# Invasion muqueuse au cours de la colonisation nasale à Staphylococcus aureus

Josselin Rigaill

▶ **To cite this version:**

Josselin Rigaill. Invasion muqueuse au cours de la colonisation nasale à Staphylococcus aureus. Biologie moléculaire. Université de Lyon, 2022. Français. NNT : 2022LYSES020 . tel-04019526

**HAL Id: tel-04019526**
**https://theses.hal.science/tel-04019526**

Submitted on 8 Mar 2023

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

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

N° d'orde NNT : 2022LYSES020

# THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

Opéréé au sein de

**Université Jean Monnet**

**École Doctorale** EDSIS 488

**École Doctorale Sciences, Ingénierie, Santé**

**Spécialité de doctorat :** Biologie

**Discipline :** Biologie cellulaire et moléculaire

Soutenue publiquement le 17/06/2022, par :

**Josselin RIGAILL**

---

# Invasion muqueuse au cours de la colonisation nasale à *Staphylococcus aureus*

---

Devant le jury composé de :

| | | |
|---|---|---|
| **Pr. Caroline LANDELLE** | MESP TIM-C - CNRS UMR5525 | Rapporteure |
| **Pr. Ousmane TRAORE** | LMGE - CNRS UMR6023 | Rapporteur |
| **Pr. Philippe BERTHELOT** | CIRI, INSERM U1111 - CNRS UMR5308 | Directeur de thèse |
| **Pr. Frédéric LAURENT** | CIRI, INSERM U1111 - CNRS UMR5308 | Co-directeur de thèse |
| **Dr Paul VERHOEVEN** | CIRI, INSERM U1111 - CNRS UMR5308 | Encadrant |
| **Dr Anne CARRICAJO** | CHU St-Etienne | Invitée |

A Léandre, Virginie
et tous ceux qui m'ont soutenu lors de la préparation de cette thèse

# Tables des matières


Etude bibliographique ..... 5

Chapitre 1 : Epidémiologie de la colonisation nasale ..... 7

Colonisation nasale ..... 7

1. Epidémiologie de la colonisation nasale à *S. aureus* ..... 7
2. Facteurs de risques individuels pour la colonisation nasale ..... 8
3. Complications infectieuses associées à la colonisation nasale ..... 9

Décolonisation nasale ..... 12

Chapitre 2 : Mécanismes de la colonisation ..... 17

Adhésion de *S. aureus* à la muqueuse nasale ..... 17

1. Adhésines d'origine protéique ..... 17

Adhésines protéiques ancrées à la paroi (CWA) ..... 19

Adhésines protéiques sécrétees : SERAMs ..... 21

2. Adhésines non protéiques : les acides téichoïques de paroi ..... 22

Internalisation de *S. aureus* dans les cellules épithéliales ..... 22

1. Réservoir intracellulaire de *S. aureus* au cours de la colonisation nasale chez l'Homme ..... 22

2 Mécanismes moléculaires d'internalisation de *S. aureus* ..... 24

Protéines de liaison à la fibronectine (FnBPs) ..... 24

Autres MSCRAMMS ..... 26

Autres protéines pouvant avoir un rôle dans l'internalisation de *S. aureus* ..... 27

3. Devenir du *S. aureus* intracellulaire ..... 28

Survie et échappement phagosomal ..... 28

Small Colony Variants (SCV) ..... 31

Mort cellulaire et chronicité de l'infection/colonisation ..... 32

Chapitre 3 : Interactions avec la flore nasale ..... 33

Microbiote nasal ..... 34

*S. aureus* et microbiote nasal ..... 37

1. Microbiote nasal des porteurs de *S. aureus* ..... 37
2. Interactions bactériennes au niveau de la cavité nasale ..... 39

*S. aureus* et corynebactéries ..... 40

*S. aureus* et autres espèces de staphylocoques ..... 42

*S. aureus* et lactobacillales ..... 43

Autres interactions décrites ..... 46

Contexte scientifique et objectifs de thèse ..... 49

Résultats personnels ..... 53

Chapitre 1 : Etude de la colonisation nasale et du réservoir intracellulaire de *Staphylococcus aureus* ..... 55

Article 1 *Staphylococcus aureus* persistent nasal colonization and intracellular reservoir, a prospective cohort study ..... 57

Article 2 Improved enzyme protection assay to study *Staphylococcus aureus* internalization and intracellular efficacity of antimicrobial compounds ..... 81

Chapitre 2 : Mécanisme d'internalisation de *Staphylococcus aureus* médiée par la protéine Eap dans les cellules phagocytaires non professionnelles : étude du rôle du récepteur cellulaire ICAM-1 ..... 93

Chapitre 3 : Evaluation de l'activité intracellulaire des traitements pour la decolonisation des porteurs de *Staphylococcus aureus* ..... 115

Article 3 Intracellular activity of antimicrobial compounds used for *Staphylococcus aureus* nasal decolonization ..... 117

Chapitre 4 : Etude du microbiote et des compétitions microbiennes au cours de la colonisation nasale à *Staphylococcus aureus* ..... 125

Discussion générale ..... 153

Références bibliographiques ..... 163

Autres publications ..... 193

# Tableaux

**Tableau 1.** Facteurs personnels prédisposant au portage nasal de *S. aureus* proposé par Sakr *et al.* ..... 9
**Tableau 2 :** Infection nosocomiale à *S. aureus* dans un contexte post chirurgicale (RAISIN 2020) ..... 11
**Tableau 3.** Principaux agents investigués pour la décolonisation nasale à *S. aureus* d'après Sakr *et al.* 14
**Tableau 4.** Principales protéines d'adhésion de *S. aureus* ..... 18
**Tableau 5.** Synthèse des études sur la prévalence du portage intracellulaire nasal de *S. aureus* chez les sujets atteints de RSC ..... 23

# Figures

**Figure 1.** Protocole de prévention des infections de site opératoire selon Schweizer *et al.*..... 13
**Figure 2**. Classification des protéines ancrées à la paroi selon Foster *et al.*..... 19
**Figure 3.** Localisation intra tissulaire de *S. aureus* sur biopsie nasale par Hanssen *et al.*..... 24
**Figure 4.** Voie FnBPs-Fn-intégrine α5β1 impliquée dans l'adhésion et l'internalisation de *S. aureus* d'après Morgene M. Fedy (Thèse d'Université 2018)..... 25
**Figure 5.** Visualisation par microscopie électronique de l'endocytose de *S. aureus* par Agerer *et al.* ... 25
**Figure 6.** Modèles du rôle potentiel de corécepteur pour Hsp60 d'après Dziewanowska *et al.*..... 26
**Figure 7.** Devenir intracellulaire de *S. aureus* dans les cellules phagocytaires non professionnelles d'après Audoux E. (Thèse d'Université, 2021)..... 29
**Figure 8.** Extraction PubMed du nombre d'articles pour la recherche microbiot* ..... 33
**Figure 9.** DPCoA du microbiote des principaux sites de colonisation bactérienne d'après le Human microbiome Poject Consortium 2012 ..... 34
**Figure 10.** DPCoA du microbiote de différents étages de la cavité nasale d'après Yan *et al.*..... 35
**Figure 11.** CST obtenus par analyse en positionnement multidimensionnel d'après Liu *et al.* ..... 37
**Figure 12.** Principales formes d'interactions connues entre *S. aureus* et les bactéries commensales du microbiote nasal d'après Krismer *et al.* ..... 39
**Figure 13.** Arbre décisionnel prédictif de la colonisation nasale par *S. aureus* d'après Liu *et al.* ..... 45

# Etude bibliographique

# Chapitre 1 : Epidémiologie de la colonisation nasale

## Colonisation nasale

### 1. Epidémiologie de la colonisation nasale à *S. aureus*

Commensale de la peau et des muqueuses, *Staphylococcus aureus* est une bactérie qui possède également un très fort pouvoir pathogène chez l'Homme. De la simple infection cutanée à la bacteriémie avec toxémie staphylococcique en passant par les infections profondes (endocardites, ostéomyélites, pneumopathie nécrosante…) *S. aureus* possède un haut niveau de morbidité/mortalité et représente l'une des principales causes d'infections liées aux soins (Schmidt *et al.* 2015). Malgré son potentiel de virulence, la colonisation par *S. aureus* est fréquente et signe un équilibre trouvé entre tolérance de l'hôte et commensalisme de la bactérie. Si la bactérie peut être isolée à partir de nombreux sites anatomiques, la cavité nasale est la principale niche écologique de *S. aureus*. Avec une personne sur trois colonisée au niveau des mains et du nez, le *vestibulum nasi* (2-3 premiers centimètres de la cavité nasale) peut servir de réservoir à la diffusion de la bactérie (Wertheim *et al.* 2005). Dans une étude randomisée en double aveugle le lien direct entre la colonisation des mains et la cavité nasale a pu être mis en évidence. Chez les soignants, on observe une diminution majeure de la présence de *S. aureus* au niveau des mains après décolonisation nasale (Reagan *et al.* 1991). Une étude de 2018 montre qu'un site de portage extra nasal peut être retrouvé chez la moitié des patients colonisés au niveau nasal par *S. aureus* (Kline *et al.* 2018). Cette colonisation nasale à un rôle central dans la pathogénèse des infections, le risque relatif d'être infecté par *S. aureus* étant multiplié par 7,1 (IC 95% [4,6-11,0]) chez les porteurs (Kluytmans *et al.* 1997). De plus il est décrit que le risque de développer une infection à SARM augmente avec le nombre de sites anatomiques colonisés par la bactérie (Sim *et al.* 2013). Une origine endogène de l'infection est retrouvée dans la grande majorité des cas (Wertheim *et al.* 2004; Berthelot *et al.* 2010; Gagnaire *et al.* 2019) et on considère ainsi que 60 à plus de 90% des infections sont directement reliées à la souche de colonisation nasale du patient (Berthelot *et al.* 2010; Huang *et al.* 2015).

Depuis les travaux du groupe d'Alex Van Belkum (van Belkum *et al.* 2009b), les porteurs nasaux de *S. aureus* ont été reclassées en deux groupes : les porteurs persistants et les porteurs intermittents dont la prévalence varie respectivement de 9 à 37% et de 9 à 69% respectivement selon les études (Verhoeven *et al.* 2014; Mehraj *et al.* 2016). Le statut de portage n'est pas figé au cours de la vie du sujet et il peut varier en fonction des facteurs extérieurs auxquels il est exposé. Pour distinguer les porteurs intermittents des non porteurs, il est nécessaire de réaliser un minimum de sept écouvillons répartis sur plusieurs semaines ce qui n'est pas compatible avec la prise en charge des patients à

l'hôpital. Un index de portage (nombre de prélèvements positifs à *S. aureus* divisé par le nombre total de prélèvements effectués) supérieur ou égal à 0,8 définit un porteur comme persistant ; un index de portage nul définit le statut de non porteur et les autres cas sont considérés comme des porteurs intermittents (Nouwen *et al.* 2004; van Belkum *et al.* 2009b). Le portage nasal persistant se caractérise par une colonisation sur le long terme avec charge bactérienne nasale élevée et un risque infectieux majoré (Wertheim *et al.* 2004; Nouwen *et al.* 2005; Verhoeven *et al.* 2016). L'identification des patients appartenant à ce groupe est par conséquent importante pour mieux évaluer le risque d'infection associé au portage. Notre équipe a proposé un algorithme basé sur la quantification de la charge bactérienne de deux écouvillons pour classer les patients comme porteurs persistants et non porteurs persistants (non porteurs et porteurs intermédiaires) (Verhoeven *et al.* 2012a, 2012b).

La prévalence de colonisation nasale est importante dans les premiers mois de vie (Andersen *et al.* 2012) avec un pic de 40-50% de prévalence observé dans les 8 premières semaines de vie avant de chuter à 21% à 6 mois (Peacock *et al.* 2003). Un lien direct entre les souches d'origine maternelle et celles de l'enfant peut être clairement établi dans 80% des cas avec, pour 90% de ces cas, une origine nasale de la souche de colonisation maternelle (Leshem *et al.* 2012). L'environnement direct des individus joue ainsi un rôle central dans la transmission horizontale de la bactérie. Des souches aux fonds génétiques identiques sont ainsi partagées entre les membres d'un même foyer (Muthukrishnan *et al.* 2013). Plusieurs études ont montré que les porteurs persistants sont plus enclins à être colonisés par une même souche de *S. aureus* sur une longue période alors que les porteurs intermittents ont tendance à changer de souches plus facilement (VandenBergh *et al.* 1999). Si ce dernier point ne fait pas consensus (Muthukrishnan *et al.* 2013), une étude de colonisation artificielle chez des volontaires sains a montré qu'il existe une relation préférentielle entre un hôte et sa souche de colonisation (van Belkum *et al.* 2009b). Si des facteurs généraux comme l'âge, le pays de résidence ou le statut économique peuvent influencer la prévalence globale de portage nasal de *S. aureus* (Wertheim *et al.* 2005; Sivaraman *et al.* 2009; Verhoeven *et al.* 2014), des facteurs individuels peuvent expliquer certaines des différences observées au sein d'une population.

### 2. Facteurs de risques individuels pour la colonisation nasale

Le fond génétique de l'hôte a longtemps été envisagé comme l'une des explications aux différences de portage observées dans la population générale cependant des études réalisées chez des jumeaux et dans le cercle familial n'abondent pas en ce sens (Roghmann *et al.* 2011; Andersen *et al.* 2012; Liu *et al.* 2015a). Une récente revue de la littérature a listé les nombreux facteurs de risques associés à la colonisation nasale par *S. aureus* (Tableau 1) (Sakr *et al.* 2018) :

Tableau 1. Facteurs personnels prédisposant au portage nasal de *S. aureus* proposé par Sakr *et al.*

| Facteurs prédisposants | Références |
|---|---|
| Infection par le VIH et immunodépression | (Raviglione *et al.* 1990; Weinke *et al.* 1992; Kotpal *et al.* 2016) |
| Obésité | (Olsen *et al.* 2013) |
| Diabète | (Luzar *et al.* 1990; Ahluwalia *et al.* 2000) |
| Granulomatose de Wegener | (Laudien *et al.* 2010) |
| Polyarthrite rhumatoïde | (Laudien *et al.* 2010) |
| Infection de la peau et des tissus mous | (Immergluck *et al.* 2017) |
| Furonculose chronique | (Demos *et al.* 2012) |
| Dermatite atopique | (Breuer *et al.* 2002) |
| Présence d'hémoglobine dans les secrétions nasales | (Pynnonen *et al.* 2011) |
| Complexe Majeur d'Histocompatibilité HLA-DR3 | (Kinsman *et al.* 1983) |
| Polymorphisme des gènes codant pour le récepteur aux glucocorticoïdes, l'interleukine-4, la protéine C réactive et les protéines inhibitrices du complément | (van den Akker *et al.* 2006; Emonts *et al.* 2008; Ruimy *et al.* 2010) |
| Contraception hormonale | (Zanger *et al.* 2012) |
| Tabagisme actif (controversé) | (Olsen *et al.* 2012; Cole *et al.* 2018) |
| Personnel hospitalier (controversé) | (Elie-Turenne *et al.* 2010; Saadatian-Elahi *et al.* 2013; Chen *et al.* 2015a; Price *et al.* 2017) |

Chez les sujets sains, certains auteurs rapportent une prévalence de portage plus importante chez les individus de sexe masculin (Wertheim *et al.* 2004; van Belkum *et al.* 2009a). Cependant d'autres études indiquent que le sexe ne semble pas influencer la prévalence de portage mais que de plus fortes charges bactériennes sont observées chez les hommes (Cole *et al.* 2001; Liu *et al.* 2015a). Des facteurs extérieurs comme la prise d'antibiotique ou la survenue d'infection virale de la sphère ORL vont modifier la flore locale et notamment la présence de *S. aureus*. En ce qui concerne le tabagisme, si un potentiel effet bactéricide de la fumée de cigarette avait été évoqué (Olsen *et al.* 2012), une étude plus récente met en évidence que les sujets fumeurs sont plus fréquemment porteurs de la bactérie et que l'arrêt de la cigarette augmente la clairance nasale de *S. aureus* (Cole *et al.* 2018). Enfin l'utilisation de drogue par voie intra veineuse participe également à l'augmentation du risque de portage mais également du risque d'infection par *S. aureus* (Al-Rawahi *et al.* 2008).

### 3. Complications infectieuses associées à la colonisation nasale

La colonisation de la cavité nasale par *S. aureus* est un facteur majeur d'infections communautaires et nosocomiales par cette bactérie (von Eiff *et al.* 2001; Wertheim *et al.* 2005). Chez les individus non hospitalisés, un lien étroit est observé entre colonisation nasale par *S. aureus* et infection de la peau et des tissus mous (dont l'impétigo et la furonculose chronique sont les principaux représentants) (Demos *et al.* 2012; Chou *et al.* 2015). En 2004, le suivi de plus de 14 000 adultes hospitalisés dans des services non chirurgicaux a montré que les 24% de patients porteurs de *S. aureus*

présentaient 3 fois plus de risques de développer une bactériémie à *S. aureus* que les non porteurs dans les 120 jours suivants le dépistage (Wertheim *et al.* 2004). Dans cette même étude, il est intéressant de noter que parmi tous les patients qui ont présenté une bactériémie à *S. aureus*, le taux de mortalité mesuré chez les porteurs était significativement inférieur à celui des non porteurs, avec des taux de mortalité respectif de 18% *vs.* 46%. Ce phénomène pourrait être expliqué par le développement au cours de la colonisation d'une certaine forme immunité protectrice de l'hôte contre *S. aureus* (Holtfreter *et al.* 2006).

Certains terrains semblent plus propices à transformer une colonisation nasale en infection. Ainsi, au cours des infections du pied diabétique, *S. aureus* est le microorganisme le plus souvent isolé ; sur une série de 276 infections du pied diabétique 36% des patients étaient porteurs de *S. aureus* au niveau de la cavité nasale et dans 65% les souches du nez et de l'infection étaient identiques (Dunyach-Remy *et al.* 2017). Les patients de soins intensifs qui ont un système de défenses immunitaires affaibli, ont ainsi de 2,5 à 4,7 plus à risques de développer une infection nosocomiale a SASM et SARM respectivement s'ils sont porteurs de cette bactérie (Honda *et al.* 2010). Les patients colonisés par *S. aureus* et infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ont également un risque d'infection à *S. aureus* multiplié par 3,6 [0,9–15,4] (Nguyen *et al.* 1999). La surinfection pulmonaire à *S. aureus* est également une des complications classiquement décrite après une infection grippale. Un modèle de souris a mis en évidence une dissémination des bactéries présentent dans le biofilm des voies respiratoires supérieures au niveau pulmonaire suite à une infection par le virus de la grippe A (Reddinger *et al.* 2016). Le risque d'infection endogène à *S. aureus* est aussi augmenté chez les patients d'hémodialyse chronique ou de dialyse péritonéale (Luzar *et al.* 1990; Ena *et al.* 1994; Verhoeven *et al.* 2016) et la présence de matériels à type de voie veineuse centrale et de cathéters sont décrits comme des facteurs favorisants (Nouwen *et al.* 2005; Katneni et Hedayati 2007). Enfin, les complications infectieuses de la colonisation ont souvent été rapportées dans le cadre de prise en charge chirurgicale, les infections de site opératoire représentant 20 à 30% des infections liées aux soins (Savage et Anderson 2013). Dans son rapport de septembre 2020 sur les données 2018 du réseau français RAISIN (Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales), la mission Spicmi (Surveillance et prévention du risque infectieux lié aux actes de chirurgie et de médecine interventionnelle) rapporte les données suivantes (Tableau 2) (Sante Publique France 2020).

Tableau 2 : Infection nosocomiale à *S. aureus* dans un contexte post chirurgicale (RAISIN 2020)

| **Type de chirurgie** | **Proportion d'infection nosocomiale à *S. aureus*** | | |
|---|---|---|---|
| Orthopédie | 34,7% (1ère cause) | n=159 | dont 35 SARM |
| Digestive | 6,2% (4ème cause) | n=20 | dont 3 SARM |
| Gynéco-Obstétrique | 32,1% (1ère cause) | n=67 | dont 9 SARM |
| Traumatologie | 40,8% (1ère cause) | n=60 | dont 11 SARM |
| Urologie | 7,1% (2ème cause) | n=11 | dont 2 SARM |
| Neurochirurgie | 40% (1ère cause) | n=14 | aucun SARM |
| Coronaire | 14,1% (2ème cause) | n=9 | aucun SARM |
| Réparatrice et reconstructrice | 26,5% (1ère cause) | n=9 | aucun SARM |
| Thoracique | 63,6% (1ère cause) | n=7 | aucun SARM |
| Vasculaire | 23,1% (1ère cause) | n=3 | aucun SARM |
| **Total** | **25,6% (1ère cause)** | **n=359** | **dont 60 SARM** |

Comme pour les bactériémies (von Eiff *et al.* 2001), il est décrit qu'environ 80% des souches d'infection de site opératoire peuvent être directement reliées par biologie moléculaire à la souche de colonisation nasale (Perl *et al.* 2002). Si la dissémination 63du germe de la narine vers la peau et la cicatrice opératoire est souvent suspectée, la contamination par voie hématogène est également évoquée dans la littérature (Krezalek *et al.* 2018; Schuler *et al.* 2021). Ces infections ont un impact majeur sur la santé des patients et sur le système de santé. Une étude rétrospective estime que les infections staphylococciques en chirurgie orthopédique et cardio-thoracique augmentent de 22 jours la durée d'hospitalisation pour un coût moyen situé entre 13 000 et 15 000€ par patient (Schmidt *et al.* 2015). Dans cette étude, le taux de mortalité à l'hôpital pour les patients infectés était multiplié entre 2,6 et 6 fois comparé au groupe contrôle non infecté. En raison de leur forte présence dans certaines régions (USA, certains pays d'Europe) jusqu'à 40% des infections nosocomiales sont causées par des souches de SARM (McKinnell *et al.* 2013). Comparées aux infections par SASM, ces souches résistantes aux antibiotiques multiplient par 2,6 la mortalité à 3 mois des infections nosocomiales à *S. aureus* tout en augmentant la durée d'hospitalisation et le coût des soins (+ 6 jours et 23 000$) (Anderson *et al.* 2009). Une méta-analyse de 31 études de cohortes sur des bactériémies à *S. aureus* confirme que les infections à SARM ont un taux de mortalité significativement supérieur à celui des infections à SASM (Cosgrove *et al.* 2003). Dans leur revue, Savage et Anderson distinguent ainsi 3 grands groupes de facteurs de risques d'infections post-opératoires : les facteurs de risques pré-opératoires, per-opératoires et post opératoires. La colonisation nasale par *S. aureus* est considérée comme un risque pré-opératoire majeur d'infection par SASM et SARM. Dans le but de prévenir les complications infectieuses associées à la colonisation nasale à *S. aureus*, différentes stratégies de décolonisation comme l'utilisation d'antimicrobiens ont été proposées.

## Décolonisation nasale

Il existe des preuves solides que le dépistage et la décolonisation nasale et cutanée des porteurs *S. aureus* avant une opération chirurgicale permet de réduire le risque d'infection du site opératoire (Perl *et al.* 2002; Bode *et al.* 2010; Verhoeven *et al.* 2014). L'utilisation d'antibiotique par voie systémique a rapidement été écartée dans le cadre de la décolonisation nasale à *S. aureus* ; la rifampicine par exemple présentait une réelle efficacité sur le réservoir nasal mais peut rapidement exposer à la sélection de clones bactériens résistants tout en ayant un impact majeur sur l'écologie microbienne des patients (Chow et Yu 1989; Liu *et al.* 2013). Deux méta-analyses de 2013 se sont intéressées aux études évaluant l'efficacité des mesures de décolonisations préopératoires en chirurgie cardiaque et orthopédique (Schweizer *et al.* 2013; Verhoeven *et al.* 2013). Depuis les années 2010, la mupirocine s'est imposée comme la principale molécule pour la décolonisation des patients porteurs de *S. aureus* (Simor 2011). Sur les 18 études analysées dans la revue de Schweizer, toutes, sauf une, ont utilisé un traitement à la mupirocine et ont décrit une protection significative contre la survenue d'infection du site opératoire dues à des bactéries à Gram positif et plus particulièrement contre *S. aureus*. La mupirocine (ou acide pseudomonique A), antibiotique isolé de souches *Pseudomonas fluorescens* dans les années 80, a rapidement été utilisé sous forme topique comme agent de décolonisation nasale (Dacre *et al.* 1983). Une étude randomisée avec bras contrôle a objectivé que 83% des patients traités à la mupirocine étaient décolonisés après traitement contre 27% dans le groupe placebo ($p$=0,001) (Perl *et al.* 2002). Avec 3 à 5 doses de mupirocine, 81% des patients porteurs de *S. aureus* traités étaient décolonisés alors qu'avec 6 doses ce nombre montait à 93%. L'une des plus grosses études utilisée dans la méta-analyse de Schweizer *et al.* (étude randomisée en double aveugle) a inclus 918 patients porteurs de *S. aureus* répartis en deux groupes : placebo *vs.* traitement nasal à la mupirocine et bain de bouche chlorexidine (Bode *et al.* 2010). Dans cette étude, le traitement préopératoire a permis de diminuer par plus de 2 le nombre d'infections du site opératoire. Une étude un peu plus récente propose le schéma de prise en charge décrit en Figure 1 pour les patients porteurs de *S. aureus* qui vont bénéficier d'une chirurgie cardiaque ou d'une arthroplastie de genou ou de hanche (Schweizer *et al.* 2015). Ce protocole est basé sur l'association d'un traitement à la mupirocine et de bains à la chlorhexidine et préopératoire, complété par un traitement antibiotique peropératoire à la céfazoline pour les souches de SASM et à la céfazoline plus vancomycine pour les SARM. Les auteurs rapportent une diminution significative du nombre d'infections complexes du site opératoire (incision profonde et infection d'organe) à *S. aureus*. Le nombre d'infections passe ainsi de 36 pour 10 000 opérations avant la mise en place du protocole à 21 pour 10 000 opérations après la mise en place de celui-ci (ratio de 0,58 avec IC95% [0.37-0.92]). Ces résultats sont comparables avec ceux de la revue Cochrane de 2008 qui décrit une réduction significative du risque relatif d'infection de 0,55 (IC95%

[0,43-0,70]) après décolonisation par traitement à la mupirocine (van Rijen *et al.* 2008). De plus, l'étude STOP-SSI à montrer que l'efficacité de la prévention des infections du site opératoire à *S. aureus* étaient corrélée au niveau d'observance des recommandations de dépistage et de decolonisation (Schweizer *et al.* 2015). Si l'association de bains de chlorhexidine à l'utilisation de mupirocine permet de cibler les sites de colonisations secondaires cutanées plusieurs études suggèrent que la décolonisation nasale est au cœur de l'efficacité des stratégies de décolonisations proposées (Kalmeijer *et al.* 2002; Perl *et al.* 2002).

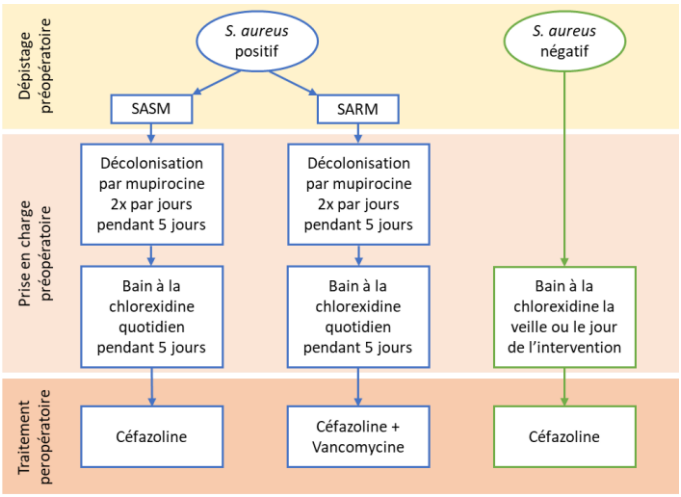



**Figure 1.** Protocole de prévention des infections de site opératoire selon Schweizer *et al.*

La povidone iodée est un antiseptique qui possède une large activité à la fois sur les bactéries à Gram positifs et Gram négatifs. Il existe à ce jour des formulations nasales à 5 et 10% de povidone iodée et cette molécule a été considérée comme agent alternatif à la mupirocine pour la décolonisation nasale à *S. aureus*. La povidone iodée a démontré une excellente activité *in vitro* sur les souches de SASM ou de SARM ; toutefois une étude a montré que son activité *in vivo* pouvait être réduite en présence de sécrétions nasales (Hill et Casewell 2000). Dans un essai randomisé contrôlé incluant 429 patients de chirurgie orthopédique (Rezapoor *et al.* 2017), le traitement des patients avec de la povidone iodée à 5% par voie nasale (2 minutes par narine, 2 applications) a permis, 4 heures après traitement, de diminuer la prévalence de portage de *S. aureus* à 21% contre 69% dans le groupe traité par lavage de nez à la solution saline. Vingt-quatre heures après traitement, 59% des patients traités à la povidone iodée étaient à nouveau porteurs de *S. aureus* alors que dans le bras contrôle 69% des patients étaient toujours colonisés. Un essai rétrospectif non randomisé en chirurgie (Bebko *et al.* 2015), a comparé l'utilisation de bains à la chlorhexidine couplée au traitement nasal à la povidone iodée aux données historiques de patients ayant reçu uniquement des bains à la chlorhexidine. Sur les trente jours suivants l'opération, le taux d'infections du site opératoire a été réduit de façon significative après instauration du traitement à la povidone iodée (1,1% contre 3,8% $p$=0,02).

L'utilisation d'antiseptique à base d'alcool a également été évaluée. En 2014, chez des professionnels de santé, l'utilisation topique d'un mélange contenant 70% d'éthanol a permis de réduire la charge nasale de *S. aureus* de 82% dans les heures qui suivaient le traitement (Steed *et al.* 2014). L'impact de ce traitement à plus long terme a été évalué à partir de 1 073 dossiers de prises en charge du rachis (Mullen *et al.* 2017). Les auteurs ont comparé la survenue d'infection du site opératoire suite à une prise charge préopératoire par bains de chlorhexidine comparé à l'association bains de chlorhexidine et application nasale d'antiseptique à base d'alcool à 0,33% en préopératoire immédiat puis 3 fois par jours pendant 5-7 jours après la sortie d'hospitalisation. Sur la période de mise en place de ce protocole, le taux d'incidence des complications infectieuses du site opératoire a été réduit de 81% ($p$=0,036).

La thérapie photodynamique qui consiste en l'activation de composés chimiques par de la lumière UV ou infrarouge, a été envisagée comme complément des lavages par lingettes de chlorhexidine pour la prévention des infections de site opératoire à *S. aureus* (Bryce *et al.* 2014). L'utilisation préopératoire d'une solution nasale à 0,1% de bleu de méthylène avec 2 cycles d'illumination laser de 2 minutes permettait ainsi de réduire le taux d'incidence des infections à 1,6% contre 2,7% du groupe classiquement traité par chlorhexidine seule ($p$=0,0004).

De nombreuses autres molécules candidates à utilisation topique ont été recensées dans une revue récente (**Tableau 3**) (Sakr *et al.* 2019):

**Tableau 3.** Principaux agents investigués pour la décolonisation nasale à *S. aureus* d'après Sakr *et al.*

| Molécule | Classification | Comparaison à la mupirocine |
|---|---|---|
| Bacitracine | Antibiotique | Elimination de *S. aureus* moins efficace (Soto *et al.* 1999; O'Grady *et al.* 2009) |
| Acide fusidique | Antibiotique | Elimination équivalente en association avec co-trimoxazole per os (Parras *et al.* 1995) |
| Retapamulin | Antibiotique | Pas de comparaison. |
| Polyhexanide | Antiseptique | Pas de comparaison |
| Octenidine | Antiseptique | Pas de comparaison |
| LTX-109 | Agent antimicrobien | Pas de comparaison |
| NP 108 (Luminaderm) | Agent antimicrobien | Pas de comparaison |
| XF-73 | Agent antimicrobien | Pas de comparaison |
| Lysostaphine | Agent antimicrobien | Pas d'étude *in vivo* |
| Analogues des squalamines | Agent antimicrobien | Pas d'étude *in vivo* |
| Epidermicine NI01 | Agent antimicrobien | Pas d'étude *in vivo* |
| Huile d'arbre à thé | Agent antimicrobien | Elimination de *S. aureus* moins efficace au niveau nasal (Dryden *et al.* 2004) |
| Miel de qualité médicale | Agent antimicrobien | Elimination de *S. aureus* équivalente après 2 cures consécutives (Poovelikunnel *et al.* 2018) |
| Phage / lysines de Phage | Agent antimicrobien | Pas d'étude *in vivo* |

Si les résultats concernant ces alternatives thérapeutiques sont encourageants, les études cliniques comparant l'efficacité de ces nouvelles stratégies à celle de référence sont très rares.

Bien que la mupirocine représente le traitement de choix pour la décolonisation nasale à *S. aureus* plusieurs limites à son utilisation sont à considérer. Plusieurs études ont décrites des souches résistantes à la mupirocine conduisant à l'échec de la décolonisation nasale (Vasquez *et al.* 2000; Pérez-Fontán *et al.* 2002; Lee *et al.* 2011a). Chez staphylocoques dorés, il existe deux niveaux de résistance à la mupirocine : les souches à haut niveau de résistance (CMI > 256 µg/ml mais variable selon les auteurs) et celles à bas niveau de résistance (CMI > 1 µg/ml d'après le Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie). Une étude a évalué l'efficacité de la mupirocine sur des souches de SARM à haut et bas niveau (avec un seuil à 4 µg/ml) de résistance à la mupirocine (Walker *et al.* 2003). Dans cette étude, l'efficacité de la mupirocine était évaluée à environ 80% pour les patients colonisés par une souche de SARM sensibles et faiblement résistantes à la mupirocine contre 28% pour les souches hautement résistantes. Cependant, 1 à 4 semaines après le traitement, l'efficacité de la mupirocine n'était plus que de 25% chez les patients porteurs de souches à bas et haut niveau de résistance. Les souches de recolonisation pouvaient presque systématiquement être reliées à la souche présente avant le traitement à la mupirocine. Pour les souches sensibles l'efficacité à 4 semaines était de 91% (Walker *et al.* 2003). Dans une étude de 2016, la prévalence de la résistance à la mupirocine parmi les souches de SARM était de 7,1% pour les bas niveaux de résistance et 7,5% pour les hauts niveaux de résistance (Hayden *et al.* 2016). De façon plus générale, le niveau de résistance à la mupirocine chez les souches de *S. aureus* isolée de colonisation est resté très faible (de 0 à 0,6%) (Perl *et al.* 2002; Fawley *et al.* 2006; Harbarth *et al.* 2008; van Rijen *et al.* 2008; Nicolas *et al.* 2020). Une autre problématique qui peut être constatée avec l'utilisation de la mupirocine est le niveau de compliance des patients. Une étude récente rapporte que presque 30% des patients déclarent une faible ou non observance du protocole de traitement à la mupirocine et chlorhexidine (Nicolas *et al.* 2020)

Même si la mupirocine présente une excellente activité sur le réservoir nasal de *S. aureus* dans les jours qui suivent le traitement, une autre problématique qui peut être constaté avec l'utilisation de la mupirocine est la survenue d'une recolonisation plus ou moins précoce après l'arrêt du traitement. Dans une étude menée chez du personnel soignant, l'utilisation de mupirocine appliquée deux fois par jour pendant cinq jours consécutifs a montré une excellente efficacité, avec 91% d'éradication dans les suites directes du traitement avec 87% de succès quatre semaines après son début (Doebbeling *et al.* 1993). Cependant, 48% et 53% des sujets traités étaient à nouveau porteurs de *S. aureus* respectivement six mois et un an après la fin du traitement (Doebbeling *et al.* 1994). Les résultats observés en hémodialyse étaient encore moins encourageants : 66% des patients décolonisés étaient à nouveau porteurs de *S. aureus* quatre mois après la fin du traitement (Bommer *et al.* 1995). Une étude beaucoup plus récente a montré que 39% des sujets considérés comme décolonisés après application

de mupirocine étaient à nouveau porteurs 90 jours après la fin du traitement, La souche de colonisation initiale étant même retrouvée pour 86% d'entre eux (Mody *et al.* 2015). Les échecs de décolonisation de certains patients pourraient être liés à la persistance d'autres sites de colonisation (Bommer *et al.* 1995). Il est également envisageable qu'un autre phénomène puisse jouer un rôle central dans ces phénomènes de recolonisation : la persistance nasale de *S. aureus* au niveau intracellulaire (Garzoni et Kelley 2009). Une meilleure compréhension des mécanismes qui régissent la colonisation nasale à *S. aureus* pourrait aboutir à une amélioration de la prévention des infections par cette bactérie et à des stratégies de décolonisation plus durable.

# Chapitre 2 : Mécanismes de la colonisation

D'un point de vue anatomique, la cavité nasale est composée de deux zones principales : Le *vestibulum nasi* qui correspond aux 2-3 premiers centimètres de la cavité nasale et qui est composé d'un épithélium stratifié squameux, kératinisé non cilié semblable à celui de la peau ; et la cavité nasale postérieure qui présente un épithélium cilié pseudostratifié avec des cellules à mucus (« goblet cells ») qui fait partie des voies aériennes respiratoires supérieures. Bien que le *vestibulum nasi* soit considéré comme le principal réservoir de *S. aureus* chez l'homme, la cavité nasale postérieure est également un site fréquemment colonisé par *S. aureus* (Baur *et al.* 2014).

Pour pouvoir lutter contre la clairance nasale et établir une colonisation stable, la bactérie doit adhérer au mucus ou aux récepteurs exprimés à la surface des cellules de la muqueuse nasale. *S. aureus* dispose alors d'un large éventail de molécules d'adhésion parmi lesquelles on distingue les adhésines d'origine protéique et le molécules d'adhérences non protéiques représentées par les acides téchoïques.

## Adhésion de *S. aureus* à la muqueuse nasale

### 1. Adhésines d'origine protéique

Principal moyen d'adhésion de *S. aureus*, la production de protéines d'adhésion appelées adhésines est principalement régulée par le système *agr* (« accessory gene regulator »), régulateur central du métabolisme de *S. aureus*. Le système *agr* va être activé par un peptide d'auto-induction dont la concentration augmentera avec la densité bactérienne. C'est ce système de « *quorum* sensing » qui va contrôler le passage d'une forme adhésive vers une forme plus virulente de la bactérie. Une étude a montré que le système *agr* n'est pas transcrit au cours de la colonisation nasale persistante (Burian *et al.* 2010). L'hémoglobine qui peut être présente à haute concentration dans la cavité nasale a également la capacité d'inhiber le système *agr* (Pynnonen *et al.* 2011).

Les protéines d'adhésion peuvent être classées en deux grands groupes : les CWA (« cell wall-anchored proteins ») qui sont des adhésines ancrées à la paroi et les SERAMs (« secreted expanded repertoir adhesive molecules ») qui vont être sécrétées par la bactérie. Les principales protéines d'adhésions de *S. aureus* pouvant interagir avec les cellules épithéliales et les composés de la matrice extracellulaire sont listées dans le Tableau 4.

**Tableau 4.** Principales protéines d'adhésion de *S. aureus*

| Nom | | Ligand cellulaire | Référence |
|---|---|---|---|
| **MSCRAMMs (CWA)** | | | |
| Clumping factor | ClfA | Fibrinogène<br>Fibrine | (McDevitt *et al.* 1997; Niemann *et al.* 2004) |
| | ClfB | Fibrinogène,<br>Cytokératine 8 et 10 | (Perkins *et al.* 2001; O'Brien *et al.* 2002; Schaffer *et al.* 2006; Wertheim *et al.* 2008; Mulcahy *et al.* 2012) |
| Fibronectin binding protein | FnBPA/B | Fibronectine<br>Fibrinogène<br>Elastine | (Wann *et al.* 2000; Roche *et al.* 2004; Burke *et al.* 2011) |
| Serine-aspartate repeat protein | SdrC | Inconnu | (Corrigan *et al.* 2009) |
| | SdrD | Desmogléine 1 | (Corrigan *et al.* 2009; Askarian *et al.* 2016) |
| Serine-rich adhesin for platelets | SraP | Gp340 | (Yang *et al.* 2014) |
| Collagen binding protein | Cna | Collagen | (Switalski *et al.* 1993) |
| Elastin binding protein | EbpS | Elastine | (Park *et al.* 1999) |
| Bone sialoprotein binding protein | Bbp | Bone sialoproteine | (Tung *et al.* 2000) |
| Extracellular matrix binding protein | EbhAB | Fibronectine | (Clarke *et al.* 2002) |
| **NEATs (CWA)** | | | |
| Iron-regulated surface determinant | IsdA | Fibrinogène<br>Fibronectine | (Clarke *et al.* 2004) |
| **Protéines à triple hélices α (CWA)** | | | |
| Protéine A | Spa | Facteur von Willebrand | (Hartleib *et al.* 2000) |
| **Famille G5-E (CWA)** | | | |
| *S. aureus* surface protein | SasG | Fibrinogène<br>Fibronectine<br>Cytokératine 10 | (Roche *et al.* 2003; Corrigan *et al.* 2009) |
| | SasX | Inconnu | (Li *et al.* 2012; Liu *et al.* 2015b) |
| **SERAM** | | | |
| Extracellular adherence protein | Eap | Fibrinogène<br>Fibronectine<br>Prothrombine | (Palma *et al.* 1999) |
| Extracellular matrix binding protein | Emp | Fibrinogène<br>Fibronectine<br>Vitronectine | (Hussain *et al.* 2001) |
| Extracellular fibrinogen binding protein | Efb | Fibrinogène<br>C3b | (Palma *et al.* 1998; Lee *et al.* 2004) |
| Von Willebrand factor binding protein | vWbp | Facteur Von Willebrand | (Bjerketorp *et al.* 2002) |
| Coagulase | Coa | Fibrinogène<br>Prothrombine | (McDevitt *et al.* 1992) |

*Adhésines protéiques ancrées à la paroi (CWA)*

Les CWA qui représentent la majeure partie des adhésines partagent des caractéristiques structurelles communes avec une séquence signal sur la partie N-terminal, une zone d'ancrage à la paroi bactérienne via la liaison covalente au peptidoglycane d'un motif LPXTG (Leu-Pro-X-Thr-Gly ou X peut être n'importe quel acide aminé) et un signal de tri (« sorting signal ») sur la partie C-terminal (Figure 2) (Foster *et al.* 2014). Le signal de tri est reconnu par la sortase A (codée par le gène *srtA*) qui permet l'adressage et la liaison covalente des adhésines à la paroi de *S. aureus*. La délétion du gène *srtA* va empêcher le ciblage et la fixation des protéines CWA à la paroi ce qui se traduit par une incapacité de la bactérie à coloniser de façon persistante la cavité nasale dans un modèle murin (Weidenmaier *et al.* 2012).

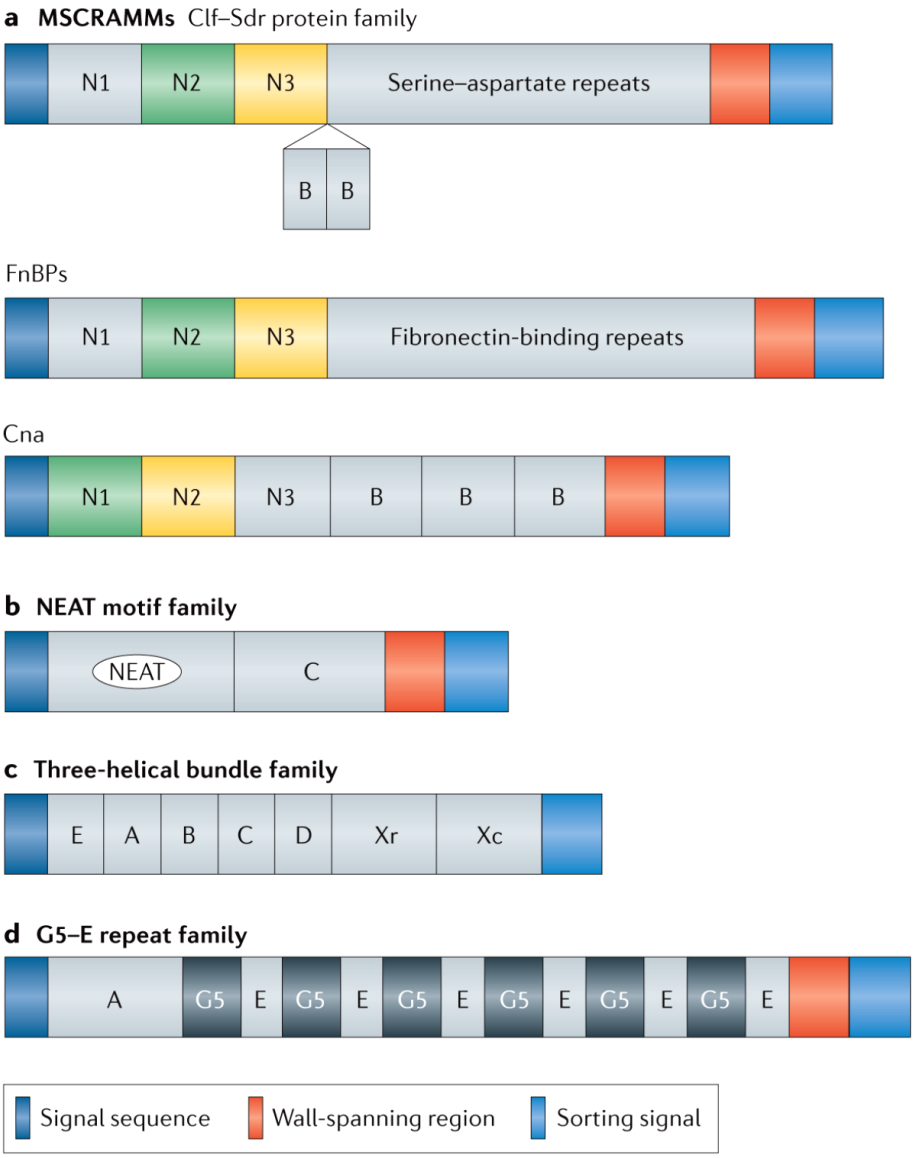



Figure 2. Classification des protéines ancrées à la paroi selon Foster *et al.*

Le *stratum corneum*, qui est la couche la plus superficielle de l'épithélium vestibulaire, est composé de kératinocytes matures (cornéocytes) qui vont exprimer une grande quantité de protéines comme la loricrine, la cytokératine 10, l'involucrine et la filaggrine. Ces protéines vont pouvoir être utilisées pour l'adhésion de *S. aureus* (Bibel *et al.* 1982; Eckhart *et al.* 2013). Plusieurs mécanismes d'adhésion ont été décrits comme pouvant être impliqués dans la colonisation nasale par *S. aureus* en favorisant l'adhésion aux protéines de la matrice extracellulaire ou aux molécules exprimées à la surface des cellules épithéliales.

Principale famille de CWA, les MSCRAMMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) possèdent une forte homologie de structure. L'une d'entre elles, le Clumping factor B (ClfB) est capable d'interagir avec la loricrine qui est la protéine la plus abondante produite au niveau de l'enveloppe kératinisée des cellules épithéliales du vestibulum nasi. Cette interaction est primordiale pour la colonisation par *S. aureus*. Dans un modèle de souris déficiente pour la loricrine, l'adhésion de *S. aureus* était réduite par 80% (Mulcahy *et al.* 2012). De même les souches de *S. aureus* déficientes en ClfB avaient une capacité réduite de colonisation sur des modèles murins (Schaffer *et al.* 2006). Une étude d'inoculation artificielle chez l'Homme a montré une clairance plus rapide de la souche ΔClfB par rapport à la souche sauvage qui persiste toujours 28 jours après inoculation (Wertheim *et al.* 2008).

Dans la même famille de protéines MSCRAMMs, les protéines SdrC et SdrD qui présentent une forte homologie de structure avec le ClfB, ont été décrites comme capable de se fixer aux cornéocytes desquamés (Corrigan *et al.* 2009; Askarian *et al.* 2016). L'interaction entre l'adhésine SraP (Serine-rich adhesin for platelets) de *S. aureus* et le récepteur cellulaire gp340 (protéine scavenger salivaire) qui a été observée avec les cellules A549 pourrait également jouer un rôle dans l'adhésion aux cellules épithéliales de la muqueuse nasale (Yang *et al.* 2014).

Les protéines de liaison à la fibronectine (FnBPs) FnBPA et FnBPB sont codées respectivement par les gènes *fbnA* et *fnbB* (Jönsson *et al.* 1991). Leurs structures sont très proches de celle de ClfA. Ces MSCRAMMs comportent un domaine A (N1+N2+N3 sur la **Figure 2**) qui va avoir la capacité de se fixer au fibrinogène et à l'élastine (Wann *et al.* 2000; Roche *et al.* 2004; Burke *et al.* 2011). Si les domaines A des deux FnBPs ne partagent que 40% de similarité, les domaines de liaison à la fibronectine sont identiques à 95% : 11 répétitions de la région de fixation à la fibronectine pour le FnBPA contre 10 répétitions pour la FnBPB (Burke *et al.* 2010). Cette hétérogénéité dans la nature et le niveau d'expression de ces gènes va se traduire par une capacité d'adhésion à la fibronectine très variable entre différentes souches de *S. aureus* (Peacock *et al.* 2000). C'est de façon indirecte, via l'utilisation d'un pont de fibronectine, que *S. aureus* va pouvoir interagir avec le récepteur cellulaire α5β1 qui va reconnaitre le motif RGD de la fibronectine fixée par *S. aureus* (Fowler *et al.* 2000). En plus de réduire la capacité

d'adhésion de *S. aureus*, les souches mutantes n'exprimant plus de FnBPs présentent également une diminution de leur capacité d'infection avec réduction de la mortalité dans un modèle murin (Shinji *et al.* 2011).

Les NEAT (pour near iron transporters ) sont des adhésines dont l'expression est régulée par le gène *fur* qui est activé dans des conditions pauvres en fer (Clarke *et al.* 2004). Au niveau de la cavité nasale, le rôle dans l'adhésion de la protéine « iron-regulated surface determinant A » (IsdA) via la fixation du fibrinogène et de la fibronectine a été observé *in vitro* et *in vivo* avec des modèles murins (Clarke *et al.* 2006).

De la même façon les protéines SasG et SasX, de la famille G5-E, ont la capacité de favoriser l'adhésion aux cellules épithéliales nasales ; la vaccination contre SasX permettant de réduire la colonisation nasale par *S. aureus* dans un modèle murin (Liu *et al.* 2015b). Si toutes ces protéines semblent impliquées dans l'adhésion de *S. aureus* à la muqueuse nasale, leur rôle chez l'homme n'a pas encore été démontré.

Enfin, on peut citer dans la famille des protéines à triple hélices α (« three-helical bundle familly »), la protéine A codée par le gène *spa* qui est présent chez la quasi-totalité des souches cliniques de *S. aureus*. La protéine A a été décrite comme capable de se fixer au récepteur du TNF (TNFR1), récepteur exprimé à la surface des cellules épithéliales des voies respiratoires. L'interaction entre protéine A et TNFR1 pourrait jouer un rôle central dans les pneumonies staphylococciques (Gómez *et al.* 2004). Cependant, l'étude du polymorphisme du gène codant la protéine A dans une collection de souches isolées de volontaires sains n'a révélé aucun rôle de cette protéine dans la persistance de la colonisation (Van Belkum *et al.* 1997)

### *Adhésines protéiques sécrétees : SERAMs*

Les SERAMs (« secretable expanded repertoire adhesive molecules ») sont des adhésines qui ne possèdent pas le motif LPXTG et qui sont sécrétées par *S. aureus* (Chavakis *et al.* 2005). Ces protéines sécrétées dans l'environnement proche de la bactérie vont pouvoir être re-capturées, via des liaisons faibles, à la paroi bactérienne. Plusieurs SERAMs comme l'extracellular fibrinogen binding l'extracellular matrix binding protein (Emp) ou l'extracellular adhesive protein (Eap) ont été décrites comme pouvant interagir avec le fibrinogène, la fibronectine ou la prothrombine. Il a été décrit l'Eap permettait l'adhésion de *S. aureus* sur un modèle de kératinocytes humains mais le récepteur impliqué dans cette adhésion n'est cependant pas décrit (Bur *et al.* 2013).

### 2. Adhésines non protéiques : les acides téichoïques de paroi

Les acides téichoïques sont un composant majeur de la paroi des bactéries à Gram positif pouvant représenter jusqu'à 60% de sa masse. On en distingue 2 types : les acides lipotéichoïques (LTA ou « lipotheichoic acids ») qui sont ancrés dans la membrane plasmique et les acides téichoïques de paroi (WTA ou « wall teichoic acids ») liés de façon covalente au peptidoglycane (Xia *et al.* 2010). En raison de leur exposition directe à l'environnement extérieur, ces molécules vont pouvoir jouer un rôle dans l'interaction avec les muqueuses de l'hôte (van Dalen *et al.* 2020) mais sont également des cibles privilégiées du système immunitaire (Jung *et al.* 2012; Mnich *et al.* 2019; van Dalen *et al.* 2019).

Les WTA de *S. aureus* sont considérés comme un facteur important d'adhésion aux cellules épithéliales des fosses nasales. Une étude a montré que les souches déficientes en WTA perdent leur capacité à coloniser les fosses nasales dans un modèle murin de « Coton Rat » (Weidenmaier *et al.* 2004). Contrairement à la colonisation du vestibule nasal, les facteurs impliqués dans la colonisation des fosses nasales postérieures par *S. aureus* restent encore peu étudiés, alors que l'épithélium de type respiratoire de la cavité nasale postérieure constitue un environnement très différent du vestibule. Une étude plus récente a montré que les WTA de *S. aureus* peuvent interagir avec le récepteur SREC-1 (Scavenger receptor de classe F, membre 1) qui est présent au niveau des cellules épithéliales de la cavité nasale postérieure chez l'Homme et le rat. Le traitement des rats avec des anticorps bloquants dirigés contre le récepteur SREC-1 a provoqué une diminution significative de la colonisation nasale jusqu'à 6 jours après inoculation (Baur *et al.* 2014).

## Internalisation de *S. aureus* dans les cellules épithéliales

### 1. Réservoir intracellulaire de *S. aureus* au cours de la colonisation nasale chez l'Homme

Longtemps considéré comme une bactérie uniquement extracellulaire, la capacité de *S. aureus* à envahir des cellules phagocytaires non professionnelles (NPPCs) comme les ostéoblastes, les fibroblastes, les kératinocytes, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales est maintenant largement reconnue (Strobel *et al.* 2016). Si le rôle de ce réservoir dans la persistance de la colonisation nasale reste à démontrer, la présence de *S. aureus* intracellulaire au sein de la muqueuse nasale a été observée dans un premier temps chez des patients souffrants d'une pathologie inflammatoire chronique de la muqueuse nasale, la rhino sinusite chronique avec ou sans polypose (Tableau 5)

**Tableau 5.** Synthèse des études sur la prévalence du portage intracellulaire nasal de *S. aureus* chez les sujets atteints de RSC

| Etude | Patients avec rhino sinusite chronique (n) | Prévalence de SA intracellulaire | Observations |
|---|---|---|---|
| (Plouin-Gaudon *et al.* 2006) | 27 | 62,9% (n=17) | Taux d'échec thérapeutique de la RSC plus élevé chez les porteurs intracellulaires |
| (Corriveau *et al.* 2009) | 31 | 32,3% (n=10) | 3 patients (/9) sans rhino sinusite chronique avec *S. aureus* intracellulaire |
| (Sachse *et al.* 2010) | 30 | 56,7% (n=17) | Aucun patient (/10) sans rhino sinusite chronique avec *S. aureus* intracellulaire |
| (Tan *et al.* 2012) | 36 | 55,6% (n=20) | Aucun patient (/8) sans rhino sinusite chronique avec *S. aureus* intracellulaire |
| (Tan *et al.* 2013) | 51 | 39,2% (n=20) | Plus haut risque d'échappement thérapeutique tardif de la RSC chez les sujets avec réservoir intracellulaire. |
| (Kim *et al.* 2013) | 31 | 58,1% (n=18) | 1 patient (/9) sans rhino sinusite chronique avec *S. aureus* intracellulaire |
| (Ou *et al.* 2016) | 40 | 65,0% (n=26) | 3 patients (/8) sans rhino sinusite chronique avec *S. aureus* intracellulaire |
| (Ou *et al.* 2017) | 34 | 76,5% (n=26) | Détection de *S. aureus* intracellulaire à différents temps malgré une tentative de décolonisation nasale |
| **Total** | **280** | **55,0% (n=154)** | **7 patient (/44) sans rhino sinusite chronique avec *S. aureus* intracellulaire** |

Dans cette population ce réservoir intracellulaire est plus fréquemment retrouvé chez les patients souffrant de rhino sinusite chronique sans polypose nasale comparativement à ceux présentant des polypes (Ou *et al.* 2016). Dans cette étude, les auteurs décrivent une infiltration par des cellules inflammatoires chez les patients présentant un réservoir intracellulaire de *S. aureus* qui ne semble pas être associée à une aggravation des symptômes cliniques ni à un risque accru d'échec thérapeutique. Cette dernière observation est cependant en contradiction avec celles faites par d'autres auteurs qui suggèrent que le réservoir intracellulaire de *S. aureus* serait à l'origine d'un taux d'échecs thérapeutiques et de rechutes plus importants (Corriveau *et al.* 2009; Tan *et al.* 2013). Dans ces études centrées sur la rhino sinusite chronique, Il est intéressant de noter la présence de *S. aureus* en intracellulaire parmi les patients sains issus des bras contrôles (**Tableau 5**). Ainsi, avec de très faibles nombres d'individus étudiés, les prévalences de *S. aureus* intracellulaire mesurées en population saine sont très variables, pouvant aller de 0% (0/10) (Sachse *et al.* 2010) à 37,5% (3/8) (Ou *et al.* 2016), avec une moyenne de 16% (7/44). Une étude en microscopie confocale de biopsies de la muqueuse nasale de volontaires sains a montré que la prévalence de *S. aureus* intra muqueux dans le *vestibulum nasi* était de 55,5% chez des porteurs persistants de *S. aureus* (10/18)(Hanssen *et al.* 2017). Dans cette étude, la bactérie a été observée dans différentes couches de la muqueuse mais c'est au niveau du *stratum corneum* (composé de kératinocytes matures) que la majorité des observations a été faite (**Figure 3**).

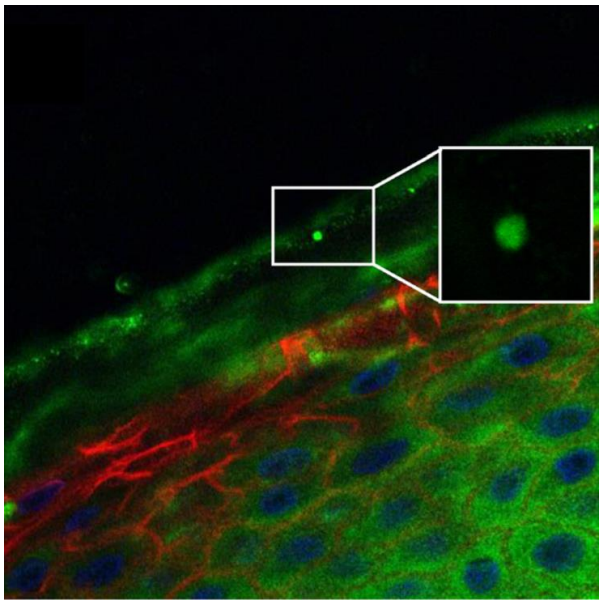


**Figure 3.** Localisation intra tissulaire de *S. aureus* sur biopsie nasale par Hanssen *et al.*

La prévalence exacte de *S. aureus* en intracellulaire chez les porteurs est encore approximative en raison des effectifs faibles de volontaire inclus dans les études. A ce jour, aucune étude de grande échelle n'a été conduite et l'observation de *S. aureus* en intracellulaire *in vivo* ou *ex vivo* est encore difficile à effectuer en pratique courante. Or, si l'adhésion est la première étape nécessaire à la colonisation nasale, l'invasion cellulaire pourrait jouer un rôle central dans la persistance du portage.

