dont sept microsatellites ayant un pouvoir discriminant élevé (Le Flèche et al., 2006).

#### ***Un haut pouvoir discriminant des nouvelles méthodes reposant sur des marqueurs stables***

Les nouvelles méthodes de typage MLVA/TRST et *fbl-typing* se sont révélées très discriminantes par rapport à la MLST. Ce phénomène de meilleure discrimination des techniques de typage utilisant les VNTRs par rapport aux gènes domestiques a été démontré pour d'autres espèces comme *S. aureus* (Schouls et al., 2009), *S. agalactiae* (Haguenoer et al., 2011) ou *L. monocytogenes* (Ohshima et al., 2017).

De façon intéressante, bien que suffisamment variables pour permettre une discrimination adéquate, un regroupement similaire des isolats a été obtenu quelles que soient les méthodes. En effet, la TRST comme le *fbl-typing* prédisaient les CCs définis par MLST dans 100% des cas. De plus, les regroupements basés sur les données MLVA étaient presque identiques lors de l'utilisation des algorithmes UPGMA et *minimum spanning tree*. Ces résultats confirment la

rareté du phénomène de recombinaison chez *S. lugdunensis*, et suggèrent que les *loci* ciblés par ces méthodes ont la stabilité nécessaire *in vivo* pour être utilisés en tant qu'outil de typage. Cette stabilité des marqueurs a de plus été confirmée *in vitro*.

### ***MLVA et TRST, deux méthodes complémentaires***

Une limite rapportée dans la littérature pour la MLVA concerne la concordance épidémiologique, qui peut être remise en cause en raison du phénomène d'**homoplasie** de taille (Estoup et al., 2002). Ce phénomène se traduit par l'observation d'un même nombre de répétitions pour un *locus* de VNTR chez deux isolats, alors qu'ils appartiennent à des lignées phylogénétiques différentes. Ces isolats peuvent ainsi être considérés identiques par erreur. Ces évolutions convergentes sont liées à l'instabilité du nombre des répétitions des VNTRs ainsi qu'à leur évolution possiblement sélective (par exemple, un certain profil de répétitions pourra être sélectionné positivement dans un environnement donné) (Johansson et al., 2006). L'homoplasie individuelle de certains *locus* de VNTR peut cependant être compensée par l'analyse d'un grand nombre de *loci* (Vergnaud and Pourcel, 2009) ou par leur séquençage (Rakov et al., 2011; Visca et al., 2011).

Ainsi, dans notre étude, le séquençage Sanger a été choisi non seulement comme méthode d'analyse du nombre de répétitions, mais également pour détecter des polymorphismes nucléotidiques au sein des VNTRs, moins sujets à l'homoplasie. La TRST s'est avérée plus discriminante que la MLVA ; en effet, un quart des allèles classés comme identiques par la MLVA « conventionnelle » (même nombre de répétitions pour chaque *locus*) présentaient des différences en termes de séquences nucléotidiques. Dans la plupart des cas, ces différences n'entraînaient cependant pas d'erreur de classification des isolats. En effet, comme observé sur le *minimum spanning tree* construit à partir des données de MLVA, chaque MT était associé à un seul CC de MLST. Une exception était à noter, un isolat appartenant au CC2 de MLST appartenait au MT2 et aurait donc été classé par erreur dans le CC3 par MLVA. La MLVA peut donc être considérée comme une technique fiable d'afférence phylogénétique ; la TRST présente quant à elle un intérêt lorsque la micro-résolution des souches est recherchée.

Peu d'études ont évalué des schémas de TRST comparativement à d'autres méthodes de typage chez d'autres espèces bactériennes. La TRST a par exemple été appliquée à l'agent pathogène du poisson *F. noatunensis*, permettant de typer les souches avec un pouvoir discriminant suffisant pour étudier des épidémies de francisellose en Norvège, mais sans être comparée à d'autres méthodes de typage (Brevik et al., 2011). Chez *C. difficile*, un schéma basé sur



l'analyse de séquences répétées de deux *loci* (TR6 et TR10) a montré une très bonne concordance avec les résultats de PCR *ribotyping* tout en présentant un pouvoir discriminant identique (ZaiSS et al., 2009).

Dans notre étude, l'intérêt de tout de même proposer un schéma classique de MLVA en *sus* du schéma de TRST est la possibilité future de l'appliquer sans avoir recours au séquençage Sanger. Nous avons évalué que la combinaison de seulement cinq des sept *loci* de VNTRs permet un regroupement très similaire des isolats, tout en ne diminuant que légèrement la capacité discriminatoire. Cette version simplifiée de MLVA à cinq *loci* pourrait ainsi permettre le développement de PCR multiplexes couplées à des amorces fluorescentes pour la détermination de la taille des allèles par électrophorèse capillaire.

### ***fbl*-typing, les avantages d'un outil de typage basé sur un seul locus**

Le principal avantage du *fbl*-typing est que les informations de typage sont obtenues à partir d'un seul *locus*, par opposition aux techniques de MLST et TRST qui nécessitent la combinaison d'informations alléliques provenant de sept *loci*. L'utilisation d'un seul marqueur est par nature moins coûteuse et moins chronophage que les techniques *multilocus*. De plus, un autre avantage du *fbl*-typing est la non-ambiguïté et l'exportabilité des données de séquence obtenues. Nous avons en effet développé en collaboration avec le service informatique de l'UFR Santé de l'université de Rouen un site *Web* permettant d'attribuer des *fbl*-types en ligne à partir des données de séquence FASTA, et de télécharger les *fbl*-types disponibles.

Le *fbl*-typing s'est montré aussi discriminant que la TRST, tout en n'analysant qu'un seul *locus*. Ceci est probablement dû au fait que les répétitions de *fbl* sont plus sujettes aux phénomènes d'excisions et de duplications *via* le mécanisme de glissement de l'ADN polymérase SSM car elles sont plus petites (18 bp) que celles utilisées pour la TRST (50 pb en moyenne) (van Belkum et al., 1998). De plus, jusqu'à 52 répétitions étaient observées pour le *locus fbl*, alors que le nombre maximal pour la TRST était atteint pour le *locus* SLU3 avec 11 répétitions. Or, il est admis que plus le nombre de répétitions est élevé pour un *locus* de VNTR, plus celui-ci est soumis à variations (Gemayel et al., 2010).

L'analyse par *minimum spanning tree* des données de *fbl*-typing a révélé que la composition et l'organisation des répétitions, plutôt que le nombre de répétitions, permettaient une corrélation avec les CCs de MLST. Cela a été décrit pour le *spa* typing de *S. aureus*, où l'affectation au sein des complexes se fait *via* les SNPs des motifs répétés, tandis que les variations intra-complexes sont liées à la perte ou au gain de répétitions. Ceci suggère que les mutations ponctuelles se

produisent à un taux beaucoup plus faible que la variation du nombre de répétitions (Koreen et al., 2004). Ce phénomène a d'ailleurs été détecté *in vivo* chez des isolats séquentiels de *S. aureus* provenant de colonisations ou d'infections pulmonaires chroniques de patients atteints de mucoviscidose, chez lesquels les variations du nombre de répétitions liées au SSM étaient plus fréquentes que les mutations ponctuelles (Kahl et al., 2005).

Le *fbl-typing* apparaît donc comme une technique capable d'indexer simultanément les variations génétiques qui s'accumulent rapidement (nombre de répétitions) et lentement (mutations) par deux mécanismes indépendants ; ce qui lui permet d'être utilisé dans des analyses épidémiologiques à court et à long terme.

Les *clusters* des *fbl-types* ont été définis à l'aide du logiciel BioNumerics®, qui utilise l'algorithme DSI (*duplications, substitutions and indels [insertions or deletions]*) pour l'alignement des répétitions (Benson, 1997). Bien que les *clusters* obtenus soient concordants avec les CCs de MLST, certaines limites ont été observées, notamment pour les *fbl-types* contenant un faible nombre de répétitions. En effet, lorsque le nombre de répétitions était inférieur à 30, les *fbl-types* n'étaient jamais assignés à un *cluster* ; ils étaient localisés de façon « centrale » dans le *minimum spanning tree*, sans réelle signification évolutive. Une meilleure définition de ces *clusters* pourrait être envisagée en se basant sur le modèle d'évolution EDSI (*excisions, duplications, substitutions and indels*), qui en plus du modèle DSI prend en compte les phénomènes d'excisions des répétitions en tandem (Sammeth et al., 2005). Par exemple, chez *S. aureus*, les *spa types* sont assignés en *spa complexes* par utilisation de l'algorithme BURP, qui constitue une variante heuristique de l'algorithme EDSI (Mellmann et al., 2007). L'algorithme BURP a été développé de façon à assigner les *spa complexes* de façon automatisée et objective, tout en reflétant l'évolution à long terme des populations de *S. aureus*, en congruence avec les données de MLST (Mellmann et al., 2007; Strommenger et al., 2006). Un algorithme de ce type pourrait ainsi être développé et implémenté sur le *fbl-typing Server* pour permettre l'attribution en ligne de *fbl-complexes* prédisant les CCs de MLST.

Au total, les méthodes de typage basées sur les VNTRs que nous avons développées pour la première fois chez l'espèce *S. lugdunensis* respectent les critères de performance émis par van Belkum et al., résumés dans le **Tableau 9** (van Belkum et al., 2007). Au vu de l'ensemble des critères habituellement utilisés pour décrire une méthode de typage, le *fbl-typing* apparaît comme un outil utilisable en première ligne pour le génotypage d'isolats de *S. lugdunensis*.

	MLA/TRST	<i>fbl</i> -typing
<b>Critères de performance</b>		
Population test	✓ OK	✓ OK
Stabilité	✓ OK	✓ OK
Typabilité	✓ OK	✓ OK
Reproductibilité	✓ OK	✓ OK
Pouvoir discriminant	✓ OK	✓ OK
Concordance épidémiologique	✓ OK	✓ OK
<b>Autres critères</b>		
Rapidité		✓ OK
Coût		✓ OK
Facilité d'utilisation		✓ OK
Objectivité des résultats	✓ OK	✓ OK
Exportabilité des résultats	✓ OK	✓ OK

**Tableau 9.** Critères des méthodes de typage basées sur les *variable number of tandem repeats* (VNTRs) développées chez *S. lugdunensis* d'après ceux de van Belkum et al. (van Belkum et al., 2007).

### 3.3.2. Données épidémiologiques générées par ces nouvelles méthodes

#### *Des géotypes prévalents quelles que soient les méthodes de typage*

Au sein des 98 isolats de *S. lugdunensis* collectés de façon prospective au CHU de Strasbourg et des 106 collectés rétrospectivement au CHU de Rouen, les **CC1** ( $n = 31$  et  $38$  respectivement) et **CC3** ( $n = 26$  et  $38$  respectivement) étaient les CCs les plus fréquemment identifiés, comme déjà observé dans d'autres études (Ho et al., 2015; Yeh et al., 2016). Au sein de ces CCs, les STs les plus prévalents sont les fondateurs de ces complexes, ST6 et ST3 respectivement.

Nous avons démontré que les techniques de typage de TRST et *fbl*-typing permettaient l'identification d'une grande variété de géotypes au sein de ces CCs prédominants. Cependant, seuls quelques-uns d'entre eux semblaient avoir la capacité de diffuser efficacement. L'exemple le plus notable est la prévalence du géotype **fbl47b**, prédominant au CHU de Strasbourg (13/98 - 13%) comme au CHU de Rouen (29/125 - 23%), sur des périodes d'étude prolongées. Le même phénomène a été décrit chez *S. aureus*, pour lequel la propagation endémique de certains *spa* types peut finalement conduire à une diminution de la discrimination de la méthode lors d'études épidémiologiques locales (Strommenger et al., 2008). Pour surmonter cette limitation, des études suggèrent l'utilisation d'une combinaison de différents marqueurs de typage pour augmenter la capacité de discrimination des isolats (Koreen et al., 2005; Kuhn et al., 2007).

De façon intéressante, le génotype fbl47b n'est que très peu subdivisé lorsque l'on combine les méthodes de typage. En effet, 14 isolats sur les 17 appartenant au fbl47b typés par l'ensemble des méthodes possèdent le même profil (à savoir ST3, CC3, VT<sup>T</sup>16, MT1, TRT1) ; ils peuvent ainsi être considérés comme appartenant à un clone. Deux études asiatiques ont précédemment identifié des clones endémiques de *S. lugdunensis* résistants à l'oxacilline dans des centres médicaux. La première, menée sur une période de quatre mois, a identifié un clone de ST3, CC3 chez des souches de *S. lugdunensis* de portage (Ho et al., 2015). La deuxième a identifié un clone de ST6, CC1 chez des souches de *S. lugdunensis* collectées d'infections sur une période de 40 mois (Cheng et al., 2015). Ces résultats sont comparables aux nôtres où le fbl47b a été isolé à plusieurs reprises sur une période de 12 mois à Rouen et 29 mois à Strasbourg. Cependant, les isolats de *S. lugdunensis* de notre étude n'étaient pas multi-résistants aux antibiotiques ; leur persistance n'est donc pas directement liée à la pression des antibiotiques. Cela suggère que certaines souches de *S. lugdunensis* pourraient être capables de s'implanter dans une niche écologique telle que le milieu hospitalier.

Kassem et al. ont d'ailleurs montré que les surfaces environnementales hospitalières peuvent être contaminées par *S. lugdunensis*, des souches ayant été identifiées dans 14 échantillons sur les 30 prélevés dans des chambres de patients (Kassem et al., 2011). Ce taux était équivalent à celui observé pour *S. epidermidis* (16 échantillons positifs sur les 30) et bien supérieur à celui observé pour *S. aureus* (un seul échantillon positif). Bien que cette étude n'ait pas typé les souches, elle souligne le risque de transmission en milieu hospitalier de ces espèces de SCN.

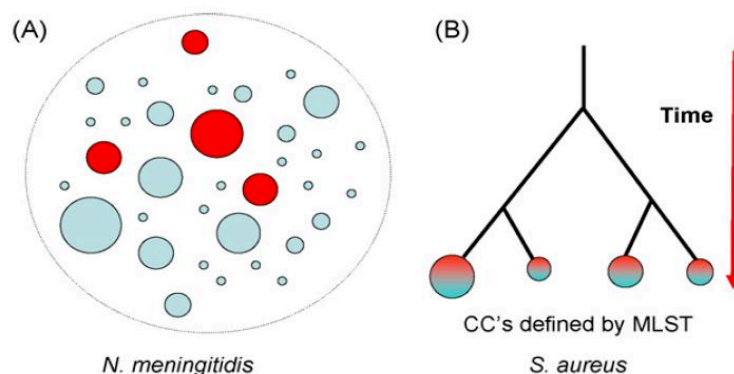
À la lumière de ces données, des études prospectives multicentriques collectant et comparant des isolats de patients hospitalisés et de leur environnement hospitalier seraient intéressantes pour explorer les réservoirs environnementaux de cette espèce et identifier d'éventuels modes de transmission. De même, une caractérisation phénotypique de tels clones « persistants » serait intéressante afin de comprendre le(s) mécanisme(s) à l'origine de leur implantation. Elle pourrait comprendre (i) une étude de leur capacité à produire du biofilm sur des surfaces abiotiques, à résister aux antiseptiques, à survivre à long terme et à croître en milieu carencé en fer ou encore (ii) une étude de leur capacité à adhérer *in vitro* aux cellules épithéliales.

### ***Une absence de corrélation entre génotype et contexte clinique***

Aucune corrélation entre contexte clinique et génotype des isolats de *S. lugdunensis* n'a été observé dans nos études, quelles que soient la méthode de typage utilisée, aussi discriminante soit-elle. Ceci avait déjà été observé lors du développement des techniques de MLST et MVLST

chez *S. lugdunensis*, dans la limite du faible nombre de souches de portage analysées ( $n = 6$ ) (Chassain et al., 2012; Didi et al., 2014). Cela pourrait suggérer que les facteurs liés à l'hôte, plutôt que la virulence de la bactérie, joue un rôle essentiel dans le développement de l'infection et/ou que ces techniques de typage ne reflètent pas le potentiel de virulence des souches.

Il a été montré que l'association potentielle de lignées phylogénétiques avec un tableau clinique d'infections ou au contraire une situation de portage était fonction du mode d'évolution de l'espèce bactérienne. Chez *N. meningitidis*, les analyses de MLST ont par exemple mis en évidence des CCs voire des STs associés aux infections invasives, alors que d'autres sont plutôt associés à une situation de portage (Jolley et al., 2000). Au contraire, chez *S. aureus*, les données de MLST ou MLVA ne fournissent aucune information sur le pouvoir pathogène des isolats. Comme suggéré par Turner and Feil, cela peut s'expliquer par des mécanismes d'évolution très différents entre ces deux espèces (Turner and Feil, 2007). *N. meningitidis* étant une espèce évoluant principalement par des phénomènes de recombinaison homologe, son *core-genome* évolue rapidement et à la même vitesse que son génome accessoire. Son équipement en facteurs de virulence peut alors être reflété par les données de MLST (Figure 77). Au contraire, *S. aureus* est une espèce d'évolution clonale, pour laquelle le *core-genome* évolue de façon plus lente ; de ce fait les CCs sont observés avec les mêmes fréquences pour des isolats responsables d'infections invasives ou de portage asymptomatique (Figure 77). Ainsi, la virulence de *S. aureus* ne sera pas reflétée par les données de MLST mais nécessitera des analyses de transcriptomes et de génomes complets pour identifier des modifications à l'origine de sa virulence.



**Figure 77. Représentations de la structure de population définie par analyse multilocus sequence typing (MLST) chez *N. meningitidis* et chez *S. aureus* (Turner 2006).** (A) *N. meningitidis*. Chaque cercle représente un complexe clonal (CC), dont la fréquence est illustrée par la taille du cercle ; certains sont associés à des souches hypervirulentes (indiqués en rouge). (B) *S. aureus*. Les CCs sont plus stables chez cette espèce ; ils ont évolué lentement dans le temps, principalement par mutation. Ils sont représentés par les cercles situés aux extrémités de l'arbre et ne diffèrent généralement pas en termes de virulence.

Quelques éléments de réponse concernant les mécanismes sous-jacents à la transition commensalisme/infection de *S. aureus* ont ainsi été apportés par la comparaison de génomes de souches de portage nasal et d'infections invasives. Celle-ci a permis d'identifier des « signatures génétiques » (comme certains SNPs) associées à la pathogénicité (Young et al., 2012, 2017). D'autres pistes récentes concernent les ARNs régulateurs qui pourraient constituer de potentiels biomarqueurs d'infections chez *S. aureus* (Bordeau et al., 2016). L'évolution de *S. lugdunensis* est principalement clonale, comme celle de *S. aureus*. De ce fait, il est probable que seule l'étude de génomes complets puisse contribuer à l'identification de potentiels déterminants moléculaires associés à la virulence ou au commensalisme chez cette espèce.

### ***L'apport futur du NGS dans le génotypage de S. lugdunensis***

L'utilisation croissante du séquençage de génomes entiers dans les laboratoires de recherche comme de routine permettra l'étude approfondie de la diversité génétique de *S. lugdunensis*. A ce jour, seulement 26 séquences génomiques sont disponibles sur NCBI, ce qui est très inférieur au nombre disponible pour les espèces *S. aureus* ( $n = 10374$ ) et *S. epidermidis* ( $n = 580$ ). Le séquençage d'un plus grand nombre d'isolats de *S. lugdunensis*, collectés au niveau mondial, isolés de contexte infectieux et de portage, mais également d'origine environnementale et animale, est donc primordial.

Cette approche permettra notamment d'identifier *in silico* les futurs *fbl-types* et TRTs, afin d'enrichir ces bases de données et suivre la diffusion internationale des lignées. Même si la plupart des erreurs d'assemblage lors d'analyses NGS proviennent des régions répétées (Salzberg and Yorke, 2005), une étude comparative des performances du NGS et du séquençage Sanger pour le typage d'isolats de *S. aureus* a montré que les *spa types* déduits des analyses NGS sont fiables par rapport au séquençage Sanger (Bartels et al., 2014). En effet, même si des séries de répétitions peuvent être omises lors de l'assemblage des données NGS, les *spa types* appartiennent tout de même aux mêmes *spa complexes* lors de l'analyse par l'algorithme BURP (Bartels et al., 2014). L'avantage des informations génomiques supplémentaires (analyses des SNPs) obtenues par le NGS est de plus bien supérieur au risque d'avoir un *spa type* erroné.

Les données de typage chez *S. lugdunensis* pourront également être affinées par des analyses de wgMLST et cgMLST, particulièrement intéressantes pour cette espèce au *pan-genome* fermé (Argemi et al., 2018). Des marqueurs supplémentaires pourront ainsi être envisagés pour améliorer la discrimination des génotypes prédominants.

### 3.3.3. Impact du polymorphisme de *fbl* dans la liaison au fibrinogène

Fbl est considérée comme la principale protéine de liaison au fibrinogène de *S. lugdunensis*. En effet, Marlinghaus et al. ont montré que la délétion du gène *fbl* chez trois souches cliniques de *S. lugdunensis* abolissait totalement leur capacité à se lier *in vitro* au fibrinogène immobilisé (Marlinghaus et al., 2012). Au cours du développement du *fbl*-typing, nous avons aligné le gène *fbl* des 15 génomes disponibles sur GenBank et des six génomes disponibles dans notre laboratoire. En plus du polymorphisme observé dans la région R, nous avons observé pour certaines souches une différence génétique clé dans l'extrémité 5' du gène *fbl*, à savoir une délétion de quatre pb entraînant un décalage du cadre de lecture. Ainsi, nous avons voulu déterminer si la variabilité génétique du gène *fbl* (présence ou non de la délétion en début du gène et polymorphisme de la région R) impactait la capacité des isolats à lier *in vitro* le fibrinogène.

La capacité de 55 isolats à adhérer au fibrinogène humain immobilisé a ainsi été étudiée, selon la méthodologie de Marlinghaus et al. (Marlinghaus et al., 2012). Les isolats testés ont été choisis pour être représentatifs des différents polymorphismes observés. Contrairement à ce que laissait supposer la prévalence du gène *fbl*, la liaison au fibrinogène n'a été observée que pour 31% de nos isolats, et variait fortement entre eux. Des résultats similaires ont été décrits pour des isolats cliniques de *S. aureus* (Ythier et al., 2010) ou *S. agalactiae* (Rosenau et al., 2007), chez lesquels la capacité de liaison *in vitro* au fibrinogène varie considérablement entre les souches analysées. Chez *S. agalactiae*, ces différences peuvent être en partie expliquées par des variations génétiques observées dans les gènes *fbs* codant des protéines de liaison au fibrinogène (Rosenau et al., 2007). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces différences de liaison des souches cliniques de *S. lugdunensis* au fibrinogène.

#### ***Liaison au fibrinogène et délétion en 5' de fbl***

Notre première hypothèse provient de la présence de la délétion en début de gène pour certains isolats. Cette délétion de quatre pb entraîne un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré, tronquant potentiellement radicalement la protéine Fbl de 881 à 21 acides aminés. Nous avons montré que les isolats ayant cette délétion se liaient significativement moins fortement au fibrinogène que le groupe d'isolats n'ayant pas cette délétion ( $P < 0,001$ ).

De façon étonnante, une seule souche ayant la délétion se liait tout de même au fibrinogène. Cependant, l'écart-type associé au test de liaison *in vitro* était beaucoup plus élevé que celui calculé pour les autres souches, soulignant un problème de reproductibilité. De plus, cette

souche appartenait à une série pour laquelle le témoin négatif présentait un taux anormalement élevé de liaison au fibrinogène. Ainsi, il serait intéressant de ré-évaluer la capacité de liaison au fibrinogène de cette souche. Si les résultats étaient confirmés, un séquençage de son génome complet serait envisagé dans l'objectif d'identifier un (ou plusieurs) gène(s) codant des adhésines putatives autre que Fbl, capables de médier l'adhésion au fibrinogène.

De plus, pour confirmer l'impact de la délétion en 5' de *fbl*, il faudrait étudier l'expression de la protéine Fbl par analyse western-blot à partir des cellules bactériennes et des surnageants de culture. Nous supposons que pour les isolats présentant la délétion, aucune protéine Fbl ne sera détectée, ni dans le culot bactérien ni dans le surnageant. Il a par exemple été observé chez des isolats cliniques de *S. aureus* que des mutations entraînant un décalage de cadre de lecture dans le gène *spa* codant la protéine A généraient une protéine avec une région C-terminale tronquée, qui ne contenait pas la région X<sub>C</sub> (comportant la séquence d'ancrage à la paroi). Par analyse western-blot, la protéine tronquée était alors retrouvée dans la fraction extracellulaire, mais pas dans la fraction liée à la paroi (Sørum et al., 2013). La localisation de Fbl au niveau de la paroi des isolats de *S. lugdunensis* pourrait également être analysée par cytométrie en flux grâce à des anticorps marqués (Hartford et al., 1997).

Fait intéressant, cette délétion n'a été observée que chez les isolats appartenant au CC1 défini par MLST, à l'exception d'un isolat. Par ailleurs, 73% des isolats de ST6, qui est le ST fondateur prédit du CC1, possédaient cette délétion. En ce qui concerne les autres STs du CC1, la délétion n'a pas été trouvée pour les isolats appartenant aux ST1 et ST7, alors que les isolats des ST12 et ST15 la présentaient. Ces quatre STs étant des SLVs du ST6 (Figure 56), nous pouvons supposer que cet événement particulier pourrait s'être produit chez certaines souches de ST6 et avoir été «transmis» aux ST12 et ST15, constituant une caractéristique particulière de ces STs. Cette découverte doit être confirmée par l'étude d'une plus grande collection d'isolats.

### ***Liaison au fibrinogène et nombre de répétitions dans la région R de fbl***

La deuxième explication possible est que le nombre de répétitions dans la région R de *fbl* affecterait la capacité de liaison au fibrinogène. Chez *S. aureus*, il a été démontré qu'un certain nombre de répétitions SD de la protéine ClfA sont nécessaires pour l'expression fonctionnelle du domaine de liaison au fibrinogène à la surface de la cellule (Hartford et al., 1997). Par analogie, il est possible que la longueur du domaine répété de Fbl soit critique pour la fonction de la protéine. Nos résultats ont montré que les isolats présentant moins de 43 répétitions étaient significativement moins adhérents au fibrinogène que ceux en présentant 43 et plus. Pour



confirmer cette tendance, et à l'instar de ce qui a été effectué chez *S. aureus* (Hartford et al., 1997), des variants de *fbl* présentant un nombre de motifs répétés variable (codant ainsi des protéines Fbl avec différentes longueurs du domaine R) pourraient être construits et clonés chez un mutant *S. lugdunensis*  $\Delta fbl$ . L'étude de la capacité de liaison au fibrinogène ainsi que la détermination de la localisation de la protéine à la surface des variants pourrait ainsi permettre de déterminer si une longueur minimale est nécessaire pour couvrir toute la paroi cellulaire et exposer le domaine de liaison au fibrinogène.

### **Autres hypothèses**

Certains isolats ne liant pas le fibrinogène comportaient pourtant plus de 43 répétitions et n'avaient pas la délétion. Cette absence de liaison pourrait être due au fait que ceux-ci exprimeraient de manière insuffisante la protéine Fbl, en raison de la perte ou de **l'expression** inadéquate du gène *fbl*. Cette hypothèse a été explorée par des analyses de qRT-PCR qui se sont révélées non concluantes. En effet, malgré des expressions variables de *fbl* observées entre les isolats testés, aucune différence significative dans les niveaux de transcription de *fbl* entre les isolats liant ou non le fibrinogène n'a été observée. Ces résultats sont cependant à pondérer du fait d'un faible nombre d'isolats testés. Là-encore, l'analyse de l'expression de Fbl à la surface cellulaire serait plus pertinente.

Enfin, malgré l'expression du gène *fbl* détectée par qRT-PCR, certains isolats ne liaient pas le fibrinogène. Par conséquent, une autre hypothèse serait la production d'une matrice extracellulaire telle une **capsule** qui pourrait masquer l'accessibilité à la protéine de surface. Ceci a été décrit pour *S. aureus*, pour lequel l'expression d'un polysaccharide capsulaire inhibe la liaison de ClfA au fibrinogène et aux plaquettes, inhibition qu'une région répétée de pleine longueur ne peut pas surmonter (Risley et al., 2007). Une capsule a été observée par microscopie électronique à transmission chez des isolats de *S. lugdunensis* en 1990 (Lambe et al., 1990) mais depuis, aucune étude ne s'est intéressée à décrire la prévalence et le rôle de la capsule chez cette espèce. Des analyses *in silico* de 21 génomes de *S. lugdunensis* effectuées au laboratoire GRAM par le Dr Lebeurre ont identifié la présence de gènes homologues à ceux codant une capsule polysaccharidique chez *S. aureus* (Lebeurre, données personnelles). Selon les CCs de ces souches, ces gènes étaient homologues à ceux des *locus cap5* ou *cap8* de *S. aureus*. Il serait donc intéressant de mettre en évidence la capsule chez des isolats cliniques de *S. lugdunensis*, et de déterminer si sa présence est corrélée à la capacité de liaison au fibrinogène.

### ***Fbl* et pathogénicité ?**

Bien que son rôle dans la virulence ne soit pas démontré, la protéine Fbl pourrait, de par sa liaison au fibrinogène, influencer la pathogénicité de *S. lugdunensis* en médiant l'adhésion et la colonisation aux tissus de l'hôte. Chez *S. aureus*, des expériences ont en effet démontré que la protéine ClfA était essentielle à la colonisation valvulaire dans des modèles d'endocardite infectieuse chez le rat, ainsi que dans ceux d'arthrite septique chez la souris (Josefsson et al., 2001; Que et al., 2005).

La diversité génétique observée dans la région R du gène *fbl* pourrait en faire une cible importante de l'évolution adaptative. Cependant, bien que des variations importantes existent au niveau de l'ADN (*fbl* types), le domaine R est principalement constitué du motif DSDSDA, suggérant une pression sélective environnementale purificatrice et le rôle critique de la sérine, de l'aspartate et de l'alanine dans la fonctionnalité de la protéine. De plus, nos observations suggèrent que le *fbl*-type des souches n'est pas prédictif de leur contexte clinique d'isolement.

De manière plus surprenante, bien qu'un large éventail de phénotypes d'adhérence au fibrinogène ait été observé, aucune corrélation avec le contexte clinique n'a été mise en évidence. Notamment, un isolat d'endocardite infectieuse ne se liait pas au fibrinogène alors qu'un isolat de portage le liait très fortement. Chez *S. agalactiae* par exemple, les isolats invasifs présentent de meilleures capacités de liaison au fibrinogène que les isolats de colonisation (Rosenau et al., 2007). Par contre, il n'a pas été montré de différence de niveau d'adhésion au fibrinogène chez *S. aureus* entre des isolats provenant de porteurs sains et des isolats provenant d'infections. De plus, la capacité de liaison au fibrinogène et à la fibronectine des souches de *S. aureus* ne permettait pas de prédire l'infectivité dans un modèle d'endocardite infectieuse chez le rat (Ythier et al., 2010). Ythier et al. ont expliqué ce paradoxe apparent par une possible expression différentielle des gènes *in vivo*, ou par des facteurs liés à l'hôte ou à une redondance des adhésines.

Dans une étude précédente, il avait été démontré qu'un mutant de *S. lugdunensis* délété du gène codant la protéine Fbl n'était pas significativement moins virulent que la souche sauvage dans un modèle d'endocardite de rat, bien qu'une tendance à la réduction de la virulence ait été observée (Heilbronner et al., 2013). Cependant, une seule souche, causant un tableau clinique moins grave chez le rat que celle de *S. aureus*, avait été testée. Ainsi, il serait intéressant de comparer la virulence de plusieurs autres isolats cliniques de *S. lugdunensis* et de leurs mutants *fbl* respectifs, dans des modèles animaux d'endocardite, mais également dans des modèles de colonisation nasale murins, afin d'étudier l'implication de *fbl* dans l'adhésion aux tissus de l'hôte.



## Conclusion générale

Ces travaux ont cherché à contribuer à la compréhension des mécanismes moléculaires qui sous-tendent la virulence de *S. lugdunensis*.

D'une part, nous avons caractérisé pour la première fois chez cette espèce un système de régulation à deux composants, **LytSR**. Ce TCS s'est révélé impliqué dans le contrôle de processus métaboliques majeurs, mais également dans la pathogenèse de *S. lugdunensis*. En effet, nous avons démontré que LytSR participe à la formation de biofilm *in vitro* chez cette espèce, probablement en lien avec le métabolisme et la mort cellulaire. Son impact dans la virulence a également été démontré *in vivo* grâce au modèle d'infection du nématode *C. elegans*. De plus, les analyses transcriptomiques comparatives effectuées chez la souche *S. lugdunensis* DSM 4804 et son mutant  $\Delta\text{lytSR}$  apportent un nouvel éclairage sur des facteurs de virulence présumés contrôlés par LytSR, de façon directe ou indirecte. Ces travaux pourraient être poursuivis par l'étude d'autres systèmes régulateurs, afin de mieux comprendre les mécanismes interconnectés qui permettent à cette espèce de s'implanter dans les différentes niches rencontrées au cours de son cycle de vie, commensal comme infectieux.

Ces travaux ont également contribué à améliorer les connaissances sur l'**épidémiologie moléculaire** des infections à *S. lugdunensis*. Nous avons en effet développé et évalué trois nouvelles méthodes de typage basées sur les VNTRs (MLVA, TRST et *fbl*-typing), qui s'avèrent être les outils de génotypage les plus discriminants disponibles à ce jour chez cette espèce clonale. Le *fbl*-typing apparaît comme la méthode utilisable en première ligne pour des études épidémiologiques chez *S. lugdunensis*, de par son faible coût, sa facilité d'utilisation et le développement d'un serveur permettant d'attribuer en ligne les génotypes (<http://fbl-typing.univ-rouen.fr/>). Ces outils prometteurs pourront être utiles à la fois en épidémiologie locale (comparaison de souches) et pour la surveillance internationale des lignées de *S. lugdunensis*, tout en s'enrichissant des futures données apportées par le séquençage de génomes complets par NGS.

Enfin, l'exploration des polymorphismes observés au sein du gène *fbl* a permis d'expliquer en partie la capacité variable des isolats cliniques de *S. lugdunensis* à lier *in vitro* le fibrinogène. Ces résultats méritent d'être complétés par des études *in vivo* afin d'appréhender le lien entre variabilité génétique, expression de la protéine Fbl à la surface cellulaire et pathogénicité chez cette espèce.



## Références bibliographiques

- Ahlstrand, E., Hellmark, B., Svensson, K., and Söderquist, B. (2014). Long-Term Molecular Epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* Blood Culture Isolates from Patients with Hematological Malignancies. *PLoS ONE* 9, e99045.
- Ainoda, Y., Takeshita, N., Hase, R., Mikawa, T., Hosokawa, N., Kawamura, I., Kurai, H., Abe, M., Kimura, M., Araoka, H., et al. (2017). Multicenter Study of the Clinical Presentation of *Staphylococcus lugdunensis* Bacteremia in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 70, 405–407.
- Aires-de-Sousa, M., Boye, K., de Lencastre, H., Deplano, A., Enright, M.C., Etienne, J., Friedrich, A., Harmsen, D., Holmes, A., Huijsdens, X.W., et al. (2006). High Interlaboratory Reproducibility of DNA Sequence-Based Typing of Bacteria in a Multicenter Study. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 619–621.
- Anguera, I., Del Río, A., Miró, J.M., Matínez-Lacasa, X., Marco, F., Gumá, J.R., Quaglio, G., Claramonte, X., Moreno, A., Mestres, C.A., et al. (2005). *Staphylococcus lugdunensis* infective endocarditis: description of 10 cases and analysis of native valve, prosthetic valve, and pacemaker lead endocarditis clinical profiles. *Heart* 91, e10.
- Arciola, C.R., Campoccia, D., Ravaioli, S., and Montanaro, L. (2015). Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front Cell Infect Microbiol* 5, 7.
- Argemi, X., Riegel, P., Lavigne, T., Lefebvre, N., Grandpré, N., Hansmann, Y., Jaulhac, B., Prévost, G., and Schramm, F. (2015). Implementation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Routine Clinical Laboratories Improves Identification of Coagulase-Negative Staphylococci and Reveals the Pathogenic Role of *Staphylococcus lugdunensis*. *J. Clin. Microbiol.* 53, 2030–2036.
- Argemi, X., Dahyot, S., Lebeurre, J., Hansmann, Y., Ronde Oustau, C., and Prévost, G. (2017a). *Staphylococcus lugdunensis* small colony variant conversion resulting in chronic prosthetic joint infection. *Med Mal Infect* 47, 498–501.
- Argemi, X., Martin, V., Loux, V., Dahyot, S., Lebeurre, J., Guffroy, A., Martin, M., Velay, A., Keller, D., Riegel, P., et al. (2017b). Whole-Genome Sequencing of Seven Strains of *Staphylococcus lugdunensis* Allows Identification of Mobile Genetic Elements. *Genome Biol Evol* 9.
- Argemi, X., Prévost, G., Riegel, P., Keller, D., Meyer, N., Baldeyrou, M., Douiri, N., Lefebvre, N., Meghit, K., Ronde Oustau, C., et al. (2017c). VISLISI trial, a prospective clinical study allowing identification of a new metalloprotease and putative virulence factor from *Staphylococcus lugdunensis*. *Clin. Microbiol. Infect.* 23, 334.e1-334.e8.
- Argemi, X., Prévost, G., Riegel, P., Provot, C., Badel-Berchoux, S., Jehl, F., Olivares, E., and Hansmann, Y. (2017d). Kinetics of biofilm formation by *Staphylococcus lugdunensis* strains in bone and joint infections. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 88, 298–304.
- Argemi, X., Hansmann, Y., Riegel, P., and Prévost, G. (2017e). Is *Staphylococcus lugdunensis* Significant in Clinical Samples? *J. Clin. Microbiol.* 55, 3167–3174.
- Argemi, X., Matelska, D., Ginalski, K., Riegel, P., Hansmann, Y., Bloom, J., Pestel-Caron, M., Dahyot, S., Lebeurre, J., and Prévost, G. (2018). Comparative genomic analysis of *Staphylococcus lugdunensis* shows a closed pan-genome and multiple barriers to horizontal gene transfer. *BMC Genomics* 19, 621.
- Arias, M., Tena, D., Apellániz, M., Asensio, M.P., Caballero, P., Hernández, C., Tejedor, F., and Bisquert, J. (2010). Skin and soft tissue infections caused by *Staphylococcus lugdunensis*: Report of 20 cases. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 42, 879–884.