## 2 Mécanismes moléculaires d'internalisation de *S. aureus*

Différentes voies d'internalisation ont été décrites, certaines faisant intervenir des protéines de *S. aureus* décrites comme participant à l'adhésion cellulaire. Nous allons détailler dans ce paragraphe les différents facteurs bactériens impliqués dans l'invasion par *S. aureus*.

### *Protéines de liaison à la fibronectine (FnBPs)*

Plusieurs études ont montré que les protéines de liaisons à la fibronectine (FnBPs) ont un rôle majeur dans l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules phagocytaires non-professionnelles (Josse *et al.* 2017). L'interaction des FnBPs de *S. aureus* avec l'intégrine cellulaire α5β1 via les molécules de fibronectine cellulaire est considérée comme la principale voie d'internalisation de *S. aureus* dans la cellule eucaryote (Tran Van Nhieu et Isberg 1993). Les souches n'exprimant pas les FnBPs (*Δfnb*) ont un niveau d'internalisation très fortement diminué dans les NPPCs *in vitro* (Fowler *et al.* 2000). Il est estimé qu'une FnBP peut fixer entre 6 et 9 molécules de fibronectine qui sont capables de recruter plusieurs intégrines α5β1 à la membrane cellulaire pour activer une cascade de réactions intracellulaires aboutissant à l'internalisation de la bactérie (**Figure 4**) (Bingham *et al.* 2008; Josse *et al.* 2017).

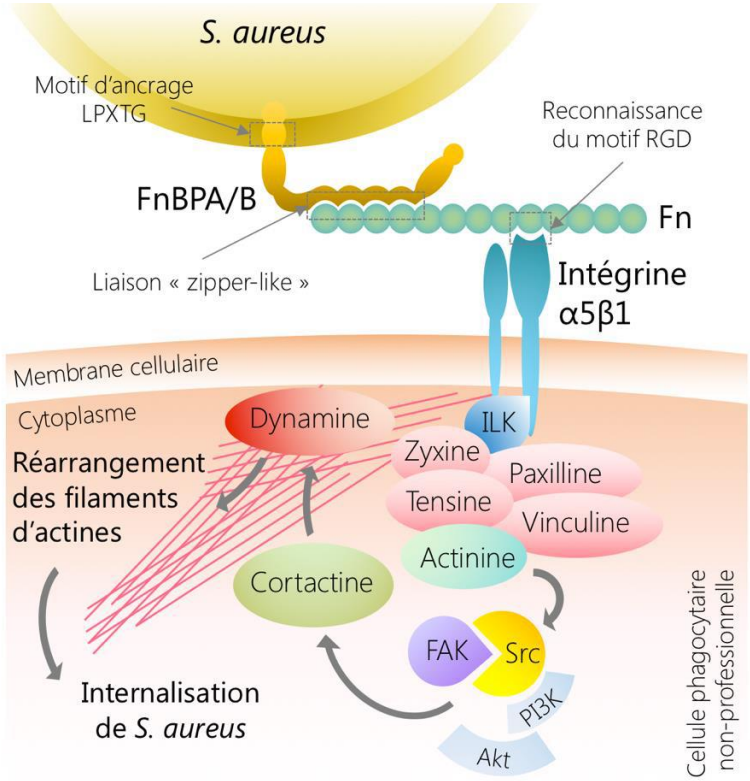



**Figure 4.** Voie FnBPs-Fn-intégrine α5β1 impliquée dans l'adhésion et l'internalisation de *S. aureus* d'après Morgene M. Fedy (Thèse d'Université 2018)

Ce processus d'internalisation est engagé en faisant intervenir la protéine ILK (Integrin Linked Kinase) associé au récepteur α5β1 (Lee *et al.* 2011b; Sayedyahossein *et al.* 2015) qui va elle-même pouvoir activer différentes protéines intracellulaires et notamment la protéine FAK (« Focal Adhesion Kinase ») et la tyrosine kinase Src (Fowler *et al.* 2003; Agerer *et al.* 2005). Il va s'en suivre l'activation des protéines PI3K et Akt (Oviedo-Boyso *et al.* 2011; Wang *et al.* 2013) qui va permettre le réarrangement du cytosquelette d'actine (Selbach et Backert 2005). La cellule va émettre des pseudopodes autour de la bactérie en vue de l'internaliser au sein d'un endosome formé à partir d'un fragment de membrane cytoplasmique sur lequel *S. aureus* est fixé (**Figure 5**) (Hauck et Ohlsen 2006).

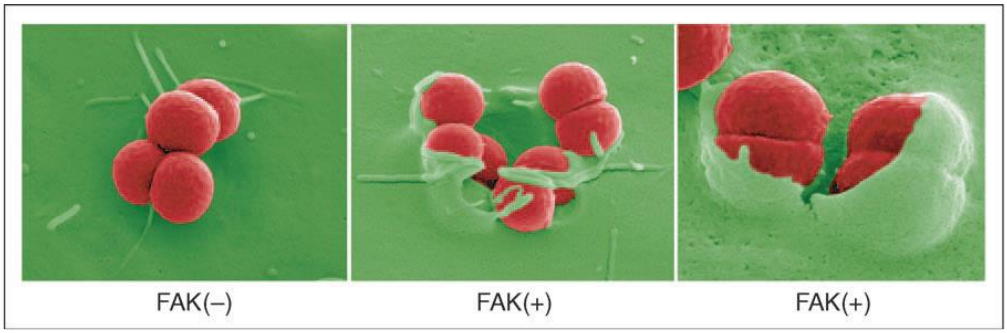



**Figure 5.** Visualisation par microscopie électronique de l'endocytose de *S. aureus* par Agerer *et al.*

L'internalisation de *S. aureus* est donc par un mécanisme actif de la cellule hôte. L'inhibition de la mobilisation de l'actine par la cytochalasine D entraine une très forte diminution de l'entrée cellulaire

de la bactérie (Ellington *et al.* 1999; Sinha *et al.* 1999; Mempel *et al.* 2002). Une étude a également montré une diminution de l'internalisation de *S. aureus* lorsque que les cellules sont incubées à une température plus basse ce qui s'explique par une diminution de la fluidité de la membrane cellulaire et de la mobilité du cytosquelette d'actine (Sinha *et al.* 1999).

Si la voie d'internalisation qui utilise le récepteur α5β1 est la plus étudiée, des voies « secondaires » ont également été décrites dans la littérature. Une étude a montré que les FnBPs de *S. aureus* qui peuvent interagir avec la heat shock proteins 60 (Hsp60) cellulaire (Dziewanowska *et al.* 2000). Initialement décrite comme molécule chaperonne associée à la matrice mitochondriale, Hsp60 a également été observée au niveau de la membrane cytoplasmique (Belles *et al.* 1999). L'interaction entre l'adhésine FnBP et la protéine Hsp60 a alors été décrite comme pouvant aboutir à l'internalisation de la bactérie ; le pré-traitement de cellules épithéliales avec de Ac bloquant Hsp60 réduisait très significativement l'internalisation de *S. aureus* (Dziewanowska *et al.* 2000). Les auteurs ont suggéré que le récepteur Hsp60 serait un corécepteur de l'intégrine α5β1 et favoriserait la formation de complexes entre les FnBPs et l'intégrine α5β1 liée à la fibronectine cellulaire pour déclencher l'internalisation de la bactérie selon le processus décrit précédemment (Figure 6). Cependant un rôle direct du recepteur, capable d'induire son propre signal cellulaire d'internalisation de la bactérie, n'est pas à exclure : une étude a montré que la protéine Hsp60 est capable de contrôler l'activité de Src (Abdel-Ghany *et al.* 1990).

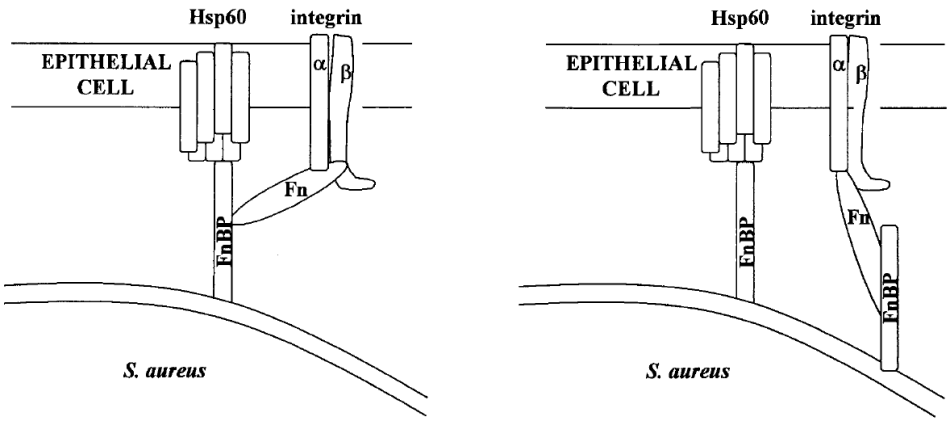



Figure 6. Modèles du rôle potentiel de corécepteur pour Hsp60 d'après Dziewanowska *et al.*

### *Autres MSCRAMMS*

En dehors des FnBPs, d'autres MSCRAMMs ont été décrites comme impliquées dans l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules phagocytaires non professionnelles.

Une étude a montré que le ClfA peut interagir avec l'Annexine A2 des cellules épithéliales mammaires bovine MAC-T (Ashraf *et al.* 2017). La co-localisation du complexe formé par ces deux molécules au niveau de la membrane plasmique a été observée par microscopie confocale et ce complexe était ensuite transporté dans le cytoplasme. Les auteurs ont suggéré que cette interaction pourrait favoriser

l'internalisation de *S. aureus*. Hors contexte de l'internalisation de *S. aureus*, l'Annexine A2 présente un rôle majeur dans la migration cellulaire et la cicatrisation. Des expériences *in vitro* sur cellules primaires épithéliales nasales ont montré que son expression était diminuée dans un contexte inflammatoire (traitement par IL-4 ou par une combinaison d IFN-γ et de TNF) (Wise *et al.* 2013). Cependant comme pour Hsp60, il est possible que l'Annexine A2 agisse comme un corécepteur de l'intégrine α5β1.
Une étude récente a montré que la protéine SraP peut interagir avec la gp340 exprimée par les cellules A549 et que l'utilisation de souches ΔSraP ou l'utilisation d'un anticorps bloquant anti-SraP réduit l'adhésion et l'internalisation de *S. aureus* de moitié (Zhou *et al.* 2021). De nombreux récepteurs cellulaires impliqués dans l'adhésion de *S. aureus* (Cf paragraphe « Adhésion de *S. aureus* à la muqueuse nasale ») pourraient jouer un rôle de corécepteurs ou avoir une action dans l'internalisation de *S. aureus* mais les études des mécanismes moléculaires sont souvent incomplètes ou absentes.

### *Autres protéines pouvant avoir un rôle dans l'internalisation de S. aureus*

Les autolysines sont des protéines liées de façon non covalente à la surface des bactéries qui possèdent des fonctions métaboliques (hydrolyse du peptidoglycane) et participent à la formation du biofilm (Biswas *et al.* 2006). L'autolysine A (AtlA) est une adhésine qui ne fait pas partie de la classe des MSCRAMM mais qui va être impliquée dans l'internalisation de *S. aureus* dans la cellule hôte. L'internalisation de *S. aureus* était significativement réduite chez les souches mutées au niveau du gène *atlA* (Hirschhausen *et al.* 2010). Dans un modèle de cellules endothéliales EA.hy 926, les auteurs ont montré que la protéine Hsc70 (heat shock cognate 70) peut se lier à l'AtlA et permettre l'internalisation de *S. aureus*. De plus, AtlA qui est capable de se fixer à la fibronectine, pourrait se substituer aux FnBPs ou agir comme un corécepteur de l'intégrine α5β1 dans un mécanisme mettant en jeu l'intervention de FAK-Src ainsi que de PI3K-Akt (Schlesier *et al.* 2020). Une étude a montré que l'AtlE exprimée par *S. epidermidis* possède les mêmes caractéristiques et peut favoriser l'internalisation via le récepteur Hsc70 (Hirschhausen *et al.* 2010; Schlesier *et al.* 2020).

La protéine Tet38 qui est connue pour son rôle de pompe à efflux qui induit une résistance à la tétracycline a été décrite comme impliquée dans la colonisation cutanée chez la souris. Le niveau de colonisation des souris était divisé par 5 avec les souches ΔTet38 (Truong-Bolduc *et al.* 2014). La même équipe a ensuite démontré l'implication de Tet38 dans l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules épithéliales (Truong-Bolduc *et al.* 2015). Les auteurs ont utilisé des souches ΔTetR21 qui expriment 5 fois plus de protéines Tet38. Le régulateur TetR21 (tetracycline regulator 21) a pour fonction de réduire l'expression de Tet38 en se fixant sur son promoteur. Les souches ΔTetR21 avaient un niveau de résistance à la tétracycline multiplié par 8 et un taux d'internalisation de *S. aureus* multiplié par 2. Une étude similaire a montré que les souches ΔTet38 ont un niveau d'internalisation 6 fois inférieur à celui

des souches sauvages sur cellules A549. Enfin, les auteurs ont identifié le récepteur scavenger CD36 comme un ligand de Tet38 (Truong-Bolduc *et al.* 2017).

Les Lpls (Lipoprtein-likes proteins) qui sont encodées par les gènes de l'ilot vSaα ont été décrites comme impliquées dans l'internalisation de *S. aureus* (Nguyen *et al.* 2015). Les auteurs ont montré que la délétion des 10 lipoprotéines d'une souche appartenant au pulsotype USA300 entraine une diminution significative de l'internalisation de la bactérie dans NPPCs (kératinocytes primaires) et de la virulence dans un modèle d'abcès rénal murin. Ces lipoprotéines partagent toutes une grande similarité et sont très répendues chez les souches de *S. aureus* isolées chez l'Homme. Par la suite, les travaux de cette équipe ont permis d'identifier les protéines Hsp90 (heat shock protein 90 α et β) comme cible directes des Lpls (Tribelli *et al.* 2020). Si l'expression de l'isoforme Hsp90α va être induite par le stress cellulaire et notamment par la chaleur, l'expression de Hsp90β est ubiquitaire (Zuehlke *et al.* 2015). C'est la pré-incubation de cellules HaCaT à 39°C qui provoque une surexpression de Hsp90α et une augmentation du nombre de *S. aureus* en intracellulaire (Tribelli *et al.* 2020). Les auteurs ont également montré que l'incubation des cellules avec un anticorps bloquant anti-Hsp90 diminue par 5 l'internalisation de *S. aureus* et que le « silencing » du gène *HSP90α* avec un RNA inhibiteur diminue par 2 l'internalisation. Au contraire, aucun effet mesurable du silencing de *Hsp90β* n'a été observé dans cette étude (Tribelli *et al.* 2020).

Enfin, l'Eap (Extracellular adherence protein), qui est une protéine secrétée se liant de façon non covalente à la paroi de *S. aureus*, a été décrite comme impliquée dans les processus d'internalisation des cellules HaCaT et des fibroblastes HEL (Haggar *et al.* 2004; Bur *et al.* 2013). Une étude a montré que l'utilisation d'Eap recombinante permet l'adhésion et l'internalisation d'espèces bactériennes normalement incapables de pénétrer à l'intérieur des NPPCs telles que *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis* et *Escherichia coli* (Bur *et al.* 2013). Si l'internalisation via Eap nécessite la mobilisation active du cytosquelette d'actine, le récepteur d'entrée et la cascade de signalisation mise en jeu sont inconnus.

Enfin, en dehors des NPPCs, il est intéressant de noter qu'une étude a montré que la protéine SEB (staphylococcal enterotoxin B) favorise l'internalisation de *S. aureus* dans les mastocytes de la muqueuse nasale (Hayes *et al.* 2019).

### 3. Devenir du *S. aureus* intracellulaire

#### *Survie et échappement phagosomal*

Comme décrit dans le paragraphe dédié à la physiologie de l'internalisation, l'entrée de *S. aureus* se fait au sein d'une vacuole d'endocytose, l'endosome, qui est formé à partir de la membrane cytoplasmique de la cellule hôte et qui est de nature très similaire aux phagosomes observés dans les phagocytes

professionnels. La phagocytose est un processus fondamental de l'immunité innée permettant aux cellules de capturer et d'éliminer des éléments exogènes comme les bactéries (Chen *et al.* 2015b). Que ce soit dans les phagocytes professionnels ou des NPPCs, le devenir naturel du phagosome est de fusionner avec le lysosome, on parle alors de phagolysosome dont l'environnement acide, riche en enzymes hydrolytiques, va entrainer la destruction de son contenu (Flannagan *et al.* 2009). Les produits issus de cette digestion pourront être réutilisés par la cellule ou seront exportés par exocytose. Cependant, certains pathogènes, dont fait partie *S. aureus*, sont capables d'échapper à ce processus et de survivre dans la cellule hôte (Horn *et al.* 2017). Plusieurs mécanismes ont été étudiés pour expliquer la survie intracellulaire de *S. aureus*, mais la plupart semblent pouvoir coexister dans le temps et dans l'espace, mais il demeure encore beaucoup de zones d'ombres à ce sujet. La Figure 7 présente les différents mécanismes qui ont été décrits.

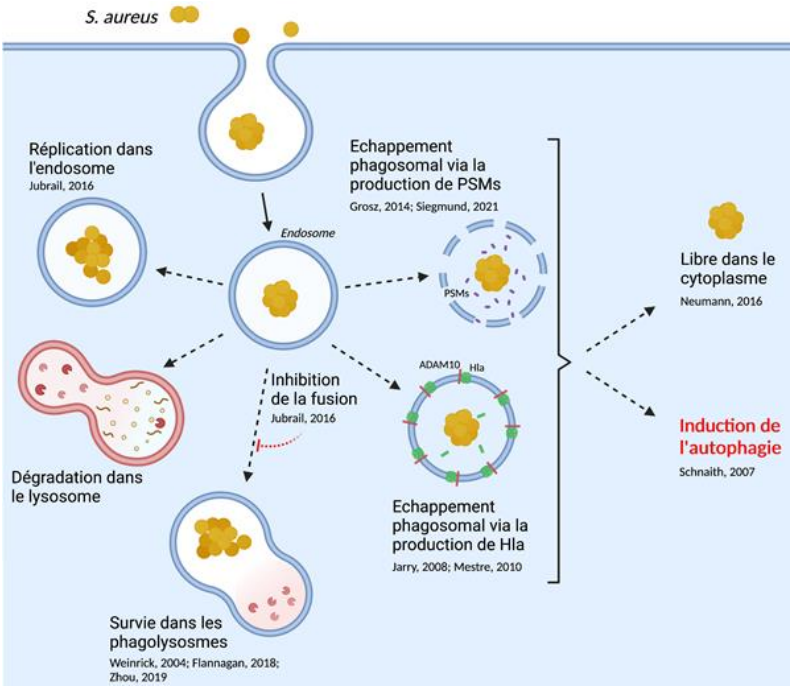



**Figure 7.** Devenir intracellulaire de *S. aureus* dans les cellules phagocytaires non professionnelles d'après Audoux E. (Thèse d'Université, 2021)

Une étude a montré que *S. aureus* est capable d'inhiber la fusion entre l'endosome et le lysosome et d'empêcher l'acidification du lysosome pour favoriser la réplication de la bactérie dans l'endosome (Jubrail *et al.* 2016). D'autres études ont montré que *S. aureus* peut survivre dans l'environnement acide des phagolysosomes (Flannagan *et al.* 2018). L'acidité des vésicules contenant *S. aureus*, pourrait entrainer des modifications de la membrane bactérienne ainsi que l'expression de facteurs de virulence via l'activation du système *agr* (Shompole *et al.* 2003; Weinrick *et al.* 2004). Cette survie dans les phagolysosomes pourrait alors être liée à la production par *S. aureus* de molécules comme l'uréase, l'ammoniac, le nitrite et la nitrate réductase (Zhou *et al.* 2019) et à une maturation

incomplète du phagolysosome car l'activation de certaines hydrolases centrales dans la digestion lysosomale est dépendante du pH acide (Tranchemontagne *et al.* 2016).

Si la survie phagosomale est une première étape cruciale au devenir intracellulaire de *S. aureus*, un autre mécanisme essentiel pour la multiplication de la bactérie est l'échappement du phagosome. La sortie du phagosome est un mécanisme qui concerne la quasi-totalité des souches des *S. aureus* étudiées (Strobel *et al.* 2016). Cette sortie dans le cytoplasme cellulaire peut être observée à la fois dans des NPPCs (cellules épithéliales, endothéliales…) et dans des phagocytes professionnelles comme les macrophages THP-1 (Grosz *et al.* 2014). L'échappement phagosomal fait intervenir des facteurs de virulence de *S. aureus* dont l'expression est contrôlée par le système de régulation *agr.* Une étude a montré que le système *agr* est fortement actif avant la sortie des bactéries dans les cytoplasmes et que les souches Δ*agr* ont une capacité d'échappement phagosomal très réduite (Chi *et al.* 2014; Strobel *et al.* 2016). Le premier facteur de virulence qui pourrait être impliqué dans cette sortie du phagosome est l'hémolysine alpha (Hla), toxine sous contrôle du système *agr*, capable de former des pores dans les membranes cellulaires (Jarry *et al.* 2008). Des auteurs ont montré que Hla est capable d'inhiber l'activité du phagolysosome en formant des pores dans la paroi de la vésicule permettant ainsi d'en neutraliser le contenu (Mestre *et al.* 2010). Cette hypothèse est cependant fortement controversée et serait au mieux dépendante du type cellulaire et de la concentration d'Hla pouvant être libérée dans le phagosome (Lâm *et al.* 2010). Certaines études décrivent l'implication des phenol-solubles modulins (PSMs) qui sont également des toxines sous contrôle du système *agr* ; la délétion des PSMs (α et β) inhibant alors l'échappement phagosomal (Siegmund *et al.* 2021). Une étude a cependant montré que la production des PSMs n'était pas suffisante à la sortie de la bactérie du pahgosome, mais nécessitait la co-expression de la phospholipase β-toxine et de la δ-toxine (Giese *et al.* 2011). Ces observations sont en opposition avec les résultats d'une étude plus récente soutenant que l'évasion phagosomale nécessite la production de PSMα sans rôle apparent des PSMβ, de la β-toxine et de la δ-toxine (Grosz *et al.* 2014). D'autres toxines, comme la toxine de Panton-Valentine (PVL), ont été décrites comme impliquées dans l'échappement phagosomal des macrophages (Münzenmayer *et al.* 2016) et des kératinocytes (Chi *et al.* 2014). Si beaucoup de ces résultats semblent contradictoires, il est important de noter que les mécanismes de survie et d'échappement phagosomal de *S. aureus* sont influencés par de nombreux paramètres et notamment par le type cellulaire et les souches étudiées (Strobel *et al.* 2016).

Il a été observé que *S. aureus* peut induire une forte activation de l'autophagie (Schnaith *et al.* 2007; Neumann *et al.* 2016). La réponse autophagique de la cellule à l'internalisation de *S. aureus* va aboutir à la formation d'un autophagosome dont l'évolution normale est la fusion au lysosome pour destruction et élimination du contenu intra vésiculaire. Cette fois-ci encore *S. aureus* est capable d'en échapper, les mécanismes déjà décrits précédemment pouvant à nouveau être impliqués dans la

subversion de l'autophagie. Il reste cependant beaucoup de questions sans réponse à ce niveau mais que ce soit après échappement du phagosome et/ou de l'autophagosome, il semble que *S. aureus* va pouvoir se retrouver libre dans un environnement riche lui permettant de se multiplier : le cytoplasme cellulaire (Neumann *et al.* 2016).

### *Small Colony Variants (SCV)*

Un phénomène associé à l'internalisation de *S. aureus* est l'existence d'un phénotype bactérien très particulier : les Small Colony Variants (SCV). Les SCV sont une forme quiescente de la bactérie qui apparait en réponse à des conditions de survie difficiles comme la privation en nutriments, la présence d'antibiotiques ou de peptides antimicrobiens cationiques (Proctor *et al.* 2014). Ces SCV présentent une sensibilité diminuée aux antibiotiques (Garcia *et al.* 2013) et vont induire une réponse réduite aux défenses de l'hôte (Tuchscherr *et al.* 2010) qui vont limiter l'élimination de *S. aureus*. La capacité de survie *in vitro* des SCV dans les cellules endothéliales a rapidement fait émettre l'hypothèse que ce phénotype pourrait être à la base de la persistance de certaines infections à *S. aureus* (Balwit *et al.* 1994). En culture sur gélose le phénotype de SCV se caractérise par la présence de petites colonies (10 fois plus petites que les colonies classiques), non pigmentées et ne présentant pas ou très peu d'hémolyse. Ce phénotype est secondaire à d'importants changements dans le métabolisme de *S. aureus* impliquant une augmentation de l'expression de facteurs d'adhésion concomitante à une réduction importante des facteurs de virulence de *S. aureus* (Kahl *et al.* 2005; Tuchscherr *et al.* 2010). Si la forte expression des facteurs d'adhésion va permettre une meilleure absorption par les cellules hôtes (Sendi et Proctor 2009), l'apparition de SCV semble également favorisée lorsque *S. aureus* est présent à l'intérieur même du compartiment intracellulaire (Vesga *et al.* 1996). L'environnement hostile du phagosome pourrait être à l'origine de l'induction du phénotype SCV et l'épaississement de la paroi bactérienne observé chez les SCV pourrait avoir un rôle dans la survie phagosomale. La voie de signalisation *SigB* est surexprimée chez les SCV et les souches délétées en *SigB* sont incapables de former des SCV (Tuchscherr *et al.* 2015). Sur culture d'ostéoblastes, en quelques jours les souches Δ*SigB* sont complètement éliminées du compartiment intracellulaire et cet effet est complètement réversible lorsque les souches de *S. aureus* sont re-complémentées avec *SigB*. Egalement observée *in vivo* (Moisan *et al.* 2006; Tuchscherr et Löffler 2016), la surexpression de *SigB* par les SCV va influer sur deux autres voies de signalisations : rétrocontrôle positif de le la voie *SarA* qui régule l'expression d'adhésines et la formation de biofilm et rétrocontrôle négatif de l'*agr* et donc de l'expression de facteurs de virulence (Tuchscherr *et al.* 2015). Alors que les SCV semblent plus adaptées à la survie initiale dans le phagosome et à la survie intracellulaire au long terme (Tuchscherr *et al.* 2020), un changement de phénotype avec

expression des facteurs de virulence sous contrôle *agr* pourrait être nécessaire à l'échappement phagosomal et à la multiplication de *S. aureus* dans la cellule.

### *Mort cellulaire et chronicité de l'infection/colonisation*

Les expériences *in vitro* d'infections de modèles cellulaires ont montré que le réservoir intracellulaire de *S. aureus* était capable d'induire la mort des cellules hôtes avec libération de bactéries viables pouvant envahir les cellules voisines. Une étude a montré que les colonies de *S. aureus* reléguées par des NPPCs mourants (ostéoblastes primaires) étaient capables de réinfecter de nouvelles cellules suggérant ainsi que ce mécanisme pourrait être à l'origine de la récidive de certaines infections osseuses en apparence guéries (Ellington *et al.* 2003). Plus récemment, sur un modèle de culture de mastocytes HMC-1, les auteurs ont observé une multiplication de *S. aureus* dans ces cellules phagocytaires conduisant à la rupture des cellules infectées et à la libération de bactéries viables dans l'espace péri-cellulaire (Hayes *et al.* 2019). Pour induire la mort cellulaire les bactéries doivent être capables d'exprimer leurs facteurs de virulence. Les souches Δ*agr* et Δ*sarA* étaient incapables de déclencher l'apoptose cellulaire (Wesson *et al.* 1998; Haslinger-Löffler *et al.* 2005). L'hémolysine α (Hla) et la toxine de Panton Valentine (PVL) ont été décrites comme capables d'induire la mort de cellules endothéliales et de kératinocytes respectivement (Menzies et Kourteva 2000; Chi *et al.* 2014). Ces processus sont à la fois complexes et non clairement élucidés. Les différentes formes de mort cellulaire (apoptose, nécrose, pyroptose) sont dépendantes aussi bien des types de cellules et de souches utilisées (Soe *et al.* 2021).

Pour conclure ce chapitre, le rôle du réservoir intracellulaire dans le cadre de la persistance du portage nasal de *S. aureus* est encore à prouver. Cependant, son existence pourrait constituer un véritable sanctuaire pour la bactérie. Ce réservoir dormant de bactéries serait un véritable cheval de Troie pour *S. aureus*, à l'abri du système immunitaire, des traitements antibiotiques et capable de resurgir au moment propice (Krezalek *et al.* 2018). Ce réservoir pourrait alors expliquer (au moins en partie) les échecs de décolonisation ainsi que les recolonisations précoces observées avec les stratégies actuelles de décolonisation (Cf paragraphe décolonisation). Sur modèle de souris il a été démontré que le traitement par vancomycine était capable d'éradiquer les bactéries planctoniques sans effet sur les staphylocoques intracellulaires qui conservaient toutes leurs virulence (Lehar *et al.* 2015). Des alternatives thérapeutiques capables d'agir sur les bactéries intracellulaires, ou d'empêcher la réimplantation nasale de *S. aureus*, sont déjà à l'étude et des solutions efficaces pourraient être trouver en étudiant la flore nasale des patients non porteurs de *S. aureus*.

# Chapitre 3 : Interactions avec la flore nasale

Le rapport entre santé et microbiote est avéré, le nombre d'étude sur cette relation a explosé ces dernières années avec les progrès technologiques et l'avènement du séquençage haut débit (Next Generation Sequencing NGS) (une vingtaine d'articles par an avant les années 2000 a presque 20.000 articles en 2021, **Figure 8**).

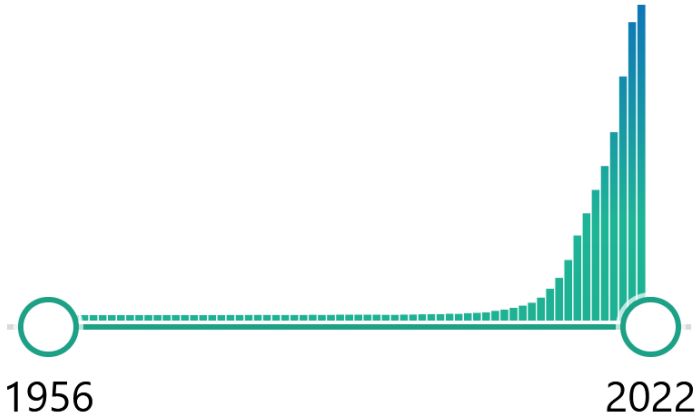



**Figure 8.** Extraction PubMed du nombre d'articles pour la recherche microbiot*

La technique la plus répandue pour l'étude du microbiote est la métagénomique 16S, qui repose sur l'amplification et le séquençage de tous les fragments d'ADN 16S obtenus dans un prélèvement. L'ADN 16S correspond à la séquence codant pour la petite sous-unité du ribosome des procaryotes, l'ARNr 16s, qui est présent dans toutes les bactéries. Ce fragment d'environ 1550 paires de bases peut être séquencé dans son intégralité, mais l'identification des espèces bactériennes par NGS repose sur le séquençage d'une ou plusieurs des 9 régions variables qui peuvent être amplifiées à l'aide d'amorces de PCR ciblées sur les régions conservées du 16S. Les données obtenues dans différentes études sont sujettes à d'importantes variabilités en rapport avec des méthodologies non standardisées et des biais possibles à chaque niveau du processus : différences de protocoles d'extraction, de région(s) séquencée(s), de protocoles d'amplification, de technologies de séquençage, de pipeline d'analyse des résultats et de bases de données d'alignement des séquences (Tremblay *et al.* 2015; Barb *et al.* 2016; Clooney *et al.* 2016; Fouhy *et al.* 2016; Siegwald *et al.* 2017).

La première étude de grande envergure à utiliser des données de métagénomique 16S a inclus 4 788 échantillons provenant de 242 individus sains (129 hommes pour 113 femmes). Elle avait pour objectif de faire la cartographie des niches bactériennes des grands sites anatomiques (Human Microbiome Project Consortium 2012). Cette étude a permis de mettre en évidence d'importantes variations dans la nature de la flore microbienne des différents sites prélevés ainsi qu'une grande hétérogénéité entre individus (**Figure 9**).

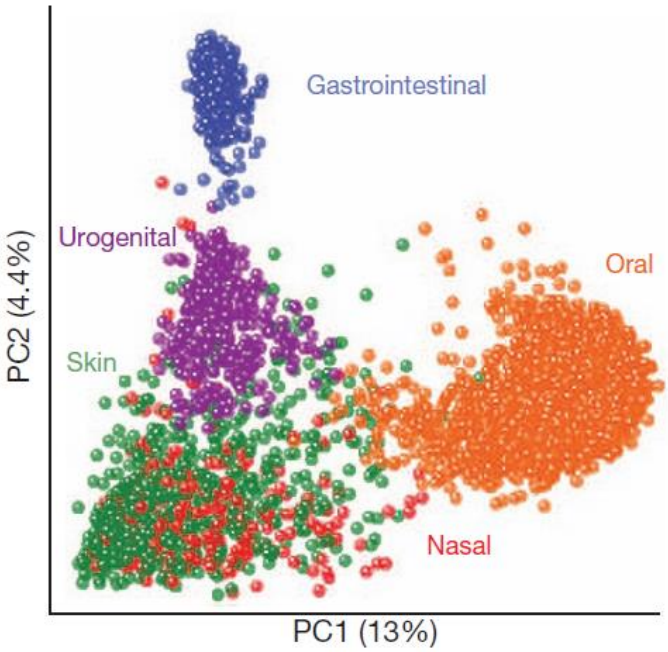



**Figure 9.** DPCoA du microbiote des principaux sites de colonisation bactérienne d'après le Human microbiome Poject Consortium 2012

On observe ainsi que les flores digestive, urogénitale et orale sont très distinctes dans leur composition alors que la peau et la muqueuse nasale sont relativement indissociables. Ce résultat est cohérent, les prélèvements nasaux ont été réalisés au niveau du *vestibulum nasi* qui présente un épithélium kératinisé semblable à celui de la peau (Human Microbiome Project Consortium 2012).

## Microbiote nasal

La similarité entre la flore cutanée et la flore nasale est depuis bien longtemps documentée (Grice *et al.* 2009; Frank *et al.* 2010; Human Microbiome Project Consortium 2012). Chez 12 patients sains, la comparaison du microbiote de prélèvements étagés de la cavité nasale (AN : vestibule, MM : méat moyen et SR : récessus sphéno-ethmoïdal) a montré que la flore qui colonise les fosses nasales antérieures (AN) diffère sensiblement de la flore de la cavité nasale postérieure (MM et SR) (**Figure 10**) (Yan *et al.* 2013).

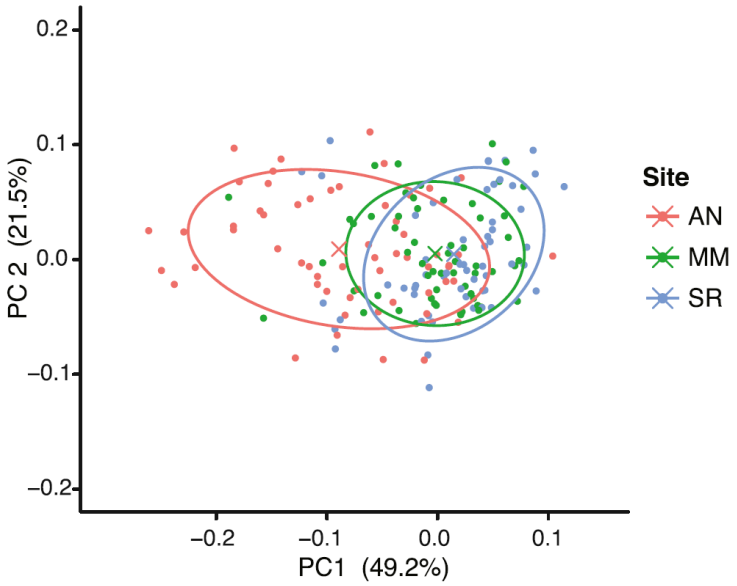



**Figure 10.** DPCoA du microbiote de différents étages de la cavité nasale d'après Yan *et al.*

Dans cette étude les auteurs ont observé une diversité plus faible (index de diversité de Shannon) au niveau du vestibule que dans les fosses nasales postérieures en lien avec une plus grande proportion d'actinobactéries et de firmicutes. Avec un épithélium de type respiratoire, la cavité nasale postérieure abriterait une flore de transition entre celle du vestibule et celle de la flore orale (plus forte abondance de streptocoques) et respiratoire supérieure (plus riche en protéobactéries dont les *Branhamella* notamment) (Costello *et al.* 2009; Lemon *et al.* 2010). On considère que la cavité nasale, dans sa globalité, est ainsi dominée par 3 grands phylums bactériens avec environ 50% d'actinobactéries, 25% de firmicutes et 20% de protéobactires (Lemon *et al.* 2010; Human Microbiome Project Consortium 2012; Yan *et al.* 2013; Bessesen *et al.* 2015).

En métagénomique 16S, les Operational Taxonomic Unit (OTU) correspondent à un groupe de séquences qui partagent une homologie de séquences supérieure ou égale à un seuil défini généralement à 97%. Pour Yan et son équipe, les 10 principaux OTU représentaient environ 80% des séquences obtenues ce qui, malgré un nombre limité de patients, souligne l'importance de certaines bactéries dans la constitution du microbiote nasal de base. De plus, chez un individu donné, lorsque qu'une flore est dominée par un organisme ce dernier est généralement présent au niveau des différents sites de la cavité nasale (Yan *et al.* 2013; Kaspar *et al.* 2016). En ce qui concerne les profils microbiens le sexe, la consommation de tabac ou de l'âge ne semblent pas induire de changements significatifs (Wos-Oxley *et al.* 2010; Camarinha-Silva *et al.* 2012). Cependant, il faut noter qu'une étude a montré que la densité bactérienne observée chez les femmes est deux fois plus faible que chez l'homme (Liu *et al.* 2015a). En dehors de circonstances particulières comme l'administration d'antibiotiques, de corticoïdes et de vaccin ou en cas d'infections virales (Ramakrishnan *et al.* 2018; Ding

*et al.* 2019), la composition du microbiote nasal reste relativement stable sur des échelles de temps de de 4 à 6 mois (Costello *et al.* 2009; Frank *et al.* 2010). Une étude a montré que les variations climatiques survenant entre les périodes hivernales et estivales étaient la cause de changements significatifs dans la composition du microbiote nasal (Camarinha-Silva *et al.* 2012). Certains facteurs intrinsèques comme le développement pubertaire peuvent entrainer une transformation majeure du microbiote nasal et cutané (Oh *et al.* 2012). On distingue ainsi dans cette étude, deux groupes de communautés de microbiote nasal distincts : un groupe associé à l'enfance correspondant aux stades de l'échelle de maturité Tanner 1 à 3 (de 0 à 12-13 ans environ) et le groupe des « adultes » pour les stades de Tanner 4 à 5.

Si l'analyse des données de métagénomique 16S jusqu'au rang taxonomique du genre ne pose pas de soucis particulier, la très grande homologie de séquences (>97%) observée entre plusieurs espèces d'un même genre fait qu'un seul OTU peut contenir plusieurs espèces. L'analyse de fragments de 16S doit être interprétée avec la plus grande prudence possible lorsqu'il est question de descendre au rang de l'espèce (Johnson *et al.* 2019; Milani *et al.* 2020). Ces bases étant posées et malgré une grande variété interindividuelle dans la composition du microbiote nasal, les espèces appartenant au genre *Corynebacterium, Cutibacterium (*anciennement *Propionibacterium) et Staphylococcus* constituent le noyau dur du microbiote nasal (Frank *et al.* 2010; Human Microbiome Project Consortium 2012; Yan *et al.* 2013; Kaspar *et al.* 2016). Ainsi, on observe chez l'adulte une prévalence de portage d'environ 88% pour les *Corynebacterium,* 83% pour *Cutibacterium* et 90% pour les *Staphylococcus* (Camarinha-Silva *et al.* 2012, 2012; Liu *et al.* 2015a; Kaspar *et al.* 2016). En terme d'abondance les *Cutibacterium* et les corynebacterium sont les genres dominants dans presque 80% des patients (Yan *et al.* 2013). L'étude du microbiote de 178 adultes sains a permis d'identifier 7 communautés bactériennes majeures (major nasal community state types : CST) au niveau du vestibule nasal, toutes dominées par une espèce ou un genre bactérien différent (Figure 11) (Liu *et al.* 2015a) : la CST 1 représentée par l'espèce *S. aureus*, la CST 2 représentée par les entérobactéries (*Escherichia spp., Proteus spp, et Klebsiella spp*), la CST 3 représentée par l'espèce *S. epidermidis*, la CST 4 représentée par le genre *Cutibacterium*, la CST 5 représentée par le genre *Corynebacterium*, la CST 6 représentée par le genre *Moraxella* et la CST 7 représentée par le genre *Dolosigranulum*.

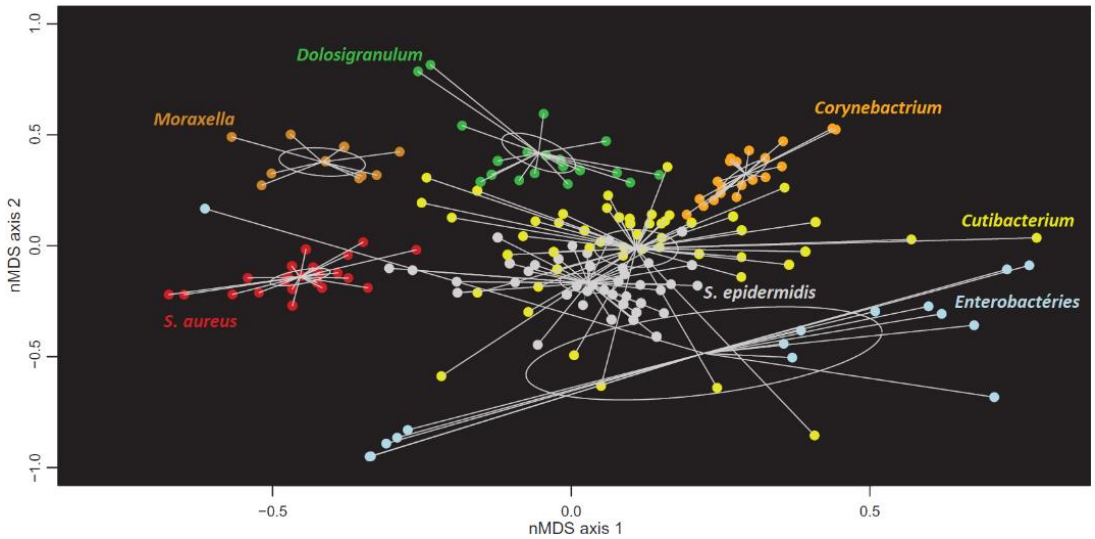



**Figure 11.** CST obtenus par analyse en positionnement multidimensionnel d'après Liu *et al.*

Les communautés bactériennes les plus fréquentes sont la CST4 (*Cutibacterium*) puis la CST3 (*S. epidermidis*) qui représentent chacune environ ¼ des patients. On retrouve ensuite le CST1 (*S. aureus*) observé chez 12,4% des individus ; les autres communautés étant bien plus rares. Dans cette étude, la comparaison du microbiote nasal de 89 paires de jumeaux (46 monozygotes et 43 hétérozygotes) n'a pas montré de rôle significatif de la génétique dans la composition du microbiote, seulement ¼ des jumeaux partageant le même CST, ce qui suggère que les facteurs extrinsèques et environnementaux ont un rôle fondamental dans la constitution de la flore (Liu *et al.* 2015a). Plusieurs études ont montré que certaines pathologies chroniques telle que la rhino sinusite chronique peuvent entrainer des changements profonds dans la composition du microbiote nasal. Cette pathologie inflammatoire chronique est associée à une dysbiose et une diminution de la richesse bactérienne locale (Chalermwatanachai *et al.* 2018; De Boeck *et al.* 2019). Ces altérations se traduisent par une augmentation de la prévalence de certaines espèces comme *Escherichia coli* et *S. aureus* alors que d'autres genres tel que les *Cutibacterium*, *Corynebacterium* et *Dolosigranulum* sont plus présents dans le groupe contrôle de patients sains (Feazel *et al.* 2012; Chalermwatanachai *et al.* 2018; Copeland *et al.* 2018; De Boeck *et al.* 2019). A ce sujet, une revue de 2018 (Sivasubramaniam et Douglas 2018) souligne que le rôle joué par le microbiome n'est pas clairement défini mais les pathobiontes (epèces commensales pouvant se comporter comme des pathogènes opportunistes) pourraient jouer un rôle dans la physiopathologie de la rhinosinusite chronique (De Boeck *et al.* 2019).

## *S. aureus* et microbiote nasal

### 1. Microbiote nasal des porteurs de *S. aureus*

*S. aureus* et *S. epidermidis* sont les deux espèces de staphylocoques les plus fréquemment retrouvées au niveau de la cavité nasale (Yan *et al.* 2013) et peuvent représenter plus de la moitié des séquences

obtenues chez certains individus (Frank *et al.* 2010). Une grande variabilité dans l'abondance de *S. aureus* peut être observée chez les patients porteurs (Bessesen *et al.* 2015) avec une colonisation qui semble intéresser toute la cavité nasale (vestibule et fosses nasales postérieures) chez les porteurs persistants (6/6) (Yan *et al.* 2013). Aucune différence apparente entre le microbiote des patients colonisés par des souches de *S. aureus* sensibles à la méticilline et celui de patients porteurs de souches résistantes à la méticilline n'est décrite (Frank *et al.* 2010; Johnson *et al.* 2015). Si certaines études ne rapportent pas de changements significatifs dans la richesse du microbiote des patients porteurs de *S. aureus* (Yan *et al.* 2013), d'autres décrivent une flore 2,2 fois plus riche chez des patients non porteurs (Bessesen *et al.* 2015). Comme décrit précédemment, chez le nouveau-né en bonne santé, la colonisation nasale est fréquente dans les premières semaines de vie (~50%) avant que la prévalence ne diminue spontanément en quelques mois (Peacock *et al.* 2003; Andersen *et al.* 2012). Une étude a montré que les nouveaux nés porteurs de *S. aureus* présentent une diversité microbienne réduite et que la décolonisation nasale par mupirocine permet de restaurer une diversité similaire à celle des non porteurs de *S. aureus* (Khamash *et al.* 2018, 2019). Dans cette étude, l'augmentation de la diversité bactérienne après traitement est la conséquence d'une augmentation marquée de l'abondance relative de corynebactéries et de *Rothia mucilaginosa*. L'abondance relative du genre *Corunebacterium* passe ainsi de 9,2 à 29,4% et celle de l'éspèce *Rothia mucilaginosa* passe de 0,1 à 22,5%. Enfin en terme de composition, plusieurs études ont montré une corrélation négative entre *Firmicutes* (staphylocoques essentiellement) et *Actinobacteria* (*Corynebacterium* et *Cutibacterium*) au niveau du microbiote vestibulaire tandis qu'au niveau oropharyngé ce sont les *Proteobacteria* qui sont retrouvées en absence de *Firmicutes* (Lemon *et al.* 2010; Johnson *et al.* 2015). Ces observations suggèrent qu'il existe une forte compétition entre les espèces bactériennes qui colonisent la muqueuse nasale.

## 2. Interactions bactériennes au niveau de la cavité nasale

Une revue récente s'est intéressée au commensalisme de *S. aureus* dans la cavité nasale et à ses interactions avec le reste du microbiote nasal (Krismer *et al.* 2017). Les auteurs décrivent 4 formes d'interactions qui peuvent exister entre *S. aureus* et les autres espèces bactériennes (**Figure 12**) :

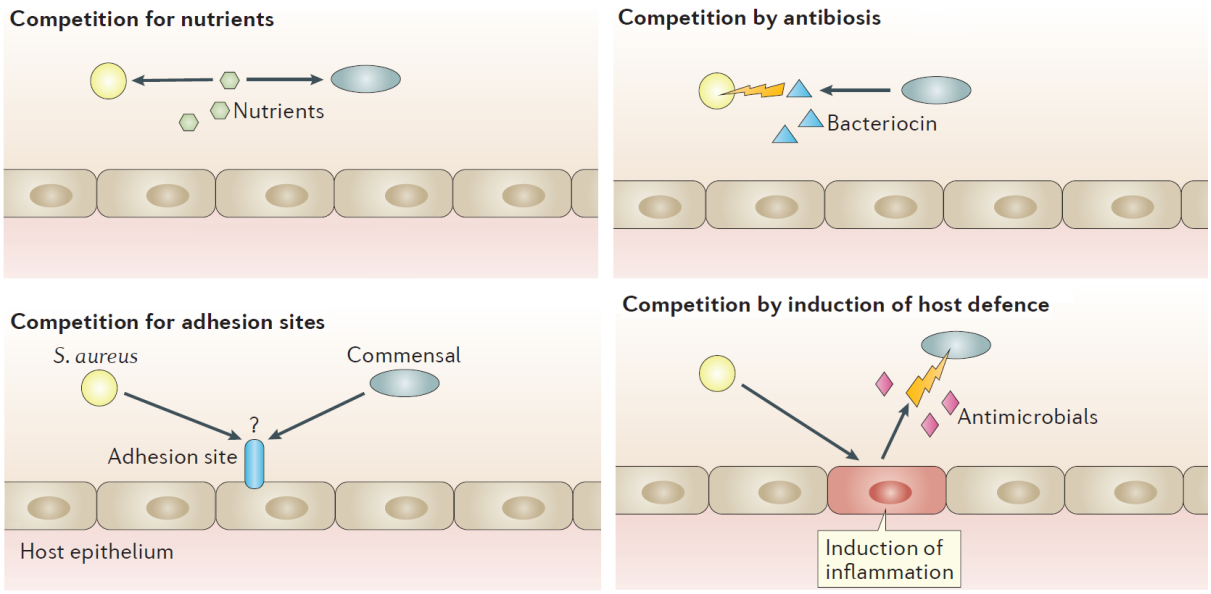



**Figure 12.** Principales formes d'interactions connues entre *S. aureus* et les bactéries commensales du microbiote nasal d'après Krismer *et al.*

La forme la plus évidente de compétition entre bactéries va être la concurrence existant pour l'acquisition des nutriments présents dans l'environnement pauvre de la cavité nasale (Krismer *et al.* 2014). *In vitro*, l'utilisation d'un milieu nasal synthétique (« Synthetic Nasal Medium ») qui contient des concentrations faibles en sucres, acides aminées, potassium, magnésium et phosphates, permet la croissance de *S. aureus* alors que la plupart des staphylocoques à coagule négative (CoNS) en sont incapables (Krismer *et al.* 2014). Ces résultats viennent soulever l'hypothèse que la cavité nasale ne pourrait être qu'un site transitoire pour les CoNS. Cependant certains métabolites peuvent servir de nutriments pour d'autres espèces, une synergie de ce type pourrait exister entre *S. aureus* et *Corynebacterium accolens* (Yan *et al.* 2013).

Comme nous l'avons déjà vu la capacité d'adhésion de *S. aureus* est primordiale pour la colonisation de la muqueuse nasale et si *S. aureus* possède plusieurs cibles de fixation d'autres espèces peuvent cibler les mêmes ligands. A notre conaissance, il n'existe qu'une publication portant sur la compétition, entre *S. aureus* et les autres bactéries composant le microbiote nasal, pour l'adhérence cellulaire (Ménard *et al.* 2020). Dans cette étude des souches de *S. epidermidis*, *C. acnes* et *C. alccolens*, ont entrainées la diminution de la capacité d'adhésion et d'internalisation de deux souches de *S. aureus* sur une lignée de cellules cancereuses gingivales (Ca9-22). Toutes les souches utilisées avaient été

isolées de la cavité nasale de volontaires participant à l'étude (Ménard *et al.* 2020). Alors que les mécanismes d'adhésion de *S. aureus* sont étudiés depuis longtemps ce n'est pas encore le cas pour de nombreux commensaux retrouvés dans la cavité nasale et des études portant sur la compétition pour l'adhésion sont à développer.

La compétition entre *S. aureus* et le reste du microbiote va également passer par l'induction des défenses de l'hôte. Ainsi la présence de *S. aureus* au niveau de la cavité nasale va avoir un effet pro-inflammatoire (Hanzelmann *et al.* 2016) qui va induire la production par l'hôte de peptides antimicrobiens (Cole *et al.* 2001). Cependant, ce processus inflammatoire serait à l'avantage de *S. aureus* et des staphylocoques en général, qui sont moins sensibles que d'autres commensaux à ces peptides antimicrobiens (lysozyme, lactoferrine, CAMPs et α/β défensines par exemple) (Peschel et Sahl 2006; Herbert *et al.* 2007).

Enfin, il existe une compétition directe entre bactéries via la production de peptides antimicrobiens, également appelés bactériocines, et nous en verrons plusieurs exemples par la suite (Krismer *et al.* 2017). Nous allons maintenant détailler les interactions décrites dans la littérature entre *S. aureus* et différentes espèces bactériennes

### *S. aureus et corynebactéries*

Les études sur le microbiote nasal ont mis en évidence qu'une faible abondance en *Corynebacterium* était prédictive d'une forte abondance en *S. aureus* (Frank *et al.* 2010; Liu *et al.* 2015a) et qu'à l'inverse les échantillons de patients non porteurs de *S. aureus* étaient riches en Corynebactéries (Johnson *et al.* 2015; Khamash *et al.* 2019). La probabilité d'isoler du Staphylocoque doré est ainsi réduite par 3 quand le niveau de *Corynebacterium spp.* est supérieur à $10^4$ UFC/écouvillon et même réduite par 10 lorsque ce niveau dépasse $10^5$ UFC. (Lina *et al.* 2003). De plus, les individus présentant une colonisation nasale stable avec des corynebactéries en forte concentration n'étaient jamais colonisés par *S. aureus* sur un suivi régulier de 3 ans alors que 10% des sujets non colonisés par *S. aureus* et corynebactéries se positivaient à *S. aureus* (Uehara *et al.* 2000). On peut également souligner le fait que 2 décolonisations spontanées à *S. aureus* sont survenues chez des patients initialement colonisés par un mélange de corynebactéries et de *S. aureus* (Uehara *et al.* 2000). En ce qui concerne les différentes espèces de corynebactéries on peut aussi bien observer des effets agoniste qu'antagoniste à la colonisation par *S. aureus*. C'est par exemple ce qui a été décrit avec la synergie qui existe entre *S. aureus* et *C. accolens* (Yan *et al.* 2013). Sans impact sur sa croissance, la co-culture de *S. aureus* et de *C. striatum* va induire des changements importants dans le métabolisme de *S. aureus* avec une réduction majeure de l'expression des gènes sous contrôle du système de quorum sensing *agr* se traduisant par

une activité hémolytique réduite sans impact significatif sur sa croissance (Ramsey *et al.* 2016). Cette répression du système *agr* s'accompagnant d'une surexpression des gènes codants pour divers facteurs d'adhésion *exprimés in vivo* au cours de la colonisation nasale, les souches de *S. aureus* utilisées présentaient une capacité accrue de fixation aux cellules épithéliales. Ces observations ont permis alors aux auteurs de conclure à une orientation vers le commensalisme de *S. aureus* forcée par la présence de *C. striatum*. Il est intéressant de noter que dans cette même étude, sur un modèle murin d'abcès sous cutané, la quantité de *S. aureus* présente au niveau de l'infection était réduite en cas de co-infection par *C. striatum* (Ramsey *et al.* 2016). Il est important de souligner que ces interactions ne peuvent intéresser que certains clones très spécifiques au sein d'une espèce donnée de corynebactéries ou de *S. aureus*. Ainsi, il a été rapporté qu'un clone de *Corynebacterium spp.* était capable d'interagir seulement avec les souches de *S. aureus* présentant un profil *agr-1* (parmi les 4 profils majeurs d'*agr*) (Lina *et al.* 2003). Une corrélation négative entre la présence de *S. aureus* et *C. pseudodiphtheriticum* a été décrite et la capacité d'inhibition de cette dernière a pu être confirmée *in vitro* (Yan *et al.* 2013). Dans une étude *in vivo* incluant 4 patients porteurs de *S. aureus* (dont un SARM) l'utilisation de spray nasal contenant une solution saline de *C. pseudodiphtheriticum* a permis de décoloniser complètement 3 patients et de réduire significativement la charge de *S. aureus* chez un 4ème sujet porteur de SARM (Kiryukhina *et al.* 2013). Dans ce dernier cas la charge de *S. aureus* n'a jamais pu être négativée par le traitement et a re-augmenté après son arrêt. De façon contradictoire une étude de 2010 basée sur le pyroséquençage, rapportait que *C. pseudodiphtheriticum* et *S. aureus* pouvaient cohabiter au niveau nasal (Wos-Oxley *et al.* 2010). Cette apparente discordance pourrait être liée aux différences de technologies utilisées pour le séquençage 16S (le pyroséquençage étant l'une des premières technologies de NGS commercialisée), aux difficultés pour assigner avec précision une identification au niveau de l'espèce sur des fragments de 16S et à la diversité de phénotypes des souches au sein d'une même espèce. Une étude récente souligne qu'en fonction de la souche utilisée, l'activité bactéricide contact-indépendante médiée par *C. pseudodiphtheriticum* sur *S. aureus* pouvait varier entre une résistance complète et une haute sensibilité et ceci sans corrélation directe avec le type de profil *agr* (Hardy *et al.* 2019). L'activité bactéricide de *C. pseudodiphtheriticum y* est décrite comme liée à la production d'un facteur sécrété par la bactérie. Ce facteur secrété est capable de détourner à son avantage la production des phenol-soluble modulins (PSMs) de *S. aureus* conduisant à d'importants dégâts sur la bactérie. L'inactivation de l'agr ou la perte des PSMs conférant à *S. aureus* une résistance à l'activité bactéricide de *C. pseudodiphtheriticum* (Hardy *et al.* 2019). Enfin, l'implantation d'une corynebactérie, la souche *Corynebacterium sp* Co304, chez des sujets porteurs de staphylocoques dorés (MSSA et MRSA) a permis une éradication complète de la colonisation par *S. aureus* chez 71% d'entre eux (12/17) alors que l'instillation d'une solution de NaCl 0.9% ou de *S. epidermidis* n'avait aucun effet sur le portage de *S. aureus* (Uehara *et al.* 2000). Cette activité ne semblait pas liée à la production d'une

bactériocine mais à la plus grande capacité qu'avait la souche Co304 à se fixer au mucus comparé aux souches de *S. aureus* et *S. epidermidis*. S. *epidermidis*, qui était présent chez tous les volontaires de l'étude, n'a jamais été éradiqué par l'administration de Co304.