- Asadollahi, P., Jabalameli, F., Beigverdi, R., and Emameini, M. (2018a). Assessment of disinfectant and antibiotic susceptibility patterns and multi-locus variable number tandem repeat analysis of *Staphylococcus epidermidis* isolated from blood cultures. *Iran J Microbiol* 10, 90–97.
- Asadollahi, P., Farahani, N.N., Mirzaii, M., Khoramrooz, S.S., van Belkum, A., Asadollahi, K., Dadashi, M., and Darban-Sarokhalil, D. (2018b). Distribution of the Most Prevalent Spa Types among Clinical Isolates of Methicillin-Resistant and -Susceptible *Staphylococcus aureus* around the World: A Review. *Frontiers in Microbiology* 9.
- Banner, M.A., Cunniffe, J.G., Macintosh, R.L., Foster, T.J., Rohde, H., Mack, D., Hoyes, E., Derrick, J., Upton, M., and Handley, P.S. (2007). Localized tufts of fibrils on *Staphylococcus epidermidis* NCTC 11047 are comprised of the accumulation-associated protein. *J. Bacteriol.* 189, 2793–2804.
- Bannerman, T.L., Rhoden, D.L., McAllister, S.K., Miller, J.M., and Wilson, L.A. (1997). The source of coagulase-negative staphylococci in the Endophthalmitis Vitrectomy Study. A comparison of eyelid and intraocular isolates using pulsed-field gel electrophoresis. *Arch. Ophthalmol.* 115, 357–361.
- Bartels, M.D., Petersen, A., Worning, P., Nielsen, J.B., Lerner-Svensson, H., Johansen, H.K., Andersen, L.P., Jarlov, J.O., Boye, K., Larsen, A.R., et al. (2014). Comparing Whole-Genome Sequencing with Sanger Sequencing for spa Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 52, 4305–4308.
- Batzilla, C.F., Rachid, S., Engelmann, S., Hecker, M., Hacker, J., and Ziebuhr, W. (2006). Impact of the accessory gene regulatory system (Agr) on extracellular proteins, codY expression and amino acid metabolism in *Staphylococcus epidermidis*. *Proteomics* 6, 3602–3613.
- Bayles, K.W. (2000). The bactericidal action of penicillin: new clues to an unsolved mystery. *Trends Microbiol.* 8, 274–278.
- Bayles, K.W. (2007). The biological role of death and lysis in biofilm development. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 721–726.
- Beall, B., Facklam, R., and Thompson, T. (1996). Sequencing emm-Specific PCR Products for Routine and Accurate Typing of Group A Streptococci. 34, 6.
- Beasley, F.C., Marolda, C.L., Cheung, J., Buac, S., and Heinrichs, D.E. (2011). *Staphylococcus aureus* transporters Hts, Sir, and Sst capture iron liberated from human transferrin by Staphyloferrin A, Staphyloferrin B, and catecholamine stress hormones, respectively, and contribute to virulence. *Infect. Immun.* 79, 2345–2355.
- Beck, K.M., Waisglass, S.E., Dick, H.L.N., and Weese, J.S. (2012). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) from skin and carriage sites of dogs after treatment of their methicillin-resistant or methicillin-sensitive staphylococcal pyoderma. *Vet. Dermatol.* 23, 369–375, e66-67.
- Becker, K., Heilmann, C., and Peters, G. (2014). Coagulase-Negative Staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews* 27, 870–926.
- Beier, D., and Gross, R. (2006). Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 143–152.
- van Belkum, A. (2007). Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 49, 22–27.
- van Belkum, A., Scherer, S., van Alphen, L., and Verbrugh, H. (1998). Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 275–293.
- van Belkum, A., Tassios, P.T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N.K., Fussing, V., Green, J., Feil, E., and Gerner-Smidt, P. (2007). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection* 13, 1–46.
- van Belkum, A.V., Scherer, S., Leeuwen, W.V., and Willemse, D. (1997). Variable Number of Tandem Repeats in Clinical Strains of *Haemophilus influenzae*. *INFECT. IMMUN.* 65, 11.

- Bellamy, R., and Barkham, T. (2002). Staphylococcus lugdunensis infection sites: predominance of abscesses in the pelvic girdle region. *Clin. Infect. Dis.* 35, E32-34.
- Benito, Y., Lina, G., Greenland, T., Etienne, J., and Vandenesch, F. (1998). trans-complementation of a Staphylococcus aureus agr mutant by Staphylococcus lugdunensis agr RNAIII. *J. Bacteriol.* 180, 5780–5783.
- Benson, G. (1997). Sequence alignment with tandem duplication. *Journal of Computational Biology* 4, 351–367.
- Benson, G. (1999). Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research* 27, 573–580.
- Benton, B.M., Zhang, J.P., Bond, S., Pope, C., Christian, T., Lee, L., Winterberg, K.M., Schmid, M.B., and Buysse, J.M. (2004). Large-scale identification of genes required for full virulence of Staphylococcus aureus. *J. Bacteriol.* 186, 8478–8489.
- Bera, A., Herbert, S., Jakob, A., Vollmer, W., and Götz, F. (2005). Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of Staphylococcus aureus. *Mol. Microbiol.* 55, 778–787.
- Bera, A., Biswas, R., Herbert, S., and Götz, F. (2006). The presence of peptidoglycan O-acetyltransferase in various staphylococcal species correlates with lysozyme resistance and pathogenicity. *Infect. Immun.* 74, 4598–4604.
- Bieber, L., and Kahlmeter, G. (2010). Staphylococcus lugdunensis in several niches of the normal skin flora. *Clinical Microbiology and Infection* 16, 385–388.
- Böcher, S., Tønning, B., Skov, R.L., and Prag, J. (2009). Staphylococcus lugdunensis, a common cause of skin and soft tissue infections in the community. *J. Clin. Microbiol.* 47, 946–950.
- Boles, B.R., and Horswill, A.R. (2011). Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends Microbiol.* 19, 449–455.
- Bordeau, V., Cady, A., Revest, M., Rostan, O., Sassi, M., Tattevin, P., Donnio, P.-Y., and Felden, B. (2016). Staphylococcus aureus Regulatory RNAs as Potential Biomarkers for Bloodstream Infections. *Emerging Infect. Dis.* 22, 1570–1578.
- Bose, J.L., Lehman, M.K., Fey, P.D., and Bayles, K.W. (2012). Contribution of the Staphylococcus aureus Atl AM and GL murein hydrolase activities in cell division, autolysis, and biofilm formation. *PLoS ONE* 7, e42244.
- Bourgeois, I., Pestel-Caron, M., Lemeland, J.-F., Pons, J.-L., and Caron, F. (2007). Tolerance to the glycopeptides vancomycin and teicoplanin in coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 740–743.
- Bourgeois, I., Camiade, E., Biswas, R., Courtin, P., Gibert, L., Götz, F., Chapot-Chartier, M.-P., Pons, J.-L., and Pestel-Caron, M. (2009). Characterization of AtlL, a bifunctional autolysin of Staphylococcus lugdunensis with N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramoyl-l-alanine amidase activities. *FEMS Microbiol. Lett.* 290, 105–113.
- Bowden, M.G. (2005). Identification and preliminary characterization of cell-wall-anchored proteins of Staphylococcus epidermidis. *Microbiology* 151, 1453–1464.
- Brevik, Ø.J., Ottem, K.F., and Nylund, A. (2011). Multiple-locus, variable number of tandem repeat analysis (MLVA) of the fish-pathogen Francisella noatunensis. *BMC Vet. Res.* 7, 5.
- Bricker, B.J., Ewalt, D.R., and Halling, S.M. (2003). Brucella “HOOF-Prints”: strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs). *BMC Microbiol.* 3, 15.
- Bronner, S., Monteil, H., and Prévost, G. (2004). Regulation of virulence determinants in Staphylococcus aureus: complexity and applications. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 183–200.
- Brunskill, E.W., and Bayles, K.W. (1996a). Identification and molecular characterization of a putative regulatory locus that affects autolysis in Staphylococcus aureus. *J. Bacteriol.* 178, 611–618.



- Brunskill, E.W., and Bayles, K.W. (1996b). Identification of LytSR-regulated genes from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* *178*, 5810–5812.
- Burgui, S., Gil, C., Solano, C., Lasa, I., and Valle, J. (2018). A Systematic Evaluation of the Two-Component Systems Network Reveals That ArlRS Is a Key Regulator of Catheter Colonization by *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol* *9*, 342.
- Cai, S., Kabuki, D.Y., Kuaye, A.Y., Cargioli, T.G., Chung, M.S., Nielsen, R., and Wiedmann, M. (2002). Rational Design of DNA Sequence-Based Strategies for Subtyping *Listeria monocytogenes*. *Journal of Clinical Microbiology* *40*, 3319–3325.
- Cameron, D.R., Jiang, J.-H., Kostoulias, X., Foxwell, D.J., and Peleg, A.Y. (2016). Vancomycin susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is mediated by YycHI activation of the WalRK essential two-component regulatory system. *Sci Rep* *6*, 30823.
- Capra, E.J., and Laub, M.T. (2012). Evolution of two-component signal transduction systems. *Annu. Rev. Microbiol.* *66*, 325–347.
- Carmody, A.B., and Otto, M. (2004). Specificity grouping of the accessory gene regulator quorum-sensing system of *Staphylococcus epidermidis* is linked to infection. *Arch. Microbiol.* *181*, 250–253.
- Casanova-Roman, M., Sanchez-Porto, A., and Casanova-Bellido, M. (2004). Urinary tract infection due to *Staphylococcus lugdunensis* in a healthy child. *Scand. J. Infect. Dis.* *36*, 149–150.
- Casino, P., Rubio, V., and Marina, A. (2010). The mechanism of signal transduction by two-component systems. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *20*, 763–771.
- Cassat, J.E., Hammer, N.D., Campbell, J.P., Benson, M.A., Perrien, D.S., Mrak, L.N., Smeltzer, M.S., Torres, V.J., and Skaar, E.P. (2013). A secreted bacterial protease tailors the *Staphylococcus aureus* virulence repertoire to modulate bone remodeling during osteomyelitis. *Cell Host Microbe* *13*, 759–772.
- Castillo-Ramírez, S., Corander, J., Martinen, P., Aldeljawi, M., Hanage, W.P., Westh, H., Boye, K., Gulay, Z., Bentley, S.D., Parkhill, J., et al. (2012). Phylogeographic variation in recombination rates within a global clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Genome Biol.* *13*, R126.
- Cavanagh, J.P., Klingenberg, C., Hanssen, A.-M., Fredheim, E.A., Francois, P., Schrenzel, J., Flægstad, T., and Sollid, J.E. (2012). Core genome conservation of *Staphylococcus haemolyticus* limits sequence based population structure analysis. *Journal of Microbiological Methods* *89*, 159–166.
- Chassain, B., Lemeé, L., Didi, J., Thiberge, J.-M., Brisse, S., Pons, J.-L., and Pestel-Caron, M. (2012). Multilocus Sequence Typing Analysis of *Staphylococcus lugdunensis* Implies a Clonal Population Structure. *Journal of Clinical Microbiology* *50*, 3003–3009.
- Chatzigeorgiou, K.-S., Siafakas, N., Petinaki, E., and Zerva, L. (2010). *fbl* gene as a species-specific target for *Staphylococcus lugdunensis* identification. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* *24*, 119–122.
- Chavakis, T., Wiechmann, K., Preissner, K.T., and Herrmann, M. (2005). *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial “secretable expanded repertoire adhesive molecules” (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb. Haemost.* *94*, 278–285.
- Cheng, C., Liu, T., Yeh, C., Lee, M., Chang, S., and Lu, J. (2015). Persistence of a major endemic clone of oxacillin-resistant *Staphylococcus lugdunensis* sequence type 6 at a tertiary medical centre in northern Taiwan. *International Journal of Infectious Diseases* *36*, 72–77.
- Cheung, A.I., Projan, S.J., Edelstein, R.E., and Fischetti, V.A. (1995). Cloning, Expression, and Nucleotide Sequence of a *Staphylococcus aureus* Gene (*fbpA*) Encoding a Fibrinogen-Binding Protein. *INFECT. IMMUN.* *63*, 7.
- Cheung, G.Y.C., Joo, H.-S., Chatterjee, S.S., and Otto, M. (2014). Phenol-soluble modulins--critical determinants of staphylococcal virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* *38*, 698–719.

- Choi, S.-H., Chung, J.-W., Lee, E.J., Kim, T.H., Lee, M.S., Kang, J.M., Song, E.H., Jun, J.-B., Kim, M.-N., Kim, Y.S., et al. (2010). Incidence, characteristics, and outcomes of *Staphylococcus lugdunensis* bacteremia. *J. Clin. Microbiol.* *48*, 3346–3349.
- Chou, D.-W., and Lee, C.-T. (2017). Primary lung abscess caused by *Staphylococcus lugdunensis*. *J. Infect. Chemother.* *23*, 791–793.
- Choudhary, K.S., Mih, N., Monk, J., Kavvas, E., Yurkovich, J.T., Sakoulas, G., and Palsson, B.O. (2018). The *Staphylococcus aureus* Two-Component System AgrAC Displays Four Distinct Genomic Arrangements That Delineate Genomic Virulence Factor Signatures. *Front Microbiol* *9*, 1082.
- Chowdhury, S.A., Arias, C.A., Nallapareddy, S.R., Reyes, J., Willems, R.J.L., and Murray, B.E. (2009). A Trilocus Sequence Typing Scheme for Hospital Epidemiology and Subspecies Differentiation of an Important Nosocomial Pathogen, *Enterococcus faecalis*. *Journal of Clinical Microbiology* *47*, 2713–2719.
- Claes, J., Vanassche, T., Peetermans, M., Liesenborghs, L., Vandenbriele, C., Vanhoorelbeke, K., Missiakas, D., Schneewind, O., Hoylaerts, M.F., Heying, R., et al. (2014). Adhesion of *Staphylococcus aureus* to the vessel wall under flow is mediated by von Willebrand factor-binding protein. *Blood* *124*, 1669–1676.
- Conlon, K.M., Humphreys, H., and O’Gara, J.P. (2002). *icaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Bacteriol.* *184*, 4400–4408.
- Conrady, D.G., Brescia, C.C., Horii, K., Weiss, A.A., Hassett, D.J., and Herr, A.B. (2008). A zinc-dependent adhesion module is responsible for intercellular adhesion in staphylococcal biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 19456–19461.
- Cookson, B.D., Robinson, D.A., Monk, A.B., Murchan, S., Deplano, A., de Ryck, R., Struelens, M.J., Scheel, C., Fussing, V., Salmenlinna, S., et al. (2007). Evaluation of Molecular Typing Methods in Characterizing a European Collection of Epidemic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains: the HARMONY Collection. *Journal of Clinical Microbiology* *45*, 1830–1837.
- Corrigan, R.M., Rigby, D., Handley, P., and Foster, T.J. (2007). The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. *Microbiology (Reading, Engl.)* *153*, 2435–2446.
- Cremniter, J., Sivadon-Tardy, V., Caulliez, C., Bauer, T., Porcher, R., Lortat-Jacob, A., Piriou, P., Judet, T., Aegerter, P., Herrmann, J.-L., et al. (2013). Genetic Analysis of Glycopeptide-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Strains from Bone and Joint Infections. *Journal of Clinical Microbiology* *51*, 1014–1019.
- Crosby, H.A., Schlievert, P.M., Merriman, J.A., King, J.M., Salgado-Pabón, W., and Horswill, A.R. (2016). The *Staphylococcus aureus* Global Regulator MgrA Modulates Clumping and Virulence by Controlling Surface Protein Expression. *PLoS Pathog.* *12*, e1005604.
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., and Penadés, J.R. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* *183*, 2888–2896.
- Cue, D., Junecko, J.M., Lei, M.G., Blevins, J.S., Smeltzer, M.S., and Lee, C.Y. (2015). SaeRS-dependent inhibition of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* Newman. *PLoS ONE* *10*, e0123027.
- Dahyot, S., Lebeurre, J., Argemi, X., François, P., Lemée, L., Prévost, G., and Pestel-Caron, M. (2018). Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) and Tandem Repeat Sequence Typing (TRST), helpful tools for subtyping *Staphylococcus lugdunensis*. *Scientific Reports* *8*.
- Dahyot, S., Lebeurre, J., Laumay, F., Argemi, X., Dubos, C., Lemée, L., Prévost, G., François, P., and Pestel-Caron, M. (2019). *fbl*-Typing of *Staphylococcus lugdunensis*: A Frontline Tool for Epidemiological Studies, but Not Predictive of Fibrinogen Binding Ability. *Front. Microbiol.* *10*, 1109.
- Darmon, E., and Leach, D.R.F. (2014). Bacterial genome instability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *78*, 1–39.