### *S. aureus et autres espèces de staphylocoques*

*S. epidermidis* est, avec *S. aureus*, l'espèce de staphylocoques la plus fréquemment retrouvée au niveau de la cavité nasale. Une étude de métagénomique ciblée sur le gène *tuf* (gène présent chez toutes les espèces de staphylocoques et permettant une meilleure discrimination inter espèces que le 16S) mesure une prévalence de portage de *S. epidermidis* de 100%, l'abondance relative de l'espèce pouvant aller de 0,74 à 94,60% des séquences obtenues. Les données de microbiote semblent cependant mener à des observations contradictoires en ce qui concerne l'association de ces deux espèces. Ainsi, si certaines études peuvent rapporter que la présence de *S. aureus* est négativement corrélée à celle de *S. epidermidis* au niveau vestibulaire (Frank *et al.* 2010), d'autres décrivent une corrélation positive entre les deux espèces (Liu *et al.* 2015a; Kaspar *et al.* 2016). Enfin *S. epidermidis* peut également être retrouvé dans l'ensemble de la cavité nasale indépendamment du statut de portage à *S. aureus* (Yan *et al.* 2013). Certaines souches de *S. epidermidis* capables de produire la sérine protéase Esp font exception à cette règle car leur présence peut être utilisée comme marqueur de l'absence de *S. aureus* (Iwase *et al.* 2010). Les souches productrices de la protéine Esp, en plus d'inhiber la capacité de formation de biofilm de *S. aureus*, permettent l'élimination *in vivo* de la colonisation par *S. aureus* chez des volontaires alors que la souche de *S. epidermidis* isogénique ΔEsp n'en était pas capable. Une explication possible est que cette protéase serait capable de dégrader de nombreuses protéines de *S. aureus* dont plusieurs molécules d'adhésion (Eap, Emp, Fnb ou protéine A) ou protéines pouvant servir de ligand (fibronectine, fibrinogène et vitronectine entre…)(Sugimoto *et al.* 2013). Une autre explication possible à l'hétérogénéité des observations faites sur ces deux espèces pourrait être liée à des interactions spécifiquement liées à un type *agr* comme ce qui a été décrit entre les souches de *S. aureus* et certaines Corynebactéries (Lina *et al.* 2003). Ainsi des souches de *S. epidermidis* présentant un *agr* de type I, II et III pouvaient inhiber la croissance des *S. aureus agr* II alors que les souches de *S. aureus agr* I n'étaient sensibles qu'aux *S. epidermidis agr* III. Une étude de 2016 a montré qu'une grande proportion (86%) des 89 souches de staphylocoques testées étaient productrices de bactériocines (Janek *et al.* 2016). La majorité des *S. epidermidis* étaient ainsi capable d'inhiber la croissance de *Dolosigranulum pigrum,* de *Moraxella catarrhalis* et de *Corynebacterium pseudodiphteriticum* alors que *S. aureus* n'en était pas capable. *Micrococcus luteus* était lui sensible à presque toutes les souches de *S. aureus* mais rarement à *S. epidermidis. S. epidermidis* était de loin le plus grand producteur de bactériocines avec 96% de souches productrices alors que chez *S. aureus* seulement 52% étaient productrice de bactériocines (69% chez les autres CoNS). Si les différentes

souches de staphylocoques disposent d'un important arsenal pour se défendre contre le reste des bactéries commensales du nez, certaines souches sont capables de produire des bactériocines ciblant d'autres staphylocoques. C'est le cas de *S. lugdunesis* dont la lugdunine est hautement active contre *S. aureus*. Les individus porteurs de *S. lugdunensis* sont 6 fois moins à risque d'être colonisés au niveau nasal par *S. aureus* et la co-infection sur modèle murin avec des souches de *S. lugdunensis* capables ou non de produire de la lugdunine n'entrainaient une diminution du nombre de *S. aureus* qu'en présence de la souche productrice (Zipperer *et al.* 2016). Il est intéressant de souligner que la compétition entre différentes souches de *S. aureus* a également été explorée et notement via le rôle protecteur que pouvait avoir les souches sensibles à la méthicilline sur la colonisation par SARM mais les données bibliographiques à ce sujet sont discordantes. S'il a été décrit que le portage nasal de SASM pouvait réduire de 50% le risque de colonisation par du SARM chez des patients en soins intensifs (Huang *et al.* 2011), d'autres équipes ne rapportent pas ce potentiel effet protecteur du SASM (Krebes *et al.* 2011 ; Landelle *et al*. 2014).

### *S. aureus et lactobacillales*

Comme *S. aureus*, les *Lactobacillales* font partie de l'ordre des *Bacilli*, et trois genres de *Lactobacillales* sont particulièrement intéressant au niveau nasal : les genres *Streptococcus, Lactobacillus et Dolosigranulum*. Si les streptocoques sont fréquemment observés au niveau du microbiote nasal (dans les fosses nasales postérieures surtout) les lactobacilles, bien connus en agroalimentaire pour leurs capacités de fermentation, ne font pas partie des résidents fréquemment isolés de la cavité nasale. Chez les nouveaux nés non porteurs de *S. aureus* on observe une abondance relative en streptocoques significativement plus élevée que chez des nouveaux nés porteurs (*S. salivarius*, *S. vestibularis*, *S. lactarius, S. oralis* et *S.* mitis notamment) (Khamash *et al.* 2019). Dans cette population on observe également une plus forte présence de pathogènes comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* et *Corynebacterium diphtheriae* dans les semaines qui précèdent la colonisation par *S. aureus*. Chez l'adulte une corrélation négative entre la présence de MRSA et de streptocoques est décrite avec une inhibition spécifique des 22 souches de MRSA de l'étude par une souche de *S. mitis* (Bessesen *et al.* 2015). L'addition de catalase au milieu de culture, qui a la capacité d'inactiver l'activité du peroxyde d'hydrogène ($H_2O_2$), permettait de lever l'inhibition de croissance de *S. aureus* par *S. mitis*. Des observations similaires ont été faites avec *S. pneumoniae*, qui est également une espèce productrice de $H_2O_2$, et dont la présence chez l'enfant au niveau naso-pharyngé était négativement associé au portage de *S. aureus* (Bogaert *et al.* 2004; Regev-Yochay *et al.* 2004, 2006). L'utilisation local de probiotiques commerciaux composés des deux souches de *Streptococcus salivarius 24SMBc* et *Streptococcus oralis 89a* a permis une réduction fortement significative de la colonisation

nasale par *S. aureus* immédiatement après traitement (De Grandi *et al.* 2019). Un mois après traitement ces deux espèces de streptocoques restaient bien implantées dans le microbiote nasal des patients.

Utilisés depuis de nombreuses années comme probiotiques, les lactobacilles sont de grands pourvoyeurs de bactériocines dont l'activité peut concerner un grand nombre de pathogènes : *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli, S. aureus*… (Darbandi *et al.* 2022). La présence de *L. gasseri*, qui est peu fréquente au niveau nasal, s'est révélée être fortement associée à l'absence de colonisation nasale par *S. aureus* (Bessesen *et al.* 2015) mais la cavité nasale ne semble pas être un environnement favorable au développement des lactobacilles. Une utilisation comme probiotique pourrait donc avoir un effet limitée car l'implantation de lactobacilles dans la cavité nasale semble difficile. En revanche, l'utilisation de bactériocines produites par ces bactéries pourrait avoir un intérêt thérapeutique dans le traitement de la colonisation nasale par *S. aureus*. La nisine F (peptide capable de former des pores dans la membrane d'autres bactéries) est une bactériocine produite à partir de souche de *L. lactis* a pu être utilisée avec succès pour traiter une infection péritonéale dans un modèle murin (Brand *et al.* 2010).

Comme rapporté par de nombreuses études, le plus important paramètre prédicteur de l'absence de colonisation nasale par *S. aureus* est la présence d'une autre espèce de l'ordre des *Lactobacillales* : *Dolosigranulum pigrum* seule espèce connue du genre *Dolosigraulum* (Wos-Oxley *et al.* 2010; Camarinha-Silva *et al.* 2012; Yan *et al.* 2013; Liu *et al.* 2015a; Khamash *et al.* 2019). La présence de *D. pigrum* dans la flore nasale est fréquemment associée à un microbiote qualifié de sain et a été décrite comme associée à une diminution du risque d'otite récurrente chez l'enfant (Lappan *et al.* 2018). Décrite pour la première fois en 1993, cette bactérie de culture difficile, possède un petit génome de 1,9Mb dont la stabilité observée sur ces 20 dernières années (Flores Ramos *et al.* 2021) signe une adaptation à l'hôte typique des bactéries symbiotiques (De Boeck *et al.* 2021). *D. pigrum* est retrouvé chez plus 50% des patients dans certaines cohortes (Wos-Oxley *et al.* 2010; Camarinha-Silva *et al.* 2012; De Boeck *et al.* 2021) et la CST7 qui est dominée par le genre *Dolosigranulum* (CST7) représente 10% des communautés bactériennes nasales (Liu *et al.* 2015a). Dans cette étude une concentration de *D. pigrum* supérieure à $1{,}2.10^6$ copies 16S par écouvillon avait une valeur prédictive de 86% pour l'absence de détection de *S. aureus* (Figure 13).

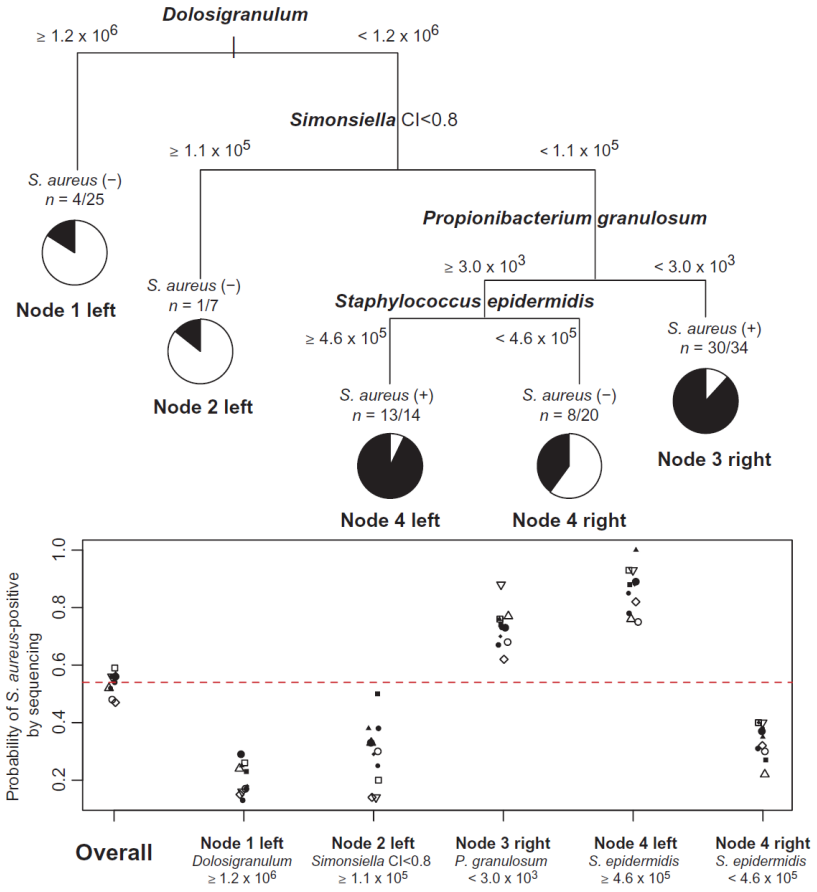



**Figure 13.** Arbre décisionnel prédictif de la colonisation nasale par *S. aureus* d'après Liu *et al.*

Dans les analyses de composition de microbiote cette bactérie est fréquemment associée à la présence des principales espèces de *Corynebacterium* (Wos-Oxley *et al.* 2010; Camarinha-Silva *et al.* 2012; Human Microbiome Project Consortium 2012; Kaspar *et al.* 2016). Une augmentation de la capacité de croissance *in vitro* de *D. pigrum* peut être obtenue grâce à l'utilisation de *C. accolens*, *pseudodiphteriticum* et *propinquum* mais l'effet inverse n'est pas observable (Brugger *et al.* 2020). Une hypothèse serait alors que ces souches de *Corynebactéries* pourraient produire des métabolites nécessaires au métabolisme auxotrophe de *D. pigrum*. Dans cette même étude, les auteurs rapportaient une inhibition sur gélose de la pousse de *S. aureus* quand il était ensemencé de façon adjacente aux 10 souches testées de *D. pigrum* incubées au préalable pendant 48h. La pré-culture de *S. aureus* n'empêchait pas la croissance de *D. pirgum* et l'association de *D. pigrum* et de *C. pseudodiphtheriticum* permettait même une inhibition de *Streptococcus pneumoniae*. La production d'acides lactiques par *D. pigrum* est insuffisante pour expliquer les effets observés et la production de composés, de type bactériocines ou de métabolites toxiques pour *S. aureus*, ne peut être exclue (Brugger *et al.* 2020). Très récemment une autre équipe a également rapporté la capacité inhibitrice d'une souche de *D. pigrum* sur *S. aureus* (De Boeck *et al.* 2021). Les auteurs décrivent également un rôle anti inflammatoire de *D. pigrum* qui est capable de protéger les barrières épithéliales d'une dégradation liée à l'inflammation causée par *S. aureus*. Ainsi sur modèle cellulaire, l'infection par *S. aureus* est responsable de la

production de cytokines pro inflammatoires (IL-8, IL-1β et TNFα) dont l'expression était significativement réduite lorsque les cellules étaient co-infectées avec *D. pigrum*. Sur modèle murin, l'effet disruptif de l'IL-4 sur l'épithélium nasal était aboli en présence de *D. pigrum* (De Boeck *et al.* 2021). Cet effet anti-inflammatoire pourrait avoir un rôle dans la physiopathologie de la rhino sinusite chronique. *D. pigrum* est ainsi détecté au niveau vestibulaire chez 54% des patients souffrant de la maladie et chez 81% des patients sains ($p < 0.0001$) (De Boeck *et al.* 2021). Au niveau du nasopharynx ce nombre était de 78% pour les patients malades et de 42% pour les patients sains ($p < 0.0001$). Enfin, si l'infection de larve de *Galleria mellonella* par *S. aureus* (1 000 UFC dans 10µl de PBS) entrainait la mort de la quasi-totalité des insectes en moins de 20h, l'injection concomitante de *D. pigrum* permettait la survie d'environ 70% des larves sur les 144h de l'étude. L'injection du même volume de PBS ou de *D. pigrum* seul n'entrainait aucune surmortalité dans les bras contrôles (De Boeck *et al.* 2021).

### *Autres interactions décrites*

Une étude a montré qu'en l'absence d'une forte abondance de *D. pigrum*, une forte abondance du genre *Simonsiella* était un facteur prédictif de l'absence de colonisation nasale par *S. aureus* (**Figure 13**)(Liu *et al.* 2015a). Cependant en dehors de cette observation aucune autre information sur une interaction possible entre ces bactéries n'est disponible dans la littérature. Dans la même étude, en l'absence de *D. pigrum* et de *Simonsiella,* une faible abondance de *Cutibacterium granulosum* ou la présence de *C. granulosum* associée à une forte abondance de *S. epidermidis* était prédictive d'une colonisation par *S. aureus*. La corrélation négative entre *Cutibacterium* et *S. aureus* a été observée dans d'autres études basées sur le séquençage 16S (Frank *et al.* 2010) ou la culture (Kaspar *et al.* 2016) et plusieurs mécanismes ont été étudiés pour expliquer cette possible interaction. Ainsi il a été démontré que *C. acnes*, peut inhiber la croissance de souches de SARM USA300 et que cette activité est liée à la capacité de fermentation de *C. acnes*. Lors de la fermentation, ces bactéries sont capables de produire des acides gras à chaine courte (dont l'acide propionique est le principal représentant), capable d'inhiber, *in vitro* et *in vivo*, la croissance de *S. aureus* en réduisant son pH intracellulaire (Shu *et al.* 2013; Wang *et al.* 2014). Cependant, l'interaction entre *Cutibacterium* et *S. aureus* ne se fait pas forcément au dépend de la croissance de ce dernier, une souche non identifiée de *Cutibacterium* capable de produire la coproporphyrine III entrainant *in vitro* l'agrégation et la formation de biofilm par *S. aureus* (Wollenberg *et al.* 2014). Cette activité nécessite un pH acide compris entre 4 et 6 qui peut être compatible avec celui observé au niveau de la peau ou du nez : le pH de la peau peut varier entre 4,5 et 6, celui de la narine est de 5,5 environ (McShane *et al.* 2003) et celui de la cavité postérieure est neutre en raison de la production de mucus cellulaire (Washington *et al.* 2000). Les *Kocuria* ont également été décrites comme négativement associées à la présence de *S. aureus*, une souche nasale

de *K. palustirs* était même capable de produire une bactériocine , appelée la kocurine, active contre des souches de SARM (Martín *et al.* 2013; Bessesen *et al.* 2015). D'autres souches de *Kocuria sp.* isolées chez des végétaux ou lors de prélèvement d'eau de mer étaient capables de produire des composés antibactériens à large spectre présentant une activité inhibitrice significative sur *S. aureus* (Kumar et Jadeja 2018; Barik *et al.* 2021). Enfin, la corrélation négative qui a pu être rapportée dans plusieurs études entre *Finegoldia magna* et *S. aureus* n'a pas encore été étudiée (Wos-Oxley *et al.* 2010; Camarinha-Silva *et al.* 2012).

De façon similaire à la transplantation fécale qui est utilisée pour traiter les colites à *Clostridium difficile* réfractaires aux antibiotiques (Buckley *et al.* 2022), les thérapies de remplacement du microbiote pourraient avoir leur place dans les stratégies de décolonisation nasale. Comme nous l'avons vu, l'administration d'espèces commensales dans la cavité nasale a déjà été expérimentée avec des résultats souvent prometteurs. Cependant, face au manque de connaissances sur le microbiote et sur les mécanismes de la colonisation nasale par *S. aureus*, ces essais empiriques n'ont jamais abouti à un changement majeur des pratiques. L'avènement des techniques de séquençage haut débit a permis de mieux appréhender les interactions possibles entre espèces commensales et a mené à la description de divers antagonismes qui façonnent la flore nasale. Si la découverte de nombreuses bactériocines actives sur *S. aureus* ouvre de nombreuses pistes thérapeutiques, leur activité reste limitée dans le temps. C'est avant tout la constitution d'une flore synthétique composée d'espèces capables de s'implanter et de survivre au niveau de la muqueuse nasale mais aussi capables de travailler de façon synergique à l'éradication de *S. aureus* qui pourrait régler le problème de recolonisation précoce observée avec les stratégies de décolonisation actuelle. En effet, si la mupirocine permet d'éliminer la présence de *S. aureus* au niveau de la muqueuse nasale l'adjonction, après traitement, d'une flore protectrice pourrait permettre d'empêcher la réimplantation de *S. aureus*, que ce soit à partir d'un réservoir intracellulaire, d'un autre site de portage ou de l'environnement extérieur. Enfin si nous nous sommes ici intéressés aux interactions microbiennes, il ne faut pas oublier l'impact majeur qu'ont les bactériophages présents dans tous les environnements contenant des bactéries.

# Contexte scientifique et objectifs de thèse

En raison de sa prévalence et de sa gravité potentielle, la prévention des infections à *S. aureus* est un enjeu majeur de santé publique. *S. aureus* est à la fois une bactérie à fort potentiel pathogène et commensale de la peau et des muqueuses de l'Homme. Il est classiquement admis que le vestibule nasal, représente le principal réservoir de la bactérie. Parmi les populations les plus à risque de développer une infection à *S. aureus* (réanimation, dialyse, chirurgie…), le portage nasal de la bactérie en est un facteur prédisposant majeur. Dans la très grande majorité des cas, ces infections sont dites endogènes, c'est-à-dire que la souche responsable de l'infection ne peut pas être dinstinguée de la souche de colonisation. Les différentes études cliniques menées depuis plusieurs décennies sur la colonisation nasale à *S. aureus* ont permis d'identifier deux grands types de portages : le portage persistant qui concerne environ 20% de la population générale et qui se caractérise par une colonisation au long terme et le portage intermittent dont la prévalence peut varier d'une étude à l'autre en raison du caractère épisodique de la colonisation. Ce sont les porteurs persistants qui vont présenter les charges bactériennes de *S. aureus* les plus importantes ainsi que le plus haut risque d'infection.

Ce lien étroit entre colonisation nasale et infection à conduit à la mise en place, de recommendations hospitalières de dépistage systématique proposées aux populations les plus à risque. Chez ces patients porteurs de *S. aureus* un traitement pour décolonisation peut alors être proposé. Ce traitement repose avant tout sur l'utilisation d'antibiotique avec en premier lieu la mupirocine dont l'utilisation topique a entrainé, dans de nombreuses cohortes de patients, la réduction significative du nombre d'infections. En plus d'exposer le patient au risque d'émergence de bactéries résistantes, cette utilisation d'antibiotique est associée à un haut niveau de recolonisation dans les semaines qui suivent l'arrêt du traitement avec une souche identique à celle présente avant traitement dans la majorité des cas. Cette recolonisation précoce pourrait être due à la recolonisation à partir d'un autre site de portage de *S. aureus* mais pourrait également provenir d'un réservoir intracellulaire de *S. aureus* au niveau de l'épithélium de la muqueuse nasale.

*S. aureus* a longtemps été considéré comme un germe exclusivement extracellulaire mais sa capacité à envahir les cellules phagocytaires non professionnelles est maintenant largement reconnue. A l'abri du système immunitaire et de la majorité des traitements antibiotiques, *S. aureus* est capable de survivre et de se multiplier dans la cellule eucaryote, ce qui pourrait participer à perpétuer la colonisation de la cavité nasale. Si les mécanismes moléculaires à l'origine de l'internalisation ont été largement étudiés, le rôle du réservoir intracellulaire de *S. aureus* est encore incertain. Une meilleure compréhension de la physiopathologie de la colonisation nasale à *S. aureus* pourrait permettre d'optimiser la prise en charge des patients.

Enfin, si la relation entre *S. aureus* et son hôte est importante il ne faut pas sous-estimer le rôle que peut avoir le reste de la flore microbienne. Pour pouvoir s'implanter de façon stable au sein du microbiote nasal, *S. aureus* va devoir sortir vainqueur de la lutte pour l'acquisition des nutriments ou

pour l'adhésion à la muqueuse nasale. De nombreuses bactéries sont également capables de produire des peptides antimicrobiens favorisant leurs survies dans cet environnement très compétitif. Les études sur le sujet se sont multipliées ces dernières années et les nombreuses espèces capables d'empêcher la colonisation par *S. aureus* pourraient être utilisées pour élaborer des flores nasales synthétiques. Leur utilisation thérapeutique pourrait être très utile en complément des stratégies de décolonisation nasale proposées à nos patients.

---

Plus facile à écouvillonner dans le cadre du dépistage du portage nasal de *S. aureus*, le vestibule est largement décrit dans la littérature comme le principal réservoir de la bactérie chez l'Homme. Cependant, tout indique que la cavité nasale postérieure constitue une niche importante pour *S. aureus*. Le **Chapitre 1** de cette thèse avait pour objectif d'étudier les différences qui pouvaient exister entre ces différents sites en ce qui concerne la colonisation par *S. aureus* et notemment la présence d'un réservoir intracellulaire de bactérie (Article 1). Le développement d'un protocole simple permettant la recherche d'un réservoir intracellulaire de *S. aureus* à partir d'un simple écouvillonnage nasal a donc été expérimenté (Article 2).

L'internalisation et la survie de *S. aureus* dans les cellules phagocytaires non professionnelles est un processus complexe faisant intervenir de nombreux facteurs bactériens et cellulaires. Alors que la voie principale d'internalisation passant par l'intégrine FnBP de *S. aureus* et le récepteur cellulaire α5β1 est assez bien décrite, de nombreuses autres voies qualifiées de secondaires restent méconnues. Le **Chapitre 2** de ce travail s'interesse donc aux mécansismes impliqués dans l'internalisation de *S. aureus* médiée par la protéine Eap. Cette protéine secrétée par *S. aureus* a été décrite comme permettant à la bactérie de pénétrer dans la cellule de façon indépendante au récepteur α5β1. Le récepteur d'entrée de la voie Eap est inconnu mais les données issues de la littérature nous ont conduit à nous intéresser au récepteur ICAM-1, glycoprotéine transmembranaire surexprimée au cours des infections virales et des stimuli inflammatoires.

Le **Chapitre 3** avait pour but d'évaluer *in vitro* l'efficacité intracellulaire des traitements utilisés dans le cadre de la décolonisation nasale à *S. aureus* et de travailler dans à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques (Article 3). Certains profils de flores pourraient être protecteurs vis-à-vis de la colonisation par *S. aureus* et différentes espèces bactériennes pourraient être utilisées pour empêcher l'implantation de cette dernière au niveau de la muqueuse nasale. A partir de données de microbiotes et d'une collection de bactéries isolées de prélèvements de la cavité nasale, nous avons évalué dans le **Chapitre 4** l'impact que différentes espèces pouvaient avoir sur les capacités prolifératives et sur le potentiel d'invasion cellulaire d'un panel varié de souches de *S. aureus*.

# Résultats personnels

# Chapitre 1 : Etude de la colonisation nasale et du réservoir intracellulaire de *Staphylococcus aureus*

La colonisation nasale par *S. aureus* est un facteur de risque majeur d'infection par la bactérie. Dans la littérature scientifique, cette colonisation se limite très souvent au *vestibulum nasi*. Plus facilement accessible, le dépistage du portage de *S. aureus* par écouvillonnage se limite souvent au prélèvement du vestibule. Il existe cependant de nombreux arguments en faveur du rôle important que pourrait jouer la cavité nasale postérieure dans cette colonisation.

Le premier objectif de cette partie de mon travail de thèse était de comparer la colonisation nasale antérieure et postérieure en population générale (Article 1). Cette étude a été proposée à tous les patients du service d'oto-rhino-laryngologie du CHU de Saint-Etienne hospitalisés pour prise en charge opératoire d'une pathologie ne touchant pas la cavité nasale. Les Prélèvements étagés ont été réalisés par le chirurgien, sous contrôle endoscopique, et ont été envoyés directement au laboratoire pour prise en charge. Avec 90 patients inclus, dont 31 porteurs de *S. aureus*, il en résulte que le vestibule et la cavité nasale postérieure sont strictement identiques en terme de prévalence de portage et de charges bactériennes de *S. aureus*. De plus l'analyse génomique sur puces à ADN, a permis de mettre en évidence que la même souche de *S. aureus* pouvait être isolée des différents sites de prélèvements. Ces travaux soulignent l'importance d'une vision globale de la colonisation nasale à *S. aureus*, que ce soit pour en expliquer les mécanismes ou proposer des solutions thérapeutiques de décolonisation notamment.

Longtemps considérée comme un microorganisme extracellulaire, la capacité qu'a *S. aureus* à envahir les cellules phagocytaires non-professionnelles est reconnue. Au moment de la création de ce projet, et encore à ce jour, rares sont les études ayant exploré la présence d'un réservoir intracellulaire nasal de *S. aureus*. Le deuxième objectif de ce travail était donc d'évaluer la présence de bactéries internalisées au niveau de cellules récupérées par prélèvement non invasif (Article 1). Il nous a été ainsi possible d'observer un réservoir intracellulaire de *S. aureus* sur des échantillons provenant du vestibule et la cavité nasale postérieure.

Si l'existence d'un réservoir intracellulaire de *S. aureus* peut exister chez certains patients porteurs de la bactérie, son implication dans la persistance de la colonisation nasale est encore à démontrer. Ce travail ouvre la voie à une prise en compte plus systématique du secteur intracellulaire dans les études et la prise en charge de la colonisation nasale à *S. aureus*.

Une meilleure prévention du risque infectieux à *S. aureus* passe par une meilleure compréhension des mécanismes régissant la colonisation nasale et notamment des interactions hôte-pathogène. Dans ce cadre, les études *in vitro* portant sur l'exploration du réservoir intracellulaire de *S. aureus* ont pris une place très importante. Avec les outils de microscopie, l'utilisation lysostaphine constitue la technique de référence pour l'étude du réservoir et de la survie intracellulaire de *S. aureus*. La lysostaphine est une molécule incapable de pénétrer à l'intérieur des cellules eucaryotes, qui a une activité lytique sur tous les *S. aureus* présents dans le milieu extracellulaire. L'élimination de la lysostaphine et la lyse des cellules permettant d'ensemencer et de dénombrer la quantité de *S. aureus* intracellulaire. On parle alors de « lysostaphine protection assay » ou « enzyme protection assay » (EPA).

Une étape clé de l'EPA est l'élimination de la lysostaphine avant la lyse des cellules et libération des bactéries intracellulaires. Pour s'assurer de l'absence d'activité résiduelle de la lysostaphine cette étape consiste en la réalisation de plusieurs lavages successifs au PBS. Cette étape est critique car elle peut entrainer une perte d'information par décollement cellulaire conduisant à une possible sous-estimation de la quantité des bactéries intracellulaires. Le risque de décollement augmente avec la charge bactérienne d'infection, la durée d'infection et la virulence de la souche. L'objectif de ce travail était donc de faire évoluer l'EPA afin de pouvoir se passer de cette étape de lavage (Article 2).

Nous avons démontré que, de par sa nature protéique, la lysostaphine pouvait être inactivée par un traitement court par protéinase K. Cette inactivation enzymatique de la lysostaphine permet de s'affranchir complètement des étapes de lavages cellulaires nécessaires à son élimination. A condition que la dose de lysostaphine soit suffisante pour éliminer toutes les bactéries extracellulaires, cette amélioration du protocole d'EPA pourrait permettre d'élargir l'exploration du réservoir intracellulaire aux cellules en suspension et aux prélèvements cliniques.

# Article 1

## *Staphylococcus aureus* persistent nasal colonization and intracellular reservoir, a prospective cohort study

---

Josselin RIGAILL*[1,2], Marie GAVID[3], Mohamed Fedy MORGENE[2], Yann LELONGE[3], Florence GRATTARD[1,2], Bruno POZZETTO[1,2], Adeline CREPIN[1], Jean Michel PRADES[3], Frédéric LAURENT[4,5], Philippe BERTHELOT[1,6], Elisabeth BOTHELO-NEVERS[1,6], Paul O. VERHOEVEN[1,2]

[1] CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, GIMAP team, University of Lyon, INSERM U1111, CNRS, UMR5308, ENS Lyon, UCBL1, University of St-Etienne, France

[2] Department of Infectious Agents and Hygiene, University Hospital of St-Etienne, St-Etienne, France

[3] Department of Ear Nose Throat Surgery, University Hospital of St-Etienne, St-Etienne, France

[4] CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Staphylococcal Pathogenesis team, University of Lyon, INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS Lyon, UCBL1, University of Lyon, Lyon, France

[5] Department of Bacteriology, Institut des Agents Infectieux, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

[6] Department of Infectious Diseases, University Hospital of St-Etienne, St-Etienne, France

Manuscrit soumis à l'European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases

# *Staphylococcus aureus* persistent nasal colonization and intracellular reservoir: a prospective cohort study

Rigaill J[1,2], Gavid M[3], Morgene MF[2], Lelonge Y[3], Grattard F[1,2], Pozzetto B[1,2], Crépin A[1], Prades JM[3], Laurent F[4,5], Botelho-Nevers E[1,6#], Berthelot P[1,6#] and Verhoeven PO[1,2]*

1) CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, GIMAP team, University of Lyon, INSERM U1111, CNRS, UMR5308, ENS Lyon, UCBL1, University of St-Etienne, France

2) Department of Infectious Agents and Hygiene, University Hospital of St-Etienne, St-Etienne, France

3) Department of Ear Nose Throat Surgery, University Hospital of St-Etienne, St-Etienne, France

4) CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Staphylococcal Pathogenesis team, University of Lyon, INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS Lyon, UCBL1, University of Lyon, Lyon, France

5) Department of Bacteriology, Institut des Agents Infectieux, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

6) Department of Infectious Diseases, University Hospital of St-Etienne, St-Etienne, France

# equally contributed to this work

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

Email: paul.verhoeven@univ-st-etienne.fr

Phone: +33 4 77 82 92 28, Fax: +33 4 77 82 84 60

Address: Laboratory of Infectious Agents and Hygiene, University Hospital of St-Etienne, 42055 St-Etienne Cedex 02, France

**Running title**: Intracellular *S. aureus* in the nasal cavity.

## INTRODUCTION

*Staphylococcus aureus* is both a life-threatening pathogen and a commensal bacterium of the skin and mucosa that colonize about 2 billion people worldwide [1]. Longitudinal studies have identified at least three nasal carriage patterns including persistent, intermittent and non-carriage states representing approximately 20, 30 and 50% of the whole population respectively [1,2]. Persistent nasal carriers of *S. aureus* were distinguished from non-persistent ones (*i.e.* intermittent and non-carriers) by a lower exchange rate of *S. aureus* strains in repeated cultures [3–5], a higher *S. aureus* nasal load [6,7], and a higher risk of infections with their own strain of carriage [8,9].

Although the nasal vestibule (*i.e* the two first centimetres of the nostril) is considered as the main reservoir of *S. aureus* in humans [2], several culture-based studies reported that the nasal cavity is likely to be colonized by *S. aureus*. The prevalence of *S. aureus* colonization of the inner nasal cavity was found to range from 17.4 up to 51.5% [10–14], which is similar to the prevalence observed in the nasal vestibule. Wall teichoic acids (WTA) of *S. aureus* were found to bind a type-I scavenger receptor (SREC-I) expressed by epithelial cells found in the nasal cavity. These findings highlight the capability of this bacterium to efficiently colonize the inner nasal cavity [15]. However, the relationship between the colonization of the nasal vestibule and the inner nasal cavity is still unclear.

*S. aureus* was found able to invade non-professional phagocytes cells (NPPCs) such as keratinocytes, osteoblasts, fibroblasts, epithelial and endothelial cells *in vitro* [16]. In patients with bone and joint infection, intracellular staphylococci were found in fibroblasts [17] and osteocytes [18]. Patient suffering from cystic fibrosis or recurrent tonsillitis were found to exhibit intracellular *S. aureus* among NPPCs [19,20]. In the nasal cavity, an intracellular reservoir was described for the first time in 2006 in a context of chronic rhino-sinusitis (CRS)

[21]. In healthy carriers, intra mucosal *S. aureus* were observed in nasal biopsies [22]. Several studies showed that intracellular *S. aureus* are protected from the action of both antibiotics and immune system [23,24]. However, the intracellular reservoir of *S. aureus* in nasal carriers is poorly investigated.

Therefore, we conducted a prospective study, in a cohort of patients undergoing ear, nose and throat (ENT) surgery, aimed to assess the *S. aureus* colonization profiles in both vestibule and inner nasal cavity and to perform screening of intracellular *S. aureus* using non-invasive nasal swabs.

## MATERIAL & METHODS

**Ethics.** This study was approved by an Institutional Review Board and by the National Security Agency of Medicine and Health Products (NCT02595112). An inform consent form was signed and obtained by all participants.

**Population.** This study took place in the ENT department of the University Hospital of Saint-Etienne, France, between February 2016 and September 2017. Consecutive patients aged of > 18 years and scheduled for an ENT surgery under general anesthesia were screened. Exclusion criteria were: ongoing infection (nasal or systemic); antibiotic treatment in the last month; patients infected with HIV; suffering from chronic furunculosis; ongoing neoplastic disease of nasal cavity, pregnancy, hemostasis disorder preventing surgical treatment.

**Sampling procedures.** Before the surgery, patients were screened for *S. aureus* nasal carriage by using a single swab (eswab, ref 481CE, Copan, Italy) to sample both nasal vestibules termed as “screening sample”. The day of surgery, patients under general anesthesia were swabbed

under endoscopic control: four samples using nylon flocked swabs (eswab, ref 481CE, Copan) were taken in each vestibule and nasal cavity (middle meatus), termed as “per-operatives samples”. Samples were sent to the lab and processed upon receipt.

**Microbiological technics.** All the samples were streaked on CHROMagar Staph aureus plates (ref TA672, CHROMagar, France) using an automatic plater (Easyspiral dilute, Interscience, France). After incubation at 37°C for 4 h in aerobic condition, *S. aureus* bacterial load was quantified with a colony counter (Scan 1200, Interscience). Antimicrobial susceptibility testing was performed for each *S. aureus* strain isolated with Vitek2 (bioMérieux, France). Spa-typing sequences were obtained for every isolated strain [25] and analysed with Applied Maths Bionumerics v7 software (bioMérieux, France). A microarray gene profiling was also performed using the *S. aureus* Genotyping Kit 2.0 (Alere-technologies, USA).

The *S. aureus* load recovered in the nasal vestibule the day before surgery was used to classify patients as either persistent or non-persistent nasal carriers using an algorithm previously described [7]. Briefly, patients were classified as persistent carrier if the *S. aureus* vestibule load was greater or equal to 10^3 CFU/swab on one sampling episode, or greater or equal to 10^2 CFU/swab on both the screening swab (called screening sample) and the nasal vestibule swabs taken during surgery.

**Detection of intracellular *S. aureus*.** For each *S. aureus* carrier (*i.e.*, with at least one sample yielding *S. aureus*) a screening for the intracellular reservoir of *S. aureus* was performed on all surgical samples. For each sample, 500 µl of swab medium was centrifuged at 300 x g for 15 min. Supernatant was discarded to remove *S. aureus* not attached to the cells and cell pellet was resuspended in 200 µl of phosphate buffer saline (PBS). After a second wash, sample was treated with 20 µg of lysostaphin (Ambi products LLC, USA) and 500 µg of gentamycin

(Sigma-Aldrich, France) for 1 h to disrupt and kill remaining extracellular *S. aureus*. Then, lysostaphin and gentamycin were removed with three successive washes with 1 ml of PBS. A sterility control of the extracellular compartment was performed by streaking 50 µl of supernatant on CHROMagar plate. Finally, cell pellets were treated with a lysis solution containing 0.25% trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich) and 0.25% Triton X100 (Sigma-Aldrich) in sterile water. Cell lysates were streaked on CHROMagar and *S. aureus* intracellular load was quantified with an automatic plater and a colony counter as described above. Sensitivity to lysostaphin and gentamycin was tested for all *S. aureus* strains.

**Confocal laser scanning microscopy (CLSM)**. A 200µL-volume of sample was incubated with 10 µg/mL lysostaphin for 1 h to disrupt extracellular *S. aureus*. The nasal epithelial cells were spotted on Cytospin slides (Shandon Single Cytoslides, Thermo Fisher Scientific) at 600 x g for 6 min and fixed in 4% formaldehyde solution and permeabilized in 0.5% Triton X-100. *S. aureus* cells were labelled with a polyclonal anti-*S. aureus* antibody (PA1-7246, Thermo Fisher Scientific) at 20 µg/ml overnight at 4°C) and subsequently with a goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 555-conjugated antibody (A-21429, Thermo Fisher Scientific) at 4 µg/ml for 1 h at room temperature. DiOC6(3) (D273, Thermo Fisher Scientific) and TO-PRO-3 iodide (T3605, Thermo Fisher Scientific) were used for membrane and nuclear staining of HNECs, respectively. Image stacks were acquired by using a FluoView FV1200 confocal laser scanning microscope equipped with a UPlanSApo 60x/1.35 Oil [infinity]/0.17 FN26.5 objective and FV10-ASW4.1 software (Olympus, Tokyo, Japan).

**Statistics.** All statistics tests used for this study were calculated with MedCalc v13.1.2 (Ostend, Belgium) and GraphPad Prism v9 (GraphPad software, USA). Fisher test was used if groups were smaller than 5. T-test was used if groups were greater than 5 and distribution was normal.

Mann-Whitney was used if groups was greater than 5 and distribution was not normal. *P*-values less than 0.05 were considered statistically significant.

## RESULTS

**Study population.** Ninety-five ENT patients were enrolled (**Figure 1**). Five of them were excluded secondarily due to missing samples (n=3) or withdrawal of consent (n=2). Among the 90 patients included in the study, the median (range) age was 60 years [20 - 89 years] and the sex ratio (M/F) was 1.25.

***S. aureus* carriage status**. Thirty-two (35.5%, CI95% [21.9 - 45.2%]) patients harbored *S. aureus* in the vestibule. Among these *S. aureus* nasal carriers, we identified 28 (31.1%, CI95% [18.6 - 40.5%] persistent carriers and 4 (4.4%, CI95% [1.1 - 10.2%]) non persistant carriers by using *S. aureus* loads. No statistically significant difference was observed between these two groups for any of the items listed in **Table 1**.

**Relationship of *S. aureus* colonization in vestibule and the nasal cavity.** In per-operative samples, 31 (34.4%, CI95% [24.6 - 51.2%]) patients were found to carry *S. aureus* in the nasal vestibule or nasal cavity in at least one swab. Unilateral carriage (samples exclusively positive in one side of the nasal cavity) was observed in 7 of 31 carriers (22.6%, CI95% [7.9 - 37.3%]) including one at the vestibule level, two at the nasal cavity level and four at both levels (**Table 2**) which is a known characteristic of nasal carriage [26].

The prevalence of *S. aureus* carriage was 32.2% (29/90) and 33.3% (30/90) in the vestibule and the nasal cavity respectively (**Table 2**). Mean *S. aureus* load was 4.10 $\log_{10}$ CFU/swab (SD 1.19) and 4.25 $\log_{10}$ CFU/swab (SD 1.37) for nasal vestibule and nasal cavity respectively ($p >$

0.05) (**Figure 2a**). *S. aureus* genotyping revealed that all nasal strains isolated in a given individual belong to the same clonal complex and spa-type (**Table 2**), which suggests a very close relationship between the nasal vestibule and the nasal cavity to support *S. aureus* colonization. Antimicrobial susceptibility testing revealed 3.2% (1/31) of methicillin resistance, 77.4% (24/31) of penicillin G resistance and 16.1% (5/31) of erythromycin resistance (**Table 2**). Interestingly, the *S. aureus* load was found to significantly increase with the number of samples found positive for *S. aureus* (test for trend, $R^2 = 0.76$, $p = 0.01$) (**Figure 2b**).

**Intracellular nasal colonization.** Using a lysostaphin and gentamycin protection assay, five patients were found to be carriers of intracellular *S. aureus*, which corresponds to a prevalence of 5.6% (CI95% [0.8 - 25.7]) in the whole cohort and 17.9% (CI95% [3.7 - 32.1]) among the 28 persistent carriers. A patient was considered carrier of intracellular *S. aureus* if at least one of its samples was found positive for intracellular *S. aureus*. No intracellular reservoir of *S. aureus* was detected within the five carriers suffering from CRS.

Patients with intracellular *S. aureus* harbored significantly higher extracellular *S. aureus* load than exclusive extracellular carriers (**Table 3**), which could be explained by multifactorial bacterial and host determinants as well as a higher probability of recovering nasal cell with intracellular *S. aureus* with the increase of nasal load. In the nasal vestibule, mean (SD) of *S. aureus* loads were 5.47 (+/- 1.38) and 3.87 (+/- 1.04) $\log_{10}$ CFU/swab in patients with and without intracellular *S. aureus* respectively (t-test, $p = 0.006$). In the nasal cavity, mean (SD) of *S. aureus* loads were 5.57 (+/- 1.81) and 3.80 (1.17) $\log_{10}$ CFU/swab in patients with and without intracellular *S. aureus* respectively (t-test, $p = 0.008$). Finally, the mean of *S. aureus* intracellular load was 1.60 (+/-0.63) $\log_{10}$ CFU/swab. CLSM observation confirmed the presence of intracellular *S. aureus* in two samples obtained from both nasal vestibule and inner nasal cavity of one patient (**Figure 3**).

176

177 **DISCUSSION**

178

179 In this study, we sought to investigate *S. aureus* colonization in both the nasal vestibule
180 and the cavity because the epithelia of these two sites have very different characteristics [27].
181 To our best knowledge, this is the first study in humans that compared loads and genotypes of
182 *S. aureus* strain isolated from the nasal vestibule and the nasal cavity in ENT patients
183 hospitalized for any reason other than a nasal cavity disorder. We demonstrated that both nasal
184 cavity and nasal vestibule support *S. aureus* colonization in a very similar manner with respect
185 to strain genotype, *S. aureus* load and carriage rate.

186 In our study, the prevalence of *S. aureus* colonization in the nasal vestibule was
187 consistent with that usually observed for inpatients with similar characteristics [1].
188 Interestingly, in our cohort almost all patients colonized with *S. aureus* in the vestibule also
189 carried *S. aureus* in the nasal cavity, which is consistent with the few published data [10–14].
190 We also observed that the *S. aureus* loads in the nasal cavity are as high as those in the nasal
191 vestibule. Together, our findings demonstrate that the nasal cavity is also a major site of *S.*
192 *aureus* carriage in humans and therefore inner nasal swabbing can be used to detect nasal
193 carriage as well as to quantify the *S. aureus* nasal load. In addition, we showed that patients
194 colonized at both the nasal vestibule and nasal cavity carried related *S. aureus* strains that
195 displayed undistinguishable genotypes. Although testing multiple *S. aureus* colonies per
196 specimen may increase the likelihood of recognizing different strains [28], genotyping a single
197 colony per swab was sufficient to identify different strains at different anatomical sites [29,30].
198 Studies of both nasal and extra-nasal sites in humans showed a clinically relevant diversity
199 between the strains isolated from different anatomical sites [29,30]. Health-care workers
200 colonized by *S. aureus* at the nasal vestibule and the pharynx were found to carry different

strains in 20% of cases [29]. Inpatients with nasal and digestive carriage of *S. aureus* also harbored different strains in 25% of cases [30]. Together, these results argue a strong relationship between the nasal vestibule and nasal cavity to foster colonization by a particular *S. aureus* strain while pharynx and gut seem capable of supporting colonization with different genotypes of *S. aureus* than the nasal one.

We believe that these results are clinically relevant for a better understanding of mechanisms promoting *S. aureus* colonization because the nasal vestibule is lined by keratinized stratified squamous epithelium comparable to that of the skin, while the nasal cavity is covered by a pseudostratified ciliated epithelium producing mucus [27]. Baur *et al.* have proposed that the nasal cavity might act as a reservoir for *S. aureus* replication in the nose of humans because *S. aureus* was found able to bind the type-I scavenger receptor expressed by cells of the nasal cavity [15].

In addition, we showed that intracellular *S. aureus* can be found in almost 20% of *S. aureus* carriers in our cohort. A similar prevalence was reported by Hanssen *et al.* who found *S. aureus* in the nasal biopsies of 10 of 18 healthy carriers of the Tromso cohort [22]. The latter study that demonstrated the intramucosal location of *S. aureus* also strongly argued for the presence of intracellular *S. aureus* in the nasal epithelium and especially in the *stratum corneum* [22]. In our cohort, for the first time we also observed intracellular *S. aureus* in samples from the nasal cavity, which demonstrates that the nasal cavity is a niche for intracellular *S. aureus* as well as the nasal vestibule. In fact, data about the intracellular reservoir of *S. aureus* in healthy carriers are scarce. In healthy control volunteers, intracellular *S. aureus* has been previously reported with a prevalence ranging from 0 to 37.5% [31–35]. Among the 44 healthy control volunteers included in those 5 studies, 7 had intracellular *S. aureus* nasal carriage, corresponding to a mean prevalence of 15.9% [IC95% 6.4-32.8%], which is similar to our results.

However, our study had some limitations in detecting intracellular *S. aureus*. First, lysostaphine and gentamycin protection assay can lead to the disruption of intracellular staphylococci when epithelial cell membranes are damaged during the sampling procedure and sample handling. Moreover, a recent study also demonstrated that gentamycin can enter in intact cells [36] suggesting that our approach may have decrease the detection of intracellular *S. aureus*. Conversely, the survival of the few bacteria within nasal mucus aggregates cannot be ruled out. Given that confocal microscopy was performed for a small subset of carriers only, it was not possible to confirm all results obtained by culture. In fact, it was quite challenging to track down intracellular staphylococci by using CLSM because we faced a lot of photobleaching of intracellular staphylococci. In future studies, automated high throughput screening approaches could help to quickly identify infected epithelial cells and then perform high magnification Z-stack acquisition to locate the staphylococci with the highest Z-axis resolution. Finally, for future clinical studies, it would be important to evaluate the performance of the sampling and in particular, to assess the number of cells recovered. Nevertheless, we showed that intracellular staphylococci could be detected from a non-invasive nasal swab, which means that this diagnosis is easily feasible in clinical practice.

To conclude, our study highlights that the nasal cavity is also a major site of *S. aureus* carriage in humans as well as the nasal vestibule to identify nasal carriers, quantify the nasal load, and to detect intracellular *S. aureus*. The nasal cavity should draw our attention for studying host-pathogen interactions involved with the colonization-associated risk of infection.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

**ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Zhiguo He for his help in acquiring confocal microscopy images. Amélie Prier is acknowledged for her technical assistance. The staff of the ENT department and the technicians of the bacteriology lab are thanked for their contribution to the study.

**AUTHORS CONTRIBUTIONS**

POV, FG, FL, PB, and BP design the study. Screening swabs were performed by JR, YL and nurses of ENT department. MG, YL, and JMP enrolled patients and performed sampling procedures during surgery. JR, MFM and AC performed microbiological procedure. JR and AC performed the immunolabeling for confocal microscopy. FG analyzed spa-typing and microarray data. FL supervised the generation of data from the microarray. JR, POV, and EBN analyzed data. JR, POV and EBN wrote the manuscript. POV, FG, EBN, PB, and BP obtained funding for the study and supervised the project.

**FUNDING**

This work was promoted and supported by a grant (no. 1508154 and 1608043) of the University Hospital of St-Etienne.

**REFERENCES**

1. Verhoeven PO, Gagnaire J, Botelho-Nevers E, Grattard F, Carricajo A, Lucht F, et al. Detection and clinical relevance of *Staphylococcus aureus* nasal carriage: an update.

Expert Review of Anti-infective Therapy 2014 1;12:75–89. doi: 10.1586/14787210.2014.859985

2. Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet Infect Dis 2005;5:751–62. doi: 10.1016/S1473-3099(05)70295-4

3. Eriksen NH, Espersen F, Rosdahl VT, Jensen K. Carriage of *Staphylococcus aureus* among 104 healthy persons during a 19-month period. Epidemiol Infect 1995;115:51–60.

4. van Belkum A, Eriksen NHR, Sijmons M, Van Leeuwen W, Van Den Bergh M, Kluytmans J, et al. Coagulase and protein A polymorphisms do not contribute to persistence of nasal colonisation by *Staphylococcus aureus*. J Microbiol Methods 1997;46:222–32. doi: 10.1099/00222615-46-3-222

5. Vandenbergh MFQ, Verbrugh HA. Carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and clinical relevance. J Lab Clin Med 1999;133:525–34. doi: 10.1016/S0022-2143(99)90181-6

6. Nouwen JL, Ott A, Kluytmans-Vandenbergh MFQ, Boelens HAM, Hofman A, van Belkum A, et al. Predicting the *Staphylococcus aureus* Nasal Carrier State: Derivation and Validation of a "Culture Rule." Clin Infect Dis 2004;39:806–11. doi: 10.1086/423376

7. Verhoeven PO, Grattard F, Carricajo A, Lucht F, Cazorla C, Garraud O, et al. An algorithm based on one or two nasal samples is accurate to identify persistent nasal carriers of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect 2012;18:551–7. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03611.x

8. Nouwen JL, Fieren MWJA, Snijders S, Verbrugh HA, van Belkum A. Persistent (not intermittent) nasal carriage of *Staphylococcus aureus* is the determinant of CPD-related infections. Kidney Int 2005;67:1084–92.

9. Verhoeven PO, Gagnaire J, Haddar CH, Grattard F, Thibaudin D, Afiani A, et al. Identifying Hemodialysis Patients With the Highest Risk of *Staphylococcus aureus* Endogenous Infection Through a Simple Nasal Sampling Algorithm. Medicine (Baltimore) 2016;95:e3231. doi: 10.1097/MD.0000000000003231

10. Moss B, Squire JR, Topley E, Johnston CM. Nose and skin carriage of *Staphylococcus aureus* in patients receiving penicillin. Lancet 1948 28;251:320–5.

11. Stratford B, Rubbo SydneyD, Christie R, Dixson S. Treatment of the nasal carrier of *Staphylococcus aureus* with framycetin and others antibacterials. The Lancet 1960 3;276:1225–7. doi: 10.1016/S0140-6736(60)92417-X

12. Jacobs SI, Williamson GM, Willis AT. Nasal abnormality and the carrier rate of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Pathol. 1961;14:519–21.

13. Glück U, Gebbers JO. The nose as bacterial reservoir: important differences between the vestibule and cavity. Laryngoscope 2000;110:426–8. doi: 10.1097/00005537-200003000-00019

14. Ucuncu H, Uslu H, Ozbek A, Aktan B, Sutbeyaz Y, Altas E. Comparison of the bacterial flora of the nasal vestibule and cavity in haemodialysis patients. Acta Otorhinolaryngol Ital 2009;29:251–4.

15. Baur S, Rautenberg M, Faulstich M, Grau T, Severin Y, Unger C, et al. A nasal epithelial receptor for *Staphylococcus aureus* WTA governs adhesion to epithelial cells and modulates nasal colonization. PLoS Pathog. 2014;10:e1004089. doi: 10.1371/journal.ppat.1004089

16. Strobel M, Pförtner H, Tuchscherr L, Völker U, Schmidt F, Kramko N, et al. Post-invasion events after infection with *Staphylococcus aureus* are strongly dependent on both the host cell type and the infecting *S. aureus* strain. Clin. Microbiol. Infect. 2016;22:799–809. doi: 10.1016/j.cmi.2016.06.020

17. Sendi P, Rohrbach M, Graber P, Frei R, Ochsner PE, Zimmerli W. *Staphylococcus aureus* small colony variants in prosthetic joint infection. Clin. Infect. Dis. 2006 15;43:961–7. doi: 10.1086/507633

18. Yang D, Wijenayaka AR, Solomon LB, Pederson SM, Findlay DM, Kidd SP, et al. Novel Insights into *Staphylococcus aureus* Deep Bone Infections: the Involvement of Osteocytes. mBio 2018 5;9:e00415-18. doi: 10.1128/mBio.00415-18

19. Zautner AE, Krause M, Stropahl G, Holtfreter S, Frickmann H, Maletzki C, et al. Intracellular Persisting *Staphylococcus aureus* Is the Major Pathogen in Recurrent Tonsillitis. PLoS One 2010;5. doi: 10.1371/journal.pone.0009452

20. Hirschhausen N, Block D, Bianconi I, Bragonzi A, Birtel J, Lee JC, et al. Extended *Staphylococcus aureus* persistence in cystic fibrosis is associated with bacterial adaptation. International Journal of Medical Microbiology 2013;303:685–92. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.09.012

21. Plouin-Gaudon I, Clement S, Huggler E, Chaponnier C, François P, Lew D, et al. Intracellular residency is frequently associated with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis. Rhinology 2006;44:249–54.

22. Hanssen A-M, Kindlund B, Stenklev NC, Furberg A-S, Fismen S, Olsen RS, et al. Localization of *Staphylococcus aureus* in tissue from the nasal vestibule in healthy carriers. BMC Microbiol. 2017 5;17:89. doi: 10.1186/s12866-017-0997-3

23. Horn J, Stelzner K, Rudel T, Fraunholz M. Inside job: *Staphylococcus aureus* host-pathogen interactions. Int. J. Med. Microbiol. 2017 26;doi: 10.1016/j.ijmm.2017.11.009

24. Rigaill J, Morgene MF, Gavid M, Lelonge Y, He Z, Carricajo A, et al. Intracellular activity of antimicrobial compounds used for *Staphylococcus aureus* nasal decolonization. J. Antimicrob. Chemother. 2018 1;73:3044–8. doi: 10.1093/jac/dky318

25. Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, et al. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. J. Clin. Microbiol. 1999;37:3556–63.
26. Kildow BJ, Conradie JP, Robson RL. Nostrils of healthy volunteers are independent with regard to *Staphylococcus aureus* carriage. J. Clin. Microbiol. 2012;50:3744–6. doi: 10.1128/JCM.01488-12
27. Michaels L. Normal Histology and Inflammatory Conditions of the Nose and Paranasal Sinuses [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 1990. doi: https://link.springer.com/book/10.1007/978-94-009-0727-0doi: 10.1007/978-94-009-0727-0_6
28. Cespedes C, Saïd-Salim B, Miller M, Lo S, Kreiswirth BN, Gordon RJ, et al. The Clonality of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage. J Infect Dis 2005;191:444–52. doi: 10.1086/427240
29. Verhoeven PO, Haddar CH, Grattard F, Carricajo A, Botelho-Nevers E, Pozzetto B, et al. Does pharyngeal sampling improve the detection of nasopharyngeal persistent carriers of *Staphylococcus aureus*? J. Infect. 2015;70:549–52. doi: 10.1016/j.jinf.2015.01.003
30. Gagnaire J, Botelho-Nevers E, Martin-Simoes P, Morel J, Zéni F, Maillard N, et al. Interplay of nasal and rectal carriage of *Staphylococcus aureus* in intensive care unit patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2019;38:1811–9. doi: 10.1007/s10096-019-03613-z
31. Corriveau M-N, Zhang N, Holtappels G, Van Roy N, Bachert C. Detection of *Staphylococcus aureus* in nasal tissue with peptide nucleic acid-fluorescence in situ hybridization. Am J Rhinol Allergy 2009;23:461–5. doi: 10.2500/ajra.2009.23.3367

32. Sachse F, Becker K, von Eiff C, Metze D, Rudack C. *Staphylococcus aureus* invades the epithelium in nasal polyposis and induces IL-6 in nasal epithelial cells in vitro. Allergy 2010;65:1430–7. doi: 10.1111/j.1398-9995.2010.02381.x

33. Tan NC-W, Foreman A, Jardeleza C, Douglas R, Tran H, Wormald PJ. The multiplicity of *Staphylococcus aureus* in chronic rhinosinusitis: Correlating surface biofilm and intracellular residence. The Laryngoscope 2012;122:1655–60. doi: 10.1002/lary.23317

34. Kim R, Freeman J, Waldvogel-Thurlow S, Roberts S, Douglas R. The characteristics of intramucosal bacteria in chronic rhinosinusitis: a prospective cross-sectional analysis. International Forum of Allergy & Rhinology 2013;3:349–54. doi: 10.1002/alr.21117

35. Ou J, Drilling A, Singhal D, Tan NC-W, Wallis-Hill D, Vreugde S, et al. Association of intracellular *Staphylococcus aureus* with prognosis in chronic rhinosinusitis. Int Forum Allergy Rhinol 2016;6:792–9. doi: 10.1002/alr.21758

36. Kim J-H, Chaurasia AK, Batool N, Ko KS, Kim KK. Alternative Enzyme Protection Assay To Overcome the Drawbacks of the Gentamicin Protection Assay for Measuring Entry and Intracellular Survival of Staphylococci. Infect Immun 2019;87. doi: 10.1128/IAI.00119-19

389 **TABLES**

390

391 **TABLE 1.** Patient characteristics according to the nasal *S. aureus* carriage status.

| | **ENT patients included in data analysis N=90*** | |
|---|---|---|
| | **Persistent carriers** n=28 (31.1%) | **Non-persistent carriers** n=62 (68.9%) |
| Age (years) | | |
| Mean (SD) | 53.7 (15.4) | 59.4 (15.0) |
| Median [range] | 53.5 [20-75] | 61.0 [21-89] |
| Sex ration (M/F) | 2.1 | 1.0 |
| Carriage promoting factors, n (%) | | |
| Overweight (BMI > 25) | 14 (50) | 35 (56.5) |
| Smokers | 10 (35.7) | 16 (25.8) |
| estrogen-progestin contraceptives | 1 (3.6) | 3 (4.8) |
| Immunodeficiency | 4 (14.3) | 10 (16.1) |
| Intranasal corticosteroids | 3 (75) | 5 (50) |
| Local corticosteroids | 0 (0) | 3 (30) |
| General corticosteroids | 0 (0) | 1 (10) |
| Other immunosuppressive medication | 1 (25) | 1 (10) |
| Congenital immunodeficiency | 0 (0) | 0 (0) |
| Chronic rhino sinusitis | 5 (17.9) | 4 (6.5) |
| Surgical localization, n (%) | | |
| Nasal cavity | 6 (21.4) | 8 (12.9) |
| Oral cavity | 3 (10.7) | 6 (9.7) |
| Upper aerodigestive tract | 8 (28.6) | 26 (41.9) |
| Thyroid and parathyroid glands | 8 (28.6) | 17 (27.4) |
| Cervical area | 2 (7.1) | 4 (6.5) |
| Others | 1 (3.6) | 1 (1.6) |
| Perioperative antimicrobial prophylaxis, n (%) | 5 (17.9) | 11 (17.7) |
| Hospitalization in the past decade, n (%) | 14 (50) | 36 (58.1) |
| Others, n (%) | | |
| High blood pressure | 10 (35.7) | 22 (35.5) |
| Gastroesophageal reflux disease | 2 (7.1) | 6 (9.7) |
| Chronic obstructive pulmonary disease | 0 (0) | 3 (4.8) |
| Diabetes | 1 (3.6) | 3 (4.8) |
| Dyslipidemia | 2 (7.1) | 9 (14.5) |
| Chronic alcohol abuse | 3 (10.7) | 4 (6.5) |

392 * No statistically significant difference was observed between the 2 groups for any item. Fisher

393 test was used if groups were smaller than 5. T-test was used if groups were greater than 5 and

394 distribution was normal. Mann-Whitney was used if groups was greater than 5 and distribution

395 was not normal.

**TABLE 2.** Carriage state, anatomic localization and strains characteristics in patients colonized by *S. aureus* during surgery.

| Patient ID | Persistent carrier | Intracellular carrier | Right side | | Left side | | Clonal complex* | Spa type* | Spa repeat succession* | AST* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Nasal vestibule | Nasal cavity | Nasal vestibule | Nasal cavity | | | | |
| 55 | No | No | - | + | + | + | CC101 | t056 | 04-20-12-17-20-17-12-17-17 | PG |
| 56 | **Yes** | No | + | + | + | + | CC59 | t3485 | 04-20-17-20-17-20-17-25-34 | PG |
| 46 | **Yes** | No | + | + | - | - | CC5 | t306 | 26-23-17-34-17-20-17-12-17-17-16 | None |
| 74 | **Yes** | No | - | + | + | + | CC5 | t002 | 26-23-17-34-17-20-17-12-17-16 | PG OX |
| 24 | **Yes** | No | + | + | + | + | CC5 | t548 | 26-23-17-34-17-20-17-12-16 | None |
| 50 | **Yes** | No | - | - | + | + | CC5 | t688 | 26-23-17-34-17-16 | PG |
| 02 | **Yes** | No | + | + | - | - | CC97 | t267 | 07-23-12-21-17-34-34-34-33-34 | PG |
| 87 | **Yes** | No | + | + | + | + | CC15 | t084 | 07-23-12-34-34-12-12-23-02-12-23 | PG |
| 06 | **Yes** | **Yes** | **§** | **§** | + | + | CC45 | t230 | 08-16-02-16-34 | None |
| 37 | **Yes** | No | + | + | + | + | CC45 | t3537 | 08-16-02-16-02-16-34 | PG |
| 84 | **Yes** | No | + | - | + | + | CC45 | t026 | 08-16-34 | PG |
| 28 | **Yes** | No | + | + | - | - | CC45 | t282 | 09-02-16-34 | PG |
| 61 | **Yes** | No | + | + | + | + | CC45 | t1549 | 08-16-02-16-34-34-16-34-16-34 | PG |
| 01 | **Yes** | No | + | + | + | + | CC45 | t14330 | 08-12-16-34-13-13-17-34-16-34 | PG |
| 13 | **Yes** | **Yes** | **§** | + | **§** | + | CC9 | t209 | 07-16-12-23-34 | PG ER |
| 20 | No | No | - | - | - | + | CC398 | t571 | 08-16-02-25-02-25-34-25 | ER |
| 67 | No | No | - | + | - | - | CC398 | t571 | 08-16-02-25-02-25-34-25 | ER |
| 81 | **Yes** | No | + | + | + | + | CC398 | t571 | 08-16-02-25-02-25-34-25 | ER |
| 23 | **Yes** | No | + | + | + | + | CC398 | Unknown | 08-16-02-25-02-34-34-25 | ER |
| 40 | **Yes** | No | + | + | + | - | CC398 | t034 | 08-16-02-25-02-25-34-24-25 | None |
| 15 | **Yes** | **Yes** | **§** | **§** | **§** | **§** | CC30 | t012 | 15-12-16-02-16-02-25-17-24-24 | PG |
| 16 | **Yes** | No | - | - | + | - | CC30 | t012 | 15-12-16-02-16-02-25-17-24-24 | PG |
| 49 | **Yes** | **Yes** | + | + | **§** | + | CC30 | t012 | 15-12-16-02-16-02-25-17-24-24 | PG |
| 90 | **Yes** | No | + | - | + | + | CC30 | t012 | 15-12-16-02-16-02-25-17-24-24 | PG |
| 72 | **Yes** | No | + | + | + | + | CC30 | t012 | 15-12-16-02-16-02-25-17-24-24 | PG |
| 35 | **Yes** | **Yes** | + | + | + | **§** | CC30 | t021 | 15-12-16-02-16-02-25-17-24 | PG |
| 76 | **Yes** | No | + | + | + | - | CC30 | t869 | 15-12-16-02-16-02-25-02-25-17-24-24 | PG |
| 09 | **Yes** | No | + | + | + | + | CC30 | t342 | 15-12-16-02-16-02-25-17 | PG |
| 78 | **Yes** | No | - | + | + | + | CC30 | t1827 | 15-12-17-24-24 | PG |
| 31 | **Yes** | No | + | + | + | + | CC30 | t817 | 04-54-31-12-16-34-16-12-25-22-22-34 | PG |
| 73 | **Yes** | No | - | + | + | + | CC30 | t410 | 04-44-33-31-12-16-34-16-12-22-22-34 | PG |

AST: antimicrobial susceptibility testing; * results showed the genotype and phenotype of one *S. aureus* strain but all strains recovered from a single patient yielded same results; - Negative sample; + Positive sample; § Intracellular reservoir; PG: Penicillin G resistance; OX: Oxacillin resistance; ER: erythromycin resistance.

399 **TABLE 3.** *S. aureus* extracellular bacterial load repartition according to the presence of an

400 intracellular reservoir of bacteria.

| ***S. aureus* extracellular load ($log_{10}$ CFU/mL of swab)** | **Carriage prevalence % (n)** | | **P value ($\chi^2$ trend)** |
|---|---|---|---|
| | **with intracellular *S. aureus*** | **without intracellular *S. aureus*** | |
| Nasal vestibule swabs | | | |
| <3 | 0.0 (0) | 26.9 (7) | |
| ≥3 and <4 | 0.0 (0) | 23.1 (6) | |
| ≥4 and <5 | 40.0 (2) | 19.2 (5) | **0.047** |
| ≥5 and <6 | 40.0 (2) | 26.9 (7) | |
| ≥6 | 20.0 (1) | 3.8 (1) | |
| Nasal cavity swabs | | | |
| <3 | 0.0 (0) | 38.5 (10) | |
| ≥3 and <4 | 20.0 (1) | 15.4 (4) | |
| ≥4 and <5 | 20.0 (1) | 36.4 (9) | **0.004** |
| ≥5 and <6 | 0.0 (0) | 11.5 (3) | |
| ≥6 | 60.0 (3) | 0.0 (0) | |

401

## FIGURES

## FIGURE 1

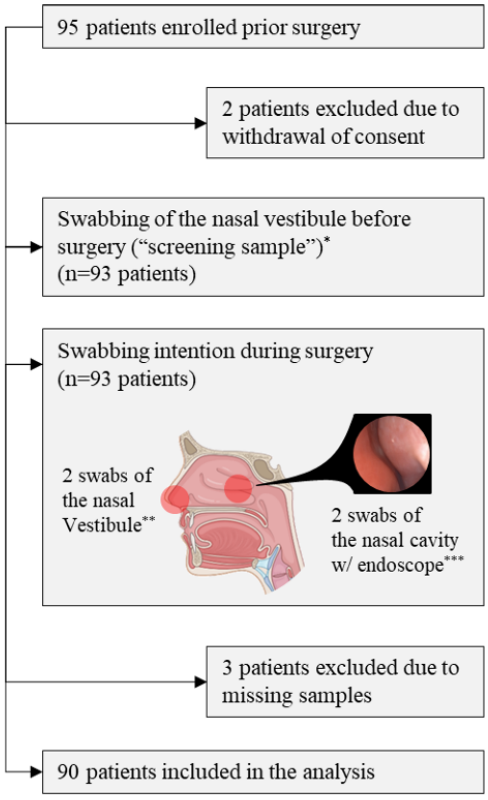



**Figure 1.** Flowchart and sampling procedures of the study.

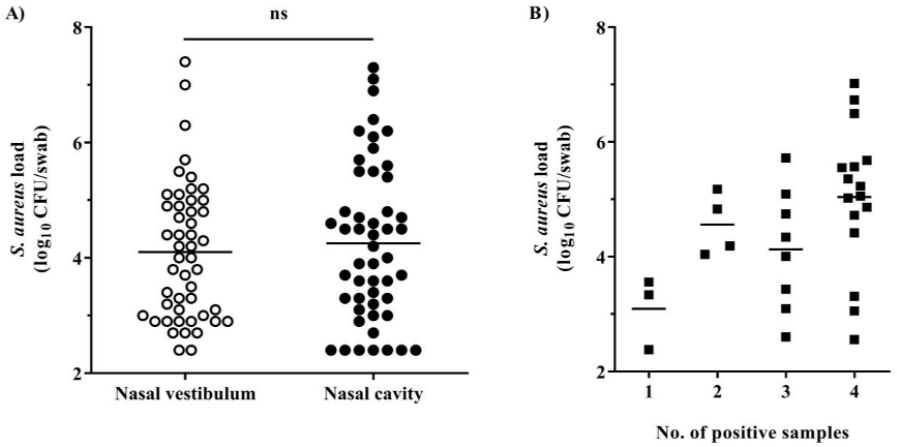
* For screening sample, a single swab was used for sampling the nasal vestibules of both sides.

** During surgery, nasal vestibules were sampled with a swab for each side.

*** Nasal cavity samples were taken with endoscopy control using a swab for each side.

413 **FIGURE 2**

414



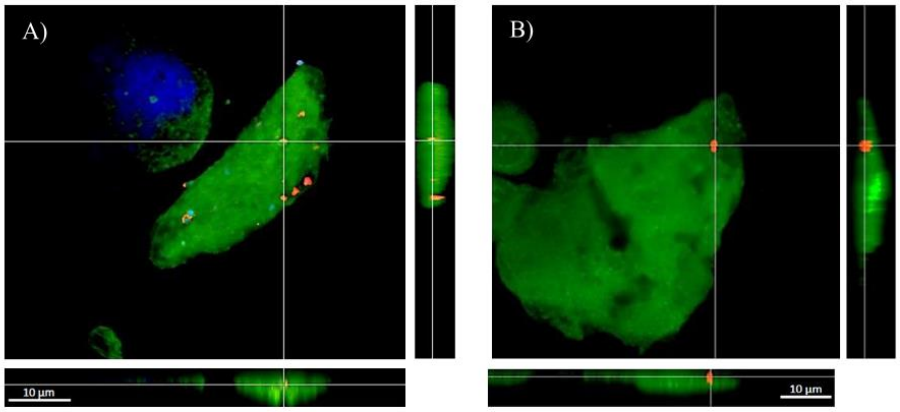

415

416 **Figure 2.** *S. aureus* extracellular load repartition within positives samples. Comparison of *S.*

417 *aureus* loads of nasal vestibule and cavity (A), distribution of bacterial loads according to the

418 number of positives nasal samples (B).

419 **FIGURE 3**




420

421 **Figure 3.** Intracellular *S. aureus* in human nasal epithelial cells recovered from nasal cavity

422 (A) and the nasal vestibule (B).

# Article 2

Improved enzyme protection assay to study *Staphylococcus aureus* internalization and intracellular efficacity of antimicrobial compounds

---

Josselin RIGAILL*[1,2], Estelle AUDOUX*[1], Killian RODRIGUEZ[1], Aurélien PEYRON[1], Philippe BERTHELOT[1,3], Jérôme JOSSE[4,5], Frédéric LAURENT[4,5], Robin CAIRE[1], Paul O. VERHOEVEN[1,2]

[1] CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, GIMAP team, University of Lyon, INSERM U1111, CNRS, UMR5308, ENS Lyon, UCBL1, University of St-Etienne, France

[2] Department of Infectious Agents and Hygiene, University Hospital of St-Etienne, St-Etienne, France

[3] Department of Infectious Diseases, University Hospital of St-Etienne, St-Etienne, France

[4] CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Staphylococcal Pathogenesis team, University of Lyon, INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS Lyon, UCBL1, University of Lyon, Lyon, France

[5] Department of Bacteriology, Institut des Agents Infectieux, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

* These authors contributed equally

Publié le 8 September 2021

Journal of Visualized Experiments: JoVE (175), e62903, doi: 10.3791/62903 (2021)

jove

# Improved Enzyme Protection Assay to Study *Staphylococcus aureus* Internalization and Intracellular Efficacy of Antimicrobial Compounds

**Josselin Rigaill**[*,1,2], **Estelle Audoux**[*,1], **Killian Rodriguez**[1], **Aurélien Peyron**[1], **Philippe Berthelot**[1,3], **Jérôme Josse**[4,5], **Frédéric Laurent**[4,5], **Robin Caire**[1], **Paul O. Verhoeven**[1,2]

[1] CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, GIMAP team, University of Lyon, INSERM U1111, CNRS, UMR5308, ENS Lyon, UCBL1, University of St-Etienne, France [2] Department of Infectious Agents and Hygiene, University Hospital of St-Etienne, St-Etienne, France [3] Department of Infectious Diseases, University Hospital of St-Etienne, St-Etienne, France [4] CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Staphylococcal Pathogenesis team, University of Lyon, INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS Lyon, UCBL1, University of Lyon, Lyon, France [5] Department of Bacteriology, Institute for Infectious Agents, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

[*] These authors contributed equally

**Corresponding Author**

**Paul O. Verhoeven**
paul.verhoeven@univ-st-etienne.fr

**Citation**

Rigaill, J., Audoux, E., Rodriguez, K., Peyron, A., Berthelot, P., Josse, J., Laurent, F., Caire, R., Verhoeven, P.O. Improved Enzyme Protection Assay to Study *Staphylococcus aureus* Internalization and Intracellular Efficacy of Antimicrobial Compounds. *J. Vis. Exp.* (175), e62903, doi:10.3791/62903 (2021).

**Date Published**

September 8, 2021

**DOI**

10.3791/62903

**URL**

jove.com/video/62903

## Abstract

*Staphylococcus aureus* expresses virulence factors to trigger its internalization into eukaryote cells and to survive inside different subcellular compartments. This paper describes an enzyme protection assay to study the extent of *S. aureus* internalization and its intracellular survival in adherent non-professional phagocytic cells (NPPCs) as well as the intracellular efficacy of antimicrobial compounds. NPPCs are grown in a multi-well plate until they reach 100% confluence. *S. aureus* cultures are grown overnight in cell culture medium. The bacterial suspension is diluted according to the number of cells per well to inoculate the cells at a controlled multiplicity of infection. Inoculated cells are incubated for 2 h to allow the bacteria to be internalized by the NPPCs, following which lysostaphin is added to the culture medium to selectively kill extracellular bacteria. Lysostaphin is present in the culture medium for the rest of the experiment.

At this point, the infected cells could be incubated with antimicrobial compounds to assess their intracellular activities against *S. aureus*. Next, the cells are washed three times to remove the drugs, and intracellular *S. aureus* load is then quantified by culturing on agar plates. Alternatively, for studying staphylococcal virulence factors involved in intracellular survival and cell toxicity, lysostaphin could be inactivated with proteinase K to eliminate the need for washing steps. This tip improves the reliability of the intracellular bacterial load quantification, especially if cells tend to detach from the culture plate when they become heavily infected because of the multiplication of

Copyright © 2021 JoVE Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License

intracellular *S. aureus*. These protocols can be used with virtually all types of adherent NPPCs and with 3D cell culture models such as organoids.

## Introduction

*Staphylococcus aureus* is both a life-threatening pathogen and a commensal bacterium of the skin and the mucosa that colonizes two billion individuals around the world[1]. In humans, nasal carriers of *S. aureus* have an increased risk of infection with their own strain of carriage; however, the multifactorial determinants of *S. aureus* mucosal carriage are still unclear[1,2]. In addition to acute infections, patients can also develop chronic *S. aureus* infections that are often challenging to cure[3]. A better understanding of host-pathogen interactions during colonization and infection is crucial for developing novel therapeutic strategies and improving patient management.

*In vitro*, *S. aureus* can trigger its internalization into host cells expressing the α5β1 integrin[4]. The tripartite interaction between the staphylococcal fibronectin-binding proteins anchored to the cell wall of *S. aureus*, the fibronectin, and the β1 integrin expressed at the host cell surface is well known as the main pathway of *S. aureus* internalization in NPPCs such as keratinocytes, osteoblasts, fibroblasts, and epithelial and endothelial cells[4]. Recent studies show that *S. aureus* can be found inside human cells during nasal colonization[5,6] and infection[7]. However, the role of the intracellular reservoir in the pathogenesis of *S. aureus* infection remains unclear. The host cells could act as a shelter for *S. aureus,* which is protected from both the immune system[8] and most antimicrobial compounds[6,9].

The lysostaphin protection assay, described by Proctor[10] earlier in the 1980s, enables the study of bacterial and host factors involved in the internalization of *S. aureus* isolates. Lysostaphin is a bacteriocin produced by *Staphylococcus simulans*, which exhibits potent activity against almost all *S. aureus* isolates, including antibiotic-resistant strains[11]. Lysostaphin has been used to destroy only extracellular *S. aureus* to enable the counting of only viable intracellular bacteria[12]. This technique has been widely used and has contributed to the discovery of several virulence factors of *S. aureus*. Gentamycin, alone and combined with lysostaphin, is also widely used to study intracellular bacteria.

However, a recent study showed that gentamycin enters eukaryotic cells and reaches internalized bacteria in a time- and concentration-dependent manner[13]. This study also demonstrated that lysostaphin does not enter eukaryotic cells, confirming that a lysostaphin-based enzyme protection assay (EPA) is the most accurate assay for quantifying intracellular *S. aureus* load by culture[13]. Regardless of which compound is used to destroy extracellular bacteria (e.g., lysostaphin or gentamycin), it should be removed by washing the cells before plating intracellular *S. aureus* on agar plates. Successive washes may result in the detachment of cells, especially poorly adherent cells (e.g., heavily infected cells), which would lead to an underestimation of the intracellular *S. aureus* load. This paper describes in detail how EPA can be used to quantify the intracellular *S. aureus* load and to measure the intracellular efficacy of antimicrobials compounds using an *in vitro* model. Of note, a simple method has been proposed to improve the reliability of intracellular load quantification by avoiding intensive washes.

Copyright © 2021 JoVE Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License

## Protocol

### 1. Culture of human epithelial cells

1. Prepare complete culture medium with Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) high glucose with phenol red, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) without antibiotics.
2. Grow A549 epithelial cells in complete culture medium at 36 ± 1 °C in 5% $CO_2$. Ensure the use of an appropriately sized culture vessel to have enough cells for subsequent steps (see step 1.10).

   NOTE: One 75 $cm^2$ (T-75) flask is sufficient to seed two 24-well plates and subculture the cells.
3. **Two days before infection**, prepare a single 24-well plate.
4. Remove and discard the spent culture medium from the T-75 flask and wash the cells once with 10 mL of Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS).
5. Add 5 mL of trypsin-EDTA and incubate the cells for 5 min at 36 ± 1 °C in 5% $CO_2$.
6. Add 5 mL of complete culture medium and transfer the cells into a tube.
7. Centrifuge the cells for 5 min at 300 × *g*.
8. Discard the supernatant and resuspend the cells in 10 mL of fresh complete culture medium.
9. Count the cells with an automatic cell counter (or a counting chamber).
10. Dilute the cells in complete culture medium to prepare 30 mL of cell suspension at a concentration of 2.0 × $10^5$ cells/mL.
11. Add 1 mL of the cell suspension to each well of a 24-well plate, which corresponds to a cell density of approximately 1.0 × $10^5$ cell/$cm^2$ for a well area of 2 $cm^2$.
12. Incubate the cells for 48 h at 36 ± 1 °C in 5% $CO_2$ until they reach 100% confluence.

    NOTE: In addition to the conditions to be tested, three wells should be reserved for cell counting on the day of infection (see step 3.1.4). According to the number of conditions to be tested, Up to two 24-well plates can be prepared simultaneously. Volumes indicated in the protocol should be increased accordingly.

### 2. Culture of *S. aureus* strains

1. **Two days before infection**, prepare complete infection medium with DMEM high glucose without phenol red, supplemented with 10% FBS without antibiotics.
2. Thaw *S. aureus* strains to be tested on agar plates.
3. Incubate the agar plates for 18-24 h at 36 ± 1 °C.
4. **The day before inoculation**, inoculate one colony of the *S. aureus* strain to be tested in 10 mL of complete infection medium.
5. Incubate the bacteria for 18-24 h at 36 ± 1 °C with shaking at 160 rpm. Use 50 mL tubes held at 45° to avoid the bacteria settling.

   NOTE: Before starting with a new strain, it is recommended to verify its lysostaphin susceptibility in the same conditions of culture that will be used for further experiments (media, bacterial loads, and lysostaphin concentration and incubation time). It is also important to determine the bacterial load corresponding to an $OD_{600nm}$ of 0.5 because it could vary slightly from one

Copyright © 2021 JoVE Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License

strain to another. Culture conditions of bacterial strains could be adapted according to the experimental aim.

### 3. Infection assay with *S. aureus*

1. Determination of cell density and viability
    1. Remove and discard the spent culture medium from the three wells dedicated for counting A549 cells.
    2. Add 1 mL of complete infection medium containing 5 µg/mL of Hoechst 33342 and 1 µg/mL of propidium iodide.
    NOTE: Hoechst 33342 is a known mutagen and should be handled with care. Propidium iodide, a potential mutagen, must be handled with care and disposed of safely according to applicable regulations.
    3. Incubate the cells for 30 min at 36 ± 1 °C in 5% $CO_2$.
    4. Count the cell number and calculate the cell viability using a wield-field fluorescence microscope.
    NOTE: If a fluorescence microscope is not available, the cell density and viability can be calculated with trypan blue staining by using a cell counting chamber.
2. Preparation of the bacterial suspension
    1. Dispense 25 mL of complete infection medium in a tube and pre-warm at 36 ± 1 °C.
    2. Adjust the *S. aureus* suspension to an$OD_{600nm}$ of 0.5 in complete infection medium using a cell density meter.
    3. Prepare 20 mL of bacterial suspension for cell inoculation by diluting the 0.5 $OD_{600nm}$ in complete infection medium to achieve a multiplicity of infection (MOI) of 1 according to the number of cells per well.
    NOTE: The MOI corresponds to the number of bacteria added per cell in each well. For example, to achieve an MOI of 1 with 1.0 × $10^6$ cells per well, prepare a bacterial suspension at 2.0 × $10^6$ CFU/mL so that $10^6$ CFU can be added in a volume of 500 µL (see step 3.3.3). The MOI can be adjusted according to the cell types and bacterial strains to be tested.
    4. Use an automatic spiral plater to determine the *S. aureus* load of the diluted bacterial suspension to be used for the cell inoculation step.
    5. Incubate the agar plates for 18-24 h at 36 ± 1 °C.
    6. The next day, count the number of colonies with a colony counter to calculate the accurate MOI for each strain tested.
    NOTE: If no automatic spiral plater is available, the bacterial load could be determined by serial dilution on an agar plate. See the bacteriological analytical manual for details[14].
3. Cell inoculation
    1. Observe every well of the 24-well plate by low magnification microscopy to ensure that the cells are healthy and growing as expected.
    2. Remove and discard the spent cell culture medium from the 24-well plate.
    3. Add 500 µL of the bacterial suspension for inoculation to each well with 100% confluent cells.
    4. Incubate the cells for 2 h at 36 ± 1 °C and 5% $CO_2$.
    NOTE: it is recommended to use three wells of the plate for each condition to be tested (triplicate) and to perform at least three independent experiments. The delay of incubation can be adapted according to the experimental aim.

Copyright © 2021 JoVE Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License

4. Quantification of intracellular bacteria with improved enzyme protection assay (iEPA)
    1. Prepare 7 mL of 4x lysis buffer with 3.5 mL of 2% Triton X-100 in sterile water and 3.5 mL of trypsin-EDTA.
    2. Prepare a lysostaphin stock solution at 10 mg/mL in acetate buffer and aliquot 25 µL into cryovials. Store at -80 °C for up to 6 months.
    3. Prepare 250 µL of a fresh lysostaphin working solution at 1 mg/mL by mixing 25 µL of the lysostaphin stock solution (10 mg/mL) and 225 µL of 0.1 M Tris-HCl. Store at 4 °C for up to 48 h.
    4. Prepare 6.25 mL of complete infection medium supplemented with lysostaphin by adding 6 mL of complete infection medium to 250 µL of the lysostaphin working solution.
    5. Add 250 µL of complete infection medium supplemented with lysostaphin into each well and gently agitate the plate by swiveling the plate by hand.
    6. Incubate the cells for 1 h at 36 ± 1 °C in 5% $CO_2$ to let the lysostaphin kill the extracellular bacteria.
    7. At the end of the incubation time, add 10 µL of proteinase K at 20 mg/mL into each well to inactivate the lysostaphin.
    8. Incubate the cells for 2 min at room temperature.
    9. Add 250 µL of 4x lysis buffer to lyse the cells by osmotic shock.
    10. Incubate the cells for 10 min at 36 ± 1 °C.
    11. Mix thoroughly by pipetting up and down ten times all over the bottom of the well to ensure that the cells are fully lysed and homogenized.
    12. Use an automatic spiral plater to determine the *S. aureus* load of each well.
    13. Incubate the agar plates for 18-24 h at 36 ± 1 °C.
    14. The next day, count the number of colonies with a colony counter to calculate the intracellular *S. aureus* load of each well.
5. Measurement of intracellular efficacy of antimicrobial compounds with enzyme protection assay (EPA)
    1. Prepare 25 mL of 1x lysis buffer with 3.125 mL of 2% Triton X-100 in sterile water, 6.25 mL of trypsin-EDTA, and 15.625 mL of sterile water.
    2. Prepare 250 µL of a fresh lysostaphin working solution at 1 mg/mL by mixing 25 µL of a lysostaphin stock solution (10 mg/mL) and 225 µL of 0.1 M Tris-HCl.
    3. Prepare 25 mL of complete infection medium supplemented with lysostaphin by adding 24.75 mL of complete infection medium to 250 µL of the lysostaphin working solution.
    4. For each antimicrobial compound to be tested, prepare 3.1 mL of complete infection medium supplemented with lysostaphin and the antimicrobial compound at the concentration to be studied.
    5. Remove and discard the spent cell culture medium from the 24-well plate.
    6. Add 1 mL of complete infection medium supplemented with lysostaphin.

Copyright © 2021 JoVE Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License

7. Incubate the cells for 1 h at 36 ± 1 °C in 5% $CO_2$ to let the lysostaphin kill the extracellular bacteria.
8. Remove and discard the medium supplemented with lysostaphin from the 24-well plate.
9. Fill three wells with 1 mL of medium supplemented with lysostaphin plus the antimicrobial compound to be tested.
10. Repeat step 3.5.9 for each antimicrobial compound to be tested.
11. For the control condition, fill three wells with 1 mL of medium supplemented with lysostaphin without any antimicrobial compound.
12. Incubate the cells for 24 h at 36 ± 1 °C in 5% $CO_2$.
13. At the end of the incubation period, remove and discard the spent medium and gently wash each well three times with sterile DPBS with $CaCl_2$ and $MgCl_2$.
14. Add 1 mL of 1x lysis buffer to each well to detach and lyse the cells by osmotic shock.
15. Incubate the cells for 10 min at 36 ± 1 °C.
16. Mix thoroughly by pipetting up and down ten times all over the well to ensure that the cells are fully lysed and homogenized.
17. Use an automatic spiral plater to determine the *S. aureus* load of each well.
18. Incubate the agar plates for 18-24 h at 36 ± 1 °C.
19. The next day, count the number of colonies with a colony counter to calculate the intracellular *S. aureus* load of each well.

    NOTE: The intracellular activity of each antimicrobial compound should be calculated according to the bacterial load of the control condition. It is also important to check the cytotoxicity of all antimicrobial compounds to prove that the differences observed between the control and the compounds are not due to cell death.

## Representative Results

The results of *S. aureus* internalization by A549 epithelial cells are depicted in **Figure 1A**. A549 cells were inoculated with *S. aureus* SF8300 WT and SF8300 Δ*fnb*A/B, which lacks fibronectin-binding proteins A and B, at an MOI of 1 for 2 h. To destroy extracellular *S. aureus*, lysostaphin was added to the culture medium, and the cells were incubated for 1 h. Next, lysostaphin was either removed by washing for EPA or inactivated with proteinase K for iEPA. Then, the cells were disrupted in lysis buffer, and the bacterial load was quantified by culture. By using EPA, the mean intracellular loads were 4.46 and 0.49 Log CFU/mL for SF8300 WT and SF8300 Δ*fnb*A/B, respectively (**Figure 1A**, green bars). Using iEPA, the mean intracellular loads were 4.53 and 0.56 Log CFU/mL for SF8300 WT and SF8300 Δ*fnb*A/B, respectively (**Figure 1A**, red bars). It is interesting to note that both EPA and iEPA showed similar results, which can be explained by the ease of performing the washes when the cells are in good condition and because the *S. aureus*-induced cytotoxicity is very low in these experimental settings (data not shown).

The results of intracellular activity of vancomycin, rifampicin, and levofloxacin against *S. aureus* are depicted in **Figure 1B**. To measure the intracellular activity of these antibiotics, HaCaT cells were inoculated with *S. aureus* ATCC 29213 at an MOI of 1 for 2 h. The cells were incubated with lysostaphin, with or without the antimicrobial compounds to be tested, for 24 h. Next, lysostaphin and the antimicrobial compounds were removed by washing. The cells were disrupted in lysis buffer, and the bacterial load was quantified by culture. The

Copyright © 2021 JoVE Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License

mean intracellular loads were 4.57, 4.51, 3.03, and 2.91 log CFU/mL for control, vancomycin (50 µg/mL), rifampicin (7 µg/mL), and levofloxacin (10 µg/mL), respectively (**Figure 1B**).

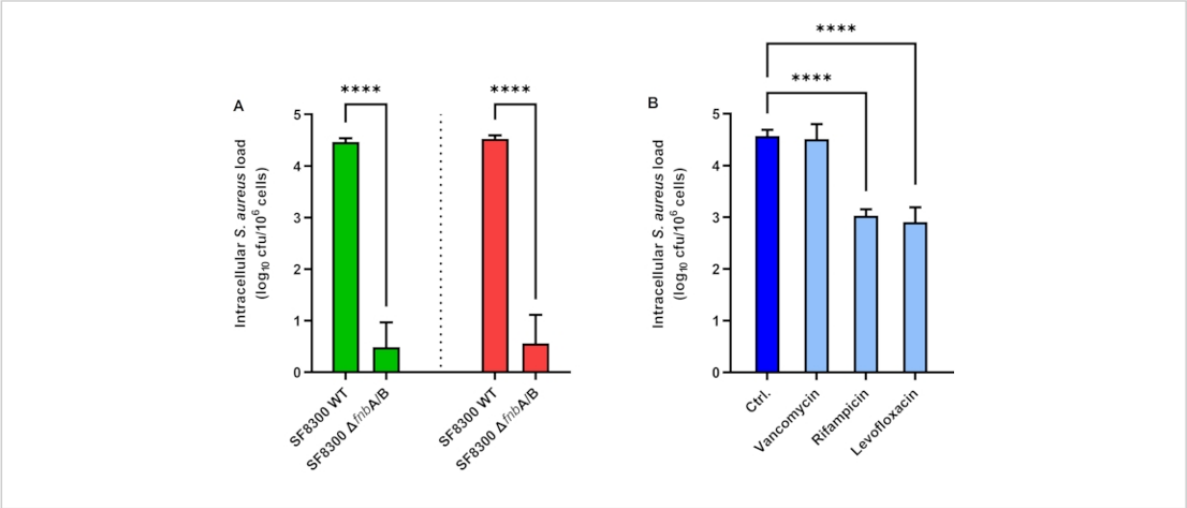



**Figure 1: Intracellular *Staphylococcus aureus* load in epithelial cells.** (**A**) Enzyme protection assay (green bars) and improved enzyme protection assay (red bars) in A549 cells infected with *S. aureus* SF8300 WT and Δ*fnb*A/B. (**B**) Intracellular activity of antimicrobial compounds in HaCaT cells infected with *S. aureus* ATCC 29213. Bars represent the mean values of three independent experiments performed in triplicate. Error bars represent the standard deviations. **** $p < 0.0001$. Abbreviations: Ctrl = control; cfu = colony-forming units. Please click here to view a larger version of this figure.

## Discussion

The assays described here are valuable for studying the extent of internalization and the intracellular survival of *S. aureus* in NPPCs, as well as the intracellular efficacy of antimicrobial compounds[6,15,16]. Some steps in both assay protocols can be critical. The health condition and the density of the cells must be perfectly controlled and consistent between independent experiments. The bacterial inoculum must be carefully standardized to obtain a real MOI close to the targeted theoretical MOI. In general, care must be taken not to detach any of the cells while pipetting. The washes to remove lysostaphin and antibiotics are critical steps in the EPA. The use of proteinase K has been found to improve this step when no antibiotic is used (see below). Last but not least, the cells should be fully detached in each well and thoroughly homogenized after the incubation with the lysis buffer to reliably quantify the *S. aureus* intracellular load.

In some instances, issues may be encountered, and several points must be checked first. In case of a lack of reproducibility, it must be kept in mind that *S. aureus* can form clumps, making quantification by absorbance inaccurate. The clumping of bacteria can be increased by centrifugation and washing steps if the culture medium is to be replaced (e.g., for eliminating a secreted protein). The bacterial suspension

Copyright © 2021 JoVE Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License

should be used rapidly because bacteria continue to grow at room temperature. The lysostaphin efficacy could decrease because of incorrect storage conditions, suboptimal pH for enzyme activity in the culture media, variability in the enzymatic activity between batches and providers, and lack of lysostaphin sensitivity of some strains in specific growth conditions. Phenol red could have a slight bacteriostatic effect, especially when the culture medium is relatively poor in nutrients compared to the typical broths used for growing bacteria. Thus, it is advisable to use a cell culture medium without phenol red, which also improves fluorescence microscopic observations by reducing the background noise.

Although this method is a valuable tool to study the intracellular fate of different strains, some limits of the method should be considered. The use of a very high MOI can overload the capability of internalization by NPPCs and level out the differences between the different strains tested. The extent of internalization of the most cytotoxic strains may be underestimated because lysostaphin (or antibiotics) rapidly destroys *S. aureus* that is released by damaged cells. Thus, experiments with extended durations (i.e., to study intracellular survival or intracellular activity of antibiotics) are easier to set up with strains with low cytotoxicity. Therefore, the incubation time and the MOI should be accurately adjusted according to the strain virulence, the cell type, and the experimental aim.

The method described here with the use of lysostaphin is more reliable than those based on gentamicin because, unlike lysostaphin, gentamicin tends to be internalized by host cells[13]. The other advantage is the possibility to inactivate the lysostaphin. Inhibition of lysostaphin activity was reported by Kim et al.[13] with the use of EDTA to chelate zinc ions or 1,10-phenanthroline; however, intensive washes are still required to remove the enzyme before plating of the bacteria. Here, proteinase K enables rapid inactivation of lysostaphin. We observed that cells tend to detach from the culture plate when they become heavily infected because of the multiplication of intracellular *S. aureus*. By skipping the final washing step, the iEPA method greatly simplified technical handling and enabled the recovery of the internalized bacteria in loosely adherent or already detached cells.

The more concentrated reagents and buffers used in iEPA also helped reduce pipetting effort and minimize the loss of cells. In addition, iEPA can be used with cells in suspension, as well as with organoids that are difficult to wash. In conclusion, enzyme protection assays enable the study of the extent of internalization and the intracellular fate of *S. aureus*, as well as the intracellular activity of antimicrobials drugs with different *in vitro* models. Improvements should be made to better characterize the relationship between internalization and cytotoxicity to better appreciate the importance of developing drugs capable of reaching *S. aureus* inside the cell.

## Disclosures

The authors have no conflicts of interest to declare.

## Acknowledgments

*S. aureus* strains SF8300 WT and SF8300 Δ*fnb*A/B were generously gifted by Prof. Binh Diep (University of California, San Francisco, USA). This work was supported by a grant of the FINOVI association (#AO13 FINOVI) under the aegis of the Foundation for the University of Lyon.

## References

1. Verhoeven, P. O. et al. Detection and clinical relevance of *Staphylococcus aureus* nasal carriage: an update.

Copyright © 2021 JoVE Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License

*Expert Review of Anti-Infective Therapy.* **12** (1), 75-89 (2014).

2. Gagnaire, J. et al. Epidemiology and clinical relevance of *Staphylococcus aureus* intestinal carriage: a systematic review and meta-analysis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy.* **15** (8), 767-785 (2017).
3. Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., Fowler, V. G. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews.* **28** (3), 603-661 (2015).
4. Josse, J., Laurent, F., Diot, A. Staphylococcal adhesion and host cell invasion: fibronectin-binding and other mechanisms. *Frontiers in Microbiology.* **8**, 2433 (2017).
5. Hanssen, A. -M. et al. Localization of *Staphylococcus aureus* in tissue from the nasal vestibule in healthy carriers. *BMC Microbiology.* **17** (1), 89 (2017).
6. Rigaill, J. et al. Evaluation of the intracellular efficacy of antimicrobial agents used for *Staphylococcus aureus* decolonization in a cell model mimicking nasal colonization. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* **73** (11), 3044-3048 (2018).
7. Yang, D. et al. Novel insights into *Staphylococcus aureus* deep bone infections: the Involvement of osteocytes. *mBio.* **9** (2), e00415-18 (2018).
8. Tuchscherr, L. et al. *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Molecular Medicine.* **3** (3), 129-141 (2011).
9. Valour, F. et al. Antimicrobial activity against intraosteoblastic *Staphylococcus aureus. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **59** (4), 2029-2036 (2015).
10. Proctor, R. A., Prendergast, E., Mosher, D. F. Fibronectin mediates attachment of *Staphylococcus aureus* to human neutrophils. *Blood.* **59** (4), 681-687 (1982).
11. Climo, M. W., Ehlert, K., Archer, G. L. Mechanism and suppression of lysostaphin resistance in oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **45** (5), 1431-1437 (2001).
12. Bur, S., Preissner, K. T., Herrmann, M., Bischoff, M. The *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein promotes bacterial internalisation by keratinocytes independent of fibronectin-binding proteins. *Journal of Investigative Dermatology.* **133** (8), 2004-2012 (2013).
13. Kim, J. -H., Chaurasia, A. K., Batool, N., Ko, K. S., Kim, K. K. Alternative enzyme protection assay to overcome the drawbacks of the gentamicin protection assay for measuring entry and intracellular survival of Staphylococci. *Infection and Immunity.* **87** (5), e00119-19 (2019).
14. Maturin, L., Peeler, J. T. Aerobic plate count. *Bacteriological Analytical Manual.*, Edition 8, Revision A, Chapter 3, https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-3-aerobic-plate-count (2021).
15. Kolenda, C. et al. Evaluation of the activity of a combination of three bacteriophages alone or in association with antibiotics on *Staphylococcus aureus* embedded in biofilm or internalized in Osteoblasts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **64** (3), e02231-19 (2020).
16. Abad, L. et al. Antibiofilm and intraosteoblastic activities of rifamycins against *Staphylococcus aureus*: promising in vitro profile of rifabutin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* **75** (6), 1466-1473 (2020).

Copyright © 2021 JoVE Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License

# Chapitre 2 : Mécanisme d'internalisation de *Staphylococcus aureus* médiée par la protéine Eap dans les cellules phagocytaires non professionnelles : étude du rôle du récepteur cellulaire ICAM-1

## INTRODUCTION

Ce chapitre présente les travaux *in vitro* effectués sur l'étude d'un mécanisme d'internalisation médié la protéine Eap (« extracellular adherence protein ») sécrétée par *S. aureus* et et le rôle du la glycoprotéine transmembranaire ICAM-1 (« intercellular adhesion molecule ») aussi appelée CD54.

De nombreuses études ont décrit la capacité de *S. aureus* à envahir une grande variété de cellules phagocytaires non professionnelles (NPPCs) : ostéoblastes, fibroblastes, kératinocytes, cellules épithéliales et endothéliales (Strobel *et al.* 2016). Ce réservoir intracellulaire peut être observé chez des patients sains. Il protège la bactérie du système immunitaire et de la majorité des traitements antibiotiques dont la mupirocine utilisée pour la décolonisation nasale à *S. aureus* (Rigaill *et al.* 2018). La voie d'entrée principale utilisée par *S. aureus* implique l'interaction entre l'intégrine cellulaire α5β1, la fibronectine présente dans la matrice extra cellulaire et les fibronectine-binding proteins A et B (FnBPs) exprimées par *S. aureus* (Fowler *et al.* 2000). Les FnBPs sont des adhésines faisant partie de la famille des MSCRAMMs (« microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules »), protéines ancrées à la paroi bactérienne jouant un rôle majeur dans l'adhésion et l'internalisation de la bactérie (Foster *et al.* 2014; Josse *et al.* 2017). Plusieurs autres mécanismes d'internalisation, faisant intervenir différentes adhésines et récepteurs cellulaires, ont été rapportés dans la littérature (Josse *et al.* 2017). Parmi celles-ci, l'Eap a été décrite comme permettant l'entrée de *S. aureus* dans les cellules épithéliales par un mécanisme indépendant des FnBPs (Bur *et al.* 2013). Cependant le récepteur d'entrée impliqué dans cette internalisation reste inconnu à ce jour.

Contrairement aux FnBPs, la protéine Eap n'est pas ancrée à la paroi bactérienne, elle fait partie d'une autre famille d'adhésines : les SERAMs (secretable expanded repertoire adhesive molecules) (Heilmann 2011). Parmi toutes les espèces de staphylocoques, il semblerait que *S. aureus* soit la seule capable de produire de l'Eap (Hussain *et al.* 2008). Formée de 4 à 6 répétitions de domaines en tandems, la protéine Eap peut avoir une taille variant entre 40 et 70 kDa (Geisbrecht *et al.* 2005; Hussain *et al.* 2008). L'expression d'Eap par *S. aureus* est maximale en phase exponentielle tardive de la multiplication bactérienne (Harraghy *et al.* 2005). Cette expression est sous le contrôle des systèmes de régulation

*agr*, *sae* et *sar*. Dans des conditions de culture pauvres en fer, le gène *fur* est également nécessaire à la production d'Eap (Johnson *et al.* 2011). La protéine Eap est capable de fixer un grand nombre de protéines présentes dans la matrice extra cellulaire ou le sérum (fibrinogène, fibronectine, prothrombine, collagène et vitronectine), et peut également se fixer à l'ADN libre (Harraghy *et al.* 2003; Eisenbeis *et al.* 2018). En raison de cette grande variété de ligands, l'Eap va jouer un rôle dans divers processus. En plus de sa capacité d'adhésion et d'invasion cellulaire, cette protéine est impliquée dans la formation de biofilm, l'activation plaquettaire et l'évasion immunitaire (Chavakis *et al.* 2002; Harraghy *et al.* 2003; Scriba *et al.* 2008; Bertling *et al.* 2012; Bur *et al.* 2013). Il a été montré que l'Eap pouvait jouer un rôle anti-chimiotactique en se fixant à la protéine ICAM-1 présente au niveau des cellules endothéliales, aboutissant alors à l'inhibition du recrutement des neutrophiles (Chavakis *et al.* 2002).

## RESULTATS ANTERIEURS DE L'EQUIPE

Une revue de la littérature effectuée dans l'équipe a rapporté que l'infection a rhinovirus était associée à une augmentation de la charge nasale de *S. aureus* et de la dissémination de cette bactérie dans l'environnement du sujet infectée (Morgene *et al.* 2018). Chez l'Homme ICAM-1 est connu comme le principal récepteur d'entrée des rhinovirus (Greve *et al.* 1989). A partir de ces observation, l'équipe s'est intéressé au rôle de l'interaction entre l'Eap et ICAM-1 pour favoriser l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules phagocytaires non professionnelles. Les résultats antérieurs de l'équipe obtenu dans le cadre de la thèse d'université de Fedy Morgene ont montré que (i) l'infection par le rhinovirus A16 et la stimulation au TNFα augmente l'expression de ICAM-1 sur les kératinocytes HaCaT et semble favoriser l'internalisation de *S. aureus*, et (ii) que l'internalisation médiée induite par cette inflammation est dépendante de la mobilisation du cytosquelette d'actine (Morgene 2018).

Effet de l'infection par le rhinovirus A16 sur l'expression de ICAM-1 sur cellules HaCaT et l'internalisation de *S. aureus*.

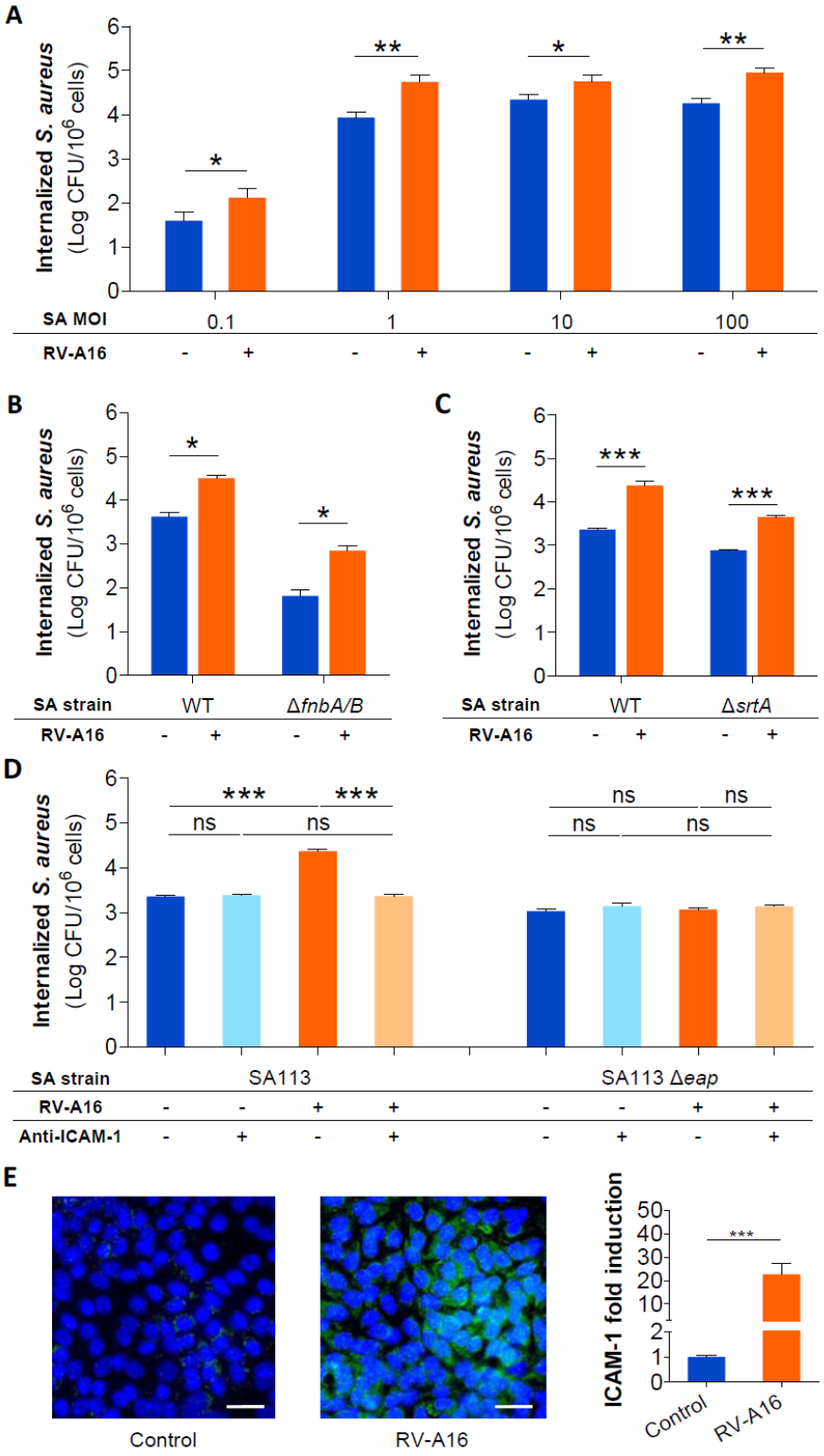



Figure 1. Impact d'infection par le rhinovirus A16 sur l'internalisation de *S. aureus* et l'expression de ICAM-1 dans les cellules HaCaT.

Les cellules HaCaT sont une lignée de kératinocytes humains qui ont été utilisées dans cette expérience pour mimer les cellules de l'épithélium malpighien du vestibule nasal. La Figure 1A montre une augmentation significative du niveau d'internalisation de la souche de *S. aureus* ATCC29213. Une saturation du niveau d'internalisation avec cette souche avait été observée pour des MOI supérieures ou égales à 10, et de ce fait il a été choisi d'utiliser des MOI inférieures ou égales à 1 pour les expériences suivantes. La Figure 1B illustre la forte diminution induite par l'utilisation d'une souche ΔFnBPs (DU 5883) comparé à son mutant isogénique (NCTC 8325-4). Malgré la perte de la principale voie d'internalisation FnBPs/α5β1, l'augmentation du niveau d'internalisation après infection par rhinovirus était toujours observée avec la souche DU 5883, ce qui avait suggéré l'implication d'une voie alternative stimulée par l'infection à rhinovirus. La même observation avait été faite avec l'utilisation d'une souche ΔsrtA (SA113 délétée pour le gène exprimant la Sortase A) (Figure 1C), indiquant que l'augmentation d'internalisation induite par l'infection à rhinovirus pourrait mettre en jeu une molécule ne faisant pas partie de la famille des MSCRAMMs. Enfin si l'expression basale de la glycoprotéine ICAM-1 à la membrane des cellules HaCaT est faible, l'infection par rhinovirus induisait une forte expression de ce récepteur après (Figure 1E). L'utilisation d'un anticorps bloquant ICAM-1 été associé à une réduction de la quantité intracellulaire de *S. aureus* à un niveau basal malgré l'infection par rhinovirus (Figure 1D), ce qui avait suggéré que la surexpression de ICAM-1 induite par le rhinovirus pouvait être responsable de l'augmentation de l'internalisation de *S. aureus*. L'augmentation d'internalisation observé après infection par rhinovirus était abolie avec la souche de *S. aureus* SA113 Δ*eap*. L'ensemble de ces résultats préliminaires avaient suggéré que la SERAM Eap de *S. aureus* pouvait interagir avec le récepteur ICAM-1 exprimé au cours de l'infection à rhinovirus pour favoriser l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules HaCaT.

1- Effet de l'inflammation induite par le TNFα sur l'expression du récepteur ICAM-1 et l'internalisation de *S. aureus*

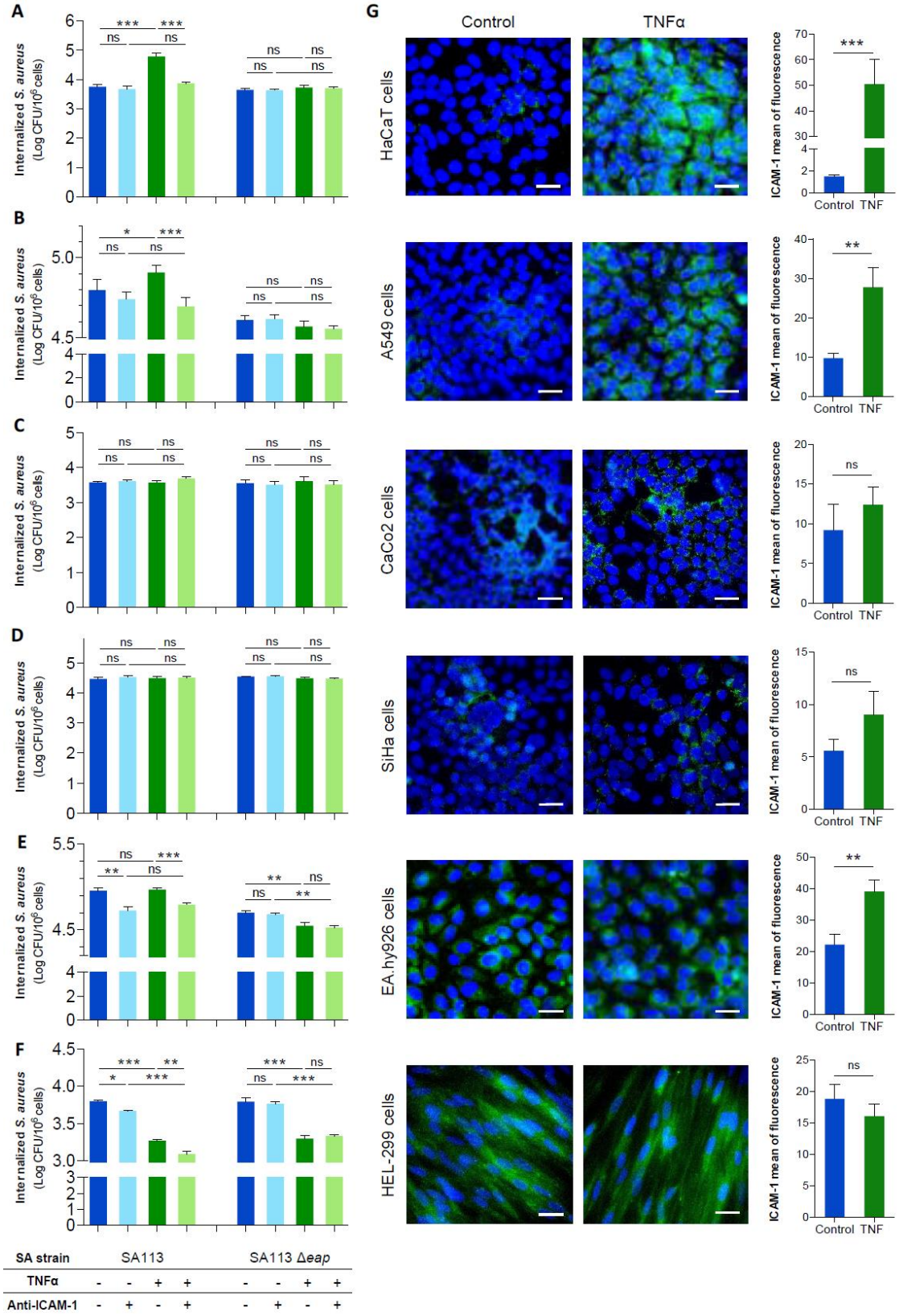



Figure 2. Impact d'une stimulation pro-inflammatoire par traitement par TNFα sur l'internalisation de *S. aureus* et l'expression de la glycoprotéine cellulaire ICAM-1.

Sur cellules HaCaT, l'augmentation du niveau d'internalisation observée après infection par rhinovirus avait également été obtenue après une stimulation par 10 ng/ml de TNFα pendant 24h (**Figure 2A**). La stimulation au TNFα était aussi responsable d'une augmentation du niveau d'expression de ICAM-1 (**Figure 2G**). L'augmentation de l'internalisation liée à la stimulation au TNFα était abolie par l'utilisation d'une souche Δeap ou par l'incubation des cellules avec un anticorps bloquant anti-ICAM-1. La **Figure 2B** nous présente dDes résultats identiques avaient été obtenu avec une lignée de cellules A549 (pneumocytes) (**Figure 2B)**. Pour d'autres lignées présentant un niveau d'expression basal de ICAM-1 important, la stimulation au TNFα n'entrainait pas d'augmentation significative du niveau d'internalisation (**Figure 2C à 2E**). Pour les cellules EA.hy926 (cellules endothéliales aortique), une diminution du niveau basal d'internalisation après utilisation d'anticorps bloquant anti-ICAM-1 ou de la souche SA113 Δ*eap* avait été observé (**Figure 2E)**, indiquant une possible implication de la voie Eap/ICAM-1 de façon basale. En revanche, pour les cellules HEL-299 (fibroblastes pulmonaires embryonnaires), la stimulation au TNFα est responsable d'une diminution importante du nombre de bactéries intracellulaires (**Figure 2F**). Ce phénomène était liée à lacytotoxicité induite par la stimulation au TNFα.. Dans ce cas, les bactéries libérées au moment de la mort cellulaire sont détruites par la lysostaphine présente dans le milieu de culture. Enfin, pour les cellules CaCo2 (entérocytes) (**Figure 2C**), et SiHa (cellules cervicales) **(Figure 2D),** aucune variation du niveau d'internalisation n'avait été observé dans les différentes conditions testées.

## 2- La mobilisation du cytosquelette d'actine responsable de l'internalisation de *S. aureus* via ICAM-1 est activée par une cascade de signalisation différente de celle utilisée par la voie α5β1 dépendante

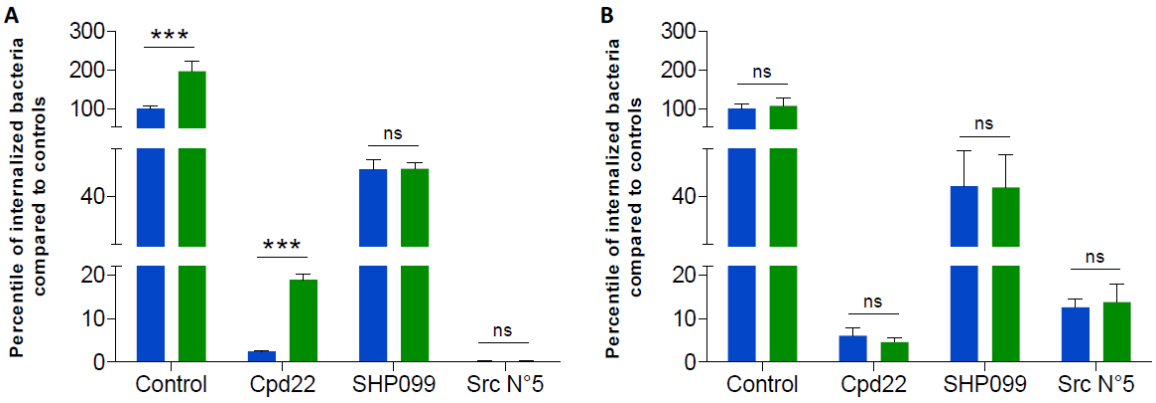



**Figure 3. Internalisation de *S. aureus* dans les kératinocytes HaCaT en présence d'inhibiteurs chimiques de l'intergrin-linked kinase associée à l'intégrine β1 (Cpd22), de la phosphatase SHP-2 associée à ICAM-1 (SHP099) et de la kinase cellulaire Src (Src n°5) avec les souches SA113 (A) et SA113 Δeap (B).**

L'internalisation de *S. aureus* par les cellules épithéliales est un mécanisme cellulaire actif qui nécessite la mobilisation du cytosquelette d'actine (Josse *et al.* 2017). Sur les cellules HaCaT non stimulées au TNF (barres bleues), l'utilisation de l'inhibiteur chimique Cpd22 induisait un blocage de l'intergrin-linked kinase (ILK) associée à l'intégrine β1 et une abolition presque complète forte diminution de l'internalisation de *S. aureus* (**Figure 3A**). La protéine ILK est connue pour être recrutée par l'intégrine β1 lors du recrutement des fibres d'actines. De la même façon, l'utilisation d'un inhibiteur de la protéine Src qui intervient plus tardivement dans la voie de signalisation impliquée dans la polymérisation des fibres d'actines entrainait aussi une abolition de l'internalisation de *S. aureus*. Lors de la stimulation au TNFα (barres vertes), une augmentation de l'internalisation avait été observé en présence de Cpd22, suggérant d'une partie de l'internalisation pouvait être indépendante de la signalisation de l'intégrine β1 (Figure 3A). Ce phénomène n'avait pas été observé avec la souche SA113 Δ*eap* (**Figure 3B**). L'inhibiteur SHP099, responsable du blocage de la phosphatase SHP2, avait aboli l'augmentation d'internalisation observée après stimulation au TNFα. Ces résultats avaient suggéré que l'entrée de *S. aureus* par le complexe Eap/ICAM-1 impliquait l'activation de la protéine SHP2 et l'activation de Src.

Certains de ces résultats n'ayant pu être validé au cours du travail de thèse précédent, nous avons choisi de poursuivre ce travail dans le but de caractériser la voie de signalisation cellulaire entrainant à une augmentation de l'internalisation de *S. aureus* au cours de la stimulation des cellules par TNFα.