- Davis, M.F., Cain, C.L., Brazil, A.M., and Rankin, S.C. (2013). Two coagulase-negative staphylococci emerging as potential zoonotic pathogens: wolves in sheep's clothing? *Front Microbiol* 4, 123.
- Deinhofer, M., and Pernthaner, A. (1995). Staphylococcus spp. as mastitis-related pathogens in goat milk. *Vet. Microbiol.* 43, 161–166.
- Delaunay, F., Pegot, A., Coquerel-Beghin, D., Aktouf, A., and Auquit-Auckbur, I. (2014). [Staphylococcus lugdunensis necrotizing fasciitis after abdominal dermolipectomy: report of two cases and review of the literature]. *Ann Chir Plast Esthet* 59, 136–139.
- Delaune, A., Poupel, O., Mallet, A., Coic, Y.-M., Msadek, T., and Dubrac, S. (2011). Peptidoglycan crosslinking relaxation plays an important role in Staphylococcus aureus WalKR-dependent cell viability. *PLoS ONE* 6, e17054.
- Delauné, A., Dubrac, S., Blanchet, C., Poupel, O., Mäder, U., Hiron, A., Leduc, A., Fitting, C., Nicolas, P., Cavaillon, J.-M., et al. (2012). The WalKR System Controls Major Staphylococcal Virulence Genes and Is Involved in Triggering the Host Inflammatory Response. *Infection and Immunity* 80, 3438–3453.
- Desai, S.K., and Kenney, L.J. (2017). To ~P or Not to ~P? Non-canonical activation by two-component response regulators. *Mol Microbiol* 103, 203–213.
- Deurenberg, R.H., and Stobberingh, E.E. (2008). The evolution of Staphylococcus aureus. *Infect. Genet. Evol.* 8, 747–763.
- Didi, J., Lemee, L., Gibert, L., Pons, J.-L., and Pestel-Caron, M. (2014). Multi-Virulence-Locus Sequence Typing of Staphylococcus lugdunensis Generates Results Consistent with a Clonal Population Structure and Is Reliable for Epidemiological Typing. *Journal of Clinical Microbiology* 52, 3624–3632.
- Dinges, M.M., Orwin, P.M., and Schlievert, P.M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews* 13, 16–34.
- Donvito, B., Etienne, J., Denoroy, L., Greenland, T., Benito, Y., and Vandenesch, F. (1997). Synergistic hemolytic activity of Staphylococcus lugdunensis is mediated by three peptides encoded by a non-agr genetic locus. *Infect. Immun.* 65, 95–100.
- Douiri, N., Hansmann, Y., Lefebvre, N., Riegel, P., Martin, M., Baldeyrou, M., Christmann, D., Prevost, G., and Argemi, X. (2016). Staphylococcus lugdunensis: a virulent pathogen causing bone and joint infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 22, 747–748.
- Dubrac, S., and Msadek, T. (2004). Identification of genes controlled by the essential YycG/YycF two-component system of Staphylococcus aureus. *J. Bacteriol.* 186, 1175–1181.
- Dubrac, S., Boneca, I.G., Poupel, O., and Msadek, T. (2007). New insights into the WalK/WalR (YycG/YycF) essential signal transduction pathway reveal a major role in controlling cell wall metabolism and biofilm formation in Staphylococcus aureus. *J. Bacteriol.* 189, 8257–8269.
- Dufour, P., Jarraud, S., Vandenesch, F., Greenland, T., Novick, R.P., Bes, M., Etienne, J., and Lina, G. (2002). High genetic variability of the agr locus in Staphylococcus species. *J. Bacteriol.* 184, 1180–1186.
- Dunman, P.M., Murphy, E., Haney, S., Palacios, D., Tucker-Kellogg, G., Wu, S., Brown, E.L., Zagursky, R.J., Shlaes, D., and Projan, S.J. (2001). Transcription profiling-based identification of Staphylococcus aureus genes regulated by the agr and/or sarA loci. *J. Bacteriol.* 183, 7341–7353.
- Durand, G., Javerliat, F., Bes, M., Veyrieras, J.-B., Guigon, G., Mugnier, N., Schicklin, S., Kaneko, G., Santiago-Allexant, E., Bouchiat, C., et al. (2018). Routine Whole-Genome Sequencing for Outbreak Investigations of Staphylococcus aureus in a National Reference Center. *Front Microbiol* 9, 511.
- Edlind, T., and Liu, Y. (2015). Development and Evaluation of a Commercial Sequence-Based Strain Typing Service for Listeria monocytogenes. *Journal of Microbial & Biochemical Technology* 07.

- Elamin, W.F., Ball, D., and Millar, M. (2015). Unbiased species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative Staphylococci: does it change the perspective on *Staphylococcus lugdunensis*? *J. Clin. Microbiol.* *53*, 292–294.
- Elias, J., Harmsen, D., Claus, H., Hellenbrand, W., Frosch, M., and Vogel, U. (2006). Spatiotemporal Analysis of Invasive Meningococcal Disease, Germany. *Emerging Infectious Diseases* *12*, 1689–1695.
- Elliott, S.P., Yogev, R., and Shulman, S.T. (2001). *Staphylococcus lugdunensis*: an emerging cause of ventriculoperitoneal shunt infections. *Pediatr Neurosurg* *35*, 128–130.
- Elston, D.M. (2007). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of the American Academy of Dermatology* *56*, 1–16.
- Enright, M.C., and Spratt, B.G. (1998). A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology (Reading, Engl.)* *144* ( Pt 11), 3049–3060.
- Enright, M.C., and Spratt, B.G. (1999). Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol.* *7*, 482–487.
- Enright, M.C., Day, N.P., Davies, C.E., Peacock, S.J., and Spratt, B.G. (2000). Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* *38*, 1008–1015.
- Enright, M.C., Robinson, D.A., Randle, G., Feil, E.J., Grundmann, H., and Spratt, B.G. (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences* *99*, 7687–7692.
- Entenza, J.M., Foster, T.J., Ni Eidhin, D., Vaudaux, P., Francioli, P., and Moreillon, P. (2000). Contribution of clumping factor B to pathogenesis of experimental endocarditis due to *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* *68*, 5443–5446.
- van den Esker, M.H., Kovács, Á.T., and Kuipers, O.P. (2017). From Cell Death to Metabolism: Holin-Antiholin Homologues with New Functions. *MBio* *8*.
- Estoup, A., Jarne, P., and Cornuet, J.-M. (2002). Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Mol. Ecol.* *11*, 1591–1604.
- Etienne, J., Pangon, B., Leport, C., Wolff, M., Clair, B., Perronne, C., Brun, Y., and Buré, A. (1989). *Staphylococcus lugdunensis* endocarditis. *Lancet* *1*, 390.
- Eyre, D.W., Golubchik, T., Gordon, N.C., Bowden, R., Piazza, P., Batty, E.M., Ip, C.L.C., Wilson, D.J., Didelot, X., O'Connor, L., et al. (2012). A pilot study of rapid benchtop sequencing of *Staphylococcus aureus* and *Clostridium difficile* for outbreak detection and surveillance. *BMJ Open* *2*.
- Faria, N.A., Carrico, J.A., Oliveira, D.C., Ramirez, M., and de Lencastre, H. (2008). Analysis of Typing Methods for Epidemiological Surveillance of both Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Strains. *Journal of Clinical Microbiology* *46*, 136–144.
- Farrand, A.J., Haley, K.P., Lareau, N.M., Heilbronner, S., McLean, J.A., Foster, T., and Skaar, E.P. (2015). An Iron-Regulated Autolysin Remodels the Cell Wall To Facilitate Heme Acquisition in *Staphylococcus lugdunensis*. *Infect. Immun.* *83*, 3578–3589.
- Feil, E.J., and Spratt, B.G. (2001). Recombination and the population structures of bacterial pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* *55*, 561–590.
- Feil, E.J., Maiden, M.C., Achtman, M., and Spratt, B.G. (1999). The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria meningitidis*. *Molecular Biology and Evolution* *16*, 1496–1502.

- Feil, E.J., Enright, M.C., and Spratt, B.G. (2000). Estimating the relative contributions of mutation and recombination to clonal diversification: a comparison between *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae*. *Res. Microbiol.* *151*, 465–469.
- Feil, E.J., Cooper, J.E., Grundmann, H., Robinson, D.A., Enright, M.C., Berendt, T., Peacock, S.J., Smith, J.M., Murphy, M., Spratt, B.G., et al. (2003). How Clonal Is *Staphylococcus aureus*? *Journal of Bacteriology* *185*, 3307–3316.
- Feil, E.J., Li, B.C., Aanensen, D.M., Hanage, W.P., and Spratt, B.G. (2004). eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. *Journal of Bacteriology* *186*, 1518–1530.
- Fitzgerald, J.R., and Holden, M.T.G. (2016). Genomics of Natural Populations of *Staphylococcus aureus*. *Annu. Rev. Microbiol.* *70*, 459–478.
- Flanagan, R.S., Watson, D.W., Surewaard, B.G.J., Kubes, P., and Heinrichs, D.E. (2018). The surreptitious survival of the emerging pathogen *Staphylococcus lugdunensis* within macrophages as an immune evasion strategy. *Cell. Microbiol.* *20*, e12869.
- Fleurette, J., Bès, M., Brun, Y., Freney, J., Forey, F., Coulet, M., Reverdy, M.E., and Etienne, J. (1989). Clinical isolates of *Staphylococcus lugdunensis* and *S. schleiferi*: bacteriological characteristics and susceptibility to antimicrobial agents. *Res. Microbiol.* *140*, 107–118.
- Foster, T.J., and Höök, M. (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* *6*, 484–488.
- Foster, T.J., Geoghegan, J.A., Ganesh, V.K., and Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Microbiology* *12*, 49–62.
- Fournier, B., and Hooper, D.C. (2000). A new two-component regulatory system involved in adhesion, autolysis, and extracellular proteolytic activity of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* *182*, 3955–3964.
- Fournier, B., Klier, A., and Rapoport, G. (2001). The two-component system ArlS-ArlR is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* *41*, 247–261.
- Francois, P., Huyghe, A., Charbonnier, Y., Bento, M., Herzig, S., Topolski, I., Fleury, B., Lew, D., Vaudaux, P., Harbarth, S., et al. (2005). Use of an Automated Multiple-Locus, Variable-Number Tandem Repeat-Based Method for Rapid and High-Throughput Genotyping of *Staphylococcus aureus* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* *43*, 3346–3355.
- Francois, P., Hochmann, A., Huyghe, A., Bonetti, E.-J., Renzi, G., Harbarth, S., Klingenberg, C., Pittet, D., and Schrenzel, J. (2008). Rapid and high-throughput genotyping of *Staphylococcus epidermidis* isolates by automated multilocus variable-number of tandem repeats: A tool for real-time epidemiology. *Journal of Microbiological Methods* *72*, 296–305.
- Frank, K.L., and Patel, R. (2007). Poly-N-Acetylglucosamine Is Not a Major Component of the Extracellular Matrix in Biofilms Formed by *icaADBC*-Positive *Staphylococcus lugdunensis* Isolates. *Infection and Immunity* *75*, 4728–4742.
- Frank, K.L., Reichert, E.J., Piper, K.E., and Patel, R. (2007). In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* *51*, 888–895.
- Frank, K.L., Del Pozo, J.L., and Patel, R. (2008). From clinical microbiology to infection pathogenesis: how daring to be different works for *Staphylococcus lugdunensis*. *Clin. Microbiol. Rev.* *21*, 111–133.
- Frénay, H.M.E., Bunschoten, A.E., Schouls, L.M., Leeuwen, W.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Verhoef, J., and Mooi, F.R. (1996). Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* *15*, 60–64.

- Freney, J., Brun, Y., Bes, M., Meugnier, H., Grimont, F., Grimont, P.A., Nervi, C., and Fleurette, J. (1988). *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two species from human clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 38, 168–172.
- Friedrich, A.W., Witte, W., Harmsen, D., de Lencastre, H., Hryniewicz, W., Scheres, J., Westh, H., and SeqNet.org participants (2006). SeqNet.org: a European laboratory network for sequence-based typing of microbial pathogens. *Euro Surveill.* 11, E060112.4.
- Garoon, R.B., Miller, D., and Flynn, H.W. (2018). Acute-onset endophthalmitis caused by *Staphylococcus lugdunensis*. *Am J Ophthalmol Case Rep* 9, 28–30.
- Gemayel, R., Vinces, M.D., Legendre, M., and Verstrepen, K.J. (2010). Variable tandem repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences. *Annu. Rev. Genet.* 44, 445–477.
- Geoghegan, J.A., Ganesh, V.K., Smeds, E., Liang, X., Höök, M., and Foster, T.J. (2010a). Molecular Characterization of the Interaction of Staphylococcal Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMM) ClfA and Fbl with Fibrinogen. *Journal of Biological Chemistry* 285, 6208–6216.
- Geoghegan, J.A., Corrigan, R.M., Gruszka, D.T., Speziale, P., O’Gara, J.P., Potts, J.R., and Foster, T.J. (2010b). Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 192, 5663–5673.
- Ghebremedhin, B., Layer, F., König, W., and König, B. (2008). Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial gap, 16S rRNA, hsp60, rpoB, sodA, and tuf gene sequences. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1019–1025.
- Gibert, L., Didi, J., Marlinghaus, L., Lesouhaitier, O., Legris, S., Szabados, F., Pons, J.-L., and Pestel-Caron, M. (2014). The major autolysin of *Staphylococcus lugdunensis*, AtlL, is involved in cell separation, stress-induced autolysis and contributes to bacterial pathogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 352, 78–86.
- Gibson, G.W., Kreuser, S.C., Riley, J.M., Rosebury-Smith, W.S., Courtney, C.L., Juneau, P.L., Hollembaek, J.M., Zhu, T., Huband, M.D., Brammer, D.W., et al. (2007). Development of a mouse model of induced *Staphylococcus aureus* infective endocarditis. *Comp. Med.* 57, 563–569.
- Gill, S.R., Fouts, D.E., Archer, G.L., Mongodin, E.F., Deboy, R.T., Ravel, J., Paulsen, I.T., Kolonay, J.F., Brinkac, L., Beanan, M., et al. (2005). Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J. Bacteriol.* 187, 2426–2438.
- Gillet, Y., Vanhems, P., Lina, G., Bes, M., Vandenesch, F., Floret, D., and Etienne, J. (2007). Factors predicting mortality in necrotizing community-acquired pneumonia caused by *Staphylococcus aureus* containing Pantone-Valentine leukocidin. *Clin. Infect. Dis.* 45, 315–321.
- Giormezis, N., Kolonitsiou, F., Makri, A., Vogiatzi, A., Christofidou, M., Anastassiou, E.D., and Spiliopoulou, I. (2015). Virulence factors among *Staphylococcus lugdunensis* are associated with infection sites and clonal spread. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 773–778.
- Giraud, A.T., Raspanti, C.G., Calzolari, A., and Nagel, R. (1994). Characterization of a Tn551-mutant of *Staphylococcus aureus* defective in the production of several exoproteins. *Can. J. Microbiol.* 40, 677–681.
- Gordon, C.P., Olson, S.D., Lister, J.L., Kavanaugh, J.S., and Horswill, A.R. (2016). Truncated Autoinducing Peptides as Antagonists of *Staphylococcus lugdunensis* Quorum Sensing. *J. Med. Chem.* 59, 8879–8888.
- Griffiths, D., Fawley, W., Kachrimanidou, M., Bowden, R., Crook, D.W., Fung, R., Golubchik, T., Harding, R.M., Jeffery, K.J.M., Jolley, K.A., et al. (2010). Multilocus Sequence Typing of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology* 48, 770–778.
- Grigg, J.C., Ukpabi, G., Gaudin, C.F.M., and Murphy, M.E.P. (2010). Structural biology of heme binding in the *Staphylococcus aureus* Isd system. *J. Inorg. Biochem.* 104, 341–348.

- Groicher, K.H., Firek, B.A., Fujimoto, D.F., and Bayles, K.W. (2000). The *Staphylococcus aureus* *lrgAB* operon modulates murein hydrolase activity and penicillin tolerance. *J. Bacteriol.* *182*, 1794–1801.
- Gross, M., Cramton, S.E., Götz, F., and Peschel, A. (2001). Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect. Immun.* *69*, 3423–3426.
- Grundmann, H., Hori, S., Enright, M.C., Webster, C., Tami, A., Feil, E.J., and Pitt, T. (2002). Determining the Genetic Structure of the Natural Population of *Staphylococcus aureus*: a Comparison of Multilocus Sequence Typing with Pulsed-Field Gel Electrophoresis, Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis, and Phage Typing. *Journal of Clinical Microbiology* *40*, 4544–4546.
- Grundmann, H., Aanensen, D.M., van den Wijngaard, C.C., Spratt, B.G., Harmsen, D., Friedrich, A.W., and European Staphylococcal Reference Laboratory Working Group (2010). Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. *PLoS Med.* *7*, e1000215.
- Guet-Revillet, H., Coignard-Biehler, H., Jais, J.-P., Quesne, G., Frapy, E., Poirée, S., Le Guern, A.-S., Le Flèche-Matéos, A., Hovnanian, A., Consigny, P.-H., et al. (2014). Bacterial pathogens associated with hidradenitis suppurativa, France. *Emerging Infect. Dis.* *20*, 1990–1998.
- Haag, A.F., and Bagnoli, F. (2017). The Role of Two-Component Signal Transduction Systems in *Staphylococcus aureus* Virulence Regulation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *409*, 145–198.
- Haguenoer, E., Baty, G., Pourcel, C., Lartigue, M.-F., Domelier, A.-S., Rosenau, A., Quentin, R., Mereghetti, L., and Lanotte, P. (2011). A multi locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) scheme for *Streptococcus agalactiae* genotyping. *BMC Microbiol.* *11*, 171.
- Haile, D.T., Hughes, J., Vetter, E., Kohner, P., Snyder, R., Patel, R., and Cockerill, F.R. (2002). Frequency of isolation of *Staphylococcus lugdunensis* in consecutive urine cultures and relationship to urinary tract infection. *J. Clin. Microbiol.* *40*, 654–656.
- Haley, K.P., Janson, E.M., Heilbronner, S., Foster, T.J., and Skaar, E.P. (2011). *Staphylococcus lugdunensis* *IsdG* liberates iron from host heme. *J. Bacteriol.* *193*, 4749–4757.
- Hallin, M., Deplano, A., Denis, O., De Mendonca, R., De Ryck, R., and Struelens, M.J. (2007). Validation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis and *spa* Typing for Long-Term, Nationwide Epidemiological Surveillance Studies of *Staphylococcus aureus* Infections. *Journal of Clinical Microbiology* *45*, 127–133.
- Hallin, M., Deplano, A., and Struelens, M.J. (2012). Molecular Typing of Bacterial Pathogens: A Tool for the Epidemiological Study and Control of Infectious Diseases. In *New Frontiers of Molecular Epidemiology of Infectious Diseases*, S. Morand, F. Beaudeau, and J. Cabaret, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 9–25.
- Handke, L.D., Rogers, K.L., Olson, M.E., Somerville, G.A., Jerrells, T.J., Rupp, M.E., Dunman, P.M., and Fey, P.D. (2008). *Staphylococcus epidermidis* *saeR* is an effector of anaerobic growth and a mediator of acute inflammation. *Infect. Immun.* *76*, 141–152.
- Hardy, K.J. (2004). Distribution and characterization of staphylococcal interspersed repeat units (SIRUs) and potential use for strain differentiation. *Microbiology* *150*, 4045–4052.
- Hardy, K.J., Oppenheim, B.A., Gossain, S., Gao, F., and Hawkey, P.M. (2006). Use of Variations in Staphylococcal Interspersed Repeat Units for Molecular Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *Journal of Clinical Microbiology* *44*, 271–273.
- Harmsen, D. (2005). DNA sequence-based tandem repeat analysis of the gene is less discriminatory than typing for methicillin-resistant. *International Journal of Medical Microbiology* *294*, 525–528.
- Harmsen, D., Claus, H., Witte, W., Rothganger, J., Claus, H., Turnwald, D., and Vogel, U. (2003). Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a University Hospital Setting by Using Novel Software for *spa* Repeat Determination and Database Management. *Journal of Clinical Microbiology* *41*, 5442–5448.