Contrairement à ce qui avait pu être observé jusqu'à présent avec les travaux antérieurs de l'équipe, le traitement des cellules HaCaT au TNFα (barres vertes) n'entrainait pas d'augmentation significative du niveau d'internalisation de la souche de *S. aureus* SA113 utilisée à MOI 0,1 (**Figure 4A**). L'utilisation d'anticorps bloquants anti-ICAM-1 ou d'une souche Δ*eap* n'avait pas d'impact sur le niveau d'internalisation mesuré de *S. aureus* SA113. La **Figure 4B** montre cependant que le récepteur ICAM-1 était bien surexprimé à la membrane par les cellules HaCaT 24h après traitement au TNFα. L'infection par rhinovirus A16 avait montré des résultats similaires avec un niveau d'expression d'ICAM-1 moins élevé (résultats non présentés).

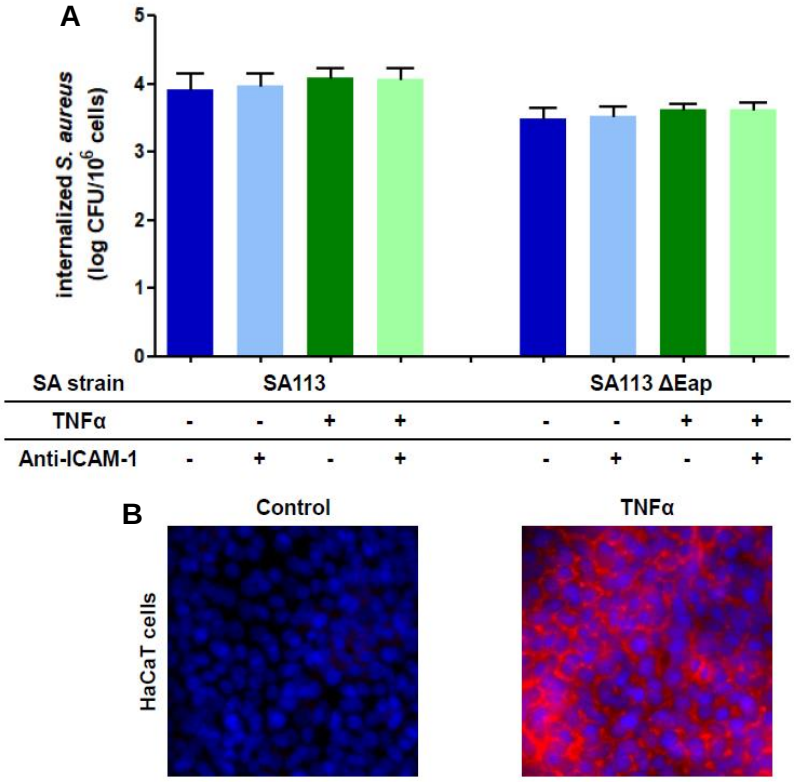



**Figure 4.** Impact du TNFα sur l'internalisation de *S. aureus* et l'expression de ICAM-1

Malgré des résultats discordants avec les résultats obtenus antérieurement dans l'équipe, il était important de noter que, malgré l'absence d'activité de l'anticorps bloquant ICAM-1, la souches SA113 Δeap avait une niveau d'internalisation diminuée par rapport à la souche SA113 WT. Une des hypothèses qui avait été faite pour expliquer ces résultats discordants était la présence de stimuli inflammatoires dans les modèles cellulaires utilisés (changement de lot de sérum, contamination de l'eau du réseau par des bactéries de l'environnement, épisode de contamination par mycoplasmes…).

Pour s'affranchir de l'effet de stimuli extérieurs et de l'utilisation du TNFα, il a été décidé de développer des lignées cellulaires génétiquement modifiées pour contrôler l'expression de la glycoprotéine ICAM-1. Dans un premier temps, des cellules CHO-K1 ont été transfectées avec un plasmide pcDNA3.1 permettant l'expression membranaire forte et constitutive du récepteur ICAM-1 humain complet ou tronqué dans sa partie cytoplasmique. Après transfection stable et sélection clonale, les cellules CHO-K1 exprimaient fortement le récepteur ICAM-1 humain (Figure 5C).

A MOI 1, toutes les souches utilisées présentent un très niveau d'adhésion élevé (Figure 5A). Une augmentation non significative de l'adhésion de *S. aureus* semble présente avec les cellules exprimant fortement ICAM-1. Sur ce modèle de cellules murines, la souche DU5883 (clone ΔFnBPs de la souche 8325-4) présentait une diminution significative de sa capacité d'adhésion ($p$ = 0.0096) alors que les souches 8325-4 et Newman avait des niveau d'adhésion similaires. La souche Newman, forte productrice de protéine Eap, a également la particularité de posséder des FnBPs tronquées et secrétées. Elle est décrite comme ayant une capacité limitée d'adhésion et d'invasion cellulaire (Grundmeier *et al.* 2004). En ce qui concerne l'internalisation de *S. aureus*, l'expression d'ICAM-1 n'a pas d'impact significatif. Les souches DU5883 et Newman présentent une capacité d'internalisation significativement diminuée, indépendamment de l'expression de ICAM-1 (Figure 5B).

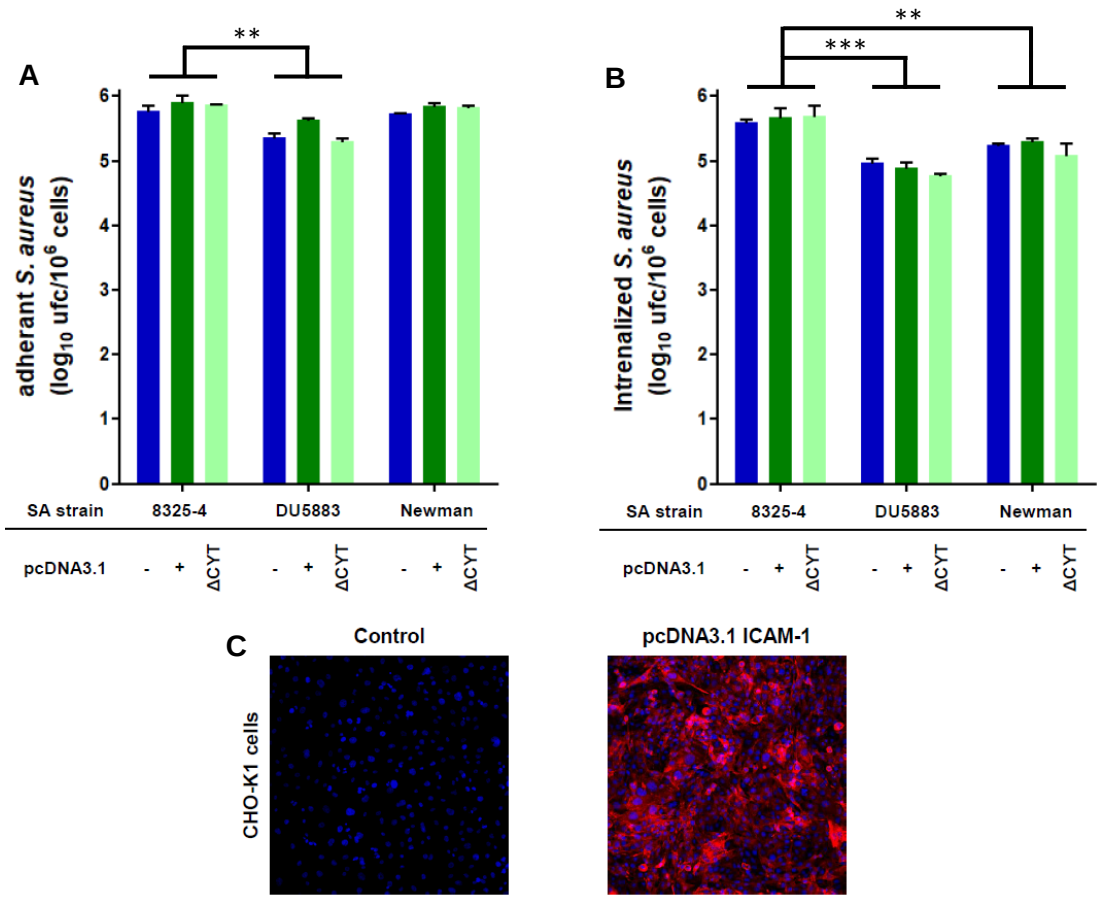



Figure 5. Adhésion (A) et Internalisation (B) de *S. aureus* dans des cellules exprimant fortement le récepteur ICAM-1 humain complet (pcDNA3.1) ou tronqué dans la partie cytoplasmique (ΔCYT).

Des cellules humaines de la lignée A549 ont été modifiées par technique CRIPSR-Cas9 pour ne plus exprimer le récepteur ICAM-1. Contrairement aux cellules sauvages (WT), les cellules ΔICAM-1 n'exprimaient plus le récepteur après stimulation au TNFα (absence de marquage ICAM-1 en vert et expression de la RFP signant l'intégration du d'une partie de la séquence du plasmide HDR) (**Figure 6C**). Que ce soit pour les cellules sauvages (**Figure 6A**) ou ΔICAM-1(**Figure 6B**), le traitement par TNFα n'a pas entrainé d'augmentation significative du niveau d'internalisation de *S. aureus* ; Une augmentation non significative du nombre de bactéries intracellulaires a été observée avec les souches exprimant les FnBPs. Les résultats obtenus avec les cellules WT ou ΔICAM-1 étaient similaires. Aucune différence d'internalisation n'a été observé avec la délétion de du gène codant l'Eap.

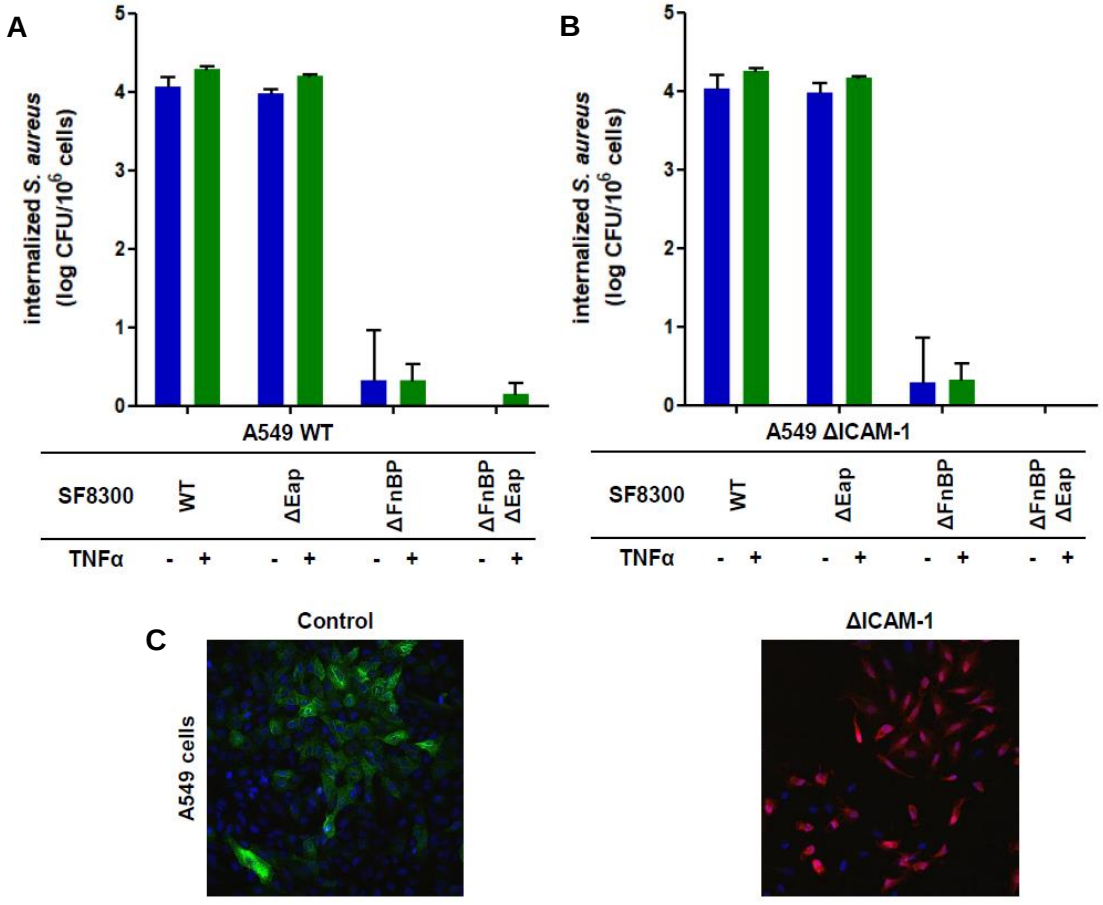



**Figure 6.** Internalisation de *S. aureus* dans des cellules A549 WT et A549 ΔICAM-1

Les cellules A549 WT et ΔICAM-1 ont été infectées avec des souches de *S. aureus* Δ*eap*, en présence ou non d'Eap recombinante. Après traitement des cellules au TNFα, l'ajout d'Eap recombinante n'a pas entrainé d'augmentation du niveau d'internalisation de *S. aureus* (**Figure 7**). Comme constaté pour la **Figure 6,** une légère augmentation du nombre de bactéries retrouvées après stimulation au TNFα a été observée avec les souches exprimant des FnBPs. Cette augmentation non significative était indépendante de l'expression d'ICAM-1 ou de la présence d'Eap recombinante.

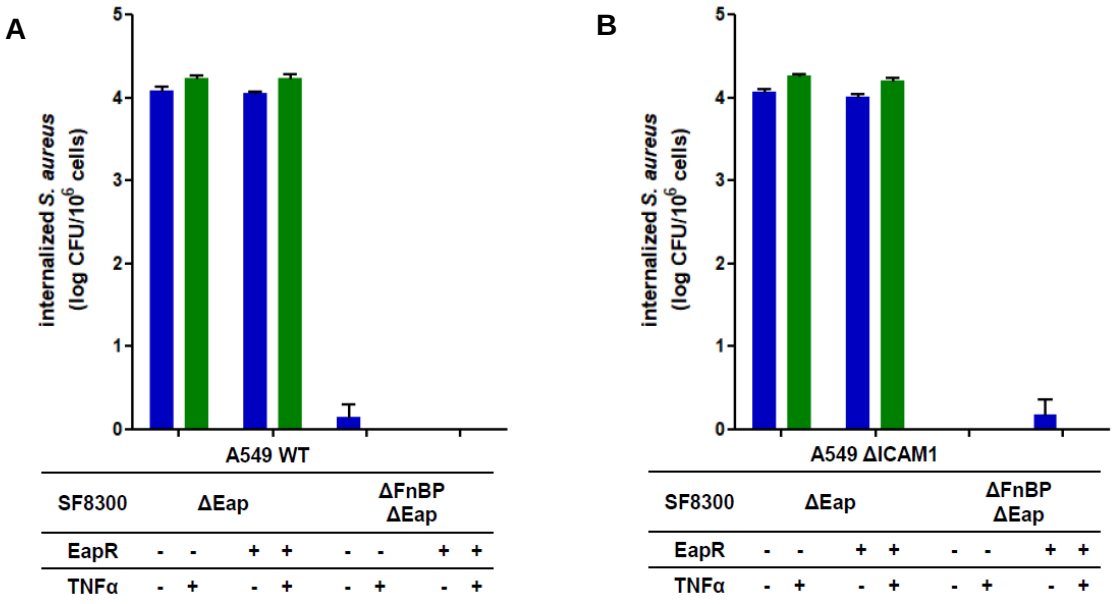



Figure 7. Impact de l'utilisation d'Eap recombinante sur l'internalisation de *S. aureus*

La mesure du nombre de noyaux présent sur 18 puits (6 champs de microscopie par puits et 3 puits par condition à l'objectif x20) a montré une diminution de la prolifération cellulaire des A549 après stimulation au TNFα (Figure 8). Avec 981 cellules en moyenne pour les cellules non traitées et 875 pour les cellules traitées, une diminution non significative de 10,6% de la prolifération cellulaire a été observé. Cette diminution n'était pas s'accompagnée 'une augmentation de la mortalité cellulaire mesurée par marquage au iodure de propidium (résultats non présentés).

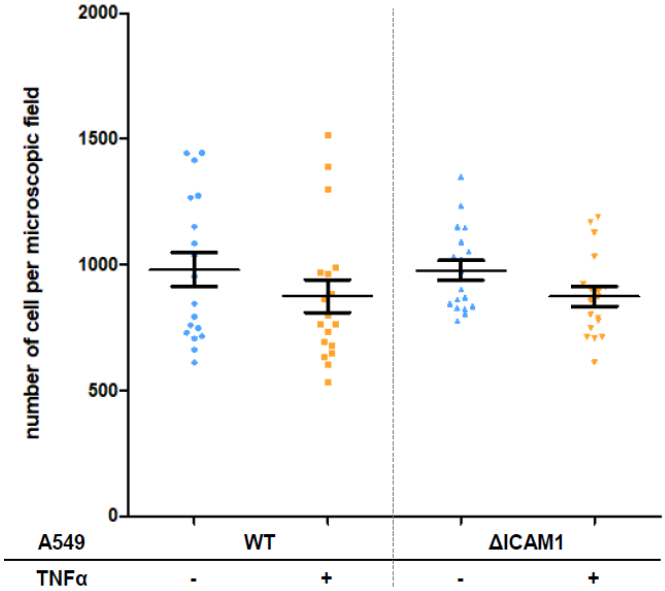



Figure 8. Impact de la stimulation au TNFα sur la prolifération des cellules A549

## DISCUSION

Si les résultats antérieurs de l'équipe montraient une implication majeure de l'Eap sur l'internalisation de *S. aureus*, via le récepteur ICAM-1, dans un contexte inflammatoire (infection par rhinovirus, stimulation au TNFα), les résultats issus de mes travaux de thèse n'ont pas abouti aux mêmes résultats.

Ainsi, sur cellules HaCaT le traitement par TNFα n'a pas entrainé d'augmentation du niveau d'internalisation de *S. aureus* et ce, malgré une surexpression membranaire importante du récepteur ICAM-1 (Figure 4). L'utilisation d'anticorps bloquants anti-ICAM-1 ou d'une souche Δ*eap* n'a pas changé le nombre de bactéries retrouvées en intracellulaire. Plusieurs hypothèses ont été évoquées et différentes conditions expérimentales ont été testées (résultats non présentés) : utilisation de différents lots de TNFα, utilisation de différentes lignées de cellules HaCaT (HaCaT du fournisseur CLS et Cellulonet), comparaison de différent niveau de confluence cellulaire (concentration cellulaire à l'ensemencement et délai de culture avant infection), recherche d'une contamination par mycoplasmes, comparaison de différent lot de SVF et de sa concentration (SVF sigma ou Gibco), utilisation d'un substitut synthétique au SVF (Ultroser), évaluation de la composition du milieu de culture (RPMI, DMEM, concentration en glucose, en fer…) et de la température d'infection (33°C et 37°C)... Aucune des conditions expérimentales évaluées n'a permis de mettre en évidence d'internalisation médiée par l'interaction entre l'Eap et la glycoprotéine ICAM-1.

Face à ce blocage, il a été décidé de se passer de l'expression de ICAM-1 via stimulation au TNFα, cette molécule n'ayant pas un effet limité à l'expression de ICAM-1 pouvant induire un biais non contrôlable dans nos expériences. Pour cela des plasmides d'expression constitutive de ICAM-1 ont été transfectés dans des cellules CHO-K1 sans effet sur l'internalisation de *S. aureus*. Ce modèle n'était toutefois pas exempt de défauts : ces cellules présentant un très haut niveau d'internalisation basal et cet important niveau d'entrée était également observé avec les souches bactériennes non productrices de FnBPs (Figure 5). Cette observation pourrait être liée à l'implication de voies alternatives, non maitrisées, et potentiellement à l'expression d'un récepteur murin proche de ICAM-1 non reconnu par les anticorps anti ICAM-1 humains utilisés pour le marquage et le blocage.

Nous nous sommes donc orientés vers le développement de deux modèles de cellules humaines (A549 et HaCaT) avec une délétion du gène codant pour ICAM-1 par technique CRISPR-Cas9 et une complémentées de ce récepteur avec une plasmide d'expression. Malheureusement les cellules HaCaT étant plus difficiles à transfecter que les cellules A549, le KO ICAM-1 n'a pu être obtenu qu'avec ces dernières dans le temps imparti à cette thèse. La transfection stable des plasmides d'expression constitutive d'ICAM-1 a ensuite été débutée dans la lignée de cellules A549 ΔICAM-1. Après plusieurs

essais infructueux et en raison des délais à respecter pour cette fin de thèse, les cellules A549 ΔICAM-1 complémentées plasmides d'expression constitutive d'ICAM-1 n'ont pas été obtenues. Les cellules A549 ΔICAM-1 ont tout de même pu être comparées à des cellules A549 WT. Comme pour les expériences précédentes, après stimulation au TNFα, le niveau d'internalisation de *S. aureus* restait inchangé dans les cellules A549 WT exprimant ICAM-1 (Figure 6). L'utilisation de souches Δ*eap* n'impactait pas non plus la capacité d'invasion des souches utilisées. Les cellules ΔICAM-1 présentaient des résultats similaires à ceux obtenus avec les cellules sauvages.

Un dernier paramètre difficilement contrôlable était le niveau d'expression d'Eap par les souches de *S. aureus*. Dans des cellules HaCaT, l'utilisation d'Eap recombinante a déjà montré sa capacité à faire pénétrer *S. aureus* ainsi que d'autres espèces incapables d'envahir les NPPCs (*S. epidermidis*, *S. lugdunensis*, *E. coli*) (Bur *et al.* 2013). L'utilisation de Eap recombinante aux concentrations optimales décrites dans cette publication n'a pas permis de mettre en évidence de rôle de l'interaction entre ICAM-1 et l'Eap en ce qui concerne l'internalisation de *S. aureus* (Figure 7). Malgré une taille attendue respectée, la fonctionnalité de la protéine eap recombinante produite n'a pas pu être vérifié par un test d'inhibition de chimiotactisme ou de prolifération de type « wound healing assay ». Dans cette étude, les MOI d'infections utilisées étaient 100 à 1000 fois plus forte que dans nos expériences. Une autre différence expérimentale majeure avec l'étude de Bur *et al.*, qui a fait la preuve de l'internalisation par Eap dans des cellules HaCaT, est l'utilisation de cellules A549 dans nos expériences avec Eap recombinante. A noter toutefois qu'il semblait possible d'observer une augmentation d'internalisation de *S. aureus* dans les cellules A549 traitées au TNFα dans sur les résultats antérieurs de l'équipe (Figure 2).

Enfin les cellules A549 ΔICAM-1 n'ont pas pu être complémentées avec un plasmide d'expression constitutive du récepteur ICAM-1. La comparaison entre cellules A549 ΔICAM-1 et cellules A549 exprimant ICAM-1 n'a pu être faite que par stimulation au TNFα des cellules WT. Sur les Figure 6 et 7 cette stimulation au TNFα entrainait une augmentation non significative du niveau d'internalisation, des souches de *S. aureus* productrices de FnBPs, non liée à ICAM-1. Cette augmentation n'est pas non plus secondaire à une prolifération plus importante des cellules A549 après traitement au TNFα. Le nombre de cellules mesuré 24h après traitement était même inférieur à celui des cellules non traitées. Si cela n'a pas été vérifié expérimentalement dans cette thèse, il a été démontré que le TNFα pouvait induire la surexpression des intégrines α5 et β1 (Takemura *et al.* 2006; Grzelkowska-Kowalczyk *et al.* 2016; Graves et Milovanova 2019). Cette augmentation d'expression en α5β1 pourrait expliquer la légère augmentation d'internalisation observée après stimulation au TNFα, la voie α5β1/FnBPs étant la principale voie d'entrée de *S. aureus*. Cette hypothèse est d'autant plus probable que ce phénomène concerne uniquement les souches capables de produire des FnBPs. Enfin l'utilisation de la souche

SF8300 Δ*fnb* entraine une abolition de la capacité d'internalisation de *S. aureus* soutenant qu'aucune voie d'internalisation indépendante des FnBPs soient présente dans ce modèle.

Si les derniers résultats ne montrent pas d'internalisation médiée par l'interaction entre l'Eap et ICAM-1, l'interaction entre ces deux protéines est bien décrite *in vitro* (Chavakis *et al.* 2002; Haggar *et al.* 2004). Cette interaction pourrait être responsable de la discrète augmentation d'adhésion observable sur cellules CHO-K1 à forte expression d'ICAM-1 (Figure 5). Alors que l'internalisation bactérienne médiée par Eap est bien décrite (Bur *et al.* 2013) et que l'infection par rhinovirus A1b augmente l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules A549 exprimant ICAM-1 (Passariello *et al.* 2006), une mécanisme d'internalisation de *S. aureus* dans les cellules épithéliales via l'interaction entre l'Eap et ICAM-1 n'a jamais été établi. Chez l'homme, l'infection artificielle par rhinovirus entraine une augmentation de l'expression de son récepteur d'entrée ICAM-1 au niveau de l'épithélium nasal (Winther *et al.* 2002). Pour rappel, une revue récente de la littérature soulignait le lien étroit existant entre les infections virales de la sphère ORL et la colonisation nasale par *S. aureus*. Enfin, il a été décrit que la grande majorité des souches de *S. aureus* sont capables de produire de l'Eap (Hussain *et al.* 2001) mais que seule l'expression d'une protéine complète pouvait favoriser l'internalisation de *S. aureus*. La souche SF8300 utilisée dans nos expériences appartient au clone USA300 qui est un clone de SARM endémique aux Etats-Unis (Planet 2017), qui possède une version complète de la protéine Eap. Il en est de même pour les souches SA113, 8325-4 et Newman.

Pour conclure, si les données issues de la littérature de ces 20 dernières années semblent indiquer un rôle de l'Eap dans les mécanismes d'internalisation de *S. aureus*, le rôle du récepteur ICAM-1 n'a pas été confirmé expérimentalement. Malgré des résultats préliminaires encourageants, les expériences suivantes n'ont pas permis de reproduire les effets mesurés initialement. Le développement de nouveau outils innovants, aussi bien cellulaires que bactériens, n'a pas non plus abouti à la validation de notre hypothèse. Une meilleure connaissance des mécanismes d'internalisation secondaires est primordiale car la voie considérée par beaucoup comme principale *in vitro* pourrait avoir un rôle limité *in vivo*. Ainsi des travaux récents auxquels j'ai participé ont mis en évidence que la capacité d'adhésion de *S. aureus* sur un modèle *ex vivo* de cornée intacte était presque nulle (Maurin *et al.* 2021). Dans cette étude, l'infection n'était possible que par création d'une lésion cornéenne superficielle. L'exposition de fibronectine induite par cette lésion permettait à *S. aureus* d'envahir les cellules cornéennes alors démasquées. Ce type de modèle cellulaire polarisé pourrait permettre d'évaluer le rôle de l'expression apicale de la glycoprotéine ICAM-1 dans l'adhésion et l'internalisation de *S. aureus* dans les *cellules épithéliales*.

# MATERIELS ET METHODES

## Souches bactériennes

Les souches bactériennes ont été cultivées sur milieu gélosé complémenté avec 5% de sang de mouton (COS-43041, bioMérieux). Les différentes souches de *S. aureus* utilisées étaient conservées à -20°C en tubes cryobilles. Les souches SA113 ont été fourni généreusement par le Dr. Mathias Hermann. Les souches SF8300 ont été fournies généreusement par le Dr. Bin Diep. Les souches SF8300 Δ*eap* ont été construites au laboratoire par technique CRISPR-Cas9.

## Culture cellulaire

Des cellules A549 (lignée de pneumocytes humains), HaCaT (lignée de kératinocytes humains) et CHO-K1 (lignée de cellules ovariennes de hamster) ont été cultivées en flasque à 37°C et 5% de $CO_2$ dans du milieu Dulbecco's modified Eagle high glucose (DMEM-D6429, Sigma-Aldrich) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF-10270-106, Gibco) sans antibiotiques. Pour les expériences d'infection par *S. aureus,* après lavage au PBS (D8537, Sigma-Aldrich), les cellules étaient décollées par traitement à la trypsine-EDTA (T4049, Sigma-Aldrich), puis ensemencées sur plaques 24 puits à une densité de $1{,}0.10^5$ cellules/$cm^2$ avant d'être incubées 48h à 37°C et 5% $CO_2$. Si besoin, les cellules pouvaient être traitées avec 10ng/ml de TNFα (Sigma-Aldrich) 24h avant infection.

## Infections de cellules par *S. aureus*

Les bactéries étaient ensemencées sur géloses à 5% de sang de mouton (COS-43041, bioMérieux) 48h avant l'infection. La veille de l'infection, une colonie isolée était déposée dans 10ml de milieu d'infection : DMEM high glucose sans rouge phénol (D1145, Sigma-Aldrich) supplémenté avec 10% de SVF et incubé pendant la nuit à 37°C sous agitation. Le jour de l'infection, le bouillon était dilué dans du milieu d'infection pour obtenir une densité optique de 0,5 sur densimètre CO8000 (WPA). La DO 0,5 correspondant à une charge de $10^8$ UFC/ml, des dilutions au dixième dans du milieu d'infection étaient réalisées pour obtenir la MOI désirée. La charge bactérienne utilisée pour l'infection était vérifiée en ensemençant du bouillon sur gélose COS à l'aide d'un ensemenceur automatique (EasySpiral Dilute, Interscience). Après lavage des puits au PBS, 1ml de bouillon ajusté à la MOI désirée était ajouté aux cellules, puis incubé pendant 2h à 37°C et 5% $CO_2$. Le milieu était ensuite aspiré et remplacé par du

milieu frais supplémenté avec 10µg/ml de lysostaphine (Ambicin, Ambi Products), puis de nouveau incubé 1h à 37°C et 5% $CO_2$. Les puits étaient alors lavés 3 fois au PBS avant d'ajouter 1ml de solution de lyse composée de : 0,25% de Triton X-100 (T8787, Sigma-Aldrich), de 25% de trypsine-EDTA et d'eau pure stérile (600500, Aguettant). Le lysat était alors ensemencé sur gélose COS avec un EasySpiral, et la quantité de *S. aureus* intracellulaire était mesuré avec un compteur de colonies (Scan 4000, Interscience) après 24h d'incubation à 37°C.

### Transfection des plasmides d'expression constitutive de ICAM-1

Quatre plasmides pcDNA3.1 ont été commandés chez GeneScript. Tous les plasmides disposaient d'une origine de réplication bactérienne ainsi qu'un gène de résistance à l'ampicilline. A réception, tous les plasmides ont été archivés dans *Escherichia coli* et vérifiés par enzyme de restriction. Pour l'expression de ICAM-1, chaque plasmide présentait un promoteur CMV d'expression forte ainsi qu'un gène de résistance à la Néomycine/Kanamycine. Enfin, un des plasmides disposait du fragment codant pour la protéines ICAM-1 entière, un autre plasmide disposait d'un fragment codant pour une protéine ICAM-1 tronquée sur sa partie cytoplasmique (ICAM-1 ΔCYT), et les deux autres étaient similaires aux deux premiers plasmides mais avec des protéines ICAM-1 couplées à de l'EGFP (enhanced green fluoresence protein). Ces plasmides ont été transfectés dans les cellules CHO-K1, A549 et HaCaT avec les réactifs de transfection JetPRIME (114-15, Polyplus) en suivant les instructions du fabricant. Les réactifs de transfection avec chaque plasmide ont été laissés 24h en contact avec les cellules, puis remplacés par du milieu frais pour 48h supplémentaires. Une sélection à la généticine (G418-11811023, Gibco) a ensuite eu lieu sur une semaine avec les doses limites de G418 retenues expérimentalement. Après sélection à la généticine, les cellules ont été passées sur cymomètre de tri (FACS Melody, BD) afin de procéder à une sélection clonale sur plaque 96 puits. Pour les cellules transfectées avec un plasmide ICAM-1 non couplé à l'EGFP, un marquage a été réalisé par anticorps primaire de souris anti-ICAM-1 (sc-107L, SantaCruz) et anticorps secondaire de chèvre anti-souris couplé en AlexaFluor488 (A11029, Invitrogen). Après enrichissement, les clones cellulaires obtenus ont été vérifiés phénotypiquement avec marquage par le même anticorps primaire anti ICAM-1 et un anticorps secondaire de chèvre anti souris couplé en AlexaFluor555 (A21422, Invitrogen). Les acides nucléiques ont été marqués avec de l'Hoechst 33342 (H3570, Invitrogen) et les images de microscopie à fluorescence ont été acquises sur microscope confocal (Ti2 CSU-W1 Spinning disk, Nikon). Pour les mesures de prolifération cellulaire, les cellules mortes étaient marquées par iodure de propidium (P3566, Life technologies). **Délétion du gène codant pour ICAM-1**

La délétion du gène codant pour ICAM-1 a été effectuée avec deux plasmides achetés chez SantaCruz : le plasmide CRISPR/Cas9 KO ICAM-1/CD54 (sc-400098-KO-2, SantaCruz) permettant l'expression de la protéine CRISPR-Cas9 capable de cibler ICAM-1, et le plasmide HDR ICAM-1/CD54 (sc-400098-HDR-2, SantaCruz) permettant la réparation de l'ADN par recombinaison homologue. La carte de ces deux plasmides commerciaux n'est pas disponible. Une transfection réussie se traduit par l'expression de RFP (red fluoresence protein) et d'un gène de résistance à la puromycine (Annexe 6). La transfection des deux plasmides a été faites dans les cellules A549 et HaCaT avec les réactifs de transfection JetPRIME. Les réactifs de transfection avec les deux plasmides ont été laissés 24h en contact avec les cellules avant ajout du milieu frais aux cellules pour 48h supplémentaires. Une sélection à la puromycine (sc-108071, SantaCruz) a ensuite eu lieu sur une semaine avec les doses limites retenues expérimentalement. Après sélection à la puromycine, les cellules ont été passées sur cymomètre de tri et séparées en fonction de l'expression de la RFP sur plaque 96 puits. Après enrichissement, les clones cellulaires ont été vérifiés phénotypiquement avec les anticorps déjà décrits : primaire anti ICAM-1 et secondaire de chèvre anti souris couplé en AlexaFluor488.

### Production d'Eap recombinante

Construction du plasmide de production d'Eap : Le gène *eap* a été amplifié, sans son peptide signal, avec la Taq polymérase Q5 Hot Start High-Fidelity (M0494S, NEB), à partir de l'ADN chromosomique de la souche de *S. aureus* HG001 et les amorces eap-pTXB1-F et eap-pTXB1-R. Le gène de l'*eap* a été purifié sur gel avec le kit Zymoclean Gel DNA Recovery (D4001, Zymo Research). Le plasmide pTXB1 a été extrait d'une souche de *E. coli* C2987 (C2987H, NEB). Le vecteur ainsi extrait a été linéarisé par PCR avec la Taq polymérase Q5 Hot Start High-Fidelity (M0494S, NEB) et les amorces pTXB1-eap-F et pTXB1-eap-R. Le plasmide pTXB1 contenant le gène *eap* a été construit avec le kit Golden Gate Assembly (E2611, NEB).

Production d'Eap recombinante dans *E. coli* : Le plasmide contenant le gène codant pour l'Eap a été transformé par choc thermique dans la souche de *E. coli* BL21 (C2527H, NEB). 200ml de milieu LB (L3022, Sigma-Aldrich) supplémenté avec 100 µg/ml d'ampicilline (A9393, Sigma-Aldrich) a été inoculé au 1/100 avec un pré culture sur la nuit de la souche d'*E. coli* BL21 contenant le plasmide de production d'Eap. Le bouillon de culture a été incubé à 37°C jusqu'à atteindre une densité optique proche de 0,5. La production de la protéine Eap a ensuite été induite par ajout d'IPTG (I6758, Sigma-Aldrich) à une concentration de 1mM pendant 4 heures. Les bactéries ont ensuite été lysé par sonication et le kit IMPACT™ (E6901S, NEB) a été utilisé selon les recommandations du fournisseur pour purification sur colonne de l'Eap recombinante. Si besoin les cellules était prétraitée avec 40µg/ml d'Eap recombinante

dans du milieu d'infection pendant 30 minutes à 37°C sous 5% de $CO_2$. Le milieu était alors aspiré pour infection des cellules par *S. aureus* comme décrit précédemment.

Table 1. **Annexe 7** : amorces utilisées pour le CRISPR *eap* et la production d'Eap recombinante

| Amorces | Séquence (5' –> 3') |
|---|---|
| eap-pTXB1-F | ATACATATGGCAGCTAAGCCATTAGATAAATCA |
| eap-pTXB1-R | CCCGTGATGCATTTATTTTTTTTTGATTTAGTGTATTGTTTTACATC |
| pTXB1-eap-F | AAAAAATAAATGCATCACGGGAGATG |
| pTXB1-eap-R | GCTTAGCTGCCATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAAC |

## Statistiques

Pour toutes les expériences d'infections sur modèle cellulaire, toutes les conditions expérimentales ont été mesurées 3 fois sur 3 expériences indépendantes. Les figures et les calculs statistiques (Analyse de variance avec comparaison de Dunnett) ont été éffectués avec GraphPad Prism.

# BIBLIOGRAPHIE


Bertling A, Niemann S, Hussain M, Holbrook L, Stanley RG, Brodde MF, *et al.* Staphylococcal extracellular adherence protein induces platelet activation by stimulation of thiol isomerases. Arterioscler Thromb Vasc Biol. août 2012;32(8):1979-90.

Bur S, Preissner KT, Herrmann M, Bischoff M. The *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein promotes bacterial internalization by keratinocytes independent of fibronectin-binding proteins. J Invest Dermatol. août 2013;133(8):2004-12.

Chavakis T, Hussain M, Kanse SM, Peters G, Bretzel RG, Flock JI, *et al. Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. Nat Med. juill 2002;8(7):687-93.

Depardieu F, Bikard D. Gene silencing with CRISPRi in bacteria and optimization of dCas9 expression levels. Methods. 1 févr 2020;172:61-75.

Eisenbeis J, Saffarzadeh M, Peisker H, Jung P, Thewes N, Preissner KT, *et al.* The *Staphylococcus aureus* Extracellular Adherence Protein Eap Is a DNA Binding Protein Capable of Blocking Neutrophil Extracellular Trap Formation. Front Cell Infect Microbiol. 2018;8:235.

Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. Nat Rev Microbiol. janv 2014;12(1):49-62.

Fowler T, Wann ER, Joh D, Johansson S, Foster TJ, Höök M. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. Eur J Cell Biol. oct 2000;79(10):672-9.

Geisbrecht BV, Hamaoka BY, Perman B, Zemla A, Leahy DJ. The crystal structures of EAP domains from *Staphylococcus aureus* reveal an unexpected homology to bacterial superantigens. J Biol Chem. 29 avr 2005;280(17):17243-50.

Graves DT, Milovanova TN. Mucosal Immunity and the FOXO1 Transcription Factors. Front Immunol. 2019;10:2530.

Greve JM, Davis G, Meyer AM, Forte CP, Yost SC, Marlor CW, *et al.* The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. Cell. 10 mars 1989;56(5):839-47.

Grundmeier M, Hussain M, Becker P, Heilmann C, Peters G, Sinha B. Truncation of Fibronectin-Binding Proteins in *Staphylococcus aureus* Strain Newman Leads to Deficient Adherence and Host Cell Invasion Due to Loss of the Cell Wall Anchor Function. Infect Immun. déc 2004;72(12):7155-63.

Grzelkowska-Kowalczyk K, Tokarska J, Grabiec K, Gajewska M, Milewska M, Błaszczyk M. Tumor necrosis factor-α alters integrins and metalloprotease ADAM12 levels and signaling in differentiating myoblasts. Pol J Vet Sci. 2016;19(2):253-9.

Haggar A, Ehrnfelt C, Holgersson J, Flock JI. The extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* inhibits neutrophil binding to endothelial cells. Infect Immun. oct 2004;72(10):6164-7.

Harraghy N, Hussain M, Haggar A, Chavakis T, Sinha B, Herrmann M, *et al.* The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional *Staphylococcus aureus* protein Eap. Microbiology. 2003;149(10):2701-7.

Harraghy N, Kormanec J, Wolz C, Homerova D, Goerke C, Ohlsen K, *et al.* sae is essential for expression of the staphylococcal adhesins Eap and Emp. Microbiology (Reading, Engl). juin 2005;151(Pt 6):1789-800.

Heilmann C. Adhesion mechanisms of staphylococci. Adv Exp Med Biol. 2011;715:105-23.

Hussain M, Becker K, von Eiff C, Schrenzel J, Peters G, Herrmann M. Identification and characterization of a novel 38.5-kilodalton cell surface protein of *Staphylococcus aureus* with extended-spectrum binding activity for extracellular matrix and plasma proteins. J Bacteriol. déc 2001;183(23):6778-86.

Hussain M, Haggar A, Peters G, Chhatwal GS, Herrmann M, Flock JI, *et al.* 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. déc 2008;76(12):5615-23.

Johnson M, Sengupta M, Purves J, Tarrant E, Williams PH, Cockayne A, *et al.* Fur is required for the activation of virulence gene expression through the induction of the sae regulatory system in *Staphylococcus aureus*. Int J Med Microbiol. janv 2011;301(1):44-52.

Josse J, Laurent F, Diot A. Staphylococcal Adhesion and Host Cell Invasion: Fibronectin-Binding and Other Mechanisms. Front Microbiol. 2017;8:2433.

Maurin C, Courrier E, He Z, Rigaill J, Josse J, Laurent F, *et al.* Key Role of Staphylococcal Fibronectin-Binding Proteins During the Initial Stage of *Staphylococcus aureus* Keratitis in Humans. Front Cell Infect Microbiol. 2021;11:745659.

Morgene MF. Modélisation in vitro de la colonisation à *Staphylococcus aureus* ; interactions avec l'infection à rhinovirus [Internet] [Thèse d'université]. Université de Lyon; 2018 [cité 24 avr 2022]. Disponible sur: https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02178370

Morgene MF, Botelho-Nevers E, Grattard F, Pillet S, Berthelot P, Pozzetto B, *et al. Staphylococcus aureus* colonization and non-influenza respiratory viruses: Interactions and synergism mechanisms. Virulence. 2018;9(1):1354-63.

Passariello C, Schippa S, Conti C, Russo P, Poggiali F, Garaci E, *et al.* Rhinoviruses promote internalisation of *Staphylococcus aureus* into non-fully permissive cultured pneumocytes. Microbes Infect. mars 2006;8(3):758-66.

Planet PJ. Life After USA300: The Rise and Fall of a Superbug. J Infect Dis. 15 févr 2017;215(suppl_1):S71-7.

Rigaill J, Morgene MF, Gavid M, Lelonge Y, He Z, Carricajo A, *et al.* Evaluation of the intracellular efficacy of antimicrobial agents used for *Staphylococcus aureus* decolonization in a cell model mimicking nasal colonization. In Copenhagen, DK; 2018.

Scriba TJ, Sierro S, Brown EL, Phillips RE, Sewell AK, Massey RC. The Staphyloccous aureus Eap protein activates expression of proinflammatory cytokines. Infect Immun. mai 2008;76(5):2164-8.

Strobel M, Pförtner H, Tuchscherr L, Völker U, Schmidt F, Kramko N, *et al.* Post-invasion events after infection with *Staphylococcus aureus* are strongly dependent on both the host cell type and the infecting *S. aureus* strain. Clin Microbiol Infect. sept 2016;22(9):799-809.

Takemura A, Nakagawa I, Kawai S, Inaba H, Kato T, Hamada S, *et al.* Inhibitory effects of tumor necrosis factor-alpha on migration of human periodontal ligament cells. J Periodontol. mai 2006;77(5):883-90.

Winther B, Arruda E, Witek TJ, Marlin SD, Tsianco MM, Innes DJ, *et al.* Expression of ICAM-1 in nasal epithelium and levels of soluble ICAM-1 in nasal lavage fluid during human experimental rhinovirus infection. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. févr 2002;128(2):131-6.

# Chapitre 3 : Evaluation de l'activité intracellulaire des traitements pour la decolonisation des porteurs de *Staphylococcus aureus*

La décolonisation nasale à *S. aureus* repose sur l'utilisation d'antibiotiques avec en première ligne l'application par voir topique de mupirocine. La résistance à la mupirocine est rare et malgré une excellente efficacité apparente du traitement, les recolonisations précoces à *S. aureus* sont fréquentes. Ainsi, quelques mois après l'arrêt du traitement, la majorité des patients sont à nouveau porteurs de leurs souches initiales de colonisation. Une recolonisation à partir d'un réservoir dormant de bactérie intracellulaire étant une hypothèse possible, l'objectif de ce travail était d'étudier l'efficacité intracellulaire des principales molécules utilisées pour la décolonisation nasale à *S. aureus* (Article 3).

Nous avons utilisé un modèle de kératinocytes (cellules HaCaT) mimant le réservoir de *S. aureus* présent au niveau du vestibule nasal. Une vingtaine de molécules ayant été utilisée dans le cadre de la décolonisation nasale à *S. aureus* ont été testées. Leurs capacités à faire diminuer la charge intracellulaire de la souche de *S. aureus* ATCC29213 a été évaluée. Pour cela, la quantité de bactérie internalisée était mesurée après 24h d'incubation en présence de la molécule à tester et de lysostaphine. Cette valeur était alors comparée à celle des puits témoins uniquement traités à la lysostaphine, cette dernière n'ayant aucune activité intracellulaire. Les molécules testées ont été utilisées aux concentrations décrites dans la littérature. Il en ressort que les quinolones (Ciprofloxacine, Moxifloxacine et Lévofloxacine) et la Rifampicine ont une excellente activité intracellulaire sur ce modèle. En revanche, la mupirocine et la majorité des molécules testées n'ont que très peu d'activité sur le réservoir intracellulaire de *S. aureus*. En raison de sa grande toxicité cellulaire, il n'a pas été possible d'évaluer l'activité de la povidone iodée.

Cette étude est la première à évaluer l'efficacité intracellulaire des molécules antimicrobienne pour la décolonisation nasale de *S. aureus*. Si certaines des molécules testées ont une excellente activité intracellulaire, le risque majeur de sélection de résistance aux antibiotiques fait que leurs utilisations doivent se limiter à la prise en charge des infections avérées. Ces résultats soulignent encore l'importance d'explorer le réservoir intracellulaire dans la colonisation nasale par *S. aureus* et de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques capable de cibler ces bactéries.

# Article 3

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

---

**Josselin RIGAILL***[1,2], Mohamed Fedy MORGENE[2], Marie GAVID[3], Yann LELONGE[3], Zhiguo HE[4], Anne CARRICAJO[1,2], Florence GRATTARD[1,2], Bruno POZZETTO[1,2], Philippe BERTHELOT[1,5], Elisabeth BOTHELO-NEVERS[1,5], Paul O. VERHOEVEN[1,2]

[1] CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, GIMAP team, University of Lyon, INSERM U1111, CNRS, UMR5308, ENS Lyon, UCBL1, University of St-Etienne, France

[2] Department of Infectious Agents and Hygiene, University Hospital of St-Etienne, St-Etienne, France

[3] Department of Ear Nose Throat Surgery, University Hospital of St-Etienne, St-Etienne, France

[4] Corneal Graft Biology, Engineering and Imaging Laboratory (BiiGC), EA2521, University of St-Etienne, France

[5] Department of Infectious Diseases, University Hospital of St-Etienne, St-Etienne, France

Publié le 16 Aout 2018

**Journal of Antimicrobial Chemotherapy: JAC** (73), 73(11):3044-3048, doi: 10.1093/jac/dky318.

J Antimicrob Chemother
doi:10.1093/jac/dky318

Journal of Antimicrobial Chemotherapy

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

**J. Rigaill[1,2], M. F. Morgene[2], M. Gavid[3], Y. Lelonge[3], Z. He[4], A. Carricajo[1,2], F. Grattard[1,2], B. Pozzetto[1,2], P. Berthelot[1,5], E. Botelho-Nevers[1,5] and P. O. Verhoeven[1,2]***

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

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

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

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

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

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

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

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

## Introduction

Previously considered as an exclusive extracellular bacterium, *Staphylococcus aureus* has been shown to be able to invade many non-professional phagocytes cells, such as keratinocytes, osteoblasts, fibroblasts and epithelial and endothelial cells.[1] The intracellular *S. aureus* localization has been well described in nasal colonization of patients suffering from chronic rhinosinusitis and more recently in nasal healthy carriers.[2–5] Intracellular *S. aureus* cells are localized in both the upper and lower layers of the nasal epithelium of healthy individuals; they are mainly found in the stratum corneum of the vestibulum nasi.[5] Intracellular localization protects *S. aureus* from the immune system and most antimicrobial treatments.[6–8] It has been described in models of osteomyelitis and seems to be associated with chronic infection.[9] The impact of the intracellular reservoir on colonization has not been yet studied. However, current strategies of decolonization, mainly based on mupirocin nasal ointment, have been associated with failure or early recolonization within a few months.[10,11] For instance, 39% of nursing home residents who were decolonized carried *S. aureus* again after 90 days; 86% of them carried their initial strain.[12]

This study aimed to determine the intracellular efficacy of the most common antimicrobial agents administered in patients for

© *The Author(s) 2018. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved. For permissions, please email: journals.permissions@oup.com.*

*S. aureus* nasal decolonization,[13] using a cell model mimicking the squamous epithelium of the vestibulum nasi.

## Methods

### *Internalization of S. aureus in HaCaT cells*

HaCaT cells (reference 300493, Cell Lines Service, Germany) (spontaneously immortalized human keratinocytes) were grown in 50% DMEM (Sigma–Aldrich, France) and 50% RMPI-1640 (Sigma–Aldrich) at 37°C under 5% $CO_2$. HaCaT cells were seeded into 24-well plates at 100000 cells/well and incubated until confluence, corresponding to $10^6$ cells/well. Twenty-four hours prior to inoculation, confluent cells were washed with PBS and incubated in RPMI-1640 (Sigma–Aldrich) supplemented with 10% FBS (Biowest, USA) and 5 g/L ferric sulphate hydrate (Sigma–Aldrich). Cells were inoculated with *S. aureus* ATCC 29213[14] at an moi of 1 for 2 h at 37°C. Non-adherent bacteria were removed by PBS washing and the remaining extracellular bacteria were disrupted by 1 h of incubation with 10 μg/mL lysostaphin (Ambi Products LLC, USA).

### *Visualization of intracellular S. aureus cells by confocal laser scanning microscopy (CLSM)*

HaCaT cells were grown in chamber slides (Falcon CultureSlides, Corning, France) and inoculated with a GFP-expressing *S. aureus* ATCC 29213 strain as described above. Human nasal epithelial cells (HNECs) were recovered from nasal swabs of *S. aureus* carriers enrolled in a cohort of 95 patients undergoing otorhinolaryngology surgery at the University Hospital of St-Etienne, France. Nasal swabs (eSwab, Copan, Italy) were incubated with 10 μg/mL lysostaphin for 1 h to disrupt extracellular *S. aureus*. HNECs were spotted on Cytospin slides (Shandon Single Cytoslides, Thermo Fisher Scientific). The cells were fixed in 4% formaldehyde solution and permeabilized in 0.5% Triton X-100.

### *Effect of antimicrobials on intracellular S. aureus*

After incubation of HaCaT cells with lysostaphin, 21 different antimicrobial compounds were added (chlorhexidine, ciprofloxacin, clindamycin, cloxacillin, co-trimoxazole, daptomycin, doxycycline, fusidic acid, gentamicin, levofloxacin, linezolid, minocycline, moxifloxacin, mupirocin, neomycin, oxacillin, povidone-iodine, rifampicin, tedizolid, tigecycline and vancomycin) at the concentration usually reached in human serum for non-topical compounds (Table S1, available as Supplementary data at *JAC* Online). After 24 h of contact with antimicrobial compounds and lysostaphin, cells were washed three times with PBS and lysed with a solution containing 0.25% trypsin/EDTA (Sigma–Aldrich) and 0.25% Triton X-100 in sterile water. Cell lysates were streaked on blood agar using an automatic plater (Easyspiral Dilute, Interscience, France). The *S. aureus* intracellular load was quantified with a colony counter (Scan 1200, Interscience). Controls (i.e. cells incubated with lysostaphin only) were added to each plate. Each antimicrobial compound was tested in triplicate in two independent experiments. The decrease in *S. aureus* intracellular load obtained for each compound was calculated with reference to that obtained for the above cell control.

### *Cytotoxicity assay*

Lactate dehydrogenase (LDH) activity was quantified in cell supernatants after 24 h of incubation with each antimicrobial compound by using the Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific).

### *Statistics*

*S. aureus* intracellular loads after incubation with antimicrobials were compared by one-way ANOVA followed by the Dunnett multicomparison test with reference to controls by using GraphPad Prism v7 (GraphPad Software, USA). *P* values <5% were considered statistically significant.

### *Ethics*

This study was approved by an institutional review board and by the National Security Agency of Medicine and Health Products (NCT02595112). All the patients signed an inform consent form.

## Results

The HaCaT cell model was used to assess the intracellular activity of antimicrobial compounds used for the decolonization of *S. aureus* nasal carriers. To validate this model, HaCaT cells inoculated with *S. aureus* and HNECs recovered from *S. aureus* nasal carriers were directly observed by CLSM (Figure 1). Among 31 *S. aureus* nasal carriers, 5 (16.1%) were found to harbour intracellular *S. aureus* inside HNECs. CLSM showed that *S. aureus* cells were internalized in a limited number of cells and that several *S. aureus* cells could be found within a single cell, as depicted in Figure 1(a) for one of these patients. In the HaCaT cell model, the same pattern of *S. aureus* cell host internalization was observed with several *S. aureus* cells inside a single cell (Figure 1b).

Accordingly, 21 antimicrobial compounds were tested in the HaCaT cell model inoculated with the *S. aureus* ATCC 29213 strain. This strain was susceptible to all the tested compounds in cell culture medium (data not shown). In lysostaphin-treated HaCaT cells used as a positive control, the mean (SD) intracellular *S. aureus* load was 4.02 (0.48) log cfu/$10^6$ cells, corresponding to an internalization rate of 1%. None of the antimicrobial concentrations used in these experiments induced cell toxicity, with the exception of povidone-iodine (data not shown). The decrease in intracellular *S. aureus* load was compared with that of cells treated with lysostaphin only; results obtained with the 20 non-toxic antimicrobial compounds incubated for 24 h in the presence of lysostaphin are depicted in Figure 2. The intracellular load was decreased by 0.43 (9.6), 0.52 (15.6), 0.55 (16.9), 0.58 (17.0), 0.88 (19.2), 1.46 (31.9), 1.54 (33.7) and 1.66 (36.4) log cfu/$10^6$ cells (%) after fusidic acid, clindamycin, linezolid, minocycline, ciprofloxacin, moxifloxacin, rifampicin and levofloxacin treatment, respectively ($P < 0.001$). By contrast, daptomycin, vancomycin, oxacillin, gentamicin, neomycin, tedizolid, tigecycline, co-trimoxazole, cloxacillin, mupirocin, doxycycline and chlorhexidine (listed in order of increasing efficacy) induced a decrease in *S. aureus* intracellular load ranging from 0.05 (0.1) to 0.24 (8.0) log cfu/$10^6$ cells (%). It is worth noting that mupirocin led to a reduction of the intracellular load of 0.19 (4.9) log cfu/$10^6$ cells (%) (Figure 2). It was verified that FBS had no direct inhibitory effect on the topical agents tested (data not shown).

## Discussion

*Ex vivo* imaging by CLSM of nasal samples taken from *S. aureus* nasal carriers demonstrates that HNECs internalize *S. aureus* during mucosal colonization. An intracellular reservoir of *S. aureus* was found in 16% of the nasal carriers tested in this study. Hanssen *et al.*[5] also reported intracellular *S. aureus* in nasal biopsies of approximately one-third (13/39) of carriers in the Tromsø study. As shown in Figure 1(a), intracellular bacteria were mainly located within non-nucleated flattened cells (i.e. mature keratinocytes), which is consistent with previous results showing that, in nasal

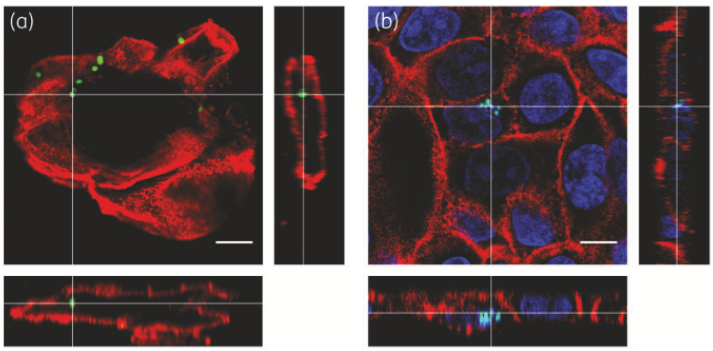



**Figure 1.** Highlighting of intracellular *S. aureus* in HNECs recovered from a nasal swab (a) and cultured HaCaT cells (b). The outlines of cells are depicted in red, nucleic acids in blue and *S. aureus* in green. Scale bars represent 10 µm. Image stacks were acquired by using a FluoView FV1200 confocal laser scanning microscope equipped with a UPlanSApo 60×/1.35 Oil [infinity]/0.17 FN26.5 objective and FV10-ASW4.1 software (Olympus, Tokyo, Japan). (a) Inside HNECs, *S. aureus* cells were labelled by indirect immunofluorescence using polyclonal rabbit anti-*S. aureus* antibody (Thermo Fisher Scientific) as primary antibody (20 µg/mL overnight at 4°C) and goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488-conjugated antibody (Thermo Fisher Scientific) as second antibody (4 µg/mL for 1 h at room temperature). DiIC18(3) and TO-PRO-3 (Thermo Fisher Scientific) were used for membrane and nuclear staining of HNECs, respectively (no nucleus is apparent as the observed cell is supposed to be a corneocyte). (b) A GFP-expressing *S. aureus* ATCC 29213 strain was used in the HaCaT cell model. Acti-stain 555 phalloidin (cytoskeleton) and TO-PRO-3 (Thermo Fisher Scientific) were used for actin and nuclear staining of HaCaT, respectively.

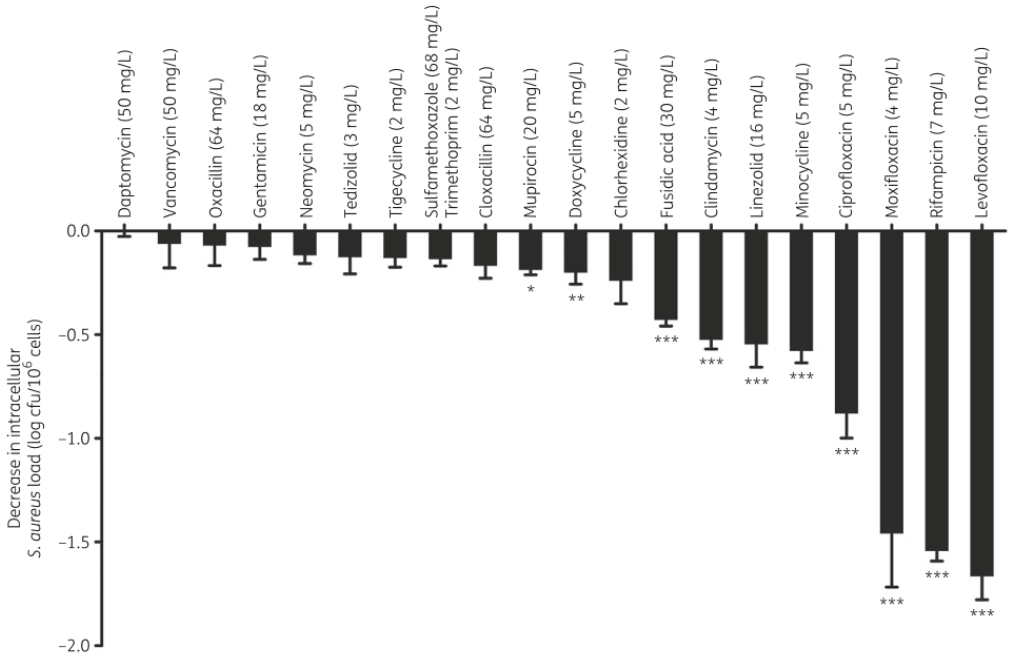



**Figure 2.** Impact of antimicrobial compounds on intracellular *S. aureus* load in HaCaT cells. Bars represent the mean with standard error of six values. The decrease in intracellular *S. aureus* load was compared with the lysostaphin control set to zero (*$P < 0.05$; **$P < 0.01$; ***$P < 0.001$).

biopsies, *S. aureus* was mostly found in the stratum corneum.[5] In the HaCaT model consisting of 5 day-old keratinocytes, *S. aureus* cells were internalized following the pattern of those observed in *ex vivo* HNECs (Figure 1b). Thus, the HaCaT cell model was found to be suitable for studying the antistaphylococcal intracellular activity of various antimicrobial compounds, including those currently used for *S. aureus* decolonization.