- Hartford, O., Francois, P., Vaudaux, P., and Foster, T.J. (1997). The dipeptide repeat region of the fibrinogen-binding protein (clumping factor) is required for functional expression of the fibrinogen-binding domain on the *Staphylococcus aureus* cell surface. *Mol. Microbiol.* *25*, 1065–1076.
- Hébert, G.A. (1990). Hemolysins and other characteristics that help differentiate and biotype *Staphylococcus lugdunensis* and *Staphylococcus schleiferi*. *J. Clin. Microbiol.* *28*, 2425–2431.
- Heilbronner, S., Holden, M.T.G., van Tonder, A., Geoghegan, J.A., Foster, T.J., Parkhill, J., and Bentley, S.D. (2011). Genome sequence of *Staphylococcus lugdunensis* N920143 allows identification of putative colonization and virulence factors: *Staphylococcus lugdunensis* genome sequence. *FEMS Microbiology Letters* *322*, 60–67.
- Heilbronner, S., Hanses, F., Monk, I.R., Speziale, P., and Foster, T.J. (2013). Sortase A Promotes Virulence in Experimental *Staphylococcus lugdunensis* Endocarditis. *Microbiology*.
- Heilbronner, S., Monk, I.R., Brozyna, J.R., Heinrichs, D.E., Skaar, E.P., Peschel, A., and Foster, T.J. (2016). Competing for Iron: Duplication and Amplification of the *isd* Locus in *Staphylococcus lugdunensis* HKU09-01 Provides a Competitive Advantage to Overcome Nutritional Limitation. *PLOS Genetics* *12*, e1006246.
- Heilmann, C., Schweitzer, O., Gerke, C., Vanittanakom, N., Mack, D., and Götz, F. (1996). Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol. Microbiol.* *20*, 1083–1091.
- Heilmann, C., Hussain, M., Peters, G., and Götz, F. (1997). Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol. Microbiol.* *24*, 1013–1024.
- Heldt Manica, L.A., and Cohen, P.R. (2017). *Staphylococcus lugdunensis* Infections of the Skin and Soft Tissue: A Case Series and Review. *Dermatology and Therapy* *7*, 555–562.
- Herchline, T.E., and Ayers, L.W. (1991). Occurrence of *Staphylococcus lugdunensis* in consecutive clinical cultures and relationship of isolation to infection. *J. Clin. Microbiol.* *29*, 419–421.
- Hershberg, R. (2015). Mutation--The Engine of Evolution: Studying Mutation and Its Role in the Evolution of Bacteria. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *7*, a018077.
- Ho, P.-L., Leung, S.M.-H., Chow, K.-H., Tse, C.W.-S., Cheng, V.C.-C., Tse, H., Mak, S.-K., and Lo, W.-K. (2015). Carriage niches and molecular epidemiology of *Staphylococcus lugdunensis* and methicillin-resistant *S. lugdunensis* among patients undergoing long-term renal replacement therapy. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* *81*, 141–144.
- Holland, L.M., Conlon, B., and O’Gara, J.P. (2011). Mutation of *tagO* reveals an essential role for wall teichoic acids in *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. *Microbiology (Reading, Engl.)* *157*, 408–418.
- Holtfreter, S., Grumann, D., Schmutde, M., Nguyen, H.T.T., Eichler, P., Strommenger, B., Kopron, K., Kolata, J., Giedrys-Kalemba, S., Steinmetz, I., et al. (2007). Clonal distribution of superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* *45*, 2669–2680.
- Hung, T., Zaghi, S., Yousefzadeh, J., and Leibowitz, M. (2012). Necrotizing Fasciitis Associated with *Staphylococcus lugdunensis*. *Case Rep Infect Dis* *2012*, 453685.
- Hunter, P.R., and Gaston, M.A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson’s index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology* *26*, 2465–2466.
- Hussain, M., Haggar, A., Peters, G., Chhatwal, G.S., Herrmann, M., Flock, J.-I., and Sinha, B. (2008). More than one tandem repeat domain of the extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus* is required for aggregation, adherence, and host cell invasion but not for leukocyte activation. *Infect. Immun.* *76*, 5615–5623.
- Hussain, M., Steinbacher, T., Peters, G., Heilmann, C., and Becker, K. (2015). The adhesive properties of the *Staphylococcus lugdunensis* multifunctional autolysin AtlL and its role in biofilm formation and internalization. *International Journal of Medical Microbiology* *305*, 129–139.



- Ikawaty, R., Willems, R.J.L., Box, A.T.A., Verhoef, J., and Fluit, A.C. (2008). Novel Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis Method for Rapid Molecular Typing of Human *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 3147–3151.
- Ishiekwene, C., Ghitan, M., Kuhn-Basti, M., Chapnick, E., and Lin, Y.S. (2017). *Staphylococcus lugdunensis* endocarditis with destruction of the ventricular septum and multiple native valves. *IDCases* 7, 14–15.
- Jarraud, S., Lyon, G.J., Figueiredo, A.M., Lina, G., Gérard, L., Vandenesch, F., Etienne, J., Muir, T.W., and Novick, R.P. (2000). Exfoliatin-producing strains define a fourth agr specificity group in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 182, 6517–6522.
- Jarraud, S., Mougel, C., Thioulouse, J., Lina, G., Meugnier, H., Forey, F., Nesme, X., Etienne, J., and Vandenesch, F. (2002). Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infect. Immun.* 70, 631–641.
- Jenul, C., and Horswill, A.R. (2018). Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. *Microbiol Spectr* 6.
- Ji, G., Beavis, R., and Novick, R.P. (1997). Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* 276, 2027–2030.
- Jiao, W.W., Mokrousov, I., Sun, G.Z., Guo, Y.J., Vyazovaya, A., Narvskaya, O., and Shen, A.D. (2008). Evaluation of new variable-number tandem-repeat systems for typing *Mycobacterium tuberculosis* with Beijing genotype isolates from Beijing, China. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1045–1049.
- Johansson, A., Koskiniemi, S., Gottfridsson, P., Wistrom, J., and Monsen, T. (2006). Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis for Typing of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 260–265.
- Jolley, K.A., Kalmusova, J., Feil, E.J., Gupta, S., Musilek, M., Kriz, P., and Maiden, M.C. (2000). Carried meningococci in the Czech Republic: a diverse recombining population. *J. Clin. Microbiol.* 38, 4492–4498.
- Jones, N., Oliver, K.A., Barry, J., Harding, R.M., Bisharat, N., Spratt, B.G., Peto, T., Crook, D.W., and Oxford Group B Streptococcus Consortium (2006). Enhanced invasiveness of bovine-derived neonatal sequence type 17 group B streptococcus is independent of capsular serotype. *Clin. Infect. Dis.* 42, 915–924.
- Josefsson, E., Hartford, O., O'Brien, L., Patti, J.M., and Foster, T. (2001). Protection against Experimental *Staphylococcus aureus* Arthritis by Vaccination with Clumping Factor A, a Novel Virulence Determinant. *The Journal of Infectious Diseases* 184, 1572–1580.
- Josse, J., Laurent, F., and Diot, A. (2017). Staphylococcal Adhesion and Host Cell Invasion: Fibronectin-Binding and Other Mechanisms. *Front Microbiol* 8, 2433.
- Kaabia, N., Scauarda, D., Lena, G., and Drancourt, M. (2002). Molecular identification of *Staphylococcus lugdunensis* in a patient with meningitis. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1824–1825.
- Kahl, B.C., Mellmann, A., Deiwick, S., Peters, G., and Harmsen, D. (2005). Variation of the polymorphic region X of the protein A gene during persistent airway infection of cystic fibrosis patients reflects two independent mechanisms of genetic change in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 502–505.
- Karavasilis, V., Zarkotou, O., Panopoulou, M., Kachrimanidou, M., Themeli-Digalaki, K., Stylianakis, A., Gennimata, V., Ntokou, E., Stathopoulos, C., Tsakris, A., et al. (2015). Wide dissemination of linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in Greece is associated with a linezolid-dependent ST22 clone. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 1625–1629.
- Kasprowicz, A., Białecka, A., Białecka, J., Godzisz, I., Barabasz, W., Jaworska, O., Małachowa, N., and Miedzobrodzki, J. (2011). The occurrence and comparative phenotypic characteristics of *Staphylococcus* spp. from healthy and diseased, household and shelter dogs, based on routine biochemical diagnostic methods. *Pol. J. Microbiol.* 60, 19–26.

- Kassem, I.I., Esseili, M.A., and Sigler, V. (2011). Detection and differentiation of staphylococcal contamination of clinical surfaces using denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Hosp. Infect.* 78, 187–193.
- Kavanaugh, J.S., and Horswill, A.R. (2016). Impact of Environmental Cues on Staphylococcal Quorum Sensing and Biofilm Development. *J. Biol. Chem.* 291, 12556–12564.
- Kinkel, T.L., Roux, C.M., Dunman, P.M., and Fang, F.C. (2013). The *Staphylococcus aureus* SrrAB two-component system promotes resistance to nitrosative stress and hypoxia. *MBio* 4, e00696-00613.
- Kleiner, E., Monk, A.B., Archer, G.L., and Forbes, B.A. (2010). Clinical significance of *Staphylococcus lugdunensis* isolated from routine cultures. *Clin. Infect. Dis.* 51, 801–803.
- Kneuper, H., Cao, Z.P., Twomey, K.B., Zoltner, M., Jäger, F., Cargill, J.S., Chalmers, J., van der Kooi-Pol, M.M., van Dijl, J.M., Ryan, R.P., et al. (2014). Heterogeneity in *ess* transcriptional organization and variable contribution of the *Ess*/Type VII protein secretion system to virulence across closely related *Staphylococcus aureus* strains. *Mol. Microbiol.* 93, 928–943.
- Kogan, G., Sadovskaya, I., Chaignon, P., Chokr, A., and Jabbouri, S. (2006). Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesin. *FEMS Microbiol. Lett.* 255, 11–16.
- Kong, C., Neoh, H., and Nathan, S. (2016). Targeting *Staphylococcus aureus* Toxins: A Potential form of Anti-Virulence Therapy. *Toxins (Basel)* 8.
- Koreen, L., Ramaswamy, S.V., Graviss, E.A., Naidich, S., Musser, J.M., and Kreiswirth, B.N. (2004). *spa* Typing Method for Discriminating among *Staphylococcus aureus* Isolates: Implications for Use of a Single Marker To Detect Genetic Micro- and Macrovariation. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 792–799.
- Koreen, L., Ramaswamy, S.V., Naidich, S., Koreen, I.V., Graff, G.R., Graviss, E.A., and Kreiswirth, B.N. (2005). Comparative Sequencing of the Serine-Aspartate Repeat-Encoding Region of the Clumping Factor B Gene (*clfB*) for Resolution within Clonal Groups of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 3985–3994.
- Köser, C.U., Holden, M.T.G., Ellington, M.J., Cartwright, E.J.P., Brown, N.M., Ogilvy-Stuart, A.L., Hsu, L.Y., Chewapreecha, C., Croucher, N.J., Harris, S.R., et al. (2012). Rapid whole-genome sequencing for investigation of a neonatal MRSA outbreak. *N. Engl. J. Med.* 366, 2267–2275.
- Kuhn, G., Francioli, P., and Blanc, D.S. (2007). Double-Locus Sequence Typing Using *clfB* and *spa*, a Fast and Simple Method for Epidemiological Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 54–62.
- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., et al. (2001). Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 357, 1225–1240.
- Ladjouzi, R., Bizzini, A., van Schaik, W., Zhang, X., Rincé, A., Benachour, A., and Hartke, A. (2015). Loss of Antibiotic Tolerance in *Sod*-Deficient Mutants Is Dependent on the Energy Source and Arginine Catabolism in Enterococci. *J. Bacteriol.* 197, 3283–3293.
- Lakhundi, S., and Zhang, K. (2018). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews* 31.
- Lambe, D.W., Ferguson, K.P., Keplinger, J.L., Gemmell, C.G., and Kalbfleisch, J.H. (1990). Pathogenicity of *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus schleiferi*, and three other coagulase-negative staphylococci in a mouse model and possible virulence factors. *Can. J. Microbiol.* 36, 455–463.
- Lamers, R.P., Stinnett, J.W., Muthukrishnan, G., Parkinson, C.L., and Cole, A.M. (2011). Evolutionary analyses of *Staphylococcus aureus* identify genetic relationships between nasal carriage and clinical isolates. *PLoS ONE* 6, e16426.
- Lang, S., Livesley, M.A., Lambert, P.A., Littler, W.A., and Elliott, T.S. (2000). Identification of a novel antigen from *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 29, 213–220.

- Larsson, J.T., Torpdahl, M., Petersen, R.F., Sorensen, G., Lindstedt, B.A., and Nielsen, E.M. (2009). Development of a new nomenclature for *Salmonella typhimurium* multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA). *Euro Surveill.* 14.
- Layer, F., Vourli, S., Karavasilis, V., Strommenger, B., Dafopoulou, K., Tsakris, A., Werner, G., and Pournaras, S. (2018). Dissemination of linezolid-dependent, linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates belonging to CC5 in German hospitals. *J Antimicrob Chemother* 73, 1181–1184.
- Le, K.Y., and Otto, M. (2015). Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview. *Front Microbiol* 6, 1174.
- Le Flèche, P., Fabre, M., Denoeud, F., Koeck, J.-L., and Vergnaud, G. (2002). High resolution, on-line identification of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on tandem repeat typing. *BMC Microbiol.* 2, 37.
- Le Flèche, P., Jacques, I., Grayon, M., Al Dahouk, S., Bouchon, P., Denoeud, F., Nöckler, K., Neubauer, H., Guilloteau, L.A., and Vergnaud, G. (2006). Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.* 6, 9.
- Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., and Beloin, C. (2014). Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 510–543.
- Lee, T., Pang, S., Abraham, S., and Coombs, G.W. (2019). Antimicrobial-resistant CC17 *Enterococcus faecium*: The past, the present and the future. *J Glob Antimicrob Resist* 16, 36–47.
- Lemee, L., Dhalluin, A., Pestel-Caron, M., Lemeland, J.-F., and Pons, J.-L. (2004). Multilocus Sequence Typing Analysis of Human and Animal *Clostridium difficile* Isolates of Various Toxigenic Types. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 2609–2617.
- Leung, M.J., Nuttall, N., Pryce, T.M., Coombs, G.W., and Pearman, J.W. (1998). Colony variation in *Staphylococcus lugdunensis*. *J. Clin. Microbiol.* 36, 3096–3098.
- Li, M., Guan, M., Jiang, X.F., Yuan, F.Y., Xu, M., Zhang, W.Z., and Lu, Y. (2004). Genetic polymorphism of the accessory gene regulator (*agr*) locus in *Staphylococcus epidermidis* and its association with pathogenicity. *J. Med. Microbiol.* 53, 545–549.
- Li, M., Wang, X., Gao, Q., and Lu, Y. (2009a). Molecular characterization of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from a teaching hospital in Shanghai, China. *J. Med. Microbiol.* 58, 456–461.
- Li, W., Raoult, D., and Fournier, P.-E. (2009b). Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 892–916.
- Liang, M., Mansell, C., Wade, C., Fisher, R., and Devlin, G. (2012). Unusually virulent coagulase-negative *Staphylococcus lugdunensis* is frequently associated with infective endocarditis: a Waikato series of patients. *N. Z. Med. J.* 125, 51–59.
- Liang, X., Zheng, L., Landwehr, C., Lunsford, D., Holmes, D., and Ji, Y. (2005). Global regulation of gene expression by *ArlRS*, a two-component signal transduction regulatory system of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 187, 5486–5492.
- Liesenborghs, L., Peetermans, M., Claes, J., Veloso, T.R., Vandenbriele, C., Criel, M., Lox, M., Peetermans, W.E., Heilbronner, S., de Groot, P.G., et al. (2016). Shear-Resistant Binding to von Willebrand Factor Allows *Staphylococcus lugdunensis* to Adhere to the Cardiac Valves and Initiate Endocarditis. *J. Infect. Dis.* 213, 1148–1156.
- Lin, J.-F., Cheng, C.-W., Kuo, A.-J., Liu, T.-P., Yang, C.-C., Huang, C.-T., Lee, M.-H., and Lu, J.-J. (2015). Clinical experience and microbiologic characteristics of invasive *Staphylococcus lugdunensis* infection in a tertiary center in northern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 48, 406–412.
- Lindsay, J.A. (2010). Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 98–103.

- Lindstedt, B.A., Torpdahl, M., Vergnaud, G., Le Hello, S., Weill, F.X., Tietze, E., Malorny, B., Prendergast, D.M., Ní Ghallchoir, E., Lista, R.F., et al. (2013). Use of multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) in eight European countries, 2012. *Euro Surveill.* *18*, 20385.
- Liu, C., Sun, D., Zhu, J., and Liu, W. (2019). Two-Component Signal Transduction Systems: A Major Strategy for Connecting Input Stimuli to Biofilm Formation. *Front. Microbiol.* *9*, 3279.
- Liu, P.-Y., Huang, Y.-F., Tang, C.-W., Chen, Y.-Y., Hsieh, K.-S., Ger, L.-P., Chen, Y.-S., and Liu, Y.-C. (2010). *Staphylococcus lugdunensis* Infective Endocarditis: A Literature Review and Analysis of Risk Factors. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* *43*, 478–484.
- Liu, Q., Yeo, W.-S., and Bae, T. (2016). The SaeRS Two-Component System of *Staphylococcus aureus*. *Genes (Basel)* *7*.
- Lou, Q., Zhu, T., Hu, J., Ben, H., Yang, J., Yu, F., Liu, J., Wu, Y., Fischer, A., Francois, P., et al. (2011). Role of the SaeRS two-component regulatory system in *Staphylococcus epidermidis* autolysis and biofilm formation. *BMC Microbiol.* *11*, 146.
- Lou, Q., Qi, Y., Ma, Y., and Qu, D. (2014). Two-component signal transduction system SaeRS positively regulates *Staphylococcus epidermidis* glucose metabolism. *ScientificWorldJournal* *2014*, 908121.
- Lourtet-Hascoët, J., Bicart-See, A., Félicé, M.P., Giordano, G., and Bonnet, E. (2016). *Staphylococcus lugdunensis*, a serious pathogen in periprosthetic joint infections: comparison to *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Int. J. Infect. Dis.* *51*, 56–61.
- Ludlam, H., and Phillips, I. (1989). *Staphylococcus lugdunensis* peritonitis. *Lancet* *2*, 1394.
- Maiden, M.C.J. (2006). Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* *60*, 561–588.
- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., et al. (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 3140–3145.
- Mainiero, M., Goerke, C., Geiger, T., Gonser, C., Herbert, S., and Wolz, C. (2010). Differential target gene activation by the *Staphylococcus aureus* two-component system saeRS. *J. Bacteriol.* *192*, 613–623.
- Maira-Litrán, T., Kropec, A., Abeygunawardana, C., Joyce, J., Mark, G., Goldmann, D.A., and Pier, G.B. (2002). Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Infect. Immun.* *70*, 4433–4440.
- Malachowa, N., Sabat, A., Gniadkowski, M., Krzyszton-Russjan, J., Empel, J., Miedzobrodzki, J., Kosowska-Shick, K., Appelbaum, P.C., and Hryniewicz, W. (2005). Comparison of Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis with Pulsed-Field Gel Electrophoresis, spa Typing, and Multilocus Sequence Typing for Clonal Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* *43*, 3095–3100.
- Mann, E.E., Rice, K.C., Boles, B.R., Endres, J.L., Ranjit, D., Chandramohan, L., Tsang, L.H., Smeltzer, M.S., Horswill, A.R., and Bayles, K.W. (2009). Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS ONE* *4*, e5822.
- Marlinghaus, L., Becker, K., Korte, M., Neumann, S., Gatermann, S.G., and Szabados, F. (2012). Construction and characterization of three knockout mutants of the *fbl* gene in *Staphylococcus lugdunensis*: CHARACTERIZATION OF ISOGENIC MUTANTS OF FBL. *APMIS* *120*, 108–116.
- Martin, P.K., Li, T., Sun, D., Biek, D.P., and Schmid, M.B. (1999). Role in cell permeability of an essential two-component system in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* *181*, 3666–3673.
- Mashruwala, A.A., and Boyd, J.M. (2017). The *Staphylococcus aureus* SrrAB Regulatory System Modulates Hydrogen Peroxide Resistance Factors, Which Imparts Protection to Aconitase during Aerobic Growth. *PLoS ONE* *12*, e0170283.