Despite the fact that little is known about the clinical impact of the intracellular reservoir on nasal colonization by *S. aureus*, this study highlights the lack of efficiency of mupirocin for reducing *S. aureus* intracellular load in HaCaT cells. To our best knowledge, mupirocin, although one of the most frequently used antimicrobial decolonization agents,[13] has not been previously tested on intracellular *S. aureus*. According to our results, we may hypothesize that failure of decolonization or early recolonization observed after mupirocin treatment could be related to this intracellular reservoir.[12] Regarding povidone-iodine, it was not possible to measure intracellular activity as this compound was cytotoxic in our model, as previously described.[15] It has been shown that povidone-iodine is inactive in nasal secretions[16] and lacked efficiency for decolonizing patients undergoing surgery.[17]

Furthermore, most of the systemic antimicrobial compounds tested in this study were not able to strongly reduce intracellular *S. aureus* load, reflecting the difficulty in reaching an intracellular concentration high enough to be truly effective.[18] Moreover, we could hypothesize that the experimental concentrations used in our study might have been higher than the nasal concentrations obtained during systemic treatment in patients. Among antimicrobials that have been used for *S. aureus* decolonization[13] and tested here, only fusidic acid, minocycline, linezolid, clindamycin, rifampicin, ciprofloxacin, moxifloxacin and levofloxacin were found able to reduce *S. aureus* intracellular load inside HaCaT cells. Similar results have been described for osteoblasts.[8] By contrast, tigecycline and oxacillin, which were found effective within osteoblasts,[8] had almost no effect inside HaCaT cells. Oxacillin, vancomycin, gentamicin and trimethoprim/sulfamethoxazole were also found to have no intracellular activity inside murine keratinocytes (PAM212) and fibroblasts (mKSA).[19] Although some systemic antimicrobials are effective in killing intracellular *S. aureus*, their use for decolonization could not be recommended because of rapid emergence of resistance.[8,20]

In conclusion, use of the HaCaT cell model showed that the *S. aureus* intracellular reservoir is not reduced by many antimicrobial compounds used for the decolonization of nares, including mupirocin. Further studies are needed to assess whether decolonization failure and early recolonization may be due to the *in vivo* nasal intracellular reservoir observed in a proportion of *S. aureus* nasal carriers.

## Acknowledgements

The staff of the Department of Ear Nose Throat Surgery of the University Hospital of St-Etienne, France, are acknowledged for their participation in the enrolment of patients.

## Funding

This study was supported by internal funding from the Faculty of Medicine, Jean Monnet University, University of Lyon, and was promoted by the University Hospital of St-Etienne.

## Transparency declarations

None to declare.

## Supplementary data

Table S1 is available as Supplementary data at *JAC* Online.

## References

**1** Strobel M, Pförtner H, Tuchscherr L *et al*. Post-invasion events after infection with *Staphylococcus aureus* are strongly dependent on both the host cell type and the infecting *S. aureus* strain. *Clin Microbiol Infect* 2016; **22**: 799–809.

**2** Clement S, Vaudaux P, Francois P *et al*. Evidence of an intracellular reservoir in the nasal mucosa of patients with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis. *J Infect Dis* 2005; **192**: 1023–8.

**3** Plouin-Gaudon I, Clement S, Huggler E *et al*. Intracellular residency is frequently associated with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis. *Rhinology* 2006; **44**: 249–54.

**4** Ou J, Drilling A, Singhal D *et al*. Association of intracellular *Staphylococcus aureus* with prognosis in chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol* 2016; **6**: 792–9.

**5** Hanssen A-M, Kindlund B, Stenklev NC *et al*. Localization of *Staphylococcus aureus* in tissue from the nasal vestibule in healthy carriers. *BMC Microbiol* 2017; **17**: 89.

**6** Ellington JK, Harris M, Hudson MC *et al*. Intracellular *Staphylococcus aureus* and antibiotic resistance: implications for treatment of staphylococcal osteomyelitis. *J Orthop Res* 2006; **24**: 87–93.

**7** Tuchscherr L, Medina E, Hussain M *et al*. *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Mol Med* 2011; **3**: 129–41.

**8** Valour F, Trouillet-Assant S, Riffard N *et al*. Antimicrobial activity against intraosteoblastic *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 2029–36.

**9** Ellington JK, Harris M, Webb L *et al*. Intracellular *Staphylococcus aureus*. A mechanism for the indolence of osteomyelitis. *J Bone Joint Surg Br* 2003; **85**: 918–21.

**10** Coates T, Bax R, Coates A. Nasal decolonization of *Staphylococcus aureus* with mupirocin: strengths, weaknesses and future prospects. *J Antimicrob Chemother* 2009; **64**: 9–15.

**11** Doebbeling BN, Reagan DR, Pfaller MA *et al*. Long-term efficacy of intranasal mupirocin ointment. *Arch Intern Med* 1994; **154**: 1505–8.

**12** Mody L, Kauffman CA, McNeil SA *et al*. Mupirocin-based decolonization of *Staphylococcus aureus* carriers in residents of 2 long-term care facilities: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Infect Dis* 2003; **37**: 1467–74.

**13** Simor AE. Staphylococcal decolonisation: an effective strategy for prevention of infection? *Lancet Infect Dis* 2011; **11**: 952–62.

**14** Soni I, Chakrapani H, Chopra S. Draft genome sequence of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. *Genome Announc* 2015; **3**: e01095-15.

**15** Wilson JR, Mills JG, Prather ID *et al*. A toxicity index of skin and wound cleansers used on in vitro fibroblasts and keratinocytes. *Adv Skin Wound Care* 2005; **18**: 373–8.

**16** Hill RL, Casewell MW. The in-vitro activity of povidone-iodine cream against *Staphylococcus aureus* and its bioavailability in nasal secretions. *J Hosp Infect* 2000; **45**: 198–205.

**17** Rezapoor M, Nicholson T, Tabatabaee RM *et al*. Povidone-iodine-based solutions for decolonization of nasal *Staphylococcus aureus*: a randomized, prospective, placebo-controlled study. *J Arthroplasty* 2017; **32**: 2815–9.

**18** Van Bambeke F, Barcia-Macay M, Lemaire S *et al*. Cellular pharmacodynamics and pharmacokinetics of antibiotics: current views and perspectives. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2006; **9**: 218–30.

**19** Krut O, Sommer H, Krönke M. Antibiotic-induced persistence of cytotoxic *Staphylococcus aureus* in non-phagocytic cells. *J Antimicrob Chemother* 2004; **53**: 167–73.

**20** Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 1997; **10**: 505–20.

## Supplementary data

**Table S1.** Listing of antimicrobial compounds tested on HaCaT cells with the concentration used in the study

| Antimicrobial class | Compound | Supplier | Used concentration on HaCaT (mg/L) | Reference plasmatic concentration (mg/L) | MIC (mg/L) | Bibliographic source for plasmatic concentration |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Aminoglycoside | Gentamicin | Sigma Aldrich | 18 | 18 | 0.25-0.5 | Nguyen HA *et al.* Antimicrob Agents Chemother 2009;53:1434-42 |
| | Neomycin | Sigma Aldrich | 5 | 5-10 | 0.5 | Toxicology of Skin; CRC Press, mars 2001: 279 |
| Carbolic acid | Mupirocin | Sigma Aldrich | 20 | Topical use | 0.50 | Irrelevant |
| Cyclic lipopeptide | Daptomycin | Alsachim | 50 | 57 | 0.25-0.5 | Nguyen HA *et al.* Antimicrob Agents Chemother 2009;53:1434-42 |
| Fluoroquinolone | Moxifloxacin | Alsachim | 4 | 4 | 0.03-0.06 | Nguyen HA *et al.* Antimicrob Agents Chemother 2009;53:1434-42 |
| | Ciprofloxacin | Alsachim | 5 | 1.9-15.4 | 0.25 | Forrest A *et al.* Antimicrob Agents Chemother 1993;37:1073-81 |
| | Levofloxacin | Alsachim | 10 | 7.5-13 | 0.12-0.25 | Lee SJ *et al.* J Chromatogr Analyt Technol Biomed Life Sci 2016;1009-1010:138-43 |
| Fusidane | Fusidic acid | Alsachim | 30 | 30 | 0.12 | Nguyen HA *et al.* Antimicrob Agents Chemother 2009;53:1434-42 |
| Glycopeptide | Vancomycin | Sigma Aldrich | 50 | 50 | 1 | Nguyen HA *et al.* Antimicrob Agents Chemother 2009;53:1434-42 |
| Glycylcycline | Tigecycline | Alsachim | 2 | 0.2-1.5 | 0.06-0.12 | Valour F *et al.* Antimicrob Agents Chemother 2015;59:2029-36 |
| Lincosamide | Clindamycin | Sigma Aldrich | 4 | 4 | 0.12 | Nguyen HA *et al.* Antimicrob Agents Chemother 2009;53:1434-42 |
| Oxazolidinone | Linezolid | Alsachim | 16 | 16 | 2 | Nguyen HA *et al.* Antimicrob Agents Chemother 2009;53:1434-42 |
| | Tedizolid | Alsachim | 3 | 2.6 | 0.5 | Rybak JM *et al.* 2015 |
| Penicillin | Oxacillin | Sigma Aldrich | 64 | 64 | 0.25 | Nguyen HA *et al.* Antimicrob Agents Chemother 2009;53:1434-42 |
| | Cloxacillin | Sigma Aldrich | 64 | 11.3-96.2 | 0.25 | Aberg B *et al.* Scand J Thorac Cardiovasc Surg 1989;23:69-73 |
| Tetracycline | Doxycycline | Sigma Aldrich | 5 | 5-5 | 0.25 | The Chemical Society. Foreign Compound Metabolism in Mammals Vol 3. London: The Chemical Society, 1975: p. 174 |
| | Minocycline | Sigma Aldrich | 5 | 2.52-6.63 | 0.15-0.25 | FDA, NDA 50-444/S-047 |
| Others | Rifampicin | Sigma Aldrich | 7 | 10–30 | 0.008 | Valour F *et al.* Antimicrob Agents Chemother 2015;59:2029-36 |
| | Co-trimoxazole | Alsachim | | | | |
| | - sulfamethoxazole | | 60 | 68 | 9.5 | Kremers P *et al.* J Clin Pharmacol 1974;14:112-7 |
| | - trimethoprim | | 2 | 2 | <0.5 | |
| Antiseptics | Chlorhexidine | Sigma Aldrich | 2 | Topical use | <1 | Irrelevant |
| | Povidone iodine | Sigma Aldrich | 1.5 | Topical use | 2 | Irrelevant |

# Chapitre 4 : Etude du microbiote et des compétitions microbiennes au cours de la colonisation nasale à *Staphylococcus aureus*

## INTRODUCTION

La colonisation nasale par *Staphylococcus aureus* est un facteur de risque majeur d'infection par la bactérie. Dans la majorité des cas ces infections sont d'origine endogène, la souche de colonisation étant directement responsable de l'infection (Wertheim *et al.* 2004; Gagnaire *et al.* 2019). Afin de réduire ce risque, le dépistage du portage et la décolonisation nasale sont proposés dans certaines populations à risque et notamment en chirurgie (Bode *et al.* 2010; Verhoeven *et al.* 2014). Les stratégies actuelles de décolonisation reposent essentiellement sur l'utilisation de mupirocine, antibiotique à utilisation topique. Ce traitement apporte une protection significative contre la survenue d'infection du site opératoire, à bactéries gram positives et plus particulièrement contre *S. aureus* (Bode *et al.* 2010; Schweizer *et al.* 2013). Bien que rare, la résistance à la mupirocine expose au risque d'échec de la décolonisation (Vasquez *et al.* 2000; Pérez-Fontán *et al.* 2002) et le taux de souches résistantes à la mupirocine augmente avec la consommation (Miller *et al.* 1996; Lee *et al.* 2011). De plus, chez les patients colonisés avec une souche de *S. aureus* sensible à la mupirocine, plus de la moitié des patients étaient à nouveau porteurs de la bactérie dans les mois qui suivent l'arrêt du traitement par mupirocine (Doebbeling *et al.* 1994; Bommer *et al.* 1995). La souche de colonisation initiale en était responsable dans 86% des cas (Mody *et al.* 2015). La persistance de la bactérie dans d'autres sites de colonisation non traités où l'absence d'activité de la mupirocine sur le réservoir intracellulaire de *S. aureus* pourraient expliquer une partie de cas de recolonisation précoce (Rigaill *et al.* 2018). Nous avons émis l'hypothèse qu'une décolonisation à long terme pourrait alors être obtenue par le maintien d'une pression de sélection empêchant la réimplantation de *S. aureus* à l'arrêt du traitement antibiotique dont l'utilisation doit être temporaire. Une meilleure compréhension des mécanismes régissant la colonisation nasale par *S. aureus* est nécessaire pour améliorer les stratégies thérapeutiques de décolonisation.

De nombreux facteurs qui prédisposent au portage nasal de *S. aureus* ont été décrits (Sakr *et al.* 2018) mais les facteurs de l'hôte ne permettent pas d' expliquer, à eux seuls, les différences observées entre individus. Le microbiote nasal joue un rôle majeur dans la colonisation à *S. aureus,* la composition de flore bactérienne étant le reflet des interactions entre microorganismes qui luttent pour persister au niveau de la muqueuse nasale (Krismer *et al.* 2017). Une revue a décrit les conditions de la vie

commensale de *S. aureus* et ses interactions avec le reste du microbiote nasal (Krismer *et al.* 2017). Quatre formes principales de compétitions ont été décrites pour (i) l'acquisition des nutriments dans un environnement nasal pauvre, (ii) l'adhésion à la muqueuse afin de lutter contre la clairance nasale, (iii) l'induction et la survie aux défenses de l'hôte, et (iv) l'interaction directe entre microorganismes par production de peptides antimicrobiens, les bactériocines.

La démocratisation des outils de séquençage haut débit a rendu possible la multiplication du nombre d'études sur le microbiote nasal et sur la place de *S. aureus* dans ce dernier (Frank *et al.* 2010; Liu *et al.* 2015; Khamash *et al.* 2019). La présence de certaines bactéries a été décrite comme négativement associée à la présence de *S. aureus* et des compétitions entre certaines souches ont été montrées *in vitro* (Yan *et al.* 2013). L'identification des souches bactériennes capables d'inhiber *S. aureus* in vivo est nécessaire pour ouvrir la voie aux thérapies de remplacement du microbiote nasal pour la décolonisation nasale des porteurs de *S. aureus*.

L'objectif de ce travail était d'évaluer, sur la base de données issues du microbiote nasal de patients porteurs ou non de *S. aureus*, le potentiel *in vitro* de certaines souches bactériennes à lutter contre la colonisation par *S. aureus.*

La composition moyenne du microbiote du vestibule (V), du récessus sphéno-ethmoïdal (S) et du nasopharynx (N), indépendamment du statut de portage à *S. aureus,* est présentée à la **Figure 1**. Le microbiote du vestibule est largement dominé par les phylums Firmicutes (*Staphylococcus*, *Streptococcus* et *Dolosigranulum*) et Actinobacteria (*Corynebactrium*, *Cutibacterium* et *Rothia*) qui représentent respectivement environ 42% et 39% des séquences obtenues. L'abondance relative (AR) de ces deux phylums est similaire au niveau du récessus sphéno-ethmoïdal (38% pour les Firmicutes et 39% pour les Actinobacteria). Avec une AR de 16%, une augmentation importante des Proteobacteria (*Moraxella*, *Neisseria* et *Haemophilus*) est à noter avec une AR au niveau du récessus sphéno-ethmoïdal. Le microbiote du récessus sphéno-ethmoïdal représente une flore de transition avec le nasopharynx dont le microbiote est marqué par une AR plus élevée en Proteobacteria (25%) associée à une diminution de l'AR des Actinobacteria autour de 15% des séquences obtenues. L'AR des Firmicutes reste relativement stable autour de 44% au niveau du nasopharynx. Ces résultats ont montré qu'il existe un continuum dans la composition de la flore entre le vestibule et le nasopharynx (confirmés sur des modèles de régressions linéaires à effets mixtes non présentés). La composition moyenne du microbiote des différents sites anatomiques, en fonction du statut de portage à *S. aureus*, est disponible en **Annexe 1**.

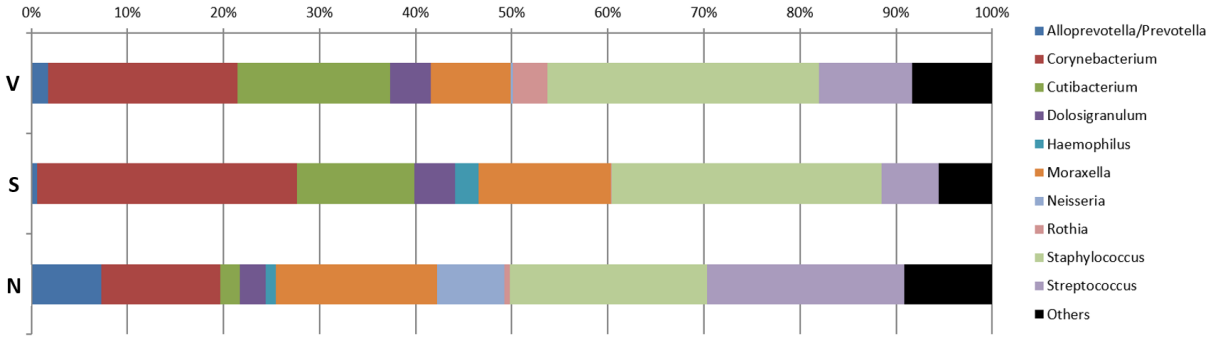



**Figure 1** : Composition moyenne du microbiote nasal des différents sites prélevés

Malgré une différence de la composition du microbiote entre le vestibule et le nasopharynx, la **Figure 2** montre que ces 3 sites anatomiques sont avant tout colonisés par un microbiote de base (« core microbiome ») assez similaire. Indépendamment du site de prélèvement, le « core microbiome » est composé des genres bactériens suivants : *Staphylococcus* (AR de 24,3%), *Corynebacterium* (18,0%), *Streptococcus* (12,8%) et *Cutibacterium* (10,7%). Lorsque que les séquences de *S. aureus* sont éliminées

de l'analyse, la comparaison par DPCoA montre que le microbiote des patients porteurs persistants de *S. aureus* partage un « core microbiome » commun avec les patients non porteurs (**Figure 3**).

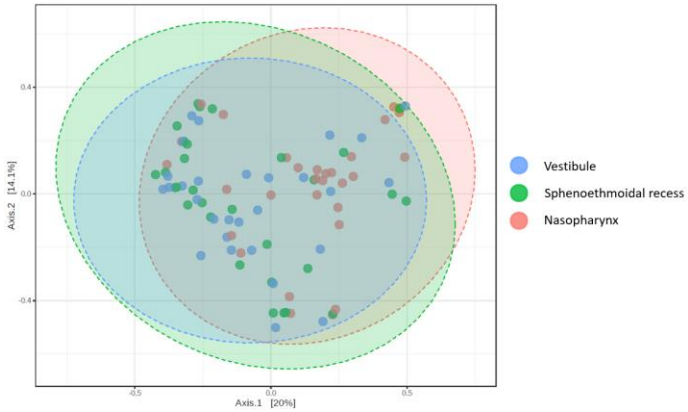



**Figure 2** : DPCoA des flores bactériennes issues de chaque site de prélèvement nasal.

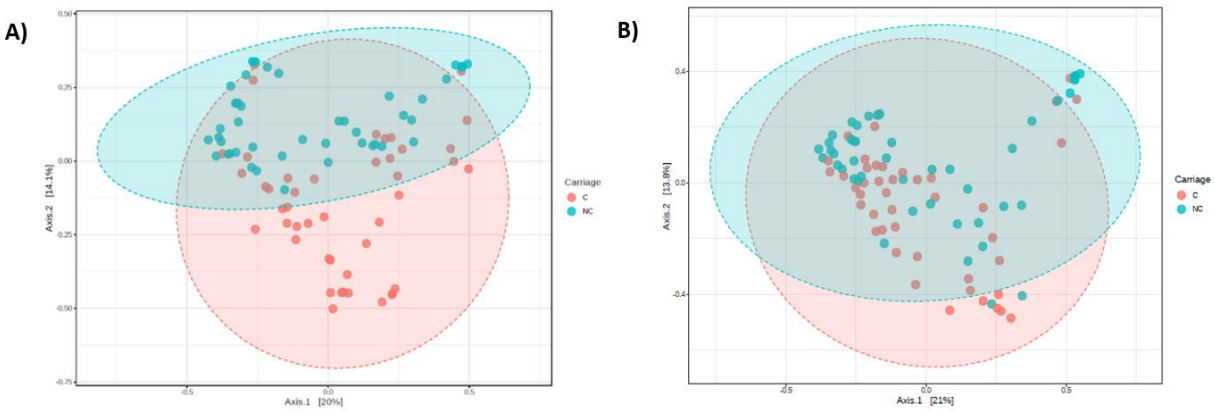



**Figure 3** : DPCoA des flores bactériennes des patients porteurs ou non de *S. aureus* en incluant toutes les séquences 16S dans l'analyse (A) et en excluant les séquences de *S. aureus* l'analyse (B).

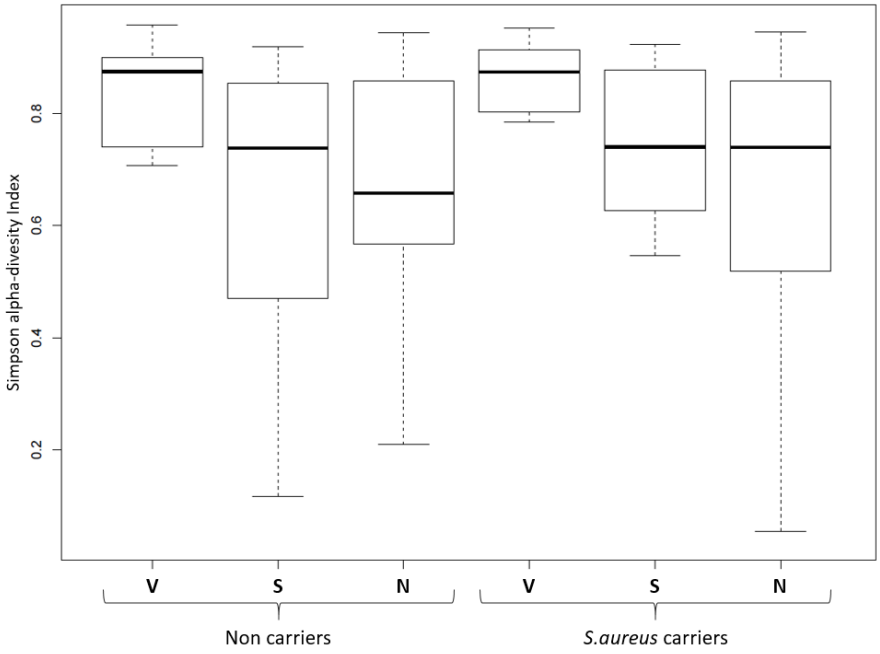


**Figure 4** : Comparaison de la diversité bactérienne en fonction du site de prélèvement et du statut de portage à *S. aureus*. V : Vestibule ; S : récessus sphéno-ethmoïdal ; N : nasopharynx.

La diversité alpha mesurée par l'index de Simpson (**Figure 4**) montre une diversité des séquences obtenues au niveau du vestibule (V) plus importante qu'au niveau du récessus sphéno-ethmoïdal (S), elle-même très légèrement supérieure à celle du nasopharynx (N). Aucune différence significative n'a été observée entre le groupe des porteurs de *S. aureus* et celui des non porteurs. La diversité importante mesurée au niveau du vestibule peut s'expliquer par la position de ce site anatomique qui est soumis aux échanges directs avec l'environnement extérieur.

Chez les patients porteurs persistants de *S. aureus*, le genre *Staphylococcus* est le plus représenté avec environ 44% de ces séquences attribuables à l'espèce *S. aureus*, indépendamment du site de prélèvement (**Figure 5A**). Chez les patients non porteurs, la flore nasale est majoritairement constituée par le genre *Corynebacterium* (**Figure 5B**). Quel que soit le statut de portage, les genres *Cutibacterium* et *Streptococcus* représentent une part importante du microbiote nasal.

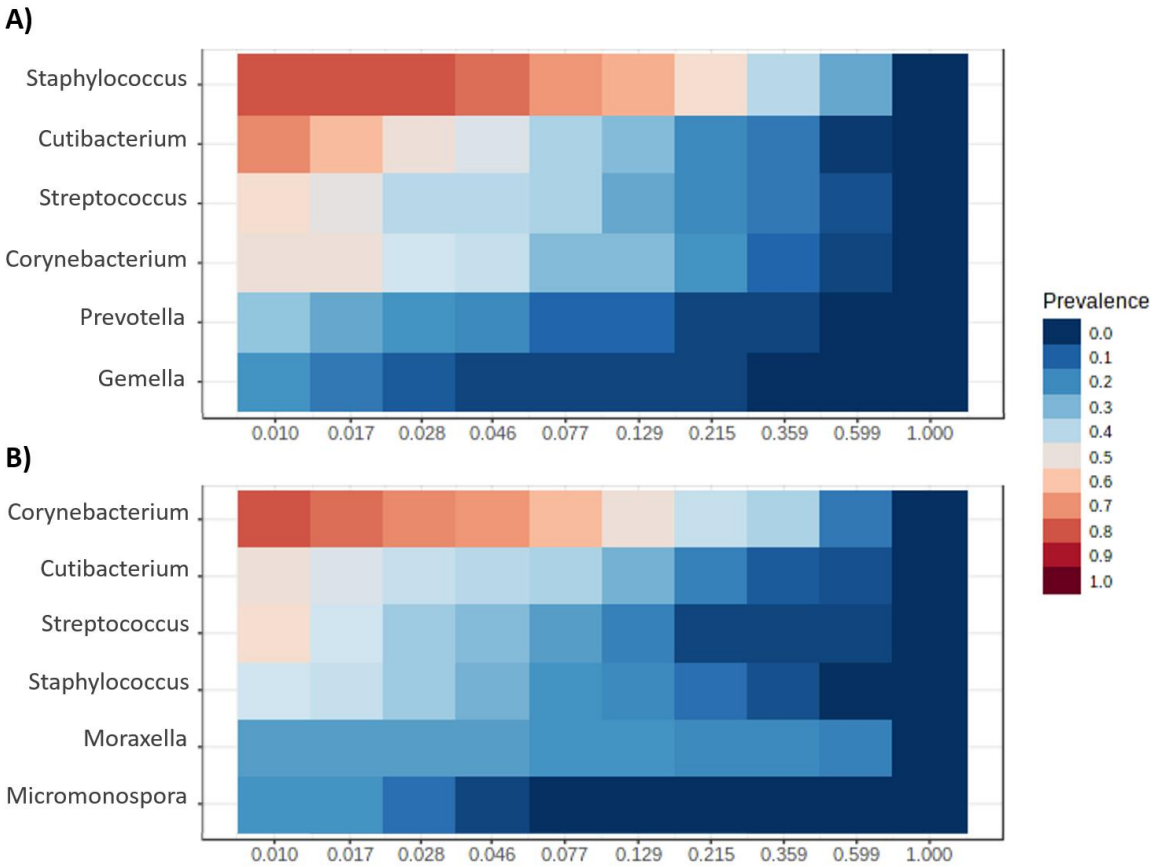



**Figure 5** : Prévalence des différents genres bactériens chez les patients porteurs (A) et non porteurs persistants de *S. aureus* (B)

Alors qu'il ne représente que 7,4% des séquences obtenues chez les patients non porteurs, le genre *Dolosigranulum* (dont la seule espèce du genre est *D. pigrum*) est le principal facteur prédictif de l'absence de *S. aureus* (**Figure 6**). Ce genre a été retrouvé chez 20% des patients de l'étude et chez 40% des patients non porteurs de *S. aureus*. Malgré leur très forte abondance chez les non porteurs (**Figure 5**), Le genre *Corynebacterium* n'était qu'en seconde position des genres bactériens prédictifs du portage. Cette observation est probablement le reflet de la grande diversité d'espèces constituant ce genre bactérien au niveau nasal. Toutes les espèces de corynebactéries n'ont potentiellement pas d'effet sur la colonisation nasale par *S. aureus ;* le genre *Corynebacterium* était le 4ème genre le plus abondamment retrouvé chez les porteurs. La présence du genre *Staphylococcus* (hors séquences de *S. aureus*) était le principal facteur bactérien prédictif de la présence de *S. aureus* au niveau de la cavité nasale.

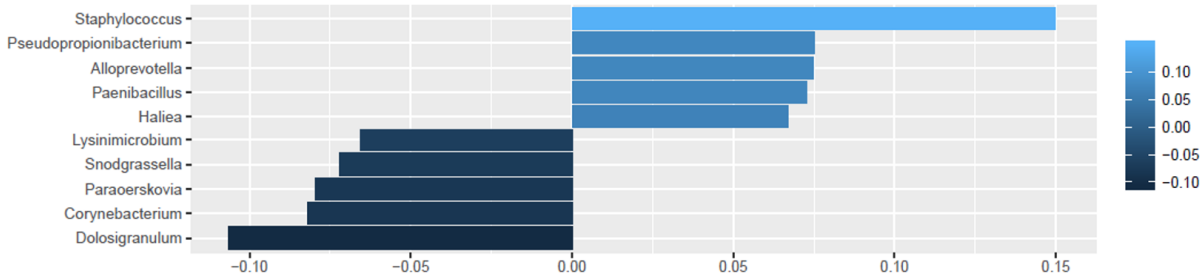



**Figure 6** : Top 10 des genres bactériens prédictifs du statut de portage (analyse LEfSe).

La capacité d'inhibition de croissance sur milieu solide de différentes souches de corynebactéries a été mesurée sur 3 souches de *S. aureus*. Ces souches de *S. aureus* représentent les fonds génétiques les plus fréquemment observés dans cette cohorte de patients. La souche *S. aureus* 74 est un SARM appartenant au complexe clonal 5 (CC5), les souches 84 et 90, sensibles à la méhticilline, appartiennent respectivement au CC45 et CC30. Pour les corynebactéries, les 3 espèces les plus fréquemment isolées en culture ont été évaluées : *C. accolens*, *C. propinquum* et *C. tuberculostearicum*. Pour chaque espèce, 3 souches isolées de patients non porteurs de *S. aureus* ont été utilisées. Avec les 3 concentrations de *S. aureus* testées, les espèces *C. accolens* et *C. tuberculostearicum* ne présentaient aucune activité d'inhibition de croissance sur *S. aureus* (**Figure 7**). Les 3 souches de *C. propinquum* ont démontré une capacité à inhibier la croissance de *S. aureus*. Cette capactié inhibitrice variait en fonction de la souche de corynebactérie utilisée mais ne semblait pas impactée par le fond génétique de *S. aureus*. Ainsi, la souche de *C. propinquum* du patient 20 avait l'activité mesurée la plus faible et a été capable d'inhiber la croissance de 25 µl d'un bouillon à $10^3$ UFC/ml (environ 40 UFC). La souche de *C. propinquum* 3 a été capable d'inhiber la croissance de 25µl d'un bouillon à $10^5$ UFC/ml (environ 4 000 UFC). La souche de *C. propinquum* 18 a été capable d'inhiber la croissance de 25µl d'un bouillon à $10^7$ UFC/ml (environ 400 000 UFC).

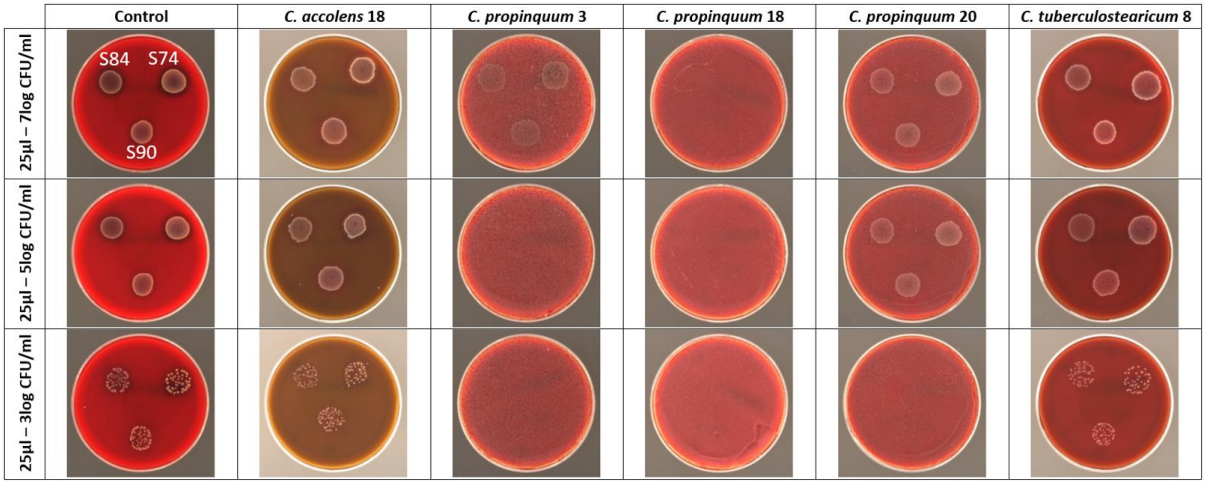



**Figure 7** : Impact de différentes espèces de corynebactéries sur la croissance de *S. aureus*.

Pour la suite des expériences d'inhibition sur milieu solide, 4 souches de *C. propinquum* ont été testées sur une plus grande variété de souches de *S. aureus* : 5 souches représentant plus de 90% des fonds génétiques de *S. aureus* issus de la cohorte de patients, 4 souches de référence de l'ATCC (American Type Culture Collection) et 7 souches d'intérêt clinique. Ces 16 souches ont été testées avec des bouillons allant de 3 à 8 log UFC/ml avec toutes les dilutions intermédiaires au dixième. Ces souches appartiennent à 9 complexes clonaux différents, 7 souches (44%) présentaient un système de régulation *agr* de type 1, 4 (25%) un *agr* 2 et 5 (31%) un *agr* 3 (**Table 1**). Une résistance à la méticilline était observée pour 10 souches (63%) et 3 (19%) souches étaient productrices de toxine de Panton Valentine (PVL) (**Table 2**). Comme observé précédemment, le niveau d'inhibition dépendait essentiellement de la souche de *C. propinquum* utilisée. Le plus haut niveau inhibiteur a été obtenu avec la souche *C. propinquum* 3 qui a inhibé la croissance de toutes les souches de *S. aureus* à la plus haute concentration utilisée. La souche *C. propinquum* 18 a montré également une excellente capacité inhibitrice avec une concentration médiane d'inhibition de croissance à 7 log UFC/ml. Par ordre d'efficacité, nous avons observé avec les souches 20 et 8 une concentration médiane d'inhibition de croissance de, respectivement, 6 et 5 log UFC/ml. Pour ces souches de corynebactéries la capacité d'inhibition de croissance était directement liée à la souche de *S. aureus* utilisée sans lien avec le complexe clonal ou le type *agr*. Toutes les souches de *S. aureus* appartenant au CC30/*agr 3* semblent spécifiquement moins sensibles à la *C. propinquum* 8. Cependant, cette observation n'était pas associée au système *agr,* d'autres souches *agr* 3 étaient à la souche *C. propinquum* 8. La production de PVL où la résistance à la méticilline n'a pas montré de protection vis-à-vis de l'activité inhibitrice de *C. propinquum*.

| | Niveau d'inhibition de la croissance de *S. aureus* (log UFC/ml) | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ***S. aureus* 13** | ***S. aureus* 20** | ***S. aureus* 74** | ***S. aureus* 84** | ***S. aureus* 90** | **ATCC-11335** | **ATCC-29213** | **ATCC-25923** | **ATCC-43866** | **SA113** | **ST22** | **ST80** | **Clone Lyon** | **SF8300** | **Mu3** | **MW2** | **Median** |
| ***C. propinquum* 3** | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | **8** |
| ***C. propinquum* 8** | 6 | 6 | 6 | 6 | 4 | 4 | 6 | 5 | 5 | 3 | 5 | 6 | 5 | 6 | 4 | 5 | **5** |
| ***C. propinquum* 18** | 7 | 7 | 7 | 7 | 8 | 7 | 7 | 6 | 7 | 6 | 8 | 7 | 6 | 7 | 7 | 7 | **7** |
| ***C. propinquum* 20** | 7 | 6 | 7 | 7 | 7 | 7 | 6 | 6 | 7 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 7 | 6 | **6** |

Table 1 : Impact de *C. propinquum* sur la croissance de *S. aureus* après 24h de co-culture.

| | ***S. aureus* 13** | ***S. aureus* 20** | ***S. aureus* 74** | ***S. aureus* 84** | ***S. aureus* 90** | **ATCC-11335** | **ATCC-29213** | **ATCC-25923** | **ATCC-43866** | **SA113** | **ST22** | **ST80** | **Clone Lyon** | **SF8300** | **Mu3** | **MW2** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Clonal Complex** | 9 | 398 | 5 | 45 | 30 | 30 | 5 | 30 | 8 | 8 | 22 | 80 | 8 | 8 | 5 | 1 |
| ***agr* type** | 2 | 1 | 2 | 1 | 3 | 3 | 2 | 3 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 | 2 | 3 |
| **Methicillin resitance** | - | + | - | - | - | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + |
| **PVL production** | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | - | - | - | - | + |

Table 2 : Caractéristiques des souches de *S. aureus* utilisées pour la compétition sur milieu solide.

La Figure 7 montre les résultats de l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules A549 en présence de différentes souches de *C. propinquum*. Le niveau d'internalisation pour les 3 souches cliniques de *S. aureus* testées était variable avec une charge intracellulaire variant de 1820 à 5430 UFC/$10^6$ cellules. Avec le niveau d'internalisation basal le plus bas, la souche de SARM *S. aureus* 74 était également la plus impactée par la présence de *C. propinquum* avec une diminution moyenne du niveau d'internalisation de 73,3%. Des diminutions très significatives du niveau d'internalisation des souches 84 et 90 ont également été observées avec une réduction du nombre de bactéries intracellulaires de 60,8% et 49,6% respectivement. Du côté des corynebactéries, les souches 3 et 18 étaient les plus efficaces pour empêcher l'entrée de *S. aureus* avec des réductions de l'entrée mesurées respectivement à 65,8% et 63,1%. Des résultats similaires ont été observés avec la souche *C. propinquum* 8 (61,3% d'inhibition) avec un effet apparemment moins marqué sur la souche de *S. aureus* 84. Enfin, la souche de *C. propinquum* du patient 20 était la souche la moins efficace pour empêcher l'internalisation de *S. aureus* avec une réduction moyenne de 54,8%.

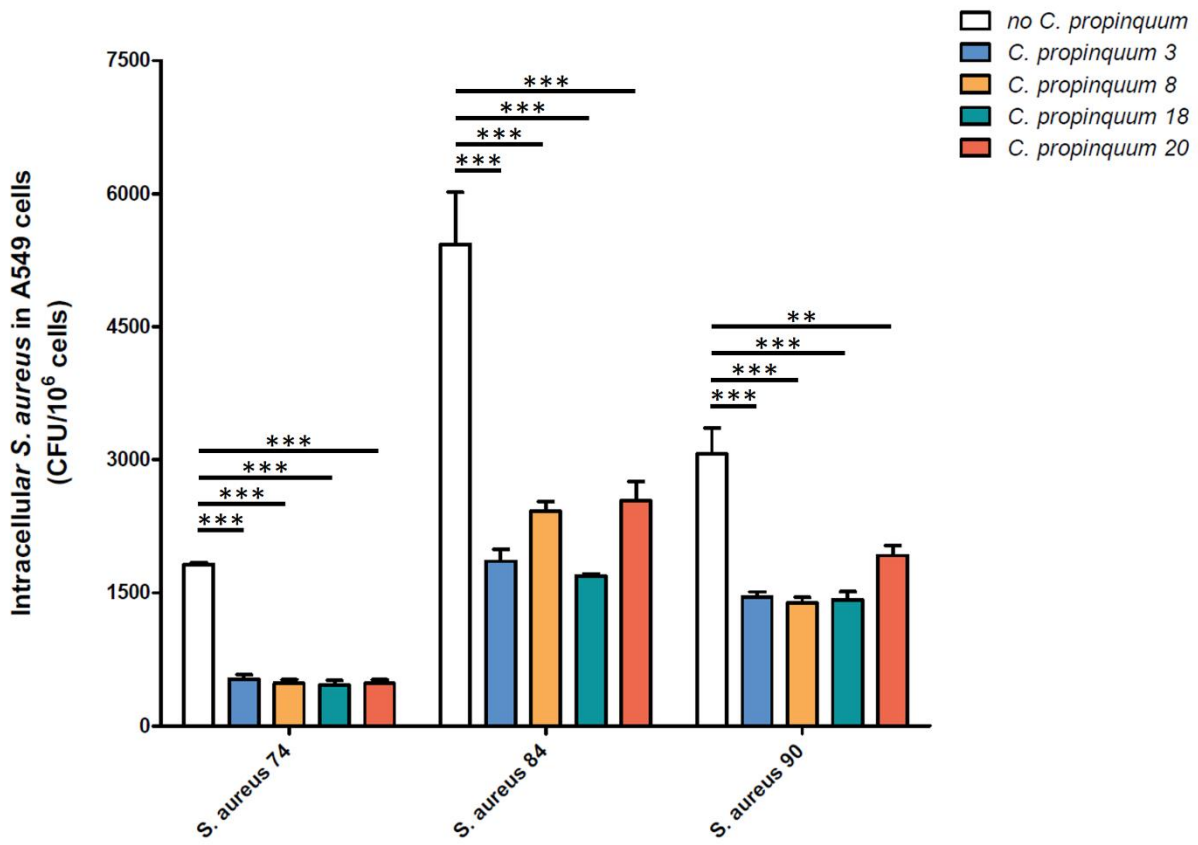



Figure 7 : Impact de *C. propinquum* sur l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules A549

## DISCUSSION

Nos résultats concernant le microbiote nasal sont en accord avec la littérature. Les fosses nasales postérieures sont décrites comme présentant une diversité (index de Shannon) plus faible avec une flore légèrement différente du vestibule (Yan *et al.* 2013). Avec un épithélium kératinisé, la flore du vestibule est proche de la flore cutanée qui est dominée par les Actinobacteria et les Firmicutes (Human Microbiome Project Consortium 2012; Yan *et al.* 2013; Bessesen *et al.* 2015). Au niveau du nasopharynx, le changement d'environnement et d'épithélium (de type respiratoire), s'accompagne d'un changement de la composition de la flore avec une augmentation importante de la quantité de Proteobacteria. Il existe un continuum bactérien entre, d'un côté le vestibule nasal qui sert de zone tampon avec l'environnement extérieur et, de l'autre, le nasopharynx qui marque une transition avec la flore de la cavité buccale. Malgré ces différences, le microbiote nasal est dans son ensemble composé d'une base commune (core microbiome) avec une dizaine d'OTUs constituant plus de 80% des séquences 16S pouvant être observée au niveau nasal (Yan *et al.* 2013). Il est rapporté une prévalence de portage d'environ 88% pour le genre Corynebacterium, 83% pour le genre Cutibacterium et 90% pour le genre Staphylococcus (Camarinha-Silva *et al.* 2012; Liu *et al.* 2015; Kaspar *et al.* 2016). Ces quelques genres bactériens peuvent être retrouvés au niveau des différents sites de la cavité nasale ce qui est notamment le cas pour *S. aureus* (Yan *et al.* 2013; Kaspar *et al.* 2016). L'étude du microbiote nasal de 89 paires de jumeaux a montré que le fond génétique de l'hôte n'avait pas de rôle significatif dans la composition du microbiote, tandis que les facteurs environnementaux et les compétitions bactériennes participaient largement à façonner la composition de la flore bactérienne (Liu *et al.* 2015).

En ce qui concerne les staphylocoques, *S. epidermidis* est l'espèce la plus souvent retrouvée au niveau nasal (Frank *et al.* 2010). Son impact sur la colonisation nasale à *S. aureus* est moins clair ; certaines études rapportant une association positive entre les deux espèces (Liu *et al.* 2015; Kaspar *et al.* 2016) alors que, pour d'autres, la présence de *S. epidermidis* est négativement corrélée à celle de *S. aureus* (Frank *et al.* 2010). Ces données contradictoires sont le reflet de l'hétérogénéité présente au sein des souches de *S. epidermidis*, certaines souches étant capables de produire une sérine protéase Esp dont l'activité sur la colonisation par *S. aureus* a été démontrée (Iwase *et al.* 2010). Certaines souches de *S. lugdunesis* sont également capables de produire de la lugdunine, bactériocine hautement active contre *S. aureus* (Zipperer *et al.* 2016). Le fait est que la très grande majorité des espèces de staphylocoques est capable de produire des bactériocines ayant principalement pour cible d'autres genres bactériens parmi lesquels les principales cibles sont les genres *Dolosigranulum, Corynebacterium Moraxella* et *Micrococcus* (Janek *et al.* 2016). Les travaux de Janek *et al.* pourraient expliquer que la

présence de staphylocoques est le principal paramètre prédictif de la présence de *S. aureus* dans notre étude. La production massive de bactériocines par le genre *Staphylococcus* pouvant contribuer à éliminer les principales espèces antagonistes de *S. aureus*.

Que ce soit chez les patients porteurs de *S. aureus* ou non, *Cutibacterium* est le deuxième genre bactérien le plus abondamment retrouvé au niveau de la cavité nasale (**Figure 4**). Au cœur de la composition du microbiote nasal, le genre Cutibacterium pourrait également influencer la colonisation nasale par *S. aureus*. La production d'acide propionique et autres acides gras à chaines courtes par le métabolisme fermentatif de *C. acnes* est capable d'inhiber, in vitro et in vivo, la croissance de *S. aureus* (Shu *et al.* 2013; Wang *et al.* 2014). La coproporphyrine III secrétée par certaines souches de Cutibacterium *spp.* pourrait cependant favoriser la formation de biofilm par *S. aureus* (Wollenberg *et al.* 2014).

Chez les nouveaux nés, dont la flore n'est pas encore durablement établie, la colonisation nasale par *S. aureus* est plus fréquente que chez l'adulte (Khamash *et al.* 2018, 2019). Dans cette population la présence de *Corynebacterium* et de *Dolosigranulum* semblent protéger contre la colonisation nasale par *S. aureus*. *Dolosigranulum pigrum* est décrit dans de nombreuses études comme l'un des plus importants prédicteurs de l'absence de colonisation nasale par *S. aureus* (Wos-Oxley *et al.* 2010; Camarinha-Silva *et al.* 2012; Yan *et al.* 2013; Liu *et al.* 2015; Khamash *et al.* 2018). Retrouvé chez 40% des patients non porteurs de *S. aureus* de notre cohorte, il peut être retrouvé chez plus de la moitié des patients dans certaines études (Wos-Oxley *et al.* 2010; Camarinha-Silva *et al.* 2012; De Boeck *et al.* 2021). Une concentration de *D. pigrum* supérieure à $1{,}2.10^6$ copies 16S par écouvillon a une valeur prédictive de 86% pour l'absence de détection de *S. aureus* (Liu *et al.* 2015). Organisme particulièrement adapté à l'environnement nasal (Lappan *et al.* 2018; Flores Ramos *et al.* 2021), la culture *in vitro* de *D. pigrum* est difficile. Possédant un métabolisme auxotrophe, sa croissance est favorisée par la présence de *Corynebacterium accolens*, *C. pseudodiphtheriticum* et *C. propinquum* (Brugger *et al.* 2020). L'effet inhibiteur de *D. pigrum* sur la croissance de *S. aureus* a pu être établi expérimentalement. L'association avec *C. pseudodiphtheriticum* permet une inhibition de *S. pneumoniae* (Brugger *et al.* 2020; De Boeck *et al.* 2021). Un effet anti-inflammatoire de *D. pigrum* a également été rapporté ainsi que sa capacité à réduire d'environ 70% la mortalité d'une infection a *S. aureus* sur un modèle de *Galleria mellonella* (De Boeck *et al.* 2021).

La dichotomie entre la présence de bactéries du genre *Corynebacterium* et *Staphylococcus* peut être retrouvée dans de nombreuses études de composition du microbiote nasal (Lemon *et al.* 2010; Yan *et al.* 2013; Johnson *et al.* 2015). Ainsi la probabilité de trouver *S. aureus* est d'autant plus faible que la quantité de Corynébactéries est importante (Uehara *et al.* 2000; Lina *et al.* 2003; Johnson *et al.* 2015;

Khamash *et al.* 2019). En plus de leur effet agoniste sur la croissance de *D. pigrum*, certaines espèces de *Corynebacterium* ont un effet propre sur *S. aureus*. Pour cette étude, la région V3 du 16S a été séquencée. Si cette région permet une bonne identification de *S. aureus* parmi les séquences de staphylocoques, la distinction des différentes espèces de *Corynebacterium* est difficile si ce n'est impossible (Table 3).

| 16S region | *C. accolens* | *C. pseudodiphtheriticum* | *C. tuberculostearicum* |
|---|---|---|---|
| V3 | 97,2% | 100,0% | 97,7% |
| V1-V3 | 93,8% | 99,0% | 94,0% |
| V1-V9 | 94,3% | 99,4% | 94,6% |

Table 3 : Homologie de séquence 16S entre *C. propinquum* et d'autres corynebactéries

En 2013, Yan *et al.* décrivaient un OTU identifié comme *C. pseudodiphtheriticum* négativement corrélé à l'absence de *S. aureus* dans le prélèvement (Yan *et al.* 2013). Par compétition sur milieu solide une inhibition de la capacité de croissance de *S. aureus* par *C. pseudodiphtheriticum* était démontrée. La co-culture de *S. aureus* et de *C. striatum* va induire une réduction majeure de l'expression des gènes sous contrôle du système de quorum sensing *agr* de *S. aureus* sans impact significatif sur sa croissance (Ramsey *et al.* 2016). Le système de régulation *agr* régule l'expression de facteurs de virulence par *S. aureus*, sa répression par *C. striatum* forçant une orientation de la bactérie vers le commensalisme. Une Corynébactérie non identifiée a été également décrite comme induisant *in vitro* une inhibition de croissance restreinte aux souches de *S. aureus* présentant un profil *agr-1* (parmi les 4 profils d'*agr*) (Lina *et al.* 2003).

En l'absence de souche de *D. pigrum* disponible dans notre collection de bactéries, nous nous sommes focalisés sur l'étude des interactions entre *S. aureus* et différentes souches de *Corynebacterium*. Si les 3 souches de *C. accolens* et de *C. tuberculostearicum* n'ont présenté aucun effet sur la croissance de *S. aureus*, toutes les souches de *C. propinquum* avaient un impact sur *S. aureus*. En raison de l'impossibilité de s'approvisionner en sang de cheval pour la fabrication du milieu MH-F en pleine pandémie à SARS-Cov-2, aucun réplica biologique n'a pu être effectué, que ce soit les expériences de compétition sur milieu solide ou sur cellules. L'inhibition de croissance de *S. aureus* observée ainsi que l'effet très significatif obtenu sur l'inhibition de son internalisation rendent ces résultats déjà très encourageants. Il est intéressant de souligner que, contrairement aux autres espèces de corynebactéries qui ont pu être isolées aussi bien chez des patients porteurs ou non de *S. aureus*, les 8 souches de *C. propinquum* obtenues par culture provenaient toutes de patients non porteurs de *S. aureus*. A titre d'illustration le microbiote du patient 18, seul patient pour lequel une souche de *C. propinquum* a été isolée et qui a bénéficié d'un séquençage, est disponible en Annexe 2. Chez ce patient les genres *Corynebacterium* et *Cutibacterium* représentent environ 70% des séquences obtenues sur les

3 sites de prélèvements avec une prédominance de *Corynebacterium* au niveau vestibulaire et de *Cutibacterium* au niveau du nasopharynx.

En ce qui concerne les effets observés sur la croissance de *S. aureus*, la variabilité du niveau d'activité des souches de *C. propinquum* est indépendante du profil *agr* de la souche de *S. aureus* testée. Des résultats très similaires ont été observés avec des travaux sur *C. pseudodiphtheriticum* (Hardy *et al.* 2019). Dans cette étude l'activité inhibitrice de *C. pseudodiphtheriticum* pouvait varier entre une résistance complète et une haute sensibilité sans corrélation avec le profil *agr* de *S. aureus*. Cette activité bactéricide contact-indépendante était liée à la production d'un facteur sécrété par *C. pseudodiphtheriticum*, capable de détourner à son avantage la production des phenol-soluble modulins de *S. aureus*, devenant alors toxique pour la bactérie (Hardy *et al.* 2019). La même année, une autre équipe étudiant les compétitions entre corynebactéries et staphylocoques a rapporté 3 souches de *C. propinquum* capables d'inhiber fortement la croissance de staphylocoques à coagulase négative par production de sidérophores (Stubbendieck *et al.* 2019). Une faible activité était également observable pour 7 autres souches de *Corynebacterium* mais aucune des 10 souches ne présentait d'activité sur *S. aureus*. Contrairement à nos résultats, les deux études précédentes décrivaient des interactions reposant sur la sécrétion de facteurs bactériens avec activités indépendantes du contact direct entre bactéries. L'activité à distance de nos 4 souches cliniques n'a pas été évaluée et le mécanisme responsable de l'inhibition de croissance observé n'a pas été élucidé. Le fond génétique de *S. aureus*, la production de PVL ou la résistance à la méticilline ne semblent pas impacter la capacité d'inhibition des souches de *C. propinquum*. Cette observation est à rapprocher de certaines études ne décrivant aucune différence apparente entre le microbiote des patients colonisés par des souches de *S. aureus* sensibles à la méticilline et celui de patients porteurs de SARM (Frank *et al.* 2010; Johnson *et al.* 2015).

A ma connaissance, il n'existe qu'une seule publication présentant des résultats de compétition entre *Corynebacterium* et *Staphylococcus* sur modèle cellulaire (Ménard *et al.* 2020). Dans cette étude, des souches de *S. epidermidis*, *C. acnes* et *C. alccolens*, ont entrainé la diminution de la capacité d'adhésion et d'internalisation de deux souches de *S. aureus* sur une lignée de cellules cancereuses gingivales (Ca9-22). Sur cellules A549, nos travaux décrivent que la co-infection par *C. propinquum* et *S. aureus* est responsable d'une diminution très significative de la capacité d'invasion cellulaire par *S. aureus*. Bien que le temps de co-incubation des souches de *S. aureus* et de *C. propinquum* était assez court (3h) on ne peut pas exclure qu'une inhibition de croissance bactérienne puisse expliquer en partie la différence d'internalisation mesurée. L'internalisation de *S. aureus* étant le reflet de sa capacité d'adhésion, la compétition pour l'adhésion cellulaire pourrait être responsable du phénomène observé ici. Une autre explication possible pourrait être la production de bactériocines capables de détruire *S.*

*aureus*. Des expériences d'adhésion cellulaire avec des souches de *C. propinquum* et des surnagents de cultures inactivées par la chaleur pourraient permettre de répondre à cette question.

Bactérie commensale de la peau et de la cavité nasale, peu d'articles traitent de *C. propinquum* dans la littérature scientifique. Seulement 29 publications en 26 ans pour la recherche de Corynebacterium propinquum dans PubMed avec la moitié d'entre elles consistant en des cases report. Souvent considérée comme un contaminent des prélèvements clinques, *C. propinquum* est rapportée comment étant la cause de différentes infections opportunistes : infections de la peau et des phanères, respiratoires, urétrites, conjonctivites, bactériémies, endocardites, infections ostéo-articulaire avec ou sans matériel (Saïdani *et al.* 2010; Bernard *et al.* 2013; Todokoro *et al.* 2015). Elles vont essentiellement toucher des patients présentant un terrain fragilisé (diabète, immunodépression, néoplasie, matériel exogène, malformations anatomiques, BPCO et bronchectasie) mais restent rares en comparaison du nombre d'infections à *S. aureus* (Balci *et al.* 2002; Díez-Aguilar *et al.* 2013; Kawasaki *et al.* 2014). Résistante à la fosfomycine, *C. propinquum* est presque toujours résistante à la clindamycine et l'érythromycine (90% de souches résistantes), mais aussi régulièrement résistante au cotrimoxazole (70%) et aux quinolones (entre 29 et 40%) (Díez-Aguilar *et al.* 2013; Hoshi *et al.* 2020). La résistance à la vancomycine est extrêmement rare (Babay 2001). L'indentification par séquençage 16S des différentes espèces de *Corynebacterium* est difficile, et si *C. propinquum* est très peu rapportée dans les études de microbiote c'est qu'elle partage une homologie séquence très importante avec les autres corynebactéries (Table 3). Pour la région V3 utilisée ici, la séquence 16S obtenue pour *C. propinquum* à une homologie de séquence de 100% avec *C. pseudodiphtheriticum* et est supérieure à 97% pour les autres principales espèces de *Corynebacterium spp.* présentes au niveau nasal. Les séquences de *C. propinquum* sont donc perdues dans les autres OTUs de corynebactéries. Egalement très proche de *C. pseudodiphtheriticum* au niveau morphologique et biochimique, l'identification certaine de *C. propinquum* repose en premier lieu sur l'analyse par spectrométrie de masse (MALDI-Tof) mais peut aussi être obtenue par séquençage des gènes *rpoB*, *ssrA* ou du 16S complet (Bernard *et al.* 2013; Rea *et al.* 2017; Xu *et al.* 2021b). La ressemblance entre les deux espèces ne s'arrête pas là. Si nous avons ici décrit le rôle inhibiteur de *C. propinquum* sur *S. aureus* il faut rappeler que le même phénomène pouvait être observé avec *C. pseudodiphtheriticum* (Yan *et al.* 2013). Plus récemment, *C. propinquum* et *C. pseudodiphtheriticum* ont été décrits comme pouvant inhiber la croissance des souches de *Streptococcus pneumoniae* de serotype 22F ; la présence de ces deux corynebactéries dans le microbiote nasal aurait un effet protecteur chez les jeunes enfants (Xu *et al.* 2021a). L'étude *in vitro* de *C. pseudodiphtheriticum* a permis de mette en évidence la capacité de cette bactérie à adhérer, pénétrer et survire à l'intérieur de cellules épithéliales humaines (Souza *et al.* 2012). Il serait intéressant de

vérifier si l'internalisation de *C. propinquum* est également possible. On pourrait alors imaginer que la compétition avec *S. aureus* puisse se poursuivre dans le secteur intracellulaire.

L'inoculation artificielle de bactéries dans le cadre de la décolonisation nasale à *S. aureus* a déjà été proposée avec des résultats prometteurs. Il y a plus de vingt ans, l'administration en spray nasal de la souche *Corynebacterium sp* Co304 permettait une éradication complète de la colonisation par *S. aureus* chez 71% des patients traités (Uehara *et al.* 2000). Dans cette même étude l'instillation d'une solution de NaCl 0.9% ou de *S. epidermidis* n'avait aucun effet sur le portage de *S. aureus*. De la même façon, dans une cohorte de 4 patients, un spray contenant une solution saline de *C. pseudodiphtheriticum* a permis de décoloniser complètement 3 patients (Kiryukhina *et al.* 2013). Pour le dernier patient, à la fin du traitement, la souche de SARM responsable de la colonisation n'a pas pu être complètement éradiquée et la colonisation à *S. aureus* a persisté. Chez l'Homme, des résultats concluants ont également pu être observés avec l'utilisation de souches de *S. epidermidis* productrices d'Esp (Iwase *et al.* 2010), ou de probiotiques commerciaux à base de *Streptococcus salivarius* et de *Streptococcus oralis* (De Grandi *et al.* 2019).

Ces essais reposent sur l'utilisation empirique de différentes souches bactériennes mais pour pouvoir un jour proposer des thérapies de remplacement de flore efficaces et sûres, il est nécessaire de pouvoir disposer du plus grand nombre possible de souches candidates bien caractérisées : spectre d'activité, pouvoir pathogène potentiel, interaction avec le reste de la flore... Pour une efficacité optimale cette greffe microbienne pourrait être administrée à la suite d'une décolonisation antibiotique ayant permis de réduire la charge nasale de *S. aureus*. L'administration non pas d'une espèce mais d'une flore complète capable de s'établir au niveau des différents sites de la cavité nasale, de se multiplier et de travailler ensemble de façon synergique, pourrait permettre une protection, au long terme, contre la réimplantation de *S. aureus* quelle que soit son origine. A cet effet, sur la base de ces travaux et de la littérature, une piste de réflexion sur la composition de cette hypothétique flore synthétique est proposée en Annexe 3.

## MATERIELS ET METHODES

### Ethique

Cette étude a été approuvée par le comité d'examen institutionnel et l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (NCT02595112). Tous les patients ont signé un formulaire de consentement éclairé.

### Population et prélèvements

Cette étude s'est déroulée dans le service d'Oto-Rhino-Laryngologie du Centre Hospitalo-Universitaire de Saint-Etienne, entre Février 2016 et Septembre 2017. L'étude était proposée aux patients de plus de 18 ans, hospitalisés pour prise en charge chirurgicale au bloc opératoire sous anesthésie générale. Ils n'étaient pas inclus s'ils présentaient l'un des critères suivants: infection en cours (nasale ou systémique), prise de traitement antibiotique dans le mois précèdent, infection par VIH, furonculose chronique, maladie néoplasique de la cavité nasale en cours, grossesse, trouble de l'hémostase majeur. Avant chirurgie, les patients inclus étaient écouvillonnés (eswab 481CE, Copan) au niveau du vestibule nasal pour recherche de portage à *S. aureus*. Le jour de la chirurgie, les patients sous anesthésie générale étaient prélevés, sous contrôle endoscopique, au niveau du vestibulaire, du récessus sphéno-ethmoïdal et du nasopharynx (eswab 481CE, Copan). Les échantillons étaient alors envoyés au laboratoire pour prise en charge immédiate.

### Détermination du statut de portage

Les échantillons vestibulaires étaient ensemencés sur gélose CHROMagar Staph aureus (TA672, CHROMagar) à l'aide d'un ensemenceur automatique (Easyspiral dilute, Interscience). Après 24 heures d'incubation à 37°C en condition aérobie, les charges bactériennes de *S. aureus* étaient mesurées avec un compteur de colonie (Scan 1200, Interscience). Les charges bactériennes étaient utilisées pour définir le statut de porteur persistant à *S. aureus* selon un l'algorithme décrit précédemment (Verhoeven *et al.* 2012).

### Création d'une collection de souches cliniques

En parallèle de l'ensemencement des géloses CHROMagar Staph aureus, pour les 30 premiers patients de l'étude, 50µl d'échantillon ont été ensemencés manuellement sur plusieurs milieux de culture : gélose 5% sang de mouton (COS 43041, Biomérieux) avec culture en condition aérobie, gélose COS avec culture sous 5% $CO_2$, gélose chocolat + PolyViteX (PVX 43101, Biomérieux) sous condition anaérobie, gélose MRS (13295949, OXOID) et Hoyle (10432443, OXOID) avec cultures en condition aérobie. Les géloses étaient lues à 24 et 48h (uniquement 48h en condition anaérobie) et plusieurs colonies

visuellement différentes étaient ré isolées pour identification par MALDI-TOF (MALDI-TOF MS System, Bruker). Pour chaque patient, toutes les espèces identifiées étaient archivées à -20°C en tubes cryobilles. Les profils génétiques des souches cliniques de *S. aureus* ont été obtenus sur micropuces *S. aureus* Genotyping Kit 2.0 (alere-technologies).

### Séquençage haut débit des échantillons

Dès réception, 250µl de chaque prélèvement étaient congelés à -80°C pour analyse métagénomique 16S à la fin des inclusions. Selon le statut de portage, défini sur la charge des prélèvements vestibulaires, 15 porteurs persistants de *S. aureus* ont été retenus pour séquençage des 3 sites de prélèvement. Un groupe contrôle constitué de 15 patients, dont les prélèvements étaient négatifs à *S. aureus*, a été appareillé au groupe porteur sur des critères d'âge et de sexe. L'âge moyen dans le groupe porteur et non porteur était respectivement de 55,8 ans et 55,7 ans pour un ratio hommes/femmes de 1,5 dans les deux groupes. Après décongélation, les échantillons ont été traités par protéinase K (GEXPRK00, Eurobio Scientific) pendant 1 heure à 56°C. L'ADN total était alors extrait avec le kit QIAamp DSP DNA Mini Kit (61304, Qiagen) sur l'automate QIAsymphony (Qiagen) selon les instructions du fabricant. Les 90 extraits ont alors été amplifiés avec la taq Platinum PCR SuperMix High Fidelity (12532016, Invitrogen) et des amorces ciblant la région V3 de l'ADN codant pour l'ARN 16S. Ces amorces 338F (ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG) and 533R (TTA CCG CGG CTG CTG GCA C) étaient déjà modifiées par ajout des barre-codes et des séquences adaptatrices spécifiques de la technologie PGM (Personal Genome Machine). Le protocole de PCR d'amplification V3 consistait en une activation de la taq par 2 minutes à 94°C suivi par 50 cycles : de dénaturation 20 secondes à 94°C, d'hybridation 20 secondes à 64°C et d'élongation 35 secondes à 68°C. Les amplicons étaient alors purifiés sur colonne GeneRead Size Selection Kit (180514, Qiagen) avant que la quantité d'ADN de chaque échantillon ne soit mesurée avec les puces d'électrophorèses High-Sensitivity DNA Kit (5067-4626, Agilent Technologies) sur automate 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Des puces Ion 318 chip V2 (4488146, ThermoFisher Scientific) ont été chargées avec 30 échantillons avec l'Ion Chef System (ion Torrent, ThermoFisher Scientific) avant d'être séquencées avec le kit Ion PGM Hi-Q View Chef 400 (A30798, ThermoFisher Scientific) sur système Ion PGM (ion Torrent, ThermoFisher Scientific).

### Analyse des séquences 16S

Les analyses de composition de microbiote au niveau du genre bactérien ont été obtenues avec mothur v1.40.5 et la base de données 16S Silva v132 avec des OTUs (Operational taxonomic units) définis à 95% d'homologie de séquence. Les séquences ne respectant pas les critères suivants ont été écartées : séquences de moins de 130 ou plus de 210 paires de bases, avec plus de 8 homopolymères, un score de qualité de moins de 22 ou représentant moins de 0,5% des séquences de l'échantillon. Le pipeline

d'analyse mothur complet est disponible en Annexe 4. En cas d'identification impossible, la séquence consensus d'un OTU pouvait être analysée sur la base de données NCBI 16S ribosomal RNA. Les mesures de diversité alpha, les analyses en DPCoA (Double Principal Coordinate Analysis) et LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size) ont été obtenues après un tri initial des séquences avec BBduk et VSEARCH, puis alignement BLASTn sur la base de données NCBI 16S ribosomal RNA avec normalisation des échantillons sur le nombre de copies 16S.

### Compétitions bactériennes sur milieu solide

Des souches de corynebactéries isolées chez des patients non porteurs de *S. aureus* ont été ensemencées sur gélose COS à partir des tubes cryobilles de la collection de souches cliniques. Après un minimum de 24 heures à 37°C sous 5% de $CO_2$, une colonie isolée était diluée dans 10ml de bouillon Mueller-Hinton 5% de sang de cheval + β-NAD (MH-F : 51075, Biomérieux ; SR0050C, ThermoScientific). Le bouillon était incubé sur la nuit à 37°C sous agitation. Le bouillon était alors dilué pour obtenir une densité optique de 0,5 sur densimètre CO8000 (WPA). La DO 0,5 de corynebactérie était alors diluée au dixième avant d'être ensemencée par inondation sur gélose MH-F. Les géloses étaient alors incubées 24h à 37°C sous 5% de $CO_2$. Avec 24h de décalage, la même procédure était suivie pour les souches de *S. aureus* (souches cliniques et de collection). Rapidement, les souches étaient ensemencées sur gélose COS avant qu'une colonie isolée ne soit utilisée pour préparer un bouillon MH. Après une nuit à 37°C sous agitation, le bouillon était dilué à une DO 0,5 (environ 8 log UFC/ml) et ce bouillon était dilué en série jusqu'à une concentration d'environ 3 log UFC/ml. Un dépôt de 25µl des dilutions de *S. aureus* d'intérêts était effectué sur les géloses MH-F déjà incubées depuis 24h avec les corynebactéries. Un témoin sans corynebactérie était systématiquement réalisé. Les géloses étaient incubées 24h à 37°C puis la croissance de *S. aureus* était visuellement vérifiée avec photographies des géloses sur compteur de colonies (Scan 4000, Interscience).

### Compétition sur cellules

Des cellules A549 (lignée de pneumocytes humains) ont été cultivées en flasque à 37°C et 5% de $CO_2$ dans du milieu Dulbecco's modified Eagle high glucose (DMEM-D6429, Sigma-Aldrich) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF-10270-106, Gibco) sans antibiotique. Pour les expériences de compétition sur cellules, après lavage au PBS (D8537, Sigma-Aldrich), les cellules étaient décollées par traitement à la trypsine-EDTA (T4049, Sigma-Aldrich) puis ensemencées sur plaque 24 puits à une densité de $1{,}0.10^5$ cellules/$cm^2$ avant d'être incubées 48h à 37°C et 5% $CO_2$. De façon similaire à la compétition sur milieu solide, un bouillon MH-F de chaque corynebactérie à tester était préparé la veille de l'infection. Le jour de l'infection, le bouillon MH-F était centrifugé, le milieu éliminé et le culot

bactérien re-suspendu dans 10ml de milieu d'infection : DMEM high glucose sans rouge phénol (D1145, Sigma-Aldrich) supplémenté avec 10% de SVF. Le bouillon était alors ajusté à une DO 0,5 puis dilué au dixième dans du milieu d'infection. La plaque 24 puits était alors lavée au PBS avant que 500µL de bouillon dilué de corynebactérie ne soit ajouté à chaque puits (trois puits par condition). Pour les 3 puits contrôles, du milieu d'infection stérile était ajouté à la place des corynebactéries. Après 1h d'incubation à 37°C sous 5% de $CO_2$, 500µl d'une DO 0,5 de *S. aureus* diluée au centième dans du milieu d'infection (MOI 0,1) étaient ajoutés aux puits et la plaque était alors incubée pendant 2h à 37°C sous 5% CO2. Le milieu était ensuite aspiré et remplacé par du milieu frais supplémenté avec 10µg/ml de lysostaphine (Ambicin, Ambi Products) puis de nouveau incubé 1h à 37°C et 5% CO2. Les puits étaient alors lavés 3 fois au PBS avant d'ajouter 1ml de solution de lyse composée de : 0,25% de Triton X-100 (T8787, Sigma-Aldrich), de 25% de trypsine-EDTA et d'eau pure stérile (600500, Aguettant). Après 15 minutes d'incubation, le lysat cellulaire était ensemencé sur gélose COS avec un EasySpiral. La quantité de *S. aureus* intracellulaire était mesurée avec un compteur de colonies (Scan 4000, Interscience) après 24h d'incubation à 37°C.

## REFERENCES BILIOGRAPHIQUES


Babay HA. Pleural effusion due to Corynebacterium propinquum in a patient with squamous cell carcinoma. Ann Saudi Med. nov 2001;21(5-6):337-9.

Balci I, Ekşi F, Bayram A. Coryneform bacteria isolated from blood cultures and their antibiotic susceptibilities. J Int Med Res. août 2002;30(4):422-7.

Bernard K, Pacheco AL, Cunningham I, Gill N, Burdz T, Wiebe D. Emendation of the description of the species *Corynebacterium propinquum* to include strains which produce urease. Int J Syst Evol Microbiol. juin 2013;63(Pt 6):2146-54.

Bessesen MT, Kotter CV, Wagner BD, Adams JC, Kingery S, Benoit JB, *et al.* MRSA colonization and the nasal microbiome in adults at high risk of colonization and infection. J Infect. déc 2015;71(6):649-57.

Bode LGM, Kluytmans JAJW, Wertheim HFL, Bogaers D, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Roosendaal R, *et al.* Preventing surgical-site infections in nasal carriers of *Staphylococcus aureus*. N Engl J Med. 7 janv 2010;362(1):9-17.

Bommer J, Vergetis W, Andrassy K, Hingst V, Borneff M, Huber W. Elimination of *Staphylococcus aureus* in hemodialysis patients. ASAIO J. mars 1995;41(1):127-31.

Brugger SD, Eslami SM, Pettigrew MM, Escapa IF, Henke MT, Kong Y, *et al. Dolosigranulum pigrum* Cooperation and Competition in Human Nasal Microbiota. mSphere. 9 sept 2020;5(5).

Camarinha-Silva A, Jáuregui R, Pieper DH, Wos-Oxley ML. The temporal dynamics of bacterial communities across human anterior nares. Environ Microbiol Rep. févr 2012;4(1):126-32.

De Boeck I, Wittouck S, Martens K, Spacova I, Cauwenberghs E, Allonsius CN, *et al.* The nasal mutualist *Dolosigranulum pigrum* AMBR11 supports homeostasis via multiple mechanisms. iScience. 24 sept 2021;24(9):102978.

De Grandi R, Bottagisio M, Di Girolamo S, Bidossi A, De Vecchi E, Drago L. Modulation of opportunistic species *Corynebacterium diphtheriae, Haemophilus parainfluenzae, Moraxella catarrhalis, Prevotella denticola, Prevotella melaninogenica, Rothia dentocariosa, Staphylococcus aureus and Streptococcus pseudopneumoniae* by intranasal administration of *Streptococcus salivarius* 24SMBc and *Streptococcus oralis* 89a combination in healthy subjects. Eur Rev Med Pharmacol Sci. mars 2019;23(1 Suppl):60-6.

Díez-Aguilar M, Ruiz-Garbajosa P, Fernández-Olmos A, Guisado P, Del Campo R, Quereda C, *et al.* Non-diphtheriae Corynebacterium species: an emerging respiratory pathogen. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. juin 2013;32(6):769-72.

Doebbeling BN, Reagan DR, Pfaller MA, Houston AK, Hollis RJ, Wenzel RP. Long-term efficacy of intranasal mupirocin ointment. A prospective cohort study of *Staphylococcus aureus* carriage. Arch Intern Med. 11 juill 1994;154(13):1505-8.

Flores Ramos S, Brugger SD, Escapa IF, Skeete CA, Cotton SL, Eslami SM, *et al.* Genomic Stability and Genetic Defense Systems in Dolosigranulum pigrum, a Candidate Beneficial Bacterium from the Human Microbiome. mSystems. 26 oct 2021;6(5):e0042521.

Frank DN, Feazel LM, Bessesen MT, Price CS, Janoff EN, Pace NR. The human nasal microbiota and *Staphylococcus aureus* carriage. PLoS ONE. 17 mai 2010;5(5):e10598.

Gagnaire J, Botelho-Nevers E, Martin-Simoes P, Morel J, Zéni F, Maillard N, *et al.* Interplay of nasal and rectal carriage of *Staphylococcus aureus* in intensive care unit patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. oct 2019;38(10):1811-9.

Hardy BL, Dickey SW, Plaut RD, Riggins DP, Stibitz S, Otto M, *et al. Corynebacterium pseudodiphtheriticum* Exploits *Staphylococcus aureus* Virulence Components in a Novel Polymicrobial Defense Strategy. MBio. 8 janv 2019;10(1).

Hoshi S, Todokoro D, Sasaki T. Corynebacterium Species of the Conjunctiva and Nose: Dominant Species and Species-Related Differences of Antibiotic Susceptibility Profiles. Cornea. nov 2020;39(11):1401-6.

Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature. 13 juin 2012;486(7402):207-14.

Iwase T, Uehara Y, Shinji H, Tajima A, Seo H, Takada K, *et al. Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. Nature. 20 mai 2010;465(7296):346-9.

Janek D, Zipperer A, Kulik A, Krismer B, Peschel A. High Frequency and Diversity of Antimicrobial Activities Produced by Nasal Staphylococcus Strains against Bacterial Competitors. PLoS Pathog. 2016;12(8):e1005812.

Johnson RC, Ellis MW, Lanier JB, Schlett CD, Cui T, Merrell DS. Correlation between nasal microbiome composition and remote purulent skin and soft tissue infections. Infect Immun. févr 2015;83(2):802-11.

Kaspar U, Kriegeskorte A, Schubert T, Peters G, Rudack C, Pieper DH, *et al.* The culturome of the human nose habitats reveals individual bacterial fingerprint patterns. Environ Microbiol. 2016;18(7):2130-42.

Kawasaki Y, Matsubara K, Ishihara H, Nigami H, Iwata A, Kawaguchi K, *et al. Corynebacterium propinquum* as the first cause of infective endocarditis in childhood. J Infect Chemother. mai 2014;20(5):317-9.

Khamash DF, Mongodin EF, White JR, Voskertchian A, Hittle L, Colantuoni E, *et al.* The Association Between the Developing Nasal Microbiota of Hospitalized Neonates and *Staphylococcus aureus* Colonization. Open Forum Infect Dis. avr 2019;6(4):ofz062.

Khamash DF, Voskertchian A, Milstone AM. Manipulating the microbiome: evolution of a strategy to prevent *S. aureus* disease in children. J Perinatol. févr 2018;38(2):105-9.

Kiryukhina NV, Melnikov VG, Suvorov AV, Morozova YA, Ilyin VK. Use of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* for elimination of *Staphylococcus aureus* from the nasal cavity in volunteers exposed to abnormal microclimate and altered gaseous environment. Probiotics Antimicrob Proteins. déc 2013;5(4):233-8.

Krismer B, Weidenmaier C, Zipperer A, Peschel A. The commensal lifestyle of *Staphylococcus aureus* and its interactions with the nasal microbiota. Nat Rev Microbiol. 12 oct 2017;15(11):675-87.

Lappan R, Imbrogno K, Sikazwe C, Anderson D, Mok D, Coates H, *et al.* A microbiome case-control study of recurrent acute otitis media identified potentially protective bacterial genera. BMC Microbiol. 20 févr 2018;18(1):13.

Lee AS, Macedo-Vinas M, François P, Renzi G, Vernaz N, Schrenzel J, *et al.* Trends in mupirocin resistance in meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* and mupirocin consumption at a tertiary care hospital. J Hosp Infect. avr 2011;77(4):360-2.

Lemon KP, Klepac-Ceraj V, Schiffer HK, Brodie EL, Lynch SV, Kolter R. Comparative analyses of the bacterial microbiota of the human nostril and oropharynx. mBio. 22 juin 2010;1(3).

Lina G, Boutite F, Tristan A, Bes M, Etienne J, Vandenesch F. Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of Staphylococcal agr alleles. Appl Environ Microbiol. janv 2003;69(1):18-23.

Liu CM, Price LB, Hungate BA, Abraham AG, Larsen LA, Christensen K, *et al. Staphylococcus aureus* and the ecology of the nasal microbiome. Sci Adv. juin 2015;1(5):e1400216.

Ménard G, Bonnaure-Mallet M, Donnio PY. Adhesion of *Staphylococcus aureus* to epithelial cells: an in vitro approach to study interactions within the nasal microbiota. J Med Microbiol. oct 2020;69(10):1253-61.

Miller MA, Dascal A, Portnoy J, Mendelson J. Development of mupirocin resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after widespread use of nasal mupirocin ointment. Infect Control Hosp Epidemiol. déc 1996;17(12):811-3.

Mody L, Krein SL, Saint S, Min LC, Montoya A, Lansing B, *et al.* A targeted infection prevention intervention in nursing home residents with indwelling devices: a randomized clinical trial. JAMA Intern Med. mai 2015;175(5):714-23.

Pérez-Fontán M, Rosales M, Rodríguez-Carmona A, Falcón TG, Valdés F. Mupirocin resistance after long-term use for *Staphylococcus aureus* colonization in patients undergoing chronic peritoneal dialysis. Am J Kidney Dis. févr 2002;39(2):337-41.

Ramsey MM, Freire MO, Gabrilska RA, Rumbaugh KP, Lemon KP. *Staphylococcus aureus* Shifts toward Commensalism in Response to Corynebacterium Species. Front Microbiol. 2016;7:1230.

Rea B, Hawkins J, Min H, Maniglia R, Talati N, Glaser L. *Corynebacterium propinquum* endocarditis: a confounding presentation of a rare entity. Cardiovasc Pathol. juin 2017;28:71-3.

Rigaill J, Morgene MF, Gavid M, Lelonge Y, He Z, Carricajo A, *et al.* Intracellular activity of antimicrobial compounds used for *Staphylococcus aureus* nasal decolonization. J Antimicrob Chemother. 16 août 2018;

Saïdani M, Kammoun S, Boutiba-Ben Boubaker I, Ben Redjeb S. *Corynebacterium propinquum* isolated from a pus collection in a patient with an osteosynthesis of the elbow. Tunis Med. mai 2010;88(5):360-2.

Sakr A, Brégeon F, Mège JL, Rolain JM, Blin O. *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization: An Update on Mechanisms, Epidemiology, Risk Factors, and Subsequent Infections. Front Microbiol. 2018;9:2419.

Schweizer M, Perencevich E, McDanel J, Carson J, Formanek M, Hafner J, *et al.* Effectiveness of a bundled intervention of decolonization and prophylaxis to decrease Gram positive surgical site infections after cardiac or orthopedic surgery: systematic review and meta-analysis. BMJ. 13 juin 2013;346:f2743.

Shu M, Wang Y, Yu J, Kuo S, Coda A, Jiang Y, *et al.* Fermentation of *Propionibacterium acnes*, a commensal bacterium in the human skin microbiome, as skin probiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. PLoS One. 2013;8(2):e55380.

Souza MC de, Santos LS dos, Gomes DLR, Sabbadini PS, Santos CS dos, Camello TCF, *et al.* Aggregative adherent strains of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* enter and survive within HEp-2 epithelial cells. Mem Inst Oswaldo Cruz. juin 2012;107(4):486-93.

Stubbendieck RM, May DS, Chevrette MG, Temkin MI, Wendt-Pienkowski E, Cagnazzo J, *et al.* Competition among Nasal Bacteria Suggests a Role for Siderophore-Mediated Interactions in Shaping the Human Nasal Microbiota. Appl Environ Microbiol. 15 mai 2019;85(10):e02406-18.

Todokoro D, Eguchi H, Yamada N, Sodeyama H, Hosoya R, Kishi S. Contact Lens-Related Infectious Keratitis with White Plaque Formation Caused by *Corynebacterium propinquum*. J Clin Microbiol. sept 2015;53(9):3092-5.

Uehara Y, Nakama H, Agematsu K, Uchida M, Kawakami Y, Abdul Fattah AS, *et al.* Bacterial interference among nasal inhabitants: eradication of *Staphylococcus aureus* from nasal cavities by artificial implantation of *Corynebacterium sp.* J Hosp Infect. févr 2000;44(2):127-33.

Vasquez JE, Walker ES, Franzus BW, Overbay BK, Reagan DR, Sarubbi FA. The epidemiology of mupirocin resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a Veterans' Affairs hospital. Infect Control Hosp Epidemiol. juill 2000;21(7):459-64.

Verhoeven PO, Gagnaire J, Botelho-Nevers E, Grattard F, Carricajo A, Lucht F, *et al.* Detection and clinical relevance of *Staphylococcus aureus* nasal carriage: an update. Expert Review of Anti-infective Therapy. 1 janv 2014;12(1):75-89.

Verhoeven PO, Grattard F, Carricajo A, Lucht F, Cazorla C, Garraud O, *et al.* An algorithm based on one or two nasal samples is accurate to identify persistent nasal carriers of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect. juin 2012;18(6):551-7.

Wang Y, Dai A, Huang S, Kuo S, Shu M, Tapia CP, *et al.* Propionic acid and its esterified derivative suppress the growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300. Benef Microbes. 1 juin 2014;5(2):161-8.

Wertheim HFL, Vos MC, Ott A, van Belkum A, Voss A, Kluytmans JAJW, *et al.* Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. Lancet. 21 août 2004;364(9435):703-5.

Wollenberg MS, Claesen J, Escapa IF, Aldridge KL, Fischbach MA, Lemon KP. Propionibacterium-produced coproporphyrin III induces *Staphylococcus aureus* aggregation and biofilm formation. mBio. 22 juill 2014;5(4):e01286-01214.

Wos-Oxley ML, Plumeier I, von Eiff C, Taudien S, Platzer M, Vilchez-Vargas R, *et al.* A poke into the diversity and associations within human anterior nare microbial communities. ISME J. juill 2010;4(7):839-51.

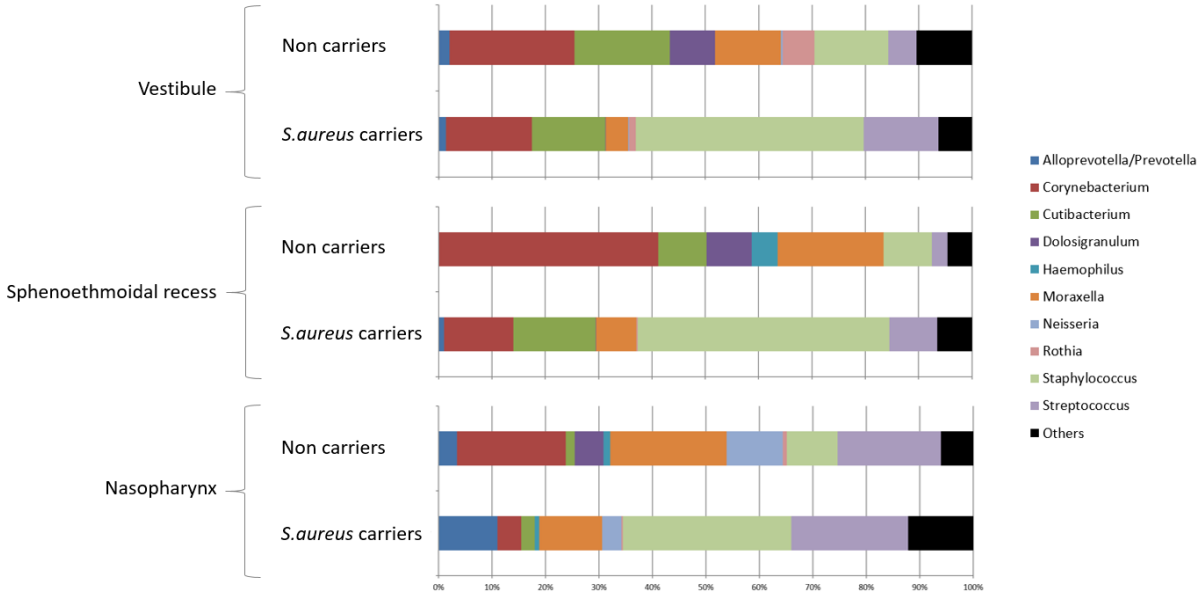
Xu L, Earl J, Pichichero ME. Nasopharyngeal microbiome composition associated with *Streptococcus pneumoniae* colonization suggests a protective role of Corynebacterium in young children. PLoS One. 2021a;16(9):e0257207.

Xu S, Qiu X, Hou X, Zhou H, Chen D, Wang X, *et al.* Direct detection of *Corynebacterium striatum, Corynebacterium propinquum,* and *Corynebacterium simulans* in sputum samples by high-resolution melt curve analysis. BMC Infect Dis. 7 janv 2021b;21(1):21.

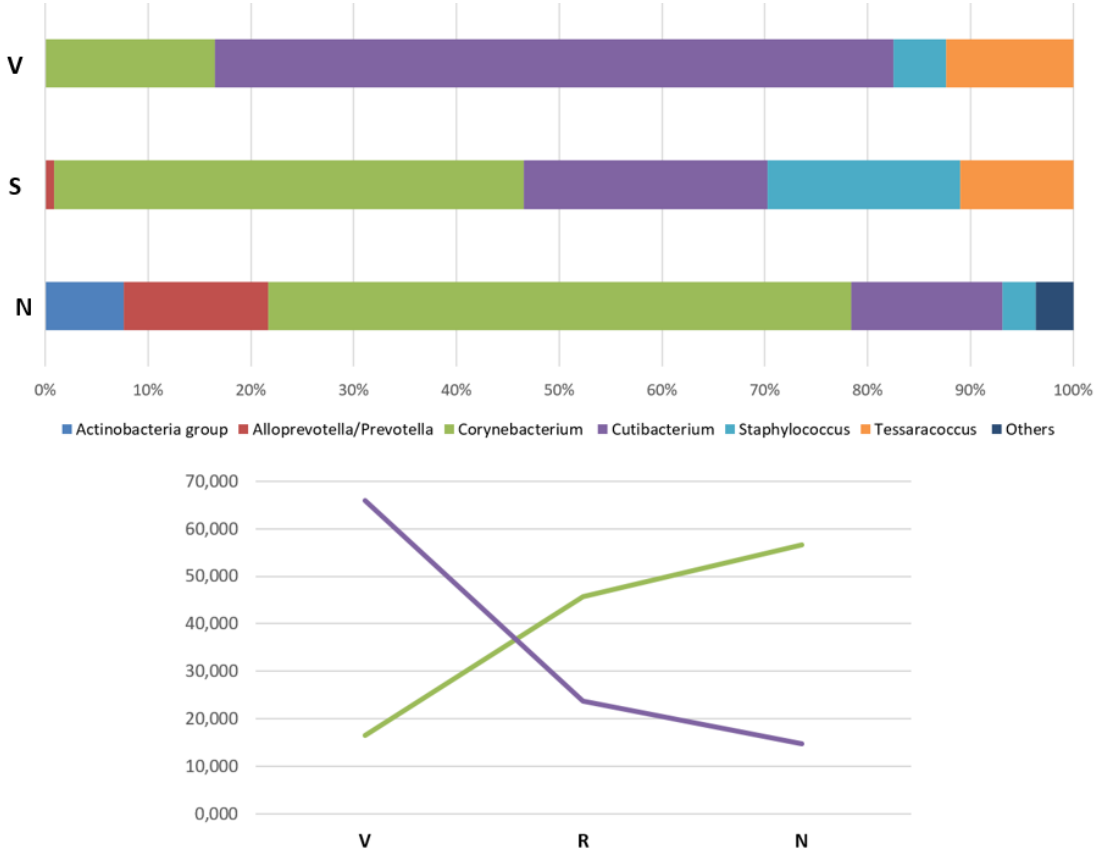
Yan M, Pamp SJ, Fukuyama J, Hwang PH, Cho DY, Holmes S, *et al.* Nasal microenvironments and interspecific interactions influence nasal microbiota complexity and *S. aureus* carriage. Cell Host Microbe. 11 déc 2013;14(6):631-40.

Zipperer A, Konnerth MC, Laux C, Berscheid A, Janek D, Weidenmaier C, *et al.* Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. Nature. 28 juill 2016;535(7613):511-6.

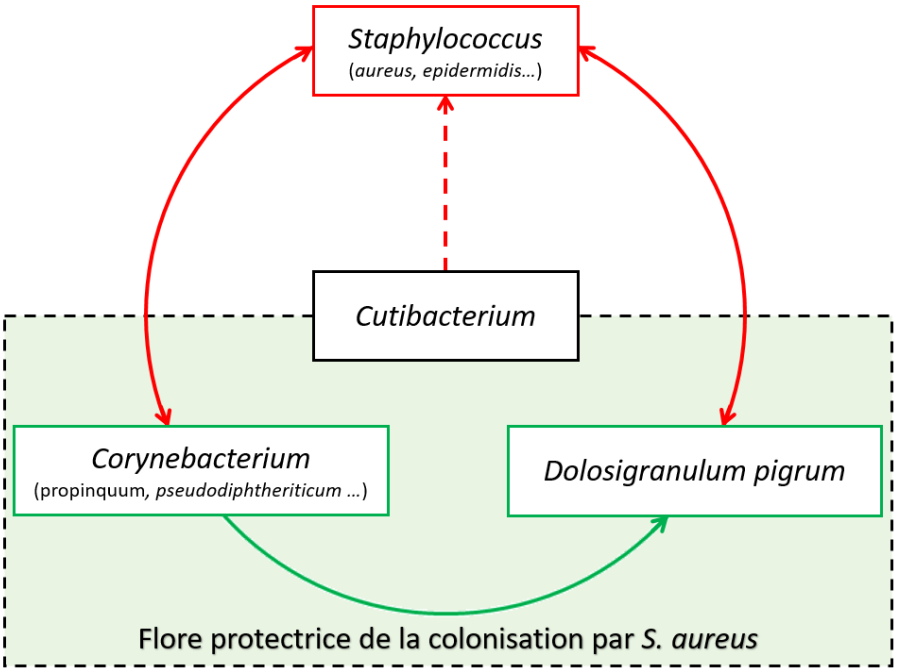
ANNEXES




**Annexe 1** : Composition moyenne du microbiote de chaque site prélevé au niveau nasal en fonction du statut de portage à *S. aureus*




**Annexe 2** : Analyse de la composition du microbiote du patient 18, seul patient porteur de C. propinquum pour lequel des données de séquençage 16S étaient disponibles + Evolution de l'abondance relative en *Corynebacterium* et *Cutibacterium* en fonction du site de prélèvement




**Annexe 3** : Principales interactions régissant la composition de la flore nasale

(flèches rouges : effet antagoniste, flèche verte : effet agoniste)

```
#01 fastq.info(fastq=C:\analysis\file.fastq, fasta=T)
#02 summary.seqs(fasta=C:\analysis\file.fasta)
#03 trim.seqs(fasta=C:\analysis\file.fasta, oligos=C:\analysis\files\oligo338.oligos, pdiffs=2,
maxhomop=7, minlength=130, maxlength=210, qfile=file.qual, qaverage=22)
#04 summary.seqs(fasta=C:\analysis\file.trim.fasta)
#05 unique.seqs(fasta=C:\analysis\file.trim.fasta)
#06 align.seqs(fasta=C:\analysis\file.trim.unique.fasta, flip=T, reference=$ref_aligned)
#07 summary.seqs(fasta=C:\analysis\file.trim.unique.align, name=C:\analysis\file.trim.names)
#08 screen.seqs(fasta=C:\analysis\file.trim.unique.align, name=C:\analysis\file.trim.names,
optimize=start-end-minlength)
#09 filter.seqs(fasta=C:\analysis\file.trim.unique.good.align, trump=., vertical=T)
#10 unique.seqs(fasta=C:\analysis\file.trim.unique.good.filter.fasta, name=C:\analysis
\file.trim.good.names)
#11 summary.seqs(fasta=C:\analysis\file.trim.unique.good.filter.unique.fasta)
#12 pre.cluster(fasta=C:\analysis\file.trim.unique.good.filter.unique.fasta, name=C:\analysis
\file.trim.unique.good.filter.names, diffs=2)
#13 chimera.vsearch(fasta=C:\analysis\file.trim.unique.good.filter.unique.precluster.fasta,
name=C:\analysis\file.trim.unique.good.filter.unique.precluster.names, dereplicate=t)
#14 remove.seqs(fasta=C:\analysis\file.trim.unique.good.filter.unique.precluster.fasta,
accnos=C:\analysis\file.trim.unique.good.filter.unique.precluster.denovo.vsearch.accnos, name=C:
\analysis\file.trim.unique.good.filter.unique.precluster.names, dups=T)
#15 summary.seqs(fasta=C:\analysis\file.trim.unique.good.filter.unique.precluster.pick.fasta)
#16 rename.file(input=file.trim.unique.good.filter.unique.precluster.pick.fasta,
new=file.mid.fasta)
#17 rename.file(input=file.trim.unique.good.filter.unique.precluster.pick.names,
new=file.mid.names)
#18 classify.seqs(fasta=C:\analysis\file.mid.fasta, name=C:\analysis\file.mid.names, template=
$rdp_fasta, taxonomy=$taxonomy_file, cutoff=80)
#19 remove.lineage(fasta=C:\analysis\file.mid.fasta, name=C:\analysis\file.mid.names,
taxonomy=C:\analysis\file.mid.$taxonomy_file.wang.taxonomy, taxon=Mitochondria-Chloroplast-
Eukaryota-unknown)
#20 summary.seqs(fasta=C:\analysis\file.mid.pick.fasta)
#21 summary.tax(taxonomy=current, name=current)
#22 rename.file(input=file.mid.pick.fasta, new=file.final.fasta)
#23 rename.file(input=file.mid.pick.names, new=file.final.names)
#24 rename.file(input=file.mid.$taxonomy_file.wang.pick.taxonomy, new=file.final.taxonomy)
#25 dist.seqs(fasta=C:\analysis\file.final.fasta, cutoff=0.05, processors=12)
#26 cluster.split(column=C:\analysis\file.final.dist, name=C:\analysis\file.final.names,
cutoff=0.05, processors=12)
#27 classify.otu(list=C:\analysis\file.final.opti_mcc.list, name=C:\analysis\file.final.names,
taxonomy=C:\analysis\file.final.taxonomy, label=0.05)
```

**Annexe 4** : Pipeline d'analyse des données métagénomiques 16S sur mothur

# Discussion générale

Ce travail de thèse avait pour objectif d'étudier plusieurs aspects très distincts de la colonisation nasale par *S. aureus* avec un travail de recherche clinique sur l'étude de la physiopathologie de la colonisation nasale à *S. aureus* (Article 1 et Chapitre 4), un travail de recherche translationnelle (Articles 2 et 3) autour des stratégies de décolonisation, et un travail de recherche fondamentale sur les mécanismes d'internalisation de *S. aureus* dans les cellules épithéliales (Chapitre 2).

Le vestibule nasal est considéré comme le principal site de colonisation chez l'Homme et seuls les prélèvements vestibulaires peuvent être utilisés pour définir le statut de porteurs persitants ou intermittents à *S. aureus*. Le statut de portage est important pour apprécier le risque infectieux associé au portage nasal de *S. aureus* et peut impacter la prise en charge des patients. L'exploration de la cavité nasale postérieure a mis en évidence un réservoir de *S. aureus* très similaire à celui qui peut être observé au niveau vestibulaire (Article 1). Avec une prévalence et des charges bactériennes identiques, nos résultats suggèrent que les prélèvements nasaux profonds, comme les prélèvements nasopharyngés réalisés pour la rehcerche de virus par exemple, pourraient être utilisés pour définir le statut de portage à *S. aureus* des patients.

Nous avons également montré la présence d'un réservoir intracellulaire de *S. aureus* provenant de prélèvements étagés de la cavité nasale (Article 1). Ces observations sont rares dans la littérature et reposent essentiellement sur l'analyse *ex vivo* de prélèvements vestibulaires. Au cours de ce travail de thèse nous nous sommes interessés à l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules épithéliales de la cavité nasale. Bien que *S. aureus* soit capable de déclencher son internalisation dans un très grand nombre de types cellulaires, d'autres mécanismes pourraient être impliqués dans l'invasion des muqueuses chez l'homme. Par exemple, l'alpha toxine de *S. aureus* (Hla) peut cliver les protéines de jonction intercellulaire E-cadhérine altérant alors la structure de la barrière épithéliale et favorisant le passage de la bactérie (Inoshima *et al.* 2011). Décrit au niveau digestif, la transcytose de complexes immunoglobulines-bactéries via les cellules M (Rochereau *et al.* 2013; Fransen *et al.* 2015) pourrait aussi avoir un rôle au niveau nasal au niveau du NALT (« Nasal-associated lymphoid tissue ») (Giannasca *et al.* 1997). Une meilleure compréhension de l'ensemble des facteurs de l'hote et de la bactérie sont essentielles pour comprendre les mécanismes impliqués dans le passage de la colonisation à l'infection pour mieux prévenir les infections.

Une étude a montré la présence de *S. aureus* dans des biopsies de 3 mm de la muqueuse nasale (Hanssen *et al.* 2017). Tous les sujets inclus étaient des volontaires sains dont le statut de portage à *S. aureus* avait été déterminé lors d'études cliniques antérieures (Sangvik *et al.* 2011; Jacobsen *et al.* 2012). Les biospsies ont été proposées à des volontaires aussi bien porteurs persistants de *S. aureus* que non porteurs persistants (non porteurs et porteurs intermittents). Les patients inclus dans les deux groupes ont été appareillés sur le sexe et l'âge (Hanssen *et al.* 2017). En parallèle de la biopsie nasale d'un des

deux vestibules, chaque patient a bénéficié d'un prélèvement de dépistage de *S. aureus* par écouvillonnage de l'autre narine. Entre les études publiées en 2011 et 2012 et celles de 2017, 4 volontaires anciennement classés comme porteurs persistants (22,2%) n'étaient plus porteurs de *S. aureus*. Pour ces 4 patients, aucun réservoir intracellulaire de *S. aureus* n'a été observé. Dix-neuf patients anciennement caractérisés comme non porteurs persistants de *S. aureus*, présentaient toujours des prélèvements négatifs. Etonnamment, pour 3 d'entre eux (15,8%), du *S. aureus* intra muqueux pouvait être observé. Malheureusement dans notre étude, la recherche de *S. aureus* intracellulaire n'a été faite que chez les patients présentant un écouvillonnage positif, rendant la comparaison impossible entre nos deux études sur ce point. Nous avons observé une prévalence du portage unilatéral de *S. aureus* de 22,6% et, pour quelques patients, seuls les prélèvements postérieurs étaient positifs (Article 1). Ces phénomènes pourraient peut être expliquer la présence de *S. aureus* intra-muqueux chez des patients *a priori* non porteurs de la bactérie dans cette étude norvégienne (Hanssen *et al.* 2017). Nos résultats indiquent également que la charge de *S. aureus* extracellulaire est directement corrélée à la détection d'un réservoir intracellulaire de *S. aureus*. Il est possible que des charges de *S. aureus* importantes augmentent la probabilité qu'un évènement d'internalisation se produise dans la cavité nasale augmentant la probabilité d'observer des cellules contenant la bactérie. A l'inverse, cette probabilité devient d'autant plus faible que la charge bactérienne diminue. La sensibilité du diagnostic de présence d'un réservoir intracellulaire de *S. aureus* est donc directment liée au nombre de cellules prélevées et analysées, ce qui souligne une fois de plus l'importance de la qualité du prélèvement en microbiologie clinique.

Le dépistage de *S. aureus* intracellulaire par microscopie confocale permet le diagnostic de certitude d'un réservoir intracellulaire. Cependant son application sur un très grand nombre de cellules est fastidieuse et ce type de microscope n'est pas disponible dans les laboratoires cliniques. Aussi, nous avons voulu développer une technique simple basée sur sa détection par culture bactériologique (Article 2). Habituellement, la détection et la quantification du réservoir intracellulaire de *S. aureus* par culture reposent sur l'élimination des bactéries extracellulaires avec des molécules antimicrobiennes et des étapes de lavage avant la mise en culture. Dans l'Article 1, l'élimination du *S. aureus* présent dans le secteur extracellulaire était basée sur l'utilisation de lysostaphine et de gentamicine. Une étude a montré que la gentamicine, aux doses utilisées dans nos expériences, pouvait être internalisée par les cellules phagocytaires et avoir un impact sur le réservoir intracellulaire de *S. aureus* (Kim *et al.* 2013). Dans cette même étude, les auteurs ont proposé d'utiliser uniquement de la lysostaphine dont l'activité se limite au secteur extracellulaire car cette molécule n'est pas internalisée par les phagocytes. Pour une utilisation *ex vivo*, Il est indispensable de s'assurer de la sensibilité de la souche de colonisation à la lysostaphine. Cependant, même avec des souches sensibles à la lysostaphine, il est important de noter

que pour des charges bactériennes élevées, son activité pourrait être insuffisante pour détruire en totalité le *S. aureus* extracellulaire. Cette molécule présente une activité lytique extrêmement rapide sur *S. aureus* (de l'ordre de quelques secondes), mais cette activité enzymatique semble rapidement atteindre un plateau (Kim *et al.* 2013). Des résultats similaires ont été obtenus dans notre laboratoire (données non présentées). Dans l'Article 1, certains patients présentaient des charges de *S. aureus* supérieures à $10^6$ voire $10^7$ UFC/ml d'écouvillon pouvant donc rendre impossible l'élimination complète des bactéries *S. aureus* extracellulaires par traitement à la lysostaphine seule. Une attention particulière doit être accordée à la procédure expérimentale utilisée pour mesurer le réservoir intracellulaire de *S. aureus* dans les prélèvements cliniques. L'utilisation de lysostaphine seule expose au risque de « faux positif » par manque d'éfficacité ou par résistance acquise de la souche de portage.

Il a été rapporté que d'autres peptides lytiques produits par des bactériophages comme la LysK (Becker *et al.* 2009; Fenton *et al.* 2011) ou la Lysine CF-301 (Schuch *et al.* 2017) ont également une forte activité sur *S. aureus* et que la LysK peut agir de façon synergique avec la lysostaphine (Becker *et al.* 2008). Ces synergies d'activité, la modification d'enzymes les rendant plus actives (Arroyo-Moreno *et al.* 2021) ou l'utilisation de protéines chimères formées de plusieurs éléments lytiques (Filatova *et al.* 2016) pourraient faciliter l'élimination des bactéries extracellulaires. Comme pour les expériences d'EPA sur modèles cellulaires (enzyme protection assay) de l'Article 2, l'inactivation de la lysostaphine par la protéinase K peut également être utilisée sur prélèvement *ex vivo*. L'utilisation de protéinase K permet alors de s'affranchir des étapes de centrifugations/lavages successives nécessaires à l'élimination de la lysostaphine et des enzymes lytiques évoquées précédemment. Une évaluation de la téchnique d'iEPA est encore nécessaire pour valider l'utilisation de cette technique comme outil du diagnostic *ex vivo* de détection des bactéries intracellulaires et notamment pour vérifier l'efficacité sur les prélèvements avec une forte charge de *S. aureus*.

Nous avons également voulu explorer les mécanismes à l'origine de l'entrée de *S. aureus* dans les cellules phagocytaires non professionnelles. La voie d'internalisation principale, médiée par les FnBPs de *S. aureus* et le récepteur cellulaire α5β1, étant déjà bien décrite, nous nous sommes intéressés aux voies d'entrées cellulaires dites secondaires et notamment à la protéine sécrétée Eap, précédemment rapportée comme permettant l'entrée de la bactérie dans des kératinocytes (Bur *et al.* 2013). Cette voie d'internalisation, décrite comme indépendante des FnBPs, semble impliquer un récepteur cellulaire dont l'identité n'est toujours pas certaine. L'interaction connue entre l'Eap et la protéine cellulaire ICAM-1 (Chavakis *et al.* 2005) nous a conduit à explorer le rôle de ces deux protéines dans l'internalisation de *S. aureus*. Malgré de premiers résultats prometteurs et le développement de nombreux outils cellulaires et bactériens, l'implication du récepteur ICAM-1 l'internalisation de *S. aureus* n'a pu être apportée (Chapitre 2). Si l'on peut se questionner sur la validité de certains modèles

utilisés (CRISPR ICAM-1 uniquement obtenu dans les cellules A549 par exemple), plusieurs points ne vont pas dans le sens de l'hypothèse d'une entrée de *S. aureus* via Eap et ICAM-1. Nos travaux ont montré que le récepteur ICAM-1 n'est pas fortement exprimé de façon basale sur les cellules HaCaT et A549, mais qu'une infection par rhinovirus ou un stimulus inflammatoire (traitement au TNFα) provoque une très forte expression membranaire de ce récepteur. Dans l'étude de 2013, relative au rôle de l'Eap dans l'internalisation de *S. aureus* (Bur *et al.* 2013), un des modèles cellulaires utilisé consistait en des cellules HaCaT présentant une expression basale faible du récepteur ICAM-1 (non vérifié dans l'étude) ce qui suggère dans ce modèle l'implication d'un autre récepteur. Dans nos expériences, l'utilisation de la souche SF8300 Δ*fnbA/B* entrainait une disparition quasi complète de la capacité d'internalisation de *S. aureus*. Cette observation n'est pas en faveur de l'implication de l'Eap dans une voie indépendante de FnBPs/α5β1, ni de n'importe quelle voie secondaire n'impliquant pas les FnBPs. Nos résultats semblent indiquer que si l'Eap favorise l'internalisation de *S. aureus*, ce mécanisme nécessite un récepteur qui n'est ni la protéine l'intégrine a5b1, ni la protéine la glycoproytéine ICAM-1 . Ces deux protéines sont en effet bien présentes sur notre modèle (A549 stimulée au TNFα) sans que la souche SF8300 Δ*fnb* ne puisse envahir les cellules, et ce, même en présence d'Eap recombinante. L'internalisation de *S. aureus* via l'Eap devrait alors impliquer un récepteur qui nécessite l'expression des FnBPs de *S. aureus* et un récepteur cellulaire encore inconnu. La confirmation de ces résultats par l'observation des modèles par microscope confocale sur notre modèle cellulaire et sur d'autres lignées pourrait permettre d'investiguer avec plus de sensibilité et d'apporter une réponse définitive à la question du rôle de l'interaction Eap-ICAM-1 dans l'adhésion et l'internalisation de *S. aureus*.

L'évaluation de l'efficacité intracellulaire des principales molécules utilisées pour la décolonisation nasale à *S. aureus* était également une part importante de ce travail de thèse. L'Article 3 nous montre ainsi que la majorité des antibiotiques utilisés pour décoloniser les porteurs ont une faible acitivité sur le réservoir intracellulaire de *S. aureus*. C'est notamment le cas de la mupirocine, antibiotique topique, à la base de la stratégie actuelle de décolonisation nasale. Cette activité très limitée de la mupirocine sur le *S. aureus* intracellulaire pourrait être à l'origine de certains cas de recolonisations observés dans les semaines qui suivent l'arrêt du traitement (Doebbeling *et al.* 1994; Bommer *et al.* 1995; Mody *et al.* 2015). Les antibiotiques présentant la meilleure activité intracellulaire sont la rifampicine et les fluoroquinolones, dont l'utilisation doit être limitée aux cas d'infections avérées. Des résultats identiques sont obtenus sur modèles d'ostéoblastes (Marro *et al.* 2021). L'excellente activité intracellulaire de la rifampicine peut expliquer son efficacité pour prévenir le risque de rechute des infections ostéo-articulaires à *S. aureus* (Meléndez-Carmona *et al.* 2019). Il est cependant nécessaire de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques capables de cibler le réservoir intracellulaire nasal de *S. aureus*. Contrairement aux antibiotiques dont le spectre peut être

assez large, les bactériophages ont une activité souvent ciblée sur certaines souches au sein d'une espèce bactérienne. Encore très rare malgré de très bons résultats, l'utilisation de phages lytiques *in vivo* se limite au traitement de dernière intention des infections à germes multi-résistants aux antibiotiques en compléments des molécules antibiotiques. Ces dernières présentent des concentrations minimales inhibitrices suffisament basses pour conserver une efficacité éventuelle (Ferry *et al.* 2020, 2022). Ces bactériophages vont présenter une excellente activité sur les bactéries extracellulaires mais, même s'ils ont été observés, et que l'on peut les retrouver dans le cytoplasme des cellules eucaryotes, l'activité lytique intracellulaire de ces phages n'est pas prouvée (Kolenda *et al.* 2019; Mannala *et al.* 2022). Une revue récente a décrit les différentes stratégies qui pourraient permettre d'éliminer les pathogènes intracellulaires (Liu *et al.* 2020). Certains peptides antimicrobiens amphiphiles (c'est-à-dire qui contiennent une région hydrophile et hydrophobe), capables de traverser la bicouche lipidique membranaire, sont connus pour avoir une activité intracellulaire (Porto *et al.* 2017). C'est le cas, par exemple, de la cathelicidine LL-37, naturellement présente au niveau de la peau de l'Homme et des temporines A et B produites par certaines espèces de grenouilles, dont l'activité sur le *S. aureus* intracellulaire a été décrite respectivement au niveau des ostéoblastes et des kératinocytes (Noore *et al.* 2013; Di Grazia *et al.* 2014). Des peptides synthétiques ont également été produits dans cet optique : le D-IK8 est un petit peptide qui a été capable de réduire de 96% la quantité de SARM et SASM dans un modèle de cellules HaCaT (Mohamed *et al.* 2016). En ce qui concerne la vectorisation de molécules, on peut citer par exemple l'utilisation d'enzymes lytiques sur lesquels a été ajouté un peptide de pénétration cellulaire (« cell-penetrating peptide » CPP) (Splith et Neundorf 2011; Wang *et al.* 2018; Röhrig *et al.* 2020). Une activité intracellulaire de vancomycine ou de lysostaphine a également été obtenue par vectorisation dans des vésicules lipidiques de type « mannosylated exosome » (Yang *et al.* 2018, 2021). L'utilisation d'un complexe antibiotique-anticorps capable d'entrer dans la cellule qui permet une activation ciblée de la molécule dans l'environnement protéolitique du phagolysosome, a montré une forte activité sur *S. aureus* en situtation intracellulaire (Lehar *et al.* 2015). Compte tenu de l'intérêt croissant porté à la localisation intracellulaire de *S. aureus* ces dernières années, le nombre de molécules efficaces sur ce réservoir a fortement augmenté. Dans le cadre de la décolonisation nasale à *S. aureus*, ces nouvelles solutions pourraient protéger les patients de la recolonisation à partir du réservoir intracellulaire de bactéries. Cependant à l'arrêt du traitement, la réimplantation de *S. aureus* au niveau de la muqueuse nasale serait toujours possible, que ce soit à partir d'un autre site de colonisation de la bactérie, ou de l'environnement extérieur. La décolonisation au long terme pourrait être obtenue en manipulant par le maintien d'une pression de sélection luttant contre l'implantation de *S. aureus*.

Le dernier aspect de la colonisation nasale à *S. aureus* abordé par ce travail de thèse est donc l'étude du microbiote nasal et des compétitions bactériennes pour la colonisation de la muqueuse nasale. Nous avons comparé la flore bactérienne de 15 patients porteurs de *S. aureus* et de 15 patients dont les prélèvements étaient négatifs (Chapitre 4). Ce travail a montré un continuum microbiologique entre le microbiote du vestibule nasal (2-3 premiers centimètres de la narine) qui est dominé par les phyla *Firmicutes* et *Actinobacteria*, le microbiote du récessus sphéno-etmoïdale qui constitue une flore de transition entre le vestibule et le nasopharynx, et le microbiote du nasopharynx qui est constitué par les phyla *Firmicutes*, *Actinobacteria* et *Proteobacteria* qui signe la proximité avec le microbiote oropharyngé.

Chez les patients porteurs de *S. aureus*, ce sont les autres espèces de staphylocoques qui sont principalement représentées au niveau de la cavité nasale. Comme déjà évoqué, cette observation peut être la résultante de la capacité qu'ont les staphylocoques à produire un grand nombre de bactériocines capables de cibler avant tout les autres espèces bactériennes (Janek *et al.* 2016). Chez les non porteurs de *S. aureus*, ce sont les corynebactéries qui sont les plus abondantes au niveau nasal. L'opposition entre la présence des espèces du genre *Corynebacterium* et *Staphylococcus* est souvent retrouvée dans la littérature. Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que certaines souches de corynebactéries sont capables d'inhiber la croissance et la capacité de colonisation de *S. aureus* (Uehara *et al.* 2000; Yan *et al.* 2013; Hardy *et al.* 2019). Malgré une prévalence de portage de *D. pigrum* bien inférieure à celle des corynebactéries, la présence de *D. pigrum* chez un patient est le principal élément prédicteur de l'absence de colonisation à *S. aureus* (Chapitre 4). Le pouvoir inhibiteur de *D. pigrum* sur *S. aureus* a été récemment rapporté, ainsi que la synergie existante entre *D. pigrum* et certaines espèces de corynebactéries (Brugger *et al.* 2020; De Boeck *et al.* 2021).

Parmi ces espèces, nous avons observé pour la première fois que certaines souches de *C. propinquum* ont été capables d'inhiber la croissance et l'invasion muqueuse de *S. aureus* (Chapitre 4). Pour développer des stratégies efficaces de manipulation du microbiote et pour prévenir la colonisation à *S. aureus*, il est important de pouvoir identifier un maximum de souches qui pourraient servir à l'élaboration d'une flore synthétique. Ces souches ne doivent pas être pathogènes pour l'Homme et doivent pouvoir s'implanter de façon durable au niveau de la muqueuse nasale tout en ayant une synergie d'action avec les autres bactéries composant la flore synthétique pour empêcher la colonisation à *S. aureus*. Les outils de séquençage de génomes complets seront utiles à la caractérisation de ces bactéries et à la compréhension des mécanismes à l'origine des interactions observées entre microorganismes. L'évaluation de la capacité des souches bactériennes à empêcher la colonisation nasale à *S. aureus* va nécessiter le développement de modèles animaux de colonisation à *S. aureus* et la conduite d'études cliniques longitudinales au long terme pour évaluer la capacité d'implantation de ces

souches ainsi que l'absence de recolonisation à *S. aureus*. Pour envisager une thérapie de changement du microbiote, il sera nécessaire détablir des protocles pour éliminer dans un premier temps les espèces bactériennes pouvant empêcher l'implantation d'une nouvelle flore synthétique. SI l'utilisation d'antibiotiques est alors possible, l'emploi de peptides lytiques (Lysostaphine, LysK, Lysine CF-301) pourrait permettre l'élimination ciblée de *S. aureus* et des autres espèces de staphylocoques (O'Flaherty *et al.* 2005; Schuch *et al.* 2017; Bonar *et al.* 2021). Nous nous sommes intéréssés aux interactions entre bactéries mais la présence de phages au niveau de la cavité nasale peut également avoir un rôle majeur dans la composition du microbiote nasal. Très récemment une souche de *Lactococcus lactis* était modifiée pour exprimer et secréter des peptides lytiques de phages actifs sur *S. aureus* (Chandran *et al.* 2022). Des transformations de ce type sur des souches déjà actives sur *S. aureus*, pourraient alors permettre de multiplier leur capacité à prévenir les épisodes de recolonisation nasale à *S. aureus* observées avec les stratégies actuelles de traitement.

# Références bibliographiques

Abdel-Ghany M, el-Gendy K, Zhang S, Racker E. Control of src kinase activity by activators, inhibitors, and substrate chaperones. Proc Natl Acad Sci U S A. sept 1990;87(18):7061-5.

Agerer F, Lux S, Michel A, Rohde M, Ohlsen K, Hauck CR. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* reveals a functional link between focal adhesion kinase and cortactin in integrin-mediated internalisation. J Cell Sci. 15 mai 2005;118(Pt 10):2189-200.

Ahluwalia A, Sood A, Sood A, Lakshmy R, Kapil A, Pandey RM. Nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in patients with diabetes mellitus. Diabet Med. juin 2000;17(6):487-8.

van den Akker ELT, Nouwen JL, Melles DC, van Rossum EFC, Koper JW, Uitterlinden AG, *et al.* *Staphylococcus aureus* nasal carriage is associated with glucocorticoid receptor gene polymorphisms. J Infect Dis. 15 sept 2006;194(6):814-8.

Al-Rawahi GN, Schreader AG, Porter SD, Roscoe DL, Gustafson R, Bryce EA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage among injection drug users: six years later. J Clin Microbiol. févr 2008;46(2):477-9.

Andersen PS, Pedersen JK, Fode P, Skov RL, Fowler VG, Stegger M, *et al.* Influence of host genetics and environment on nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in danish middle-aged and elderly twins. J Infect Dis. oct 2012;206(8):1178-84.

Anderson DJ, Kaye KS, Chen LF, Schmader KE, Choi Y, Sloane R, *et al.* Clinical and financial outcomes due to methicillin resistant *Staphylococcus aureus* surgical site infection: a multi-center matched outcomes study. PLoS One. 15 déc 2009;4(12):e8305.