- Mashruwala, A.A., Guchte, A. van de, and Boyd, J.M. (2017). Impaired respiration elicits SrrAB-dependent programmed cell lysis and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Elife* 6.
- Matas, A., Veiga, A., and Gabriel, J.P. (2015). Brain Abscess due to *Staphylococcus lugdunensis* in the Absence of Endocarditis or Bacteremia. *Case Rep Neurol* 7, 1–5.
- Mateo, M., Maestre, J.-R., Aguilar, L., Cafini, F., Puente, P., Sánchez, P., Alou, L., Giménez, M.-J., and Prieto, J. (2005). Genotypic versus phenotypic characterization, with respect to susceptibility and identification, of 17 clinical isolates of *Staphylococcus lugdunensis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56, 287–291.
- McDougal, L.K., Steward, C.D., Killgore, G.E., Chaitram, J.M., McAllister, S.K., and Tenover, F.C. (2003). Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States: Establishing a National Database. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 5113–5120.
- McHardy, I.H., Veltman, J., Hindler, J., Bruxvoort, K., Carvalho, M.M., and Humphries, R.M. (2017). Clinical and Microbiological Aspects of  $\beta$ -Lactam Resistance in *Staphylococcus lugdunensis*. *J. Clin. Microbiol.* 55, 585–595.
- van der Mee-Marquet, N., Achard, A., Mereghetti, L., Danton, A., Minier, M., and Quentin, R. (2003). *Staphylococcus lugdunensis* Infections: High Frequency of Inguinal Area Carriage. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 1404–1409.
- Mei-Dan, O., Mann, G., Steinbacher, G., Ballester, S.J., Cugat, R.B., and Alvarez, P.D. (2008). Septic arthritis with *Staphylococcus lugdunensis* following arthroscopic ACL revision with BPTB allograft. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 16, 15–18.
- Meier, S., Goerke, C., Wolz, C., Seidl, K., Homerova, D., Schulthess, B., Kormanec, J., Berger-Bächli, B., and Bischoff, M. (2007). *sigmaB* and the *sigmaB*-dependent *arlRS* and *yabJ-spoVG* loci affect capsule formation in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 75, 4562–4571.
- Melles, D.C., Schouls, L., François, P., Herzig, S., Verbrugh, H.A., Belkum, A., and Schrenzel, J. (2009). High-throughput typing of *Staphylococcus aureus* by amplified fragment length polymorphism (AFLP) or multi-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) reveals consistent strain relatedness. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 28, 39–45.
- Mellmann, A., Mosters, J., Bartelt, E., Roggentin, P., Ammon, A., Friedrich, A.W., Karch, H., and Harmsen, D. (2004). Sequence-Based Typing of *flaB* Is a More Stable Screening Tool Than Typing of *flaA* for Monitoring of *Campylobacter* Populations. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 4840–4842.
- Mellmann, A., Friedrich, A.W., Rosenkötter, N., Rothgänger, J., Karch, H., Reintjes, R., and Harmsen, D. (2006). Automated DNA Sequence-Based Early Warning System for the Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Outbreaks. *PLoS Medicine* 3, e33.
- Mellmann, A., Weniger, T., Berssenbrügge, C., Rothgänger, J., Sammeth, M., Stoye, J., and Harmsen, D. (2007). Based Upon Repeat Pattern (BURP): an algorithm to characterize the long-term evolution of *Staphylococcus aureus* populations based on *spa* polymorphisms. *BMC Microbiology* 7, 98.
- Mellmann, A., Weniger, T., Berssenbrugge, C., Keckevoet, U., Friedrich, A.W., Harmsen, D., and Grundmann, H. (2008). Characterization of Clonal Relatedness among the Natural Population of *Staphylococcus aureus* Strains by Using *spa* Sequence Typing and the BURP (Based upon Repeat Patterns) Algorithm. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 2805–2808.
- Memmi, G., Nair, D.R., and Cheung, A. (2012). Role of *ArlRS* in autolysis in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. Bacteriol.* 194, 759–767.
- Mendes, R.E., Deshpande, L.M., Costello, A.J., and Farrell, D.J. (2012). Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from U.S. hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 4656–4661.
- Mertens, A., and Ghebremedhin, B. (2013). Genetic determinants and biofilm formation of clinical *Staphylococcus epidermidis* isolates from blood cultures and indwelling devices. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 3, 111–119.

- Miragaia, M., Thomas, J.C., Couto, I., Enright, M.C., and de Lencastre, H. (2007). Inferring a Population Structure for *Staphylococcus epidermidis* from Multilocus Sequence Typing Data. *Journal of Bacteriology* 189, 2540–2552.
- Miragaia, M., Carriço, J.A., Thomas, J.C., Couto, I., Enright, M.C., and de Lencastre, H. (2008). Comparison of molecular typing methods for characterization of *Staphylococcus epidermidis*: proposal for clone definition. *J. Clin. Microbiol.* 46, 118–129.
- Miro, J.M., Anguera, I., Cabell, C.H., Chen, A.Y., Stafford, J.A., Corey, G.R., Olaison, L., Eykyn, S., Hoen, B., Abrutyn, E., et al. (2005). *Staphylococcus aureus* native valve infective endocarditis: report of 566 episodes from the International Collaboration on Endocarditis Merged Database. *Clin. Infect. Dis.* 41, 507–514.
- Missineo, A., Di Poto, A., Geoghegan, J.A., Rindi, S., Heilbronner, S., Gianotti, V., Arciola, C.R., Foster, T.J., Speziale, P., and Pietrocola, G. (2014). IsdC from *Staphylococcus lugdunensis* induces biofilm formation under low-iron growth conditions. *Infect. Immun.* 82, 2448–2459.
- Mitchell, J., Tristan, A., and Foster, T.J. (2004). Characterization of the fibrinogen-binding surface protein Fbl of *Staphylococcus lugdunensis*. *Microbiology (Reading, Engl.)* 150, 3831–3841.
- Monk, A.B., and Archer, G.L. (2007). Use of outer surface protein repeat regions for improved genotyping of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Microbiol.* 45, 730–735.
- Moormeier, D.E., and Bayles, K.W. (2017). *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Mol. Microbiol.* 104, 365–376.
- Moormeier, D.E., Endres, J.L., Mann, E.E., Sadykov, M.R., Horswill, A.R., Rice, K.C., Fey, P.D., and Bayles, K.W. (2013). Use of microfluidic technology to analyze gene expression during *Staphylococcus aureus* biofilm formation reveals distinct physiological niches. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 3413–3424.
- Moormeier, D.E., Bose, J.L., Horswill, A.R., and Bayles, K.W. (2014). Temporal and stochastic control of *Staphylococcus aureus* biofilm development. *MBio* 5, e01341-01314.
- Moreillon, P., Entenza, J.M., Francioli, P., Mcdevitt, D., Foster, T.J., Ois, P.F., and Vaudaux, P. (1995). Role of *Staphylococcus aureus* Coagulase and Clumping Factor in Pathogenesis of Experimental Endocarditis. *INFECT. IMMUN.* 63, 6.
- Mouw, J.K., Ou, G., and Weaver, V.M. (2014). Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 771–785.
- Murdoch, D.R., Everts, R.J., Chambers, S.T., and Cowan, I.A. (1996). Vertebral osteomyelitis due to *Staphylococcus lugdunensis*. *J. Clin. Microbiol.* 34, 993–994.
- Muthukrishnan, G., Lamers, R.P., Ellis, A., Paramanandam, V., Persaud, A.B., Tafur, S., Parkinson, C.L., and Cole, A.M. (2013). Longitudinal genetic analyses of *Staphylococcus aureus* nasal carriage dynamics in a diverse population. *BMC Infectious Diseases* 13.
- Nadon, C.A., Trees, E., Ng, L.K., Møller Nielsen, E., Reimer, A., Maxwell, N., Kubota, K.A., Gerner-Smidt, P., and the MLVA Harmonization Working Group, C. (2013). Development and application of MLVA methods as a tool for inter-laboratory surveillance. *Eurosurveillance* 18.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (1999). Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents (Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards).
- Nei, M., and Gojbori, T. (1986). Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 3, 418–426.
- Nesher, L., Tarrand, J., Chemaly, R.F., and Rolston, K.V. (2017). *Staphylococcus lugdunensis* infections, filling in the gaps: a 3-year retrospective review from a comprehensive cancer center. *Support Care Cancer* 25, 1063–1069.

- Nichol, K.A., Adam, H.J., Hussain, Z., Mulvey, M.R., McCracken, M., Mataseje, L.F., Thompson, K., Kost, S., Lagacé-Wiens, P.R.S., Hoban, D.J., et al. (2011). Comparison of community-associated and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canada: results of the CANWARD 2007-2009 study. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 69, 320–325.
- Nicolas-Chanoine, M.-H., Bertrand, X., and Madec, J.-Y. (2014). *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 543–574.
- Nilsson, M., Bjerketorp, J., Guss, B., and Frykberg, L. (2004a). A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 241, 87–93.
- Nilsson, M., Bjerketorp, J., Wiebenschj ,  ., Ljungh,  ., Frykberg, L., and Guss, B. (2004b). A von Willebrand factor-binding protein from *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiology Letters* 234, 155–161.
- Noguchi, N., Goto, K., Ro, T., Narui, K., Ko, M., Nasu, Y., Utsumi, K., Takazawa, K., Moriyasu, F., and Sasatsu, M. (2010). Using the tannase gene to rapidly and simply identify *Staphylococcus lugdunensis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 66, 120–123.
- Non, L.R., and Santos, C.A.Q. (2017). The occurrence of infective endocarditis with *Staphylococcus lugdunensis* bacteremia: A retrospective cohort study and systematic review. *Journal of Infection* 74, 179–186.
- Novick, R.P. (2003). Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol. Microbiol.* 48, 1429–1449.
- Novick, R.P., and Jiang, D. (2003). The staphylococcal saeRS system coordinates environmental signals with agr quorum sensing. *Microbiology (Reading, Engl.)* 149, 2709–2717.
- O’Brien, L.M., Walsh, E.J., Massey, R.C., Peacock, S.J., and Foster, T.J. (2002). *Staphylococcus aureus* clumping factor B (ClfB) promotes adherence to human type I cyokeratin 10: implications for nasal colonization. *Cell. Microbiol.* 4, 759–770.
- O’Gara, J.P. (2007). *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 270, 179–188.
- O’Hara, F.P., Suaya, J.A., Ray, G.T., Baxter, R., Brown, M.L., Mera, R.M., Close, N.M., Thomas, E., and Amrine-Madsen, H. (2016). *spa* Typing and Multilocus Sequence Typing Show Comparable Performance in a Macroepidemiologic Study of *Staphylococcus aureus* in the United States. *Microbial Drug Resistance* 22, 88–96.
- Ohshima, C., Takahashi, H., Iwakawa, A., Kuda, T., and Kimura, B. (2017). A novel typing method for *Listeria monocytogenes* using high-resolution melting analysis (HRMA) of tandem repeat regions. *Int. J. Food Microbiol.* 253, 36–42.
- de Oliveira Calsolari, R.A., Pereira, V.C., Araújo Júnior, J.P., and de Souza da Cunha, M. de L.R. (2011). Determination of toxigenic capacity by reverse transcription polymerase chain reaction in coagulase-negative staphylococci and *Staphylococcus aureus* isolated from newborns in Brazil. *Microbiol. Immunol.* 55, 394–407.
- Olson, M.E., Todd, D.A., Schaeffer, C.R., Paharik, A.E., Van Dyke, M.J., B ttner, H., Dunman, P.M., Rohde, H., Cech, N.B., Fey, P.D., et al. (2014). *Staphylococcus epidermidis* agr quorum-sensing system: signal identification, cross talk, and importance in colonization. *J. Bacteriol.* 196, 3482–3493.
- Oshida, T., Sugai, M., Komatsuzawa, H., Hong, Y.M., Suginaka, H., and Tomasz, A. (1995). A *Staphylococcus aureus* autolysin that has an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain and an endo-beta-N-acetylglucosaminidase domain: cloning, sequence analysis, and characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 285–289.
- O’Toole, G., Kaplan, H.B., and Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 49–79.
- Otter, J.A., and French, G.L. (2011). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains as a cause of healthcare-associated infection. *J. Hosp. Infect.* 79, 189–193.

- Otto, M. (2013). Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu. Rev. Med.* 64, 175–188.
- Otto, M. (2018). Staphylococcal Biofilms. *Microbiol Spectr* 6.
- Otto, M., Echner, H., Voelter, W., and Götz, F. (2001). Pheromone cross-inhibition between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* 69, 1957–1960.
- Papapetropoulos, N., Papapetropoulou, M., and Vantarakis, A. (2013). Abscesses and wound infections due to *Staphylococcus lugdunensis*: report of 16 cases. *Infection* 41, 525–528.
- Pareja, J., Gupta, K., and Koziel, H. (1998). The toxic shock syndrome and *Staphylococcus lugdunensis* bacteremia. *Ann. Intern. Med.* 128, 603–604.
- Patel, R. (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. *Clin. Infect. Dis.* 57, 564–572.
- Patel, K., and Golemi-Kotra, D. (2015). Signaling mechanism by the *Staphylococcus aureus* two-component system LytSR: role of acetyl phosphate in bypassing the cell membrane electrical potential sensor LytS. *F1000Res* 4, 79.
- Patel, R., Piper, K.E., Rouse, M.S., Uhl, J.R., Cockerill, F.R., and Steckelberg, J.M. (2000). Frequency of isolation of *Staphylococcus lugdunensis* among staphylococcal isolates causing endocarditis: a 20-year experience. *J. Clin. Microbiol.* 38, 4262–4263.
- Patti, J.M., Allen, B.L., McGavin, M.J., and Höök, M. (1994). MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu. Rev. Microbiol.* 48, 585–617.
- Patton, T.G., Rice, K.C., Foster, M.K., and Bayles, K.W. (2005). The *Staphylococcus aureus* cidC gene encodes a pyruvate oxidase that affects acetate metabolism and cell death in stationary phase. *Mol. Microbiol.* 56, 1664–1674.
- Patton, T.G., Yang, S.-J., and Bayles, K.W. (2006). The role of proton motive force in expression of the *Staphylococcus aureus* cid and Irg operons. *Mol. Microbiol.* 59, 1395–1404.
- Paulsson, M., Petersson, A.C., and Ljungh, A. (1993). Serum and tissue protein binding and cell surface properties of *Staphylococcus lugdunensis*. *J. Med. Microbiol.* 38, 96–102.
- Pei, J., and Grishin, N.V. (2001). Type II CAAX prenyl endopeptidases belong to a novel superfamily of putative membrane-bound metalloproteases. *Trends Biochem. Sci.* 26, 275–277.
- Peng, H.L., Novick, R.P., Kreiswirth, B., Kornblum, J., and Schlievert, P. (1988). Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (agr) in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 170, 4365–4372.
- Pereira, E.M., Oliveira, F.L.F., Schuenck, R.P., Zoletti, G.O., and dos Santos, K.R.N. (2010). Detection of *Staphylococcus lugdunensis* by a new species-specific PCR based on the *fbl* gene. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 58, 295–298.
- Pereira, E.M., Teixeira, C.A.A., Alvarenga, A.L.M., Schuenck, R.P., Giambiagi-Demarval, M., Holandino, C., Mattos-Guaraldi, A.L., and dos Santos, K.R.N. (2012). A Brazilian lineage of *Staphylococcus lugdunensis* presenting rough colony morphology may adhere to and invade lung epithelial cells. *J. Med. Microbiol.* 61, 463–469.
- Perez, T., Cascales, E., Munoz-Davila, M.J., and Gallego, M.C. (2015). Urinary tract infection due to *Staphylococcus lugdunensis* in a 70-year-old woman with cystocele grade 3. *JMM Case Reports* 2.
- Periasamy, S., Joo, H.-S., Duong, A.C., Bach, T.-H.L., Tan, V.Y., Chatterjee, S.S., Cheung, G.Y.C., and Otto, M. (2012). How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 1281–1286.



- Pfaller, M.A., Jones, R.N., Doern, G.V., Sader, H.S., Kugler, K.C., and Beach, M.L. (1999). Survey of blood stream infections attributable to gram-positive cocci: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and Latin America from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. SENTRY Participants Group. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* *33*, 283–297.
- Pinna, A., Zanetti, S., Sotgiu, M., Sechi, L.A., Fadda, G., and Carta, F. (1999). Identification and antibiotic susceptibility of coagulase negative staphylococci isolated in corneal/external infections. *Br J Ophthalmol* *83*, 771–773.
- Ponnuraj, K., Bowden, M.G., Davis, S., Gurusiddappa, S., Moore, D., Choe, D., Xu, Y., Hook, M., and Narayana, S.V.L. (2003). A “dock, lock, and latch” Structural Model for a Staphylococcal Adhesin Binding to Fibrinogen. *Cell* *115*, 217–228.
- Pragman, A.A., Yarwood, J.M., Tripp, T.J., and Schlievert, P.M. (2004). Characterization of Virulence Factor Regulation by SrrAB, a Two-Component System in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* *186*, 2430–2438.
- Pragman, A.A., Ji, Y., and Schlievert, P.M. (2007). Repression of *Staphylococcus aureus* SrrAB using inducible antisense srrA alters growth and virulence factor transcript levels. *Biochemistry* *46*, 314–321.
- Que, Y.-A., Haefliger, J.-A., Piroth, L., François, P., Widmer, E., Entenza, J.M., Sinha, B., Herrmann, M., Francioli, P., Vaudaux, P., et al. (2005). Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis. *The Journal of Experimental Medicine* *201*, 1627–1635.
- Radin, J.N., Kelliher, J.L., Párraga Solórzano, P.K., and Kehl-Fie, T.E. (2016). The Two-Component System ArlRS and Alterations in Metabolism Enable *Staphylococcus aureus* to Resist Calprotectin-Induced Manganese Starvation. *PLoS Pathog.* *12*, e1006040.
- Ragon, M., Wirth, T., Hollandt, F., Lavenir, R., Lecuit, M., Le Monnier, A., and Brisse, S. (2008). A New Perspective on *Listeria monocytogenes* Evolution. *PLoS Pathogens* *4*, e1000146.
- Rajendran, N.B., Eikmeier, J., Becker, K., Hussain, M., Peters, G., and Heilmann, C. (2015). Important contribution of the novel locus comEB to extracellular DNA-dependent *Staphylococcus lugdunensis* biofilm formation. *Infect. Immun.* *83*, 4682–4692.
- Rakov, A.V., Ubukata, K., and Robinson, D.A. (2011). Population structure of hyperinvasive serotype 12F, clonal complex 218 *Streptococcus pneumoniae* revealed by multilocus boxB sequence typing. *Infect. Genet. Evol.* *11*, 1929–1939.
- Ranjit, D.K., Endres, J.L., and Bayles, K.W. (2011). *Staphylococcus aureus* CidA and LrgA proteins exhibit holin-like properties. *J. Bacteriol.* *193*, 2468–2476.
- Rautenberg, M., Joo, H.-S., Otto, M., and Peschel, A. (2011). Neutrophil responses to staphylococcal pathogens and commensals via the formyl peptide receptor 2 relates to phenol-soluble modulins release and virulence. *FASEB J.* *25*, 1254–1263.
- Resch, A., Rosenstein, R., Nerz, C., and Götz, F. (2005). Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* *71*, 2663–2676.
- Rice, K.C., Firek, B.A., Nelson, J.B., Yang, S.-J., Patton, T.G., and Bayles, K.W. (2003). The *Staphylococcus aureus* cidAB operon: evaluation of its role in regulation of murein hydrolase activity and penicillin tolerance. *J. Bacteriol.* *185*, 2635–2643.
- Rice, K.C., Mann, E.E., Endres, J.L., Weiss, E.C., Cassat, J.E., Smeltzer, M.S., and Bayles, K.W. (2007). The cidA murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 8113–8118.

- Risley, A.L., Loughman, A., Cywes-Bentley, C., Foster, T.J., and Lee, J.C. (2007). Capsular Polysaccharide Masks Clumping Factor A–Mediated Adherence of *Staphylococcus aureus* to Fibrinogen and Platelets. *The Journal of Infectious Diseases* 196, 919–927.
- Robinson, D.A., and Enright, M.C. (2003). Evolutionary Models of the Emergence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47, 3926–3934.
- Rocha, E.P.C., Smith, J.M., Hurst, L.D., Holden, M.T.G., Cooper, J.E., Smith, N.H., and Feil, E.J. (2006). Comparisons of dN/dS are time dependent for closely related bacterial genomes. *J. Theor. Biol.* 239, 226–235.
- Rodionov, D.A. (2007). Comparative genomic reconstruction of transcriptional regulatory networks in bacteria. *Chem. Rev.* 107, 3467–3497.
- Rohde, H., Burandt, E.C., Siemssen, N., Frommelt, L., Burdelski, C., Wurster, S., Scherpe, S., Davies, A.P., Harris, L.G., Horstkotte, M.A., et al. (2007). Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* 28, 1711–1720.
- Rook, K.A., Brown, D.C., Rankin, S.C., and Morris, D.O. (2012). Case-control study of *Staphylococcus lugdunensis* infection isolates from small companion animals. *Vet. Dermatol.* 23, 476–e90.
- Rosenau, A., Martins, K., Amor, S., Gannier, F., Lanotte, P., van der Mee-Marquet, N., Mereghetti, L., and Quentin, R. (2007). Evaluation of the ability of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from genital and neonatal specimens to bind to human fibrinogen and correlation with characteristics of the *fbsA* and *fbsB* genes. *Infect. Immun.* 75, 1310–1317.
- Rosenstein, R., and Götz, F. (2013). What distinguishes highly pathogenic staphylococci from medium- and non-pathogenic? *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 358, 33–89.
- Sabat, A., Krzyszton-Russjan, J., Strzalka, W., Filipek, R., Kosowska, K., Hryniewicz, W., Travis, J., and Potempa, J. (2003). New Method for Typing *Staphylococcus aureus* Strains: Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis of Polymorphism and Genetic Relationships of Clinical Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 1801–1804.
- Sabat, A.J., Budimir, A., Nashev, D., Sá-Leão, R., van Dijl, J. m, Laurent, F., Grundmann, H., Friedrich, A.W., and ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM) (2013). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill.* 18, 20380.
- Sabe, M.A., Shrestha, N.K., Gordon, S., and Menon, V. (2014). *Staphylococcus lugdunensis*: a rare but destructive cause of coagulase-negative staphylococcus infective endocarditis. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care* 3, 275–280.
- Sader, H.S., and Jones, R.N. (2012). Antimicrobial activity of daptomycin in comparison to glycopeptides and other antimicrobials when tested against numerous species of coagulase-negative *Staphylococcus*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 73, 212–214.
- Sadovskaya, I., Chaignon, P., Kogan, G., Chokr, A., Vinogradov, E., and Jabbouri, S. (2006). Carbohydrate-containing components of biofilms produced in vitro by some staphylococcal strains related to orthopaedic prosthesis infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 47, 75–82.
- Sadykov, M.R., and Bayles, K.W. (2012). The control of death and lysis in staphylococcal biofilms: a coordination of physiological signals. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 211–215.
- Said, K.B., Ramotar, K., Zhu, G., and Zhao, X. (2009). Repeat-based subtyping and grouping of *Staphylococcus aureus* from human infections and bovine mastitis using the R-domain of the clumping factor A gene. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 63, 24–37.
- Said, K.B., Ismail, J., Campbell, J., Mulvey, M.R., Bourgault, A.-M., Messier, S., and Zhao, X. (2010). Regional Profiling for Determination of Genotype Diversity of Mastitis-Specific *Staphylococcus aureus* Lineage in Canada

by Use of Clumping Factor A, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and spa Typing. *Journal of Clinical Microbiology* 48, 375–386.

Salipante, S.J., SenGupta, D.J., Cummings, L.A., Land, T.A., Hoogestraat, D.R., and Cookson, B.T. (2015). Application of whole-genome sequencing for bacterial strain typing in molecular epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 53, 1072–1079.

Salzberg, S.L., and Yorke, J.A. (2005). Beware of mis-assembled genomes. *Bioinformatics* 21, 4320–4321.

Sammeth, M., Weniger, T., Harmsen, D., and Stoye, J. (2005). Alignment of Tandem Repeats with Excision, Duplication, Substitution and Indels (EDSI). In *Algorithms in Bioinformatics*, R. Casadio, and G. Myers, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 276–290.

Sandoe, J.A., and Longshaw, C.M. (2001). Ventriculoperitoneal shunt infection caused by *Staphylococcus lugdunensis*. *Clin. Microbiol. Infect.* 7, 385–387.

Schnitzler, N., Meilicke, R., Conrads, G., Frank, D., and Haase, G. (1998). *Staphylococcus lugdunensis*: report of a case of peritonitis and an easy-to-perform screening strategy. *J. Clin. Microbiol.* 36, 812–813.

Schouls, L.M., Spalburg, E.C., van Luit, M., Huijsdens, X.W., Pluister, G.N., van Santen-Verheuvél, M.G., van der Heide, H.G.J., Grundmann, H., Heck, M.E.O.C., and de Neeling, A.J. (2009). Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis of *Staphylococcus Aureus*: Comparison with Pulsed-Field Gel Electrophoresis and spa-Typing. *PLoS ONE* 4, e5082.

Schürch, A.C., Arredondo-Alonso, S., Willems, R.J.L., and Goering, R.V. (2018). Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches. *Clin. Microbiol. Infect.* 24, 350–354.

Seng, P., Traore, M., Lavigne, J.-P., Maulin, L., Lagier, J.-C., Thiery, J.-F., Levy, P.-Y., Roger, P.-M., Bonnet, E., Sotto, A., et al. (2017). *Staphylococcus lugdunensis*: a neglected pathogen of infections involving fracture-fixation devices. *Int Orthop* 41, 1085–1091.

Shah, N.B., Osmon, D.R., Fadel, H., Patel, R., Kohner, P.C., Steckelberg, J.M., Mabry, T., and Berbari, E.F. (2010). Laboratory and clinical characteristics of *Staphylococcus lugdunensis* prosthetic joint infections. *J. Clin. Microbiol.* 48, 1600–1603.

Sharma-Kuinkel, B.K., Mann, E.E., Ahn, J.-S., Kuechenmeister, L.J., Dunman, P.M., and Bayles, K.W. (2009). The *Staphylococcus aureus* LytSR Two-Component Regulatory System Affects Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology* 191, 4767–4775.

Shockman, G.D., Daneo-Moore, L., Kariyama, R., and Massidda, O. (1996). Bacterial walls, peptidoglycan hydrolases, autolysins, and autolysis. *Microb. Drug Resist.* 2, 95–98.

Shopsin, B., Gomez, M., Montgomery, S.O., Smith, D.H., Waddington, M., Dodge, D.E., Bost, D.A., Riehman, M., Naidich, S., and Kreiswirth, B.N. (1999). Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3556–3563.

Sifri, C.D., Begun, J., Ausubel, F.M., and Calderwood, S.B. (2003). *Caenorhabditis elegans* as a model host for *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Infect. Immun.* 71, 2208–2217.

Singh, R., and Ray, P. (2014). Quorum sensing-mediated regulation of staphylococcal virulence and antibiotic resistance. *Future Microbiol* 9, 669–681.

Singh, V.K., Vaish, M., Johansson, T.R., Baum, K.R., Ring, R.P., Singh, S., Shukla, S.K., and Moskovitz, J. (2015). Significance of four methionine sulfoxide reductases in *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* 10, e0117594.

Singh, V.K., Singh, K., and Baum, K. (2018). The Role of Methionine Sulfoxide Reductases in Oxidative Stress Tolerance and Virulence of *Staphylococcus aureus* and Other Bacteria. *Antioxidants (Basel)* 7.

- Smith, J.M., Smith, N.H., O'Rourke, M., and Spratt, B.G. (1993). How clonal are bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *90*, 4384–4388.
- Sobral, D., Le Cann, P., Gerard, A., Jarraud, S., Lebeau, B., Loisy-Hamon, F., Vergnaud, G., and Pourcel, C. (2011). High-throughput typing method to identify a non-outbreak-involved *Legionella pneumophila* strain colonizing the entire water supply system in the town of Rennes, France. *Appl. Environ. Microbiol.* *77*, 6899–6907.
- Solyman, S.M., Black, C.C., Duim, B., Perreten, V., van Duijkeren, E., Wagenaar, J.A., Eberlein, L.C., Sadeghi, L.N., Videla, R., Bemis, D.A., et al. (2013). Multilocus Sequence Typing for Characterization of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Clinical Microbiology* *51*, 306–310.
- Sørum, M., Sangvik, M., Stegger, M., Olsen, R.S., Johannessen, M., Skov, R., and Sollid, J.U.E. (2013). *Staphylococcus aureus* mutants lacking cell wall-bound protein A found in isolates from bacteraemia, MRSA infection and a healthy nasal carrier. *Pathog Dis* *67*, 19–24.
- Speziale, P., Pietrocola, G., Foster, T.J., and Geoghegan, J.A. (2014). Protein-based biofilm matrices in *Staphylococci*. *Front Cell Infect Microbiol* *4*, 171.
- Spratt, B.G., and Maiden, M.C. (1999). Bacterial population genetics, evolution and epidemiology. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* *354*, 701–710.
- Stefani, S., Chung, D.R., Lindsay, J.A., Friedrich, A.W., Kearns, A.M., Westh, H., and MacKenzie, F.M. (2012). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *International Journal of Antimicrobial Agents* *39*, 273–282.
- Steinhuber, A., Goerke, C., Bayer, M.G., Döring, G., and Wolz, C. (2003). Molecular architecture of the regulatory Locus *sae* of *Staphylococcus aureus* and its impact on expression of virulence factors. *J. Bacteriol.* *185*, 6278–6286.
- Stewart, P.S., and Costerton, J.W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* *358*, 135–138.
- Stewart, P.S., and Franklin, M.J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* *6*, 199–210.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., and Goudreau, P.N. (2000). Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* *69*, 183–215.
- Strommenger, B., Kettlitz, C., Weniger, T., Harmsen, D., Friedrich, A.W., and Witte, W. (2006). Assignment of *Staphylococcus* Isolates to Groups by *spa* Typing, *Sma*I Macrorestriction Analysis, and Multilocus Sequence Typing. *Journal of Clinical Microbiology* *44*, 2533–2540.
- Strommenger, B., Braulke, C., Heuck, D., Schmidt, C., Pasemann, B., Nubel, U., and Witte, W. (2008). *spa* Typing of *Staphylococcus aureus* as a Frontline Tool in Epidemiological Typing. *Journal of Clinical Microbiology* *46*, 574–581.
- Szabados, F., Nowotny, Y., Marlinghaus, L., Korte, M., Neumann, S., Kaase, M., and Gatermann, S.G. (2011a). Occurrence of genes of putative fibrinogen binding proteins and hemolysins, as well as of their phenotypic correlates in isolates of *S. lugdunensis* of different origins. *BMC Research Notes* *4*, 113.
- Szabados, F., Marlinghaus, L., Korte, M., Neumann, S., Kaase, M., and Gatermann, S.G. (2011b). *Fbl* is not involved in the invasion of eukaryotic epithelial and endothelial cells by *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* *324*, 48–55.
- Szczuka, E., Trawczyński, K., and Kaznowski, A. (2014). Clonal analysis of *Staphylococcus hominis* strains isolated from hospitalized patients. *Pol. J. Microbiol.* *63*, 349–354.
- Taglialegna, A., Navarro, S., Ventura, S., Garnett, J.A., Matthews, S., Penades, J.R., Lasa, I., and Valle, J. (2016). *Staphylococcal Bap* Proteins Build Amyloid Scaffold Biofilm Matrices in Response to Environmental Signals. *PLoS Pathog.* *12*, e1005711.

- Tal-Gan, Y., Ivancic, M., Cornilescu, G., and Blackwell, H.E. (2016). Characterization of structural elements in native autoinducing peptides and non-native analogues that permit the differential modulation of AgrC-type quorum sensing receptors in *Staphylococcus aureus*. *Org. Biomol. Chem.* *14*, 113–121.
- Tan, L., Li, S.R., Jiang, B., Hu, X.M., and Li, S. (2018). Therapeutic Targeting of the *Staphylococcus aureus* Accessory Gene Regulator (agr) System. *Front Microbiol* *9*, 55.
- Tan, M.W., Mahajan-Miklos, S., and Ausubel, F.M. (1999). Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 715–720.
- Tan, T.Y., Ng, S.Y., and Ng, W.X. (2006). Clinical significance of coagulase-negative staphylococci recovered from nonsterile sites. *J. Clin. Microbiol.* *44*, 3413–3414.
- Tan, T.Y., Ng, S.Y., and He, J. (2008). Microbiological characteristics, presumptive identification, and antibiotic susceptibilities of *Staphylococcus lugdunensis*. *J. Clin. Microbiol.* *46*, 2393–2395.
- Tenover, F.C., Vaughn, R.R., McDougal, L.K., Fosheim, G.E., and McGowan, J.E. (2007). Multiple-locus variable-number tandem-repeat assay analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* *45*, 2215–2219.
- Thoendel, M., Kavanaugh, J.S., Flack, C.E., and Horswill, A.R. (2011). Peptide Signaling in the Staphylococci. *Chemical Reviews* *111*, 117–151.
- Thomas, J.C., Vargas, M.R., Miragaia, M., Peacock, S.J., Archer, G.L., and Enright, M.C. (2007). Improved Multilocus Sequence Typing Scheme for *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Clinical Microbiology* *45*, 616–619.
- Thomas, J.C., Zhang, L., and Robinson, D.A. (2014a). Differing lifestyles of *Staphylococcus epidermidis* as revealed through Bayesian clustering of multilocus sequence types. *Infection, Genetics and Evolution* *22*, 257–264.
- Thomas, V.C., Sadykov, M.R., Chaudhari, S.S., Jones, J., Endres, J.L., Widhelm, T.J., Ahn, J.-S., Jawa, R.S., Zimmerman, M.C., and Bayles, K.W. (2014b). A central role for carbon-overflow pathways in the modulation of bacterial cell death. *PLoS Pathog.* *10*, e1004205.
- Throup, J.P., Zappacosta, F., Lunsford, R.D., Annan, R.S., Carr, S.A., Lonsdale, J.T., Bryant, A.P., McDevitt, D., Rosenberg, M., and Burnham, M.K. (2001). The *srhSR* gene pair from *Staphylococcus aureus*: genomic and proteomic approaches to the identification and characterization of gene function. *Biochemistry* *40*, 10392–10401.
- Tiwari, S., Jamal, S.B., Hassan, S.S., Carvalho, P.V.S.D., Almeida, S., Barh, D., Ghosh, P., Silva, A., Castro, T.L.P., and Azevedo, V. (2017). Two-Component Signal Transduction Systems of Pathogenic Bacteria As Targets for Antimicrobial Therapy: An Overview. *Front. Microbiol.* *8*.
- Toledo-Arana, A., Merino, N., Vergara-Irigaray, M., Débarbouillé, M., Penadés, J.R., and Lasa, I. (2005). *Staphylococcus aureus* develops an alternative, *ica*-independent biofilm in the absence of the *arlRS* two-component system. *J. Bacteriol.* *187*, 5318–5329.
- Tolo, I., Thomas, J.C., Fischer, R.S.B., Brown, E.L., Gray, B.M., and Robinson, D.A. (2016). Do *Staphylococcus epidermidis* Genetic Clusters Predict Isolation Sources? *Journal of Clinical Microbiology* *54*, 1711–1719.
- Tong, S.Y.C., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., and Fowler, V.G. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* *28*, 603–661.
- Tormo, M.A., Martí, M., Valle, J., Manna, A.C., Cheung, A.L., Lasa, I., and Penadés, J.R. (2005). SarA is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. *J. Bacteriol.* *187*, 2348–2356.
- Tosh, P.K., Disbot, M., Duffy, J.M., Boom, M.L., Heseltine, G., Srinivasan, A., Gould, C.V., and Berríos-Torres, S.I. (2011). Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* surgical site infections after arthroscopic procedures: Texas, 2009. *Infect Control Hosp Epidemiol* *32*, 1179–1186.

- Tse, H., Tsoi, H.W., Leung, S.P., Lau, S.K.P., Woo, P.C.Y., and Yuen, K.Y. (2010). Complete Genome Sequence of *Staphylococcus lugdunensis* Strain HKU09-01. *Journal of Bacteriology* 192, 1471–1472.
- Tseng, S.-P., Lin, Y.-T., Tsai, J.-C., Hung, W.-C., Chen, H.-J., Chen, P.-F., Hsueh, P.-R., and Teng, L.-J. (2015). Genotypes and phenotypes of *Staphylococcus lugdunensis* isolates recovered from bacteremia. *J Microbiol Immunol Infect* 48, 397–405.
- Tu Quoc, P.H., Genevaux, P., Pajunen, M., Savilahti, H., Georgopoulos, C., Schrenzel, J., and Kelley, W.L. (2007). Isolation and characterization of biofilm formation-defective mutants of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 75, 1079–1088.
- Turner, K.M.E., and Feil, E.J. (2007). The secret life of the multilocus sequence type. *Int. J. Antimicrob. Agents* 29, 129–135.
- Ulrich, L.E., Koonin, E.V., and Zhulin, I.B. (2005). One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol.* 13, 52–56.
- Ulrich, M., Bastian, M., Cramton, S.E., Ziegler, K., Pragman, A.A., Bragonzi, A., Memmi, G., Wolz, C., Schlievert, P.M., Cheung, A., et al. (2007). The staphylococcal respiratory response regulator *SrrAB* induces *ica* gene transcription and polysaccharide intercellular adhesin expression, protecting *Staphylococcus aureus* from neutrophil killing under anaerobic growth conditions. *Mol. Microbiol.* 65, 1276–1287.
- Valle, J., Toledo-Arana, A., Berasain, C., Ghigo, J.-M., Amorena, B., Penadés, J.R., and Lasa, I. (2003). *SarA* and not *sigmaB* is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 48, 1075–1087.
- Van Wamel, W.J., van Rossum, G., Verhoef, J., Vandenbroucke-Grauls, C.M., and Fluit, A.C. (1998). Cloning and characterization of an accessory gene regulator (*agr*)-like locus from *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 163, 1–9.
- Vandenesch, F., Storrs, M.J., Poitevin-Later, F., Etienne, J., Courvalin, P., and Fleurette, J. (1991). Delta-like haemolysin produced by *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 62, 65–68.
- Vandenesch, F., Etienne, J., Reverdy, M.E., and Eykyn, S.J. (1993a). Endocarditis due to *Staphylococcus lugdunensis*: report of 11 cases and review. *Clin. Infect. Dis.* 17, 871–876.
- Vandenesch, F., Projan, S.J., Kreiswirth, B., Etienne, J., and Novick, R.P. (1993b). *Agr*-related sequences in *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 111, 115–122.
- Vasconcelos, N.G., Pereira, V.C., Araújo Júnior, J.P., and da Cunha, M. de L.R.S. (2011). Molecular detection of enterotoxins E, G, H and I in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples of newborns in Brazil. *J. Appl. Microbiol.* 111, 749–762.
- Vergara-Irigaray, M., Valle, J., Merino, N., Latasa, C., García, B., Ruiz de Los Mozos, I., Solano, C., Toledo-Arana, A., Penadés, J.R., and Lasa, I. (2009). Relevant role of fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* biofilm-associated foreign-body infections. *Infect. Immun.* 77, 3978–3991.
- Vergheze, B., Schwalm, N.D., Dudley, E.G., and Knabel, S.J. (2012). A combined multi-virulence-locus sequence typing and *Staphylococcal* Cassette Chromosome *mec* typing scheme possesses enhanced discriminatory power for genotyping MRSA. *Infection, Genetics and Evolution* 12, 1816–1821.
- Vergnaud, G., and Pourcel, C. (2009). Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis. In *Molecular Epidemiology of Microorganisms*, D.A. Caugant, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 141–158.
- Vergnaud, G., Hauck, Y., Christiany, D., Daoud, B., Pourcel, C., Jacques, I., Cloeckeaert, A., and Zygmunt, M.S. (2018). Genotypic Expansion Within the Population Structure of Classical *Brucella* Species Revealed by MLVA16 Typing of 1404 *Brucella* Isolates From Different Animal and Geographic Origins, 1974–2006. *Front Microbiol* 9, 1545.
- Vignaud, M.-L., Cherchame, E., Marault, M., Chaing, E., Le Hello, S., Michel, V., Jourdan-Da Silva, N., Lailier, R., Brisabois, A., and Cadel-Six, S. (2017). MLVA for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Dublin:

- Development of a Method Suitable for Inter-Laboratory Surveillance and Application in the Context of a Raw Milk Cheese Outbreak in France in 2012. *Front Microbiol* 8, 295.
- Villanueva, M., García, B., Valle, J., Rapún, B., Ruiz de Los Mozos, I., Solano, C., Martí, M., Penadés, J.R., Toledo-Arana, A., and Lasa, I. (2018). Sensory deprivation in *Staphylococcus aureus*. *Nat Commun* 9, 523.
- Visca, P., D'Arezzo, S., Ramisse, F., Gelfand, Y., Benson, G., Vergnaud, G., Fry, N.K., and Pourcel, C. (2011). Investigation of the population structure of *Legionella pneumophila* by analysis of tandem repeat copy number and internal sequence variation. *Microbiology* 157, 2582–2594.
- Voyich, J.M., Vuong, C., DeWald, M., Nygaard, T.K., Kocianova, S., Griffith, S., Jones, J., Iverson, C., Sturdevant, D.E., Braughton, K.R., et al. (2009). The SaeR/S gene regulatory system is essential for innate immune evasion by *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 199, 1698–1706.
- Vuong, C., Gotz, F., and Otto, M. (2000). Construction and Characterization of an agr Deletion Mutant of *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and Immunity* 68, 1048–1053.
- Vuong, C., Gerke, C., Somerville, G.A., Fischer, E.R., and Otto, M. (2003). Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Infect. Dis.* 188, 706–718.
- Walker, J.N., Crosby, H.A., Spaulding, A.R., Salgado-Pabón, W., Malone, C.L., Rosenthal, C.B., Schlievert, P.M., Boyd, J.M., and Horswill, A.R. (2013). The *Staphylococcus aureus* ArlRS two-component system is a novel regulator of agglutination and pathogenesis. *PLoS Pathog.* 9, e1003819.
- Wang, X.-M. (2003). Evaluation of a multilocus sequence typing system for *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Medical Microbiology* 52, 989–998.
- Wang, B., and Muir, T.W. (2016). Regulation of Virulence in *Staphylococcus aureus*: Molecular Mechanisms and Remaining Puzzles. *Cell Chem Biol* 23, 214–224.
- Wang, R., Khan, B.A., Cheung, G.Y.C., Bach, T.-H.L., Jameson-Lee, M., Kong, K.-F., Queck, S.Y., and Otto, M. (2011). *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 238–248.
- Warne, B., Harkins, C.P., Harris, S.R., Vatsiou, A., Stanley-Wall, N., Parkhill, J., Peacock, S.J., Palmer, T., and Holden, M.T.G. (2016). The Ess/Type VII secretion system of *Staphylococcus aureus* shows unexpected genetic diversity. *BMC Genomics* 17, 222.
- Wästfelt, M., Stålhammar-Carlemalm, M., Delisse, A.M., Cabezon, T., and Lindahl, G. (1996). Identification of a family of streptococcal surface proteins with extremely repetitive structure. *J. Biol. Chem.* 271, 18892–18897.
- Wei, H.L., Kao, C.W., Wei, S.H., Tzen, J.T.C., and Chiou, C.S. (2011). Comparison of PCR ribotyping and multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) for improved detection of *Clostridium difficile*. *BMC Microbiol.* 11, 217.
- Weightman, N.C., Allerton, K.E., and France, J. (2000). Bone and prosthetic joint infection with *Staphylococcus lugdunensis*. *J. Infect.* 40, 98–99.
- West, A.H., and Stock, A.M. (2001). Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem. Sci.* 26, 369–376.
- Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., and Mattick, J.S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295, 1487.
- White, M.J., Boyd, J.M., Horswill, A.R., and Nauseef, W.M. (2014). Phosphatidylinositol-specific phospholipase C contributes to survival of *Staphylococcus aureus* USA300 in human blood and neutrophils. *Infect. Immun.* 82, 1559–1571.

- Widerström, M., McCullough, C.A., Coombs, G.W., Monsen, T., and Christiansen, K.J. (2012). A Multidrug-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Clone (ST2) Is an Ongoing Cause of Hospital-Acquired Infection in a Western Australian Hospital. *Journal of Clinical Microbiology* 50, 2147–2151.
- Wilde, A.D., Snyder, D.J., Putnam, N.E., Valentino, M.D., Hammer, N.D., Lonergan, Z.R., Hinger, S.A., Aysanoa, E.E., Blanchard, C., Dunman, P.M., et al. (2015). Bacterial Hypoxic Responses Revealed as Critical Determinants of the Host-Pathogen Outcome by TnSeq Analysis of *Staphylococcus aureus* Invasive Infection. *PLoS Pathog.* 11, e1005341.
- Windham, I.H., Chaudhari, S.S., Bose, J.L., Thomas, V.C., and Bayles, K.W. (2016). *SrrAB* Modulates *Staphylococcus aureus* Cell Death through Regulation of *cidABC* Transcription. *J. Bacteriol.* 198, 1114–1122.
- Wisplinghoff, H., Rosato, A.E., Enright, M.C., Noto, M., Craig, W., and Archer, G.L. (2003). Related Clones Containing SCCmec Type IV Predominate among Clinically Significant *Staphylococcus epidermidis* Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47, 3574–3579.
- Witte, W., Strommenger, B., Stanek, C., and Cuny, C. (2007). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerging Infect. Dis.* 13, 255–258.
- Wu, A.-B., Wang, M.-C., Tseng, C.-C., Lin, W.-H., Teng, C.-H., Huang, A.-H., Hung, K.-H., Chiang-Ni, C., and Wu, J.-J. (2011). Clinical and microbiological characteristics of community-acquired *Staphylococcus lugdunensis* infections in Southern Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3015–3018.
- Wu, Y., Wang, J., Xu, T., Liu, J., Yu, W., Lou, Q., Zhu, T., He, N., Ben, H., Hu, J., et al. (2012). The two-component signal transduction system *ArlRS* regulates *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation in an *ica*-dependent manner. *PLoS ONE* 7, e40041.
- Wu, Y., Liu, J., Jiang, J., Hu, J., Xu, T., Wang, J., and Qu, D. (2014). Role of the two-component regulatory system *arlRS* in *ica* operon and *aap* positive but non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* isolates from hospitalized patients. *Microb. Pathog.* 76, 89–98.
- Wu, Y., Wu, Y., Zhu, T., Han, H., Liu, H., Xu, T., Francois, P., Fischer, A., Bai, L., Götz, F., et al. (2015). *Staphylococcus epidermidis SrrAB* regulates bacterial growth and biofilm formation differently under oxic and microaerobic conditions. *J. Bacteriol.* 197, 459–476.
- Xu, T., Wu, Y., Lin, Z., Bertram, R., Götz, F., Zhang, Y., and Qu, D. (2017). Identification of Genes Controlled by the Essential *YycFG* Two-Component System Reveals a Role for Biofilm Modulation in *Staphylococcus epidermidis*. *Front Microbiol* 8, 724.
- Yang, S.-J., Rice, K.C., Brown, R.J., Patton, T.G., Liou, L.E., Park, Y.H., and Bayles, K.W. (2005). A *LysR*-type regulator, *CidR*, is required for induction of the *Staphylococcus aureus cidABC* operon. *J. Bacteriol.* 187, 5893–5900.
- Yang, S.-J., Xiong, Y.Q., Yeaman, M.R., Bayles, K.W., Abdelhady, W., and Bayer, A.S. (2013). Role of the *LytSR* two-component regulatory system in adaptation to cationic antimicrobial peptides in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3875–3882.
- Yao, Y., Vuong, C., Kocianova, S., Villaruz, A.E., Lai, Y., Sturdevant, D.E., and Otto, M. (2006). Characterization of the *Staphylococcus epidermidis* accessory-gene regulator response: quorum-sensing regulation of resistance to human innate host defense. *J. Infect. Dis.* 193, 841–848.
- Yarwood, J.M., McCormick, J.K., and Schlievert, P.M. (2001). Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 183, 1113–1123.
- Yeh, C.-F., Liu, T.-P., Cheng, C.-W., Chang, S.-C., Lee, M.-H., and Lu, J.-J. (2015). Molecular Characteristics of Disease-Causing and Commensal *Staphylococcus lugdunensis* Isolates from 2003 to 2013 at a Tertiary Hospital in Taiwan. *PLOS ONE* 10, e0134859.



- Yeh, C.-F., Chang, S.-C., Cheng, C.-W., Lin, J.-F., Liu, T.-P., and Lu, J.-J. (2016). Clinical Features, Outcomes, and Molecular Characteristics of Community- and Health Care-Associated *Staphylococcus lugdunensis* Infections. *Journal of Clinical Microbiology* *54*, 2051–2057.
- Yoganathan, A.P., He, Z., and Casey Jones, S. (2004). Fluid mechanics of heart valves. *Annu Rev Biomed Eng* *6*, 331–362.
- Young, B.C., Golubchik, T., Batty, E.M., Fung, R., Lerner-Svensson, H., Votintseva, A.A., Miller, R.R., Godwin, H., Knox, K., Everitt, R.G., et al. (2012). Evolutionary dynamics of *Staphylococcus aureus* during progression from carriage to disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, 4550–4555.
- Young, B.C., Wu, C.-H., Gordon, N.C., Cole, K., Price, J.R., Liu, E., Sheppard, A.E., Perera, S., Charlesworth, J., Golubchik, T., et al. (2017). Severe infections emerge from commensal bacteria by adaptive evolution. *Elife* *6*.
- Young, I., Wang, I., and Roof, W.D. (2000). Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends Microbiol.* *8*, 120–128.
- Ythier, M., Entenza, J.M., Bille, J., Vandenesch, F., Bes, M., Moreillon, P., and Sakwinska, O. (2010). Natural variability of in vitro adherence to fibrinogen and fibronectin does not correlate with in vivo infectivity of *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity* *78*, 1711–1716.
- Yu, F., Ying, Q., Chen, C., Li, T., Ding, B., Liu, Y., Lu, Y., Qin, Z., Parsons, C., Salgado, C., et al. (2012). Outbreak of pulmonary infection caused by *Klebsiella pneumoniae* isolates harbouring blaIMP-4 and blaDHA-1 in a neonatal intensive care unit in China. *J. Med. Microbiol.* *61*, 984–989.
- Yu, W., Missiakas, D., and Schneewind, O. (2018). Septal secretion of protein A in *Staphylococcus aureus* requires SecA and lipoteichoic acid synthesis. *Elife* *7*.
- Zaaroura, H., Geffen, Y., Bergman, R., and Avitan-Hersh, E. (2018). Clinical and microbiological properties of *Staphylococcus lugdunensis* skin infections. *J. Dermatol.* *45*, 994–999.
- ZaiSS, N.H., Rupnik, M., Kuijper, E.J., Harmanus, C., Michielsen, D., Janssens, K., and Nubel, U. (2009). Typing *Clostridium difficile* strains based on tandem repeat sequences. *BMC Microbiology* *9*, 6.
- Zapotoczna, M., Heilbronner, S., Speziale, P., and Foster, T.J. (2012). Iron-regulated surface determinant (Isd) proteins of *Staphylococcus lugdunensis*. *J. Bacteriol.* *194*, 6453–6467.
- Zhang, L., Thomas, J.C., Miragaia, M., Bouchami, O., Chaves, F., d’Azevedo, P.A., Aanensen, D.M., de Lencastre, H., Gray, B.M., and Robinson, D.A. (2013). Multilocus Sequence Typing and Further Genetic Characterization of the Enigmatic Pathogen, *Staphylococcus hominis*. *PLoS ONE* *8*, e66496.
- Zhou, K., Aertsen, A., and Michiels, C.W. (2014). The role of variable DNA tandem repeats in bacterial adaptation. *FEMS Microbiology Reviews* *38*, 119–141.
- Zhu, T., Lou, Q., Wu, Y., Hu, J., Yu, F., and Qu, D. (2010). Impact of the *Staphylococcus epidermidis* LytSR two-component regulatory system on murein hydrolase activity, pyruvate utilization and global transcriptional profile. *BMC Microbiol.* *10*, 287.
- Zinkernagel, A.S., Zinkernagel, M.S., Elzi, M.V., Genoni, M., Gubler, J., Zbinden, R., and Mueller, N.J. (2008). Significance of *Staphylococcus lugdunensis* Bacteremia: Report of 28 Cases and Review of the Literature. *Infection* *36*, 314–321.
- Zipperer, A., Konnerth, M.C., Laux, C., Berscheid, A., Janek, D., Weidenmaier, C., Burian, M., Schilling, N.A., Slavetinsky, C., Marschal, M., et al. (2016). Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature* *535*, 511–516.

## Résumé / Abstract

---

### Contribution à la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la virulence de *Staphylococcus lugdunensis*

Nos travaux ont cherché à mieux comprendre les mécanismes à l'origine de la virulence de *Staphylococcus lugdunensis*, espèce au pouvoir pathogène proche de celui de *Staphylococcus aureus*. Nous avons procédé à la première caractérisation fonctionnelle chez cette espèce d'un système à deux composants, LytSR. Ce système s'est révélé impliqué dans le contrôle de processus métaboliques majeurs et dans la virulence. Il est en effet impliqué dans la formation de biofilm, probablement en lien avec le contrôle exercé sur la mort cellulaire. LytSR est de plus impliqué dans la pathogenèse des infections à *S. lugdunensis*, comme démontré dans le modèle d'infection du nématode *Caenorhabditis elegans*.

Pour mieux caractériser et suivre la diffusion de clones prédominants chez cette espèce, nous avons dans un deuxième volet développé trois nouvelles méthodes de typage (MLVA, TRST et *fbl*-typing), reposant sur le polymorphisme de séquences répétées en tandem. Ces méthodes se sont révélées très discriminantes, permettant la définition de nouveaux génotypes chez cette espèce clonale. Ces outils sont à ce titre très prometteurs pour des études micro- comme macro-épidémiologiques chez *S. lugdunensis*, le *fbl*-typing apparaissant à bien des égards comme l'outil utilisable en première ligne (<http://fbl-typing.univ-rouen.fr/>). Enfin, nous avons montré que la variabilité de la liaison de *S. lugdunensis* au fibrinogène *in vitro* peut être en partie expliquée par des variations génétiques de *fbl*.

**Mots clés :** *Staphylococcus lugdunensis*, Système à deux composants, LytSR, Virulence, Génotypage, nombre variable de séquences répétées en tandem, MLVA, TRST, Fbl, Epidémiologie

---

---

### Contribution to the understanding of the molecular mechanisms involved in the virulence of *Staphylococcus lugdunensis*

Our work has sought to better understand mechanisms involved in *Staphylococcus lugdunensis* virulence, a species whose pathogenicity is close to that of *Staphylococcus aureus*. We performed the first functional characterization of a two-component regulatory system, LytSR, in this species. This system has been shown to be involved in the control of major metabolic processes and in virulence. It is indeed involved in biofilm formation, probably in connection with the control of cell death. LytSR is furthermore implicated in the pathogenesis of *S. lugdunensis* infections, as demonstrated in the infection model of the nematode *Caenorhabditis elegans*.

To better characterize and monitor the diffusion of predominant clones in this species, we have in a second part developed three new typing methods (MLVA, TRST and *fbl*-typing), based on the polymorphism of variable number of tandem repeats. These methods were highly discriminant, allowing the definition of new genotypes in this clonal species. These tools are very promising for micro- and macro-epidemiological studies in *S. lugdunensis*, *fbl*-typing appearing in many ways as the frontline tool (<http://fbl-typing.univ-rouen.fr/>). Finally, we have shown that the variability of the binding of *S. lugdunensis* to fibrinogen *in vitro* can be partly explained by some *fbl* genetic variations.

**Keywords :** *Staphylococcus lugdunensis*, Two-component regulatory system, LytSR, Virulence, Genotyping, Variable number of tandem repeats, MLVA, TRST, Fbl, Epidemiology

---