Arroyo-Moreno S, Begley M, Dembicka K, Coffey A. Engineering of the CHAPk Staphylococcal Phage Endolysin to Enhance Antibacterial Activity against Stationary-Phase Cells. Antibiotics (Basel). 16 juin 2021;10(6):722.

Ashraf S, Cheng J, Zhao X. Clumping factor A of *Staphylococcus aureus* interacts with AnnexinA2 on mammary epithelial cells. Sci Rep. 19 janv 2017;7:40608.

Askarian F, Ajayi C, Hanssen A-M, van Sorge NM, Pettersen I, Diep DB, *et al.* The interaction between *Staphylococcus aureus* SdrD and desmoglein 1 is important for adhesion to host cells. Sci Rep. 29 févr 2016;6:22134.

Balwit JM, van Langevelde P, Vann JM, Proctor RA. Gentamicin-resistant menadione and hemin auxotrophic *Staphylococcus aureus* persist within cultured endothelial cells. J Infect Dis. oct 1994;170(4):1033-7.

Barb JJ, Oler AJ, Kim H-S, Chalmers N, Wallen GR, Cashion A, *et al.* Development of an Analysis Pipeline Characterizing Multiple Hypervariable Regions of 16S rRNA Using Mock Samples. PLoS One. févr 2016.

Barik A, Patel GD, Sen SK, Rajhans G, Nayak C, Raut S. Probiotic Characterization of Indigenous Kocuria flava Y4 Strain Isolated from Dioscorea villosa Leaves. Probiotics Antimicrob Proteins. 25 nov 2021;

Baur S, Rautenberg M, Faulstich M, Grau T, Severin Y, Unger C, *et al.* A Nasal Epithelial Receptor for *Staphylococcus aureus* WTA Governs Adhesion to Epithelial Cells and Modulates Nasal Colonization. PLoS Pathog. mai 2014.

Bebko SP, Green DM, Awad SS. Effect of a preoperative decontamination protocol on surgical site infections in patients undergoing elective orthopedic surgery with hardware implantation. JAMA Surg. mai 2015;150(5):390-5.

Becker SC, Dong S, Baker JR, Foster-Frey J, Pritchard DG, Donovan DM. LysK CHAP endopeptidase domain is required for lysis of live staphylococcal cells. FEMS Microbiol Lett. mai 2009;294(1):52-60.

Becker SC, Foster-Frey J, Donovan DM. The phage K lytic enzyme LysK and lysostaphin act synergistically to kill MRSA. FEMS Microbiol Lett. oct 2008;287(2):185-91.

van Belkum A, Melles DC, Nouwen J, van Leeuwen WB, van Wamel W, Vos MC, *et al.* Co-evolutionary aspects of human colonisation and infection by *Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol. janv 2009a;9(1):32-47.

van Belkum A, Verkaik NJ, de Vogel CP, Boelens HA, Verveer J, Nouwen JL, *et al.* Reclassification of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage Types. J Infect Dis. 2009b;199(12):1820-6.

Belles C, Kuhl A, Nosheny R, Carding SR. Plasma membrane expression of heat shock protein 60 in vivo in response to infection. Infect Immun. août 1999;67(8):4191-200.

Berthelot P, Grattard F, Cazorla C, Passot J-P, Fayard J-P, Meley R, *et al.* Is nasal carriage of *Staphylococcus aureus* the main acquisition pathway for surgical-site infection in orthopaedic surgery? Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1 avr 2010;29(4):373-82.

Bessesen MT, Kotter CV, Wagner BD, Adams JC, Kingery S, Benoit JB, *et al.* MRSA colonization and the nasal microbiome in adults at high risk of colonization and infection. J Infect. déc 2015;71(6):649-57.

Bibel DJ, Aly R, Shinefield HR, Maibach HI, Strauss WG. Importance of the keratinized epithelial cell in bacterial adherence. J Invest Dermatol. oct 1982;79(4):250-3.

Bingham RJ, Rudiño-Piñera E, Meenan NAG, Schwarz-Linek U, Turkenburg JP, Höök M, *et al.* Crystal structures of fibronectin-binding sites from *Staphylococcus aureus* FnBPA in complex with fibronectin domains. Proc Natl Acad Sci U S A. 26 août 2008;105(34):12254-8.

Biswas R, Voggu L, Simon UK, Hentschel P, Thumm G, Götz F. Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. FEMS Microbiol Lett. juin 2006;259(2):260-8.

Bjerketorp J, Nilsson M, Ljungh Å, Flock J-I, Jacobsson K, Frykberg L. A novel von Willebrand factor binding protein expressed by *Staphylococcus aureus*. Microbiology (Reading). juill 2002;148(Pt 7):2037-44.

Bode LGM, Kluytmans JAJW, Wertheim HFL, Bogaers D, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Roosendaal R, *et al.* Preventing surgical-site infections in nasal carriers of *Staphylococcus aureus*. N Engl J Med. 7 janv 2010;362(1):9-17.

Bogaert D, van Belkum A, Sluijter M, Luijendijk A, de Groot R, Rümke HC, *et al.* Colonisation by Streptococcus pneumoniae and *Staphylococcus aureus* in healthy children. Lancet. 5 juin 2004;363(9424):1871-2.

Bommer J, Vergetis W, Andrassy K, Hingst V, Borneff M, Huber W. Elimination of *Staphylococcus aureus* in hemodialysis patients. ASAIO J. mars 1995;41(1):127-31.

Bonar E, Bukowski M, Chlebicka K, Madry A, Bereznicka A, Kosecka-Strojek M, *et al.* Human skin microbiota-friendly lysostaphin. Int J Biol Macromol. 28 avr 2021;

Brand AM, de Kwaadsteniet M, Dicks LMT. The ability of nisin F to control *Staphylococcus aureus* infection in the peritoneal cavity, as studied in mice. Lett Appl Microbiol. déc 2010;51(6):645-9.

Breuer K, HAussler S, Kapp A, Werfel T. *Staphylococcus aureus*: colonizing features and influence of an antibacterial treatment in adults with atopic dermatitis. Br J Dermatol. juill 2002;147(1):55-61.

Brugger SD, Eslami SM, Pettigrew MM, Escapa IF, Henke MT, Kong Y, *et al.* Dolosigranulum pigrum Cooperation and Competition in Human Nasal Microbiota. mSphere. 9 sept 2020;5(5).

Bryce E, Wong T, Forrester L, Masri B, Jeske D, Barr K, *et al.* Nasal photodisinfection and chlorhexidine wipes decrease surgical site infections: a historical control study and propensity analysis. J Hosp Infect. oct 2014;88(2):89-95.

Buckley AM, Moura IB, Wilcox MH. The potential of microbiome replacement therapies for Clostridium difficile infection. Curr Opin Gastroenterol. 1 janv 2022;38(1):1-6.

Bur S, Preissner KT, Herrmann M, Bischoff M. The *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein promotes bacterial internalization by keratinocytes independent of fibronectin-binding proteins. J Invest Dermatol. août 2013;133(8):2004-12.

Burian M, Rautenberg M, Kohler T, Fritz M, Krismer B, Unger C, *et al.* Temporal expression of adhesion factors and activity of global regulators during establishment of *Staphylococcus aureus* nasal colonization. J Infect Dis. 1 mai 2010;201(9):1414-21.

Burke FM, Di Poto A, Speziale P, Foster TJ. The A domain of fibronectin-binding protein B of *Staphylococcus aureus* contains a novel fibronectin binding site. FEBS J. juill 2011;278(13):2359-71.

Burke FM, McCormack N, Rindi S, Speziale P, Foster TJ. Fibronectin-binding protein B variation in *Staphylococcus aureus*. BMC Microbiol. 1 juin 2010;10:160.

Camarinha-Silva A, Jáuregui R, Pieper DH, Wos-Oxley ML. The temporal dynamics of bacterial communities across human anterior nares. Environ Microbiol Rep. févr 2012;4(1):126-32.

Chalermwatanachai T, Vilchez-Vargas R, Holtappels G, Lacoere T, Jáuregui R, Kerckhof F-M, *et al.* Chronic rhinosinusitis with nasal polyps is characterized by dysbacteriosis of the nasal microbiota. Sci Rep. 21 2018;8(1):7926.

Chandran C, Tham HY, Abdul Rahim R, Lim SHE, Yusoff K, Song AA-L. Lactococcus lactis secreting phage lysins as a potential antimicrobial against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. PeerJ. 2022;10:e12648.

Chavakis T, Wiechmann K, Preissner KT, Herrmann M. *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial « secretable expanded repertoire adhesive molecules » (SERAM) in disturbing host defense systems. Thromb Haemost. août 2005;94(2):278-85.

Chen B, Dai X, He B, Pan K, Li H, Liu X, *et al.* Differences in *Staphylococcus aureus* nasal carriage and molecular characteristics among community residents and healthcare workers at Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Southern China. BMC Infect Dis. 30 juill 2015a;15:303.

Chen Y, Jiang C, Jin M, Gong Y, Zhang X. The role of Rab6 GTPase in the maturation of phagosome against *Staphylococcus aureus*. Int J Biochem Cell Biol. avr 2015b;61:35-44.

Chi C-Y, Lin C-C, Liao I-C, Yao Y-C, Shen F-C, Liu C-C, *et al.* Panton-Valentine leukocidin facilitates the escape of *Staphylococcus aureus* from human keratinocyte endosomes and induces apoptosis. J Infect Dis. 15 janv 2014;209(2):224-35.

Chou Y-H, Lee M-S, Lin R-Y, Wu C-Y. Risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft-tissue infections in outpatients in Taiwan. Epidemiol Infect. mars 2015;143(4):749-53.

Chow JW, Yu VL. *Staphylococcus aureus* nasal carriage in hemodialysis patients. Its role in infection and approaches to prophylaxis. Arch Intern Med. juin 1989;149(6):1258-62.

Clarke SR, Brummell KJ, Horsburgh MJ, McDowell PW, Mohamad SAS, Stapleton MR, *et al.* Identification of In Vivo–Expressed Antigens of *Staphylococcus aureus* and Their Use in Vaccinations for Protection against Nasal Carriage. The Journal of Infectious Diseases. 15 avr 2006;193(8):1098-108.

Clarke SR, Harris LG, Richards RG, Foster SJ. Analysis of Ebh, a 1.1-megadalton cell wall-associated fibronectin-binding protein of *Staphylococcus aureus*. Infect Immun. déc 2002;70(12):6680-7.

Clarke SR, Wiltshire MD, Foster SJ. IsdA of *Staphylococcus aureus* is a broad spectrum, iron-regulated adhesin. Mol Microbiol. mars 2004;51(5):1509-19.

Clement S, Vaudaux P, Francois P, Schrenzel J, Huggler E, Kampf S, *et al.* Evidence of an intracellular reservoir in the nasal mucosa of patients with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis. J Infect Dis. 15 sept 2005;192(6):1023-8.

Clooney AG, Fouhy F, Sleator RD, O' Driscoll A, Stanton C, Cotter PD, *et al.* Comparing Apples and Oranges?: Next Generation Sequencing and Its Impact on Microbiome Analysis. PLoS One. févr 2016.

Cole AL, Schmidt-Owens M, Beavis AC, Chong CF, Tarwater PM, Schaus J, *et al.* Cessation from Smoking Improves Innate Host Defense and Clearance of Experimentally Inoculated Nasal *Staphylococcus aureus*. Infect Immun. avr 2018;86(4):e00912-17.

Cole AM, Tahk S, Oren A, Yoshioka D, Kim YH, Park A, *et al.* Determinants of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. Clin Diagn Lab Immunol. nov 2001;8(6):1064-9.

Copeland E, Leonard K, Carney R, Kong J, Forer M, Naidoo Y, *et al.* Chronic Rhinosinusitis: Potential Role of Microbial Dysbiosis and Recommendations for Sampling Sites. Front Cell Infect Microbiol. 2018;8:57.

Corrigan RM, Miajlovic H, Foster TJ. Surface proteins that promote adherence of *Staphylococcus aureus* to human desquamated nasal epithelial cells. BMC Microbiol. 30 janv 2009;9:22.

Corriveau M-N, Zhang N, Holtappels G, Van Roy N, Bachert C. Detection of *Staphylococcus aureus* in Nasal Tissue with Peptide Nucleic Acid–Fluorescence in Situ Hybridization. Am J Rhinol-Allergy. 1 sept 2009;23(5):461-5.

Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. Clin Infect Dis. 1 janv 2003;36(1):53-9.

Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. Science. 18 déc 2009;326(5960):1694-7.

Dacre JE, Emmerson AM, Jenner EA. Nasal carriage of gentamicin and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* treated with topical pseudomonic acid. Lancet. 29 oct 1983;2(8357):1036.

van Dalen R, De La Cruz Diaz JS, Rumpret M, Fuchsberger FF, van Teijlingen NH, Hanske J, *et al.* Langerhans Cells Sense *Staphylococcus aureus* Wall Teichoic Acid through Langerin To Induce Inflammatory Responses. mBio. 14 mai 2019;10(3):e00330-19.

van Dalen R, Peschel A, van Sorge NM. Wall Teichoic Acid in *Staphylococcus aureus* Host Interaction. Trends Microbiol. déc 2020;28(12):985-98.

Darbandi A, Asadi A, Mahdizade Ari M, Ohadi E, Talebi M, Halaj Zadeh M, *et al.* Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. J Clin Lab Anal. janv 2022;36(1):e24093.

De Boeck I, Wittouck S, Martens K, Claes J, Jorissen M, Steelant B, *et al.* Anterior Nares Diversity and Pathobionts Represent Sinus Microbiome in Chronic Rhinosinusitis. mSphere. 27 2019;4(6).

De Boeck I, Wittouck S, Martens K, Spacova I, Cauwenberghs E, Allonsius CN, *et al.* The nasal mutualist Dolosigranulum pigrum AMBR11 supports homeostasis via multiple mechanisms. iScience. 24 sept 2021;24(9):102978.

De Grandi R, Drago L, Bidossi A, Bottagisio M, Gelardi M, De Vecchi E. Putative Microbial Population Shifts Attributable to Nasal Administration of Streptococcus salivarius 24SMBc and Streptococcus oralis 89a. Probiotics Antimicrob Proteins. déc 2019;11(4):1219-26.

Demos M, McLeod MP, Nouri K. Recurrent furunculosis: a review of the literature. Br J Dermatol. oct 2012;167(4):725-32.

Di Grazia A, Luca V, Segev-Zarko L-AT, Shai Y, Mangoni ML. Temporins A and B stimulate migration of HaCaT keratinocytes and kill intracellular *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. mai 2014;58(5):2520-7.

Ding T, Song T, Zhou B, Geber A, Ma Y, Zhang L, *et al.* Microbial Composition of the Human Nasopharynx Varies According to Influenza Virus Type and Vaccination Status. mBio. 02 2019;10(4).

Doebbeling BN, Breneman DL, Neu HC, Aly R, Yangco BG, Holley HP, *et al.* Elimination of *Staphylococcus aureus* nasal carriage in health care workers: analysis of six clinical trials with calcium mupirocin ointment. The Mupirocin Collaborative Study Group. Clin Infect Dis. sept 1993;17(3):466-74.

Doebbeling BN, Reagan DR, Pfaller MA, Houston AK, Hollis RJ, Wenzel RP. Long-term efficacy of intranasal mupirocin ointment. A prospective cohort study of *Staphylococcus aureus* carriage. Arch Intern Med. 11 juill 1994;154(13):1505-8.

Dryden MS, Dailly S, Crouch M. A randomized, controlled trial of tea tree topical preparations versus a standard topical regimen for the clearance of MRSA colonization. J Hosp Infect. avr 2004;56(4):283-6.

Dunyach-Remy C, Courtais-Coulon C, DeMattei C, Jourdan N, Schuldiner S, Sultan A, *et al.* Link between nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and infected diabetic foot ulcers. Diabetes Metab. avr 2017;43(2):167-71.

Dziewanowska K, Carson AR, Patti JM, Deobald CF, Bayles KW, Bohach GA. Staphylococcal fibronectin binding protein interacts with heat shock protein 60 and integrins: role in internalization by epithelial cells. Infect Immun. nov 2000;68(11):6321-8.

Eckhart L, Lippens S, Tschachler E, Declercq W. Cell death by cornification. Biochim Biophys Acta. déc 2013;1833(12):3471-80.

von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. Nasal Carriage as a Source of *Staphylococcus aureus* Bacteremia. New England Journal of Medicine. 4 janv 2001;344(1):11-6.

Elie-Turenne M-C, Fernandes H, Mediavilla JR, Rosenthal M, Mathema B, Singh A, *et al.* Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* colonization among healthcare professionals in an urban teaching hospital. Infect Control Hosp Epidemiol. juin 2010;31(6):574-80.

Ellington JK, Harris M, Webb L, Smith B, Smith T, Tan K, *et al.* Intracellular *Staphylococcus aureus*. A mechanism for the indolence of osteomyelitis. J Bone Joint Surg Br. août 2003;85(6):918-21.

Ellington JK, Reilly SS, Ramp WK, Smeltzer MS, Kellam JF, Hudson MC. Mechanisms of *Staphylococcus aureus* invasion of cultured osteoblasts. Microb Pathog. juin 1999;26(6):317-23.

Emonts M, Uitterlinden AG, Nouwen JL, Kardys I, Maat MPM de, Melles DC, *et al.* Host polymorphisms in interleukin 4, complement factor H, and C-reactive protein associated with nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and occurrence of boils. J Infect Dis. 1 mai 2008;197(9):1244-53.

Ena J, Boelaert JR, Boyken LD, Van Landuyt HW, Godard CA, Herwaldt LA. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections in patients on hemodialysis. Infect Control Hosp Epidemiol. févr 1994;15(2):78-81.

Fawley WN, Parnell P, Hall J, Wilcox MH. Surveillance for mupirocin resistance following introduction of routine peri-operative prophylaxis with nasal mupirocin. J Hosp Infect. mars 2006;62(3):327-32.

Feazel LM, Robertson CE, Ramakrishnan VR, Frank DN. Microbiome complexity and *Staphylococcus aureus* in chronic rhinosinusitis. Laryngoscope. févr 2012;122(2):467-72.

Fenton M, Ross RP, McAuliffe O, O'Mahony J, Coffey A. Characterization of the staphylococcal bacteriophage lysin CHAP(K). J Appl Microbiol. oct 2011;111(4):1025-35.

Ferry T, Kolenda C, Batailler C, Gustave C-A, Lustig S, Malatray M, *et al.* Phage Therapy as Adjuvant to Conservative Surgery and Antibiotics to Salvage Patients With Relapsing *S. aureus* Prosthetic Knee Infection. Front Med (Lausanne). 2020;7:570572.

Ferry T, Kolenda C, Briot T, Lustig S, Leboucher G, Laurent F, *et al.* Implementation of a complex bone and joint infection phage therapy centre in France: lessons to be learned after 4 years' experience. Clin Microbiol Infect. janv 2022;28(1):145-6.

Filatova LY, Donovan DM, Ishnazarova NT, Foster-Frey JA, Becker SC, Pugachev VG, *et al.* A Chimeric LysK-Lysostaphin Fusion Enzyme Lysing *Staphylococcus aureus* Cells: a Study of Both Kinetics of Inactivation and Specifics of Interaction with Anionic Polymers. Appl Biochem Biotechnol. oct 2016;180(3):544-57.

Flannagan RS, Cosío G, Grinstein S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. Nat Rev Microbiol. mai 2009;7(5):355-66.

Flannagan RS, Kuiack RC, McGavin MJ, Heinrichs DE. *Staphylococcus aureus* Uses the GraXRS Regulatory System To Sense and Adapt to the Acidified Phagolysosome in Macrophages. mBio. 17 juill 2018;9(4):e01143-18.

Flores Ramos S, Brugger SD, Escapa IF, Skeete CA, Cotton SL, Eslami SM, *et al.* Genomic Stability and Genetic Defense Systems in Dolosigranulum pigrum, a Candidate Beneficial Bacterium from the Human Microbiome. mSystems. 26 oct 2021;6(5):e0042521.

Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. Nat Rev Microbiol. janv 2014;12(1):49-62.

Fouhy F, Clooney AG, Stanton C, Claesson MJ, Cotter PD. 16S rRNA gene sequencing of mock microbial populations- impact of DNA extraction method, primer choice and sequencing platform. BMC Microbiol. 2016;16(1):123.

Fowler T, Johansson S, Wary KK, Höök M. Src kinase has a central role in in vitro cellular internalization of *Staphylococcus aureus*. Cell Microbiol. juin 2003;5(6):417-26.

Fowler T, Wann ER, Joh D, Johansson S, Foster TJ, Höök M. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. Eur J Cell Biol. oct 2000;79(10):672-9.

Frank DN, Feazel LM, Bessesen MT, Price CS, Janoff EN, Pace NR. The human nasal microbiota and *Staphylococcus aureus* carriage. PLoS ONE. 17 mai 2010;5(5):e10598.

Fransen F, Zagato E, Mazzini E, Fosso B, Manzari C, El Aidy S, *et al.* BALB/c and C57BL/6 Mice Differ in Polyreactive IgA Abundance, which Impacts the Generation of Antigen-Specific IgA and Microbiota Diversity. Immunity. 15 sept 2015;43(3):527-40.

Gagnaire J, Botelho-Nevers E, Martin-Simoes P, Morel J, Zéni F, Maillard N, *et al.* Interplay of nasal and rectal carriage of *Staphylococcus aureus* in intensive care unit patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. oct 2019;38(10):1811-9.

Garcia LG, Lemaire S, Kahl BC, Becker K, Proctor RA, Denis O, *et al.* Antibiotic activity against small-colony variants of *Staphylococcus aureus*: review of in vitro, animal and clinical data. J Antimicrob Chemother. juill 2013;68(7):1455-64.

Garzoni C, Kelley WL. *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. Trends in Microbiology. 1 févr 2009;17(2):59-65.

Giannasca PJ, Boden JA, Monath TP. Targeted delivery of antigen to hamster nasal lymphoid tissue with M-cell-directed lectins. Infect Immun. oct 1997;65(10):4288-98.

Giese B, Glowinski F, Paprotka K, Dittmann S, Steiner T, Sinha B, *et al.* Expression of δ-toxin by *Staphylococcus aureus* mediates escape from phago-endosomes of human epithelial and endothelial cells in the presence of β-toxin. Cell Microbiol. févr 2011;13(2):316-29.

Gómez MI, Lee A, Reddy B, Muir A, Soong G, Pitt A, *et al. Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. Nat Med. août 2004;10(8):842-8.

Grice EA, Kong HH, Conlan S, Deming CB, Davis J, Young AC, *et al.* Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. Science. 29 mai 2009;324(5931):1190-2.

Grosz M, Kolter J, Paprotka K, Winkler A-C, Schäfer D, Chatterjee SS, *et al.* Cytoplasmic replication of *Staphylococcus aureus* upon phagosomal escape triggered by phenol-soluble modulin α. Cell Microbiol. avr 2014;16(4):451-65.

Haggar A, Ehrnfelt C, Holgersson J, Flock J-I. The extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* inhibits neutrophil binding to endothelial cells. Infect Immun. oct 2004;72(10):6164-7.

Hanssen A-M, Kindlund B, Stenklev NC, Furberg A-S, Fismen S, Olsen RS, *et al.* Localization of *Staphylococcus aureus* in tissue from the nasal vestibule in healthy carriers. BMC Microbiology. 2017;17:89.

Hanzelmann D, Joo H-S, Franz-Wachtel M, Hertlein T, Stevanovic S, Macek B, *et al.* Toll-like receptor 2 activation depends on lipopeptide shedding by bacterial surfactants. Nat Commun. 29 juill 2016;7:12304.

Harbarth S, Fankhauser C, Schrenzel J, Christenson J, Gervaz P, Bandiera-Clerc C, *et al.* Universal screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at hospital admission and nosocomial infection in surgical patients. JAMA. 12 mars 2008;299(10):1149-57.

Hardy BL, Dickey SW, Plaut RD, Riggins DP, Stibitz S, Otto M, *et al.* Corynebacterium pseudodiphtheriticum Exploits *Staphylococcus aureus* Virulence Components in a Novel Polymicrobial Defense Strategy. MBio. 8 janv 2019;10(1).

Hartleib J, Köhler N, Dickinson RB, Chhatwal GS, Sixma JJ, Hartford OM, *et al.* Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. Blood. 15 sept 2000;96(6):2149-56.

Haslinger-Löffler B, Kahl BC, Grundmeier M, Strangfeld K, Wagner B, Fischer U, *et al.* Multiple virulence factors are required for *Staphylococcus aureus*-induced apoptosis in endothelial cells. Cell Microbiol. août 2005;7(8):1087-97.

Hauck CR, Ohlsen K. Sticky connections: extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by *Staphylococcus aureus*. Curr Opin Microbiol. févr 2006;9(1):5-11.

Hayden MK, Lolans K, Haffenreffer K, Avery TR, Kleinman K, Li H, *et al.* Chlorhexidine and Mupirocin Susceptibility of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates in the REDUCE-MRSA Trial. J Clin Microbiol. nov 2016;54(11):2735-42.

Hayes SH, Biggs TC, Goldie SP, Harries PG, Walls AF, Allan RN, *et al. Staphylococcus aureus* internalisation in mast cells in nasal polyps - Characterisation of interactions and potential mechanisms. J Allergy Clin Immunol. 26 juin 2019;

Herbert S, Bera A, Nerz C, Kraus D, Peschel A, Goerke C, *et al.* Molecular basis of resistance to muramidase and cationic antimicrobial peptide activity of lysozyme in staphylococci. PLoS Pathog. 27 juill 2007;3(7):e102.

Hill RL, Casewell MW. The in-vitro activity of povidone-iodinecream against *Staphylococcus aureus* and its bioavailability in nasal secretions. J Hosp Infect. juill 2000;45(3):198-205.

Hirschhausen N, Schlesier T, Schmidt MA, Götz F, Peters G, Heilmann C. A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin Atl and heat shock cognate protein Hsc70 as host cell receptor. Cell Microbiol. déc 2010;12(12):1746-64.

Holtfreter S, Roschack K, Eichler P, Eske K, Holtfreter B, Kohler C, *et al. Staphylococcus aureus* carriers neutralize superantigens by antibodies specific for their colonizing strain: a potential explanation for their improved prognosis in severe sepsis. J Infect Dis. 1 mai 2006;193(9):1275-8.

Honda H, Krauss MJ, Coopersmith CM, Kollef MH, Richmond AM, Fraser VJ, *et al. Staphylococcus aureus* nasal colonization and subsequent infection in intensive care unit patients: does methicillin resistance matter? Infect Control Hosp Epidemiol. juin 2010;31(6):584-91.

Horn J, Stelzner K, Rudel T, Fraunholz M. Inside job: *Staphylococcus aureus* host-pathogen interactions. Int J Med Microbiol. 26 nov 2017;

Huang S, Datta R, RIfas-Shiman S, Kleinman K, Placzek H, Lankiewicz J, Platt R. Colonization with antibiotic-susceptible strains protects against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* but not vancomycin-resistant enterococci acquisition: a nested case-control study. Crit Care. 14 sept 2011;15(5):R210.

Huang Y-C, Lien R-I, Lin T-Y. Effect of Mupirocin Decolonization on Subsequent Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection in Infants in Neonatal Intensive Care Units. The Pediatric Infectious Disease Journal. mars 2015;34(3):241-5.

Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature. 13 juin 2012;486(7402):207-14.

Hussain M, Becker K, von Eiff C, Schrenzel J, Peters G, Herrmann M. Identification and characterization of a novel 38.5-kilodalton cell surface protein of *Staphylococcus aureus* with extended-spectrum binding activity for extracellular matrix and plasma proteins. J Bacteriol. déc 2001;183(23):6778-86.

Immergluck LC, Jain S, Ray SM, Mayberry R, Satola S, Parker TC, *et al.* Risk of Skin and Soft Tissue Infections among Children Found to be *Staphylococcus aureus* MRSA USA300 Carriers. West J Emerg Med. févr 2017;18(2):201-12.

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

Iwase T, Uehara Y, Shinji H, Tajima A, Seo H, Takada K, *et al.* Staphylococcus epidermidis Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. Nature. 20 mai 2010;465(7296):346-9.

Jacobsen BK, Eggen AE, Mathiesen EB, Wilsgaard T, Njølstad I. Cohort profile: the Tromso Study. Int J Epidemiol. août 2012;41(4):961-7.

Janek D, Zipperer A, Kulik A, Krismer B, Peschel A. High Frequency and Diversity of Antimicrobial Activities Produced by Nasal Staphylococcus Strains against Bacterial Competitors. PLoS Pathog. 2016;12(8):e1005812.

Jarry TM, Memmi G, Cheung AL. The expression of alpha-haemolysin is required for *Staphylococcus aureus* phagosomal escape after internalization in CFT-1 cells. Cell Microbiol. sept 2008;10(9):1801-14.

Johnson JS, Spakowicz DJ, Hong B-Y, Petersen LM, Demkowicz P, Chen L, *et al.* Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. Nat Commun. 6 nov 2019;10(1):5029.

Johnson RC, Ellis MW, Lanier JB, Schlett CD, Cui T, Merrell DS. Correlation between nasal microbiome composition and remote purulent skin and soft tissue infections. Infect Immun. févr 2015;83(2):802-11.

Jönsson K, Signäs C, Müller HP, Lindberg M. Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*. The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. Eur J Biochem. 18 déc 1991;202(3):1041-8.

Josse J, Laurent F, Diot A. Staphylococcal Adhesion and Host Cell Invasion: Fibronectin-Binding and Other Mechanisms. Front Microbiol. 2017;8:2433.

Jubrail J, Morris P, Bewley MA, Stoneham S, Johnston SA, Foster SJ, *et al.* Inability to sustain intraphagolysosomal killing of *Staphylococcus aureus* predisposes to bacterial persistence in macrophages. Cell Microbiol. janv 2016;18(1):80-96.

Jung D-J, An J-H, Kurokawa K, Jung Y-C, Kim M-J, Aoyagi Y, *et al.* Specific serum Ig recognizing staphylococcal wall teichoic acid induces complement-mediated opsonophagocytosis against *Staphylococcus aureus*. J Immunol. 15 nov 2012;189(10):4951-9.

Kahl BC, Belling G, Becker P, Chatterjee I, Wardecki K, Hilgert K, *et al.* Thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* small-colony variants are associated with extensive alterations in regulator and virulence gene expression profiles. Infect Immun. juill 2005;73(7):4119-26.

Kalmeijer MD, Coertjens H, van Nieuwland-Bollen PM, Bogaers-Hofman D, de Baere G a. J, Stuurman A, *et al.* Surgical site infections in orthopedic surgery: the effect of mupirocin nasal ointment in a double-blind, randomized, placebo-controlled study. Clin Infect Dis. 15 août 2002;35(4):353-8.

Kaspar U, Kriegeskorte A, Schubert T, Peters G, Rudack C, Pieper DH, *et al.* The culturome of the human nose habitats reveals individual bacterial fingerprint patterns. Environ Microbiol. 2016;18(7):2130-42.

Katneni R, Hedayati SS. Central venous catheter-related bacteremia in chronic hemodialysis patients: epidemiology and evidence-based management. Nat Clin Pract Nephrol. mai 2007;3(5):256-66.

Khamash DF, Mongodin EF, White JR, Voskertchian A, Hittle L, Colantuoni E, *et al.* The Association Between the Developing Nasal Microbiota of Hospitalized Neonates and *Staphylococcus aureus* Colonization. Open Forum Infect Dis. avr 2019;6(4):ofz062.

Khamash DF, Voskertchian A, Milstone AM. Manipulating the microbiome: evolution of a strategy to prevent *S. aureus* disease in children. J Perinatol. févr 2018;38(2):105-9.

Kim R, Freeman J, Waldvogel-Thurlow S, Roberts S, Douglas R. The characteristics of intramucosal bacteria in chronic rhinosinusitis: a prospective cross-sectional analysis. International Forum of Allergy & Rhinology. 2013;3(5):349-54.

Kinsman OS, McKenna R, Noble WC. Association between histocompatability antigens (HLA) and nasal carriage of *Staphylococcus aureus* - PubMed [Internet]. 1983 [cité 26 oct 2021]. Disponible sur: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6573514/

Kiryukhina NV, Melnikov VG, Suvorov AV, Morozova YA, Ilyin VK. Use of Corynebacterium pseudodiphtheriticum for elimination of *Staphylococcus aureus* from the nasal cavity in volunteers exposed to abnormal microclimate and altered gaseous environment. Probiotics Antimicrob Proteins. déc 2013;5(4):233-8.

Kline SE, Neaton JD, Lynfield R, Ferrieri P, Kulasingam S, Dittes K, *et al.* Randomized controlled trial of a self-administered five-day antiseptic bundle versus usual disinfectant soap showers for preoperative eradication of *Staphylococcus aureus* colonization. Infect Control Hosp Epidemiol. sept 2018;39(9):1049-57.

Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev. juill 1997;10(3):505-20.

Kolenda C, Josse J, Medina M, Fevre C, Lustig S, Ferry T, *et al.* Evaluation of the activity of a combination of three bacteriophages alone or in association with antibiotics on *Staphylococcus aureus* embedded in biofilm or internalised in osteoblasts. Antimicrob Agents Chemother. 23 déc 2019;

Kotpal R, Prakash K, Bhalla P, Dewan R, Kaur R. Incidence and Risk Factors of Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* in HIV-Infected Individuals in Comparison to HIV-Uninfected Individuals: A Case-Control Study - J Int Assoc Provid AIDS Care. mars-april 2016.

Krebes J, Al-Ghusein H, Feasey N, Breathnach A, Lindsay J. Are nasal carriers of Staphylococcus aureus more likely to become colonized or infected with methicillin-resistant Staphylococcus aureus on admission to a hospital? J Clin Microbiol. jan 2011;49(1):430-2.

Krezalek MA, Hyoju S, Zaborin A, Okafor E, Chandrasekar L, Bindokas V, *et al.* Can Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Silently Travel From the Gut to the Wound and Cause Postoperative Infection? Modeling the « Trojan Horse Hypothesis ». Ann Surg. avr 2018;267(4):749-58.

Krismer B, Liebeke M, Janek D, Nega M, Rautenberg M, Hornig G, *et al.* Nutrient limitation governs *Staphylococcus aureus* metabolism and niche adaptation in the human nose. PLoS Pathog. janv 2014;10(1):e1003862.

Krismer B, Weidenmaier C, Zipperer A, Peschel A. The commensal lifestyle of *Staphylococcus aureus* and its interactions with the nasal microbiota. Nat Rev Microbiol. 12 oct 2017;15(11):675-87.

Kumar RR, Jadeja VJ. Characterization and partial purification of an antibacterial agent from halophilic actinomycetes Kocuria sp. strain rsk4. Bioimpacts. 2018;8(4):253-61.

Lâm T-T, Giese B, Chikkaballi D, Kühn A, Wolber W, Pané-Farré J, *et al.* Phagolysosomal integrity is generally maintained after *Staphylococcus aureus* invasion of nonprofessional phagocytes but is modulated by strain 6850. Infect Immun. août 2010;78(8):3392-403.

Landelle C, Iten A, Uckay I, Sax H, Camus S, Cohen G *et al.* Does colonization with methicillin-susceptible Staphylococcus aureus protect against nosocomial acquisition of methicillin-resistant S. aureus? Infect Control Hosp Epidemiol. may 2014;35(5):527-33.

Lappan R, Imbrogno K, Sikazwe C, Anderson D, Mok D, Coates H, *et al.* A microbiome case-control study of recurrent acute otitis media identified potentially protective bacterial genera. BMC Microbiol. 20 févr 2018;18(1):13.

Laudien M, Gadola SD, Podschun R, Hedderich J, Paulsen J, Reinhold-Keller E, *et al.* Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and endonasal activity in Wegener s granulomatosis as compared to rheumatoid arthritis and chronic Rhinosinusitis with nasal polyps. Clin Exp Rheumatol. févr 2010;28(1 Suppl 57):51-5.

Lee AS, Macedo-Vinas M, François P, Renzi G, Schrenzel J, Vernaz N, *et al.* Impact of combined low-level mupirocin and genotypic chlorhexidine resistance on persistent methicillin-resistant *Staphylococcus*

*aureus* carriage after decolonization therapy: a case-control study. Clin Infect Dis. 15 juin 2011a;52(12):1422-30.

Lee LYL, Liang X, Höök M, Brown EL. Identification and characterization of the C3 binding domain of the *Staphylococcus aureus* extracellular fibrinogen-binding protein (Efb). J Biol Chem. 3 déc 2004;279(49):50710-6.

Lee S-L, Hsu E-C, Chou C-C, Chuang H-C, Bai L-Y, Kulp SK, *et al.* Identification and characterization of a novel integrin-linked kinase inhibitor. J Med Chem. 22 sept 2011b;54(18):6364-74.

Lehar SM, Pillow T, Xu M, Staben L, Kajihara KK, Vandlen R, *et al.* Novel antibody-antibiotic conjugate eliminates intracellular *S. aureus*. Nature. 19 nov 2015;527(7578):323-8.

Lemon KP, Klepac-Ceraj V, Schiffer HK, Brodie EL, Lynch SV, Kolter R. Comparative analyses of the bacterial microbiota of the human nostril and oropharynx. mBio. 22 juin 2010;1(3).

Leshem E, Maayan-Metzger A, Rahav G, Dolitzki M, Kuint J, Roytman Y, *et al.* Transmission of *Staphylococcus aureus* from mothers to newborns. Pediatr Infect Dis J. avr 2012;31(4):360-3.

Li M, Du X, Villaruz AE, Diep BA, Wang D, Song Y, *et al.* MRSA epidemic linked to a quickly spreading colonization and virulence determinant. Nat Med. mai 2012;18(5):816-9.

Lina G, Boutite F, Tristan A, Bes M, Etienne J, Vandenesch F. Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of Staphylococcal agr alleles. Appl Environ Microbiol. janv 2003;69(1):18-23.

Liu CM, Price LB, Hungate BA, Abraham AG, Larsen LA, Christensen K, *et al. Staphylococcus aureus* and the ecology of the nasal microbiome. Sci Adv. juin 2015a;1(5):e1400216.

Liu CM, Soldanova K, Nordstrom L, Dwan MG, Moss OL, Contente-Cuomo TL, *et al.* Medical therapy reduces microbiota diversity and evenness in surgically recalcitrant chronic rhinosinusitis. Int Forum Allergy Rhinol. oct 2013;3(10):775-81.

Liu Q, Du X, Hong X, Li T, Zheng B, He L, *et al.* Targeting surface protein SasX by active and passive vaccination to reduce *Staphylococcus aureus* colonization and infection. Infect Immun. mai 2015b;83(5):2168-74.

Liu Y, Jia Y, Yang K, Wang Z. Heterogeneous Strategies to Eliminate Intracellular Bacterial Pathogens. Front Microbiol. 2020;11:563.

Luzar MA, Coles GA, Faller B, Slingeneyer A, Dah GD, Briat C, *et al. Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. N Engl J Med. 22 févr 1990;322(8):505-9.

Mannala GK, Rupp M, Walter N, Brunotte M, Alagboso F, Docheva D, *et al.* Microbiological and ultrastructural evaluation of bacteriophage 191219 against planktonic, intracellular and biofilm infection with *Staphylococcus aureus*. Eur Cell Mater. 24 févr 2022;43:66-78.

Marro FC, Abad L, Blocker AJ, Laurent F, Josse J, Valour F. In vitro antibiotic activity against intraosteoblastic *Staphylococcus aureus*: a narrative review of the literature. J Antimicrob Chemother. 12 nov 2021;76(12):3091-102.

Martín J, Sousa T da S, Crespo G, Palomo S, González I, Tormo JR, *et al.* Kocurin, the True Structure of PM181104, an Anti-Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Thiazolyl Peptide from the Marine-Derived Bacterium Kocuria palustris. Mar Drugs. 4 févr 2013;11(2):387-98.

McDevitt D, Nanavaty T, House-Pompeo K, Bell E, Turner N, McIntire L, *et al.* Characterization of the interaction between the *Staphylococcus aureus* clumping factor (ClfA) and fibrinogen. Eur J Biochem. 1 juill 1997;247(1):416-24.

McDevitt D, Vaudaux P, Foster TJ. Genetic evidence that bound coagulase of *Staphylococcus aureus* is not clumping factor. Infect Immun. avr 1992;60(4):1514-23.

McKinnell JA, Huang SS, Eells SJ, Cui E, Miller LG. Quantifying the impact of extranasal testing of body sites for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization at the time of hospital or intensive care unit admission. Infect Control Hosp Epidemiol. févr 2013;34(2):161-70.

McShane D, Davies JC, Davies MG, Bush A, Geddes DM, Alton EWFW. Airway surface pH in subjects with cystic fibrosis. Eur Respir J. janv 2003;21(1):37-42.

Mehraj J, Witte W, Akmatov MK, Layer F, Werner G, Krause G. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage Patterns in the Community. Curr Top Microbiol Immunol. 2016;398:55-87.

Meléndez-Carmona MÁ, Muñoz-Gallego I, Viedma E, Lora-Tamayo J, Chaves F. Intraosteoblastic Activity of Levofloxacin and Rifampin Alone and in Combination Against Clinical Isolates of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* causing Prosthetic Joint Infection. Int J Antimicrob Agents. 26 juin 2019;

Mempel M, Schnopp C, Hojka M, Fesq H, Weidinger S, Schaller M, *et al.* Invasion of human keratinocytes by *Staphylococcus aureus* and intracellular bacterial persistence represent haemolysin-independent virulence mechanisms that are followed by features of necrotic and apoptotic keratinocyte cell death. Br J Dermatol. 2002;146(6):943-51.

Ménard G, Bonnaure-Mallet M, Donnio P-Y. Adhesion of *Staphylococcus aureus* to epithelial cells: an in vitro approach to study interactions within the nasal microbiota. J Med Microbiol. oct 2020;69(10):1253-61.

Menzies BE, Kourteva I. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin induces apoptosis in endothelial cells. FEMS Immunol Med Microbiol. sept 2000;29(1):39-45.

Mestre MB, Fader CM, Sola C, Colombo MI. Alpha-hemolysin is required for the activation of the autophagic pathway in *Staphylococcus aureus*-infected cells. Autophagy. janv 2010;6(1):110-25.

Milani C, Alessandri G, Mangifesta M, Mancabelli L, Lugli GA, Fontana F, *et al.* Untangling Species-Level Composition of Complex Bacterial Communities through a Novel Metagenomic Approach. mSystems. 28 juill 2020;5(4):e00404-20.

Mnich ME, van Dalen R, Gerlach D, Hendriks A, Xia G, Peschel A, *et al.* The C-type lectin receptor MGL senses N-acetylgalactosamine on the unique *Staphylococcus aureus* ST395 wall teichoic acid. Cell Microbiol. oct 2019;21(10):e13072.

Mody L, Krein SL, Saint S, Min LC, Montoya A, Lansing B, *et al.* A targeted infection prevention intervention in nursing home residents with indwelling devices: a randomized clinical trial. JAMA Intern Med. mai 2015;175(5):714-23.

Mohamed MF, Abdelkhalek A, Seleem MN. Evaluation of short synthetic antimicrobial peptides for treatment of drug-resistant and intracellular *Staphylococcus aureus*. Sci Rep. 11 juill 2016;6:29707.

Moisan H, Brouillette E, Jacob CL, Langlois-Bégin P, Michaud S, Malouin F. Transcription of virulence factors in *Staphylococcus aureus* small-colony variants isolated from cystic fibrosis patients is influenced by SigB. J Bacteriol. janv 2006;188(1):64-76.

Mulcahy ME, Geoghegan JA, Monk IR, O'Keeffe KM, Walsh EJ, Foster TJ, *et al.* Nasal colonisation by *Staphylococcus aureus* depends upon clumping factor B binding to the squamous epithelial cell envelope protein loricrin. PLoS Pathog. déc 2012;8(12):e1003092.

Mullen A, Wieland HJ, Wieser ES, Spannhake EW, Marinos RS. Perioperative participation of orthopedic patients and surgical staff in a nasal decolonization intervention to reduce Staphylococcus spp surgical site infections. Am J Infect Control. 1 mai 2017;45(5):554-6.

Münzenmayer L, Geiger T, Daiber E, Schulte B, Autenrieth SE, Fraunholz M, *et al.* Influence of Sae-regulated and Agr-regulated factors on the escape of *Staphylococcus aureus* from human macrophages. Cell Microbiol. août 2016;18(8):1172-83.

Muthukrishnan G, Lamers RP, Ellis A, Paramanandam V, Persaud AB, Tafur S, *et al.* Longitudinal genetic analyses of *Staphylococcus aureus* nasal carriage dynamics in a diverse population. BMC Infect Dis. 16 mai 2013;13:221.

Neumann Y, Bruns SA, Rohde M, Prajsnar TK, Foster SJ, Schmitz I. Intracellular *Staphylococcus aureus* eludes selective autophagy by activating a host cell kinase. Autophagy. nov 2016;12(11):2069-84.

Nguyen MH, Kauffman CA, Goodman RP, Squier C, Arbeit RD, Singh N, *et al.* Nasal carriage of and infection with *Staphylococcus aureus* in HIV-infected patients. Ann Intern Med. 2 févr 1999;130(3):221-5.

Nguyen MT, Kraft B, Yu W, Demircioglu DD, Demicrioglu DD, Hertlein T, *et al.* The vSaα Specific Lipoprotein Like Cluster (lpl) of *S. aureus* USA300 Contributes to Immune Stimulation and Invasion in Human Cells. PLoS Pathog. juin 2015;11(6):e1004984.

Nicolas R, Carricajo A, Morel J, Rigaill J, Grattard F, Guezzou S, *et al.* Evaluation of effectiveness and compliance with the mupirocin nasal ointment part of *Staphylococcus aureus* decolonization in real life using UPLC-MS/MS mupirocin quantification. J Antimicrob Chemother. 1 juin 2020;75(6):1623-30.

Niemann S, Spehr N, Van Aken H, Morgenstern E, Peters G, Herrmann M, *et al.* Soluble fibrin is the main mediator of *Staphylococcus aureus* adhesion to platelets. Circulation. 13 juill 2004;110(2):193-200.

Noore J, Noore A, Li B. Cationic antimicrobial peptide LL-37 is effective against both extra- and intracellular *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. mars 2013;57(3):1283-90.

Nouwen JL, Fieren MWJA, Snijders S, Verbrugh HA, Van Belkum A. Persistent (not intermittent) nasal carriage of *Staphylococcus aureus* is the determinant of CPD-related infections. Kidney Int. mars 2005;67(3):1084-92.

Nouwen JL, Ott A, Kluytmans-Vandenbergh MFQ, Boelens HAM, Hofman A, Belkum A van, *et al.* Predicting the *Staphylococcus aureus* Nasal Carrier State: Derivation and Validation of a "Culture Rule". Clin Infect Dis. 15 sept 2004;39(6):806-11.

O'Brien LM, Walsh EJ, Massey RC, Peacock SJ, Foster TJ. *Staphylococcus aureus* clumping factor B (ClfB) promotes adherence to human type I cytokeratin 10: implications for nasal colonization. Cell Microbiol. nov 2002;4(11):759-70.

O'Flaherty S, Coffey A, Meaney W, Fitzgerald GF, Ross RP. The recombinant phage lysin LysK has a broad spectrum of lytic activity against clinically relevant staphylococci, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. oct 2005;187(20):7161-4.

O'Grady S, Hirji Z, Pejcic-Karapetrovic B, Fung S, Dedier H, Takata-Shewchuk J, *et al.* A double-blind, randomized, controlled trial of topical polysporin triple compound versus topical mupirocin for the eradication of colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a complex continuing care population. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2009;20(3):e49-55.

Oh J, Conlan S, Polley EC, Segre JA, Kong HH. Shifts in human skin and nares microbiota of healthy children and adults. Genome Med. 2012;4(10):77.

Olsen K, Danielsen K, Wilsgaard T, Sangvik M, Sollid JUE, Thune I, *et al.* Obesity and *Staphylococcus aureus* nasal colonization among women and men in a general population. PLoS One. 2013;8(5):e63716.

Olsen K, Falch BM, Danielsen K, Johannessen M, Ericson Sollid JU, Thune I, *et al. Staphylococcus aureus* nasal carriage is associated with serum 25-hydroxyvitamin D levels, gender and smoking status. The Tromsø Staph and Skin Study - Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 31 april 2012.

Ou J, A B, A D, Aj P, S V, Pj W. The persistence of intracellular *Staphylococcus aureus* in the sinuses: a longitudinal study. Rhinology. 12 janv 2017 .

Ou J, Drilling A, Singhal D, Tan NC-W, Wallis-Hill D, Vreugde S, *et al.* Association of intracellular *Staphylococcus aureus* with prognosis in chronic rhinosinusitis. Int Forum Allergy Rhinol. août 2016;6(8):792-9.

Oviedo-Boyso J, Cortés-Vieyra R, Huante-Mendoza A, Yu HB, Valdez-Alarcón JJ, Bravo-Patiño A, *et al.* The phosphoinositide-3-kinase-Akt signaling pathway is important for *Staphylococcus aureus* internalization by endothelial cells. Infect Immun. nov 2011;79(11):4569-77.

Palma M, Haggar A, Flock JI. Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. J Bacteriol. mai 1999;181(9):2840-5.

Palma M, Wade D, Flock M, Flock JI. Multiple binding sites in the interaction between an extracellular fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus aureus* and fibrinogen. J Biol Chem. 22 mai 1998;273(21):13177-81.

Park PW, Broekelmann TJ, Mecham BR, Mecham RP. Characterization of the elastin binding domain in the cell-surface 25-kDa elastin-binding protein of *Staphylococcus aureus* (EbpS). J Biol Chem. 29 janv 1999;274(5):2845-50.

Parras F, Guerrero MC, Bouza E, Blázquez MJ, Moreno S, Menarguez MC, *et al.* Comparative study of mupirocin and oral co-trimoxazole plus topical fusidic acid in eradication of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. janv 1995;39(1):175-9.

Peacock SJ, Day NP, Thomas MG, Berendt AR, Foster TJ. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibit diversity in fnb genes and adhesion to human fibronectin. J Infect. juill 2000;41(1):23‑31.

Peacock SJ, Justice A, Griffiths D, de Silva GDI, Kantzanou MN, Crook D, *et al.* Determinants of acquisition and carriage of *Staphylococcus aureus* in infancy. J Clin Microbiol. déc 2003;41(12):5718‑25.

Pérez-Fontán M, Rosales M, Rodríguez-Carmona A, Falcón TG, Valdés F. Mupirocin resistance after long-term use for *Staphylococcus aureus* colonization in patients undergoing chronic peritoneal dialysis. Am J Kidney Dis. févr 2002;39(2):337‑41.

Perkins S, Walsh EJ, Deivanayagam CC, Narayana SV, Foster TJ, Höök M. Structural organization of the fibrinogen-binding region of the clumping factor B MSCRAMM of *Staphylococcus aureus*. J Biol Chem. 30 nov 2001;276(48):44721‑8.

Perl TM, Cullen JJ, Wenzel RP, Zimmerman MB, Pfaller MA, Sheppard D, *et al.* Intranasal mupirocin to prevent postoperative *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med. 13 juin 2002;346(24):1871‑7.

Peschel A, Sahl H-G. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. Nat Rev Microbiol. juill 2006;4(7):529‑36.

Plouin-Gaudon I, Clement S, Huggler E, Chaponnier C, François P, Lew D, *et al.* Intracellular residency is frequently associated with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis. Rhinology. déc 2006;44(4):249‑54.

Poovelikunnel TT, Gethin G, Solanki D, McFadden E, Codd M, Humphreys H. Randomized controlled trial of honey versus mupirocin to decolonize patients with nasal colonization of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Hosp Infect. févr 2018;98(2):141‑8.

Porto WF, Pires AS, Franco OL. Computational tools for exploring sequence databases as a resource for antimicrobial peptides. Biotechnol Adv. juin 2017;35(3):337‑49.

Price JR, Cole K, Bexley A, Kostiou V, Eyre DW, Golubchik T, *et al.* Transmission of *Staphylococcus aureus* between health-care workers, the environment, and patients in an intensive care unit: a longitudinal cohort study based on whole-genome sequencing. Lancet Infect Dis. févr 2017;17(2):207‑14.

Proctor RA, Kriegeskorte A, Kahl BC, Becker K, Löffler B, Peters G. *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs): a road map for the metabolic pathways involved in persistent infections. Front Cell Infect Microbiol. 2014;4:99.

Pynnonen M, Stephenson RE, Schwartz K, Hernandez M, Boles BR. Hemoglobin promotes *Staphylococcus aureus* nasal colonization. PLoS Pathog. juill 2011;7(7):e1002104.

Ramakrishnan VR, Holt J, Nelson LF, Ir D, Robertson CE, Frank DN. Determinants of the Nasal Microbiome: Pilot Study of Effects of Intranasal Medication Use. Allergy Rhinol (Providence). déc 2018;9:2152656718789519.

Ramsey MM, Freire MO, Gabrilska RA, Rumbaugh KP, Lemon KP. *Staphylococcus aureus* Shifts toward Commensalism in Response to Corynebacterium Species. Front Microbiol. 2016;7:1230.

Raviglione MC, Mariuz P, Pablos-Mendez A, Battan R, Ottuso P, Taranta A. High *Staphylococcus aureus* nasal carriage rate in patients with acquired immunodeficiency syndrome or AIDS-related complex. Am J Infect Control. avr 1990;18(2):64-9.

Reagan DR, Doebbeling BN, Pfaller MA, Sheetz CT, Houston AK, Hollis RJ, *et al.* Elimination of coincident *Staphylococcus aureus* nasal and hand carriage with intranasal application of mupirocin calcium ointment. Ann Intern Med. 15 janv 1991;114(2):101-6.

Reddinger RM, Luke-Marshall NR, Hakansson AP, Campagnari AA. Host Physiologic Changes Induced by Influenza A Virus Lead to *Staphylococcus aureus* Biofilm Dispersion and Transition from Asymptomatic Colonization to Invasive Disease. mBio. 9 août 2016;7(4):e01235-16.

Regev-Yochay G, Dagan R, Raz M, Carmeli Y, Shainberg B, Derazne E, *et al.* Association between carriage of Streptococcus pneumoniae and *Staphylococcus aureus* in Children. JAMA. 11 août 2004;292(6):716-20.

Regev-Yochay G, Trzciński K, Thompson CM, Malley R, Lipsitch M. Interference between Streptococcus pneumoniae and *Staphylococcus aureus*: In Vitro Hydrogen Peroxide-Mediated Killing by Streptococcus pneumoniae. J Bacteriol. juill 2006;188(13):4996-5001.

Rezapoor M, Nicholson T, Tabatabaee RM, Chen AF, Maltenfort MG, Parvizi J. Povidone-Iodine-Based Solutions for Decolonization of Nasal *Staphylococcus aureus*: A Randomized, Prospective, Placebo-Controlled Study. J Arthroplasty. sept 2017;32(9):2815-9.

van Rijen M, Bonten M, Wenzel R, Kluytmans J. Mupirocin ointment for preventing *Staphylococcus aureus* infections in nasal carriers. Cochrane Database Syst Rev. 8 oct 2008;(4):CD006216.

Roche FM, Downer R, Keane F, Speziale P, Park PW, Foster TJ. The N-terminal A domain of fibronectin-binding proteins A and B promotes adhesion of *Staphylococcus aureus* to elastin. J Biol Chem. 10 sept 2004;279(37):38433-40.

Roche FM, Meehan M, Foster TJ. The *Staphylococcus aureus* surface protein SasG and its homologues promote bacterial adherence to human desquamated nasal epithelial cells. Microbiology (Reading). oct 2003;149(Pt 10):2759-67.

Rochereau N, Drocourt D, Perouzel E, Pavot V, Redelinghuys P, Brown GD, *et al.* Dectin-1 is essential for reverse transcytosis of glycosylated SIgA-antigen complexes by intestinal M cells. PLoS Biol. sept 2013;11(9):e1001658.

Roghmann M-C, Johnson JK, Stine OC, Lydecker AD, Ryan KA, Mitchell BD, *et al.* Persistent *Staphylococcus aureus* Colonization Is Not a Strongly Heritable Trait in Amish Families. PLoS One. 28 févr 2011;6(2):e17368.

Röhrig C, Huemer M, Lorgé D, Luterbacher S, Phothaworn P, Schefer C, *et al.* Targeting Hidden Pathogens: Cell-Penetrating Enzybiotics Eradicate Intracellular Drug-Resistant *Staphylococcus aureus*. mBio. 14 avr 2020;11(2):e00209-20.

Ruimy R, Angebault C, Djossou F, Dupont C, Epelboin L, Jarraud S, *et al.* Are host genetics the predominant determinant of persistent nasal *Staphylococcus aureus* carriage in humans? J Infect Dis. 15 sept 2010;202(6):924-34.

Saadatian-Elahi M, Tristan A, Laurent F, Rasigade J-P, Bouchiat C, Ranc A-G, *et al.* Basic rules of hygiene protect health care and lab workers from nasal colonization by *Staphylococcus aureus*: an international cross-sectional study. PLoS One. 2013;8(12):e82851.

Sachse F, Becker K, von Eiff C, Metze D, Rudack C. *Staphylococcus aureus* invades the epithelium in nasal polyposis and induces IL-6 in nasal epithelial cells in vitro. Allergy. nov 2010;65(11):1430-7.

Sakr A, Brégeon F, Mège J-L, Rolain J-M, Blin O. *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization: An Update on Mechanisms, Epidemiology, Risk Factors, and Subsequent Infections. Front Microbiol. 2018;9:2419.

Sakr A, Brégeon F, Rolain J-M, Blin O. *Staphylococcus aureus* nasal decolonization strategies: a review. Expert Rev Anti Infect Ther. mai 2019;17(5):327-40.

Sangvik M, Olsen RS, Olsen K, Simonsen GS, Furberg A-S, Sollid JUE. Age- and gender-associated *Staphylococcus aureus* spa types found among nasal carriers in a general population: the Tromso Staph and Skin Study. J Clin Microbiol. déc 2011;49(12):4213-8.

Sante Publique France. Surveillance des infections du site opératoire dans les établissements de santé français. Sept 2020 : https://www.santepubliquefrance.fr/

Savage JW, Anderson PA. An update on modifiable factors to reduce the risk of surgical site infections. Spine J. sept 2013;13(9):1017-29.

Sayedyahossein S, Xu SX, Rudkouskaya A, McGavin MJ, McCormick JK, Dagnino L. *Staphylococcus aureus* keratinocyte invasion is mediated by integrin-linked kinase and Rac1. FASEB J. févr 2015;29(2):711-23.

Schaffer AC, Solinga RM, Cocchiaro J, Portoles M, Kiser KB, Risley A, *et al.* Immunization with *Staphylococcus aureus* clumping factor B, a major determinant in nasal carriage, reduces nasal colonization in a murine model. Infect Immun. avr 2006;74(4):2145-53.

Schlesier T, Siegmund A, Rescher U, Heilmann C. Characterization of the Atl-mediated staphylococcal internalization mechanism. Int J Med Microbiol. déc 2020;310(8):151463.

Schmidt A, Bénard S, Cyr S. Hospital Cost of Staphylococcal Infection after Cardiothoracic or Orthopedic Operations in France: A Retrospective Database Analysis. Surg Infect (Larchmt). août 2015;16(4):428-35.

Schnaith A, Kashkar H, Leggio SA, Addicks K, Krönke M, Krut O. *Staphylococcus aureus* subvert autophagy for induction of caspase-independent host cell death. J Biol Chem. 26 janv 2007;282(4):2695-706.

Schuch R, Khan BK, Raz A, Rotolo JA, Wittekind M. Bacteriophage Lysin CF-301, a Potent Antistaphylococcal Biofilm Agent. Antimicrob Agents Chemother. juill 2017;61(7):e02666-16.

Schuler F, Barth PJ, Niemann S, Schaumburg F. A Narrative Review on the Role of *Staphylococcus aureus* Bacteriuria in *S. aureus* Bacteremia. Open Forum Infect Dis. juin 2021;8(6):ofab158.

Schweizer M, Perencevich E, McDanel J, Carson J, Formanek M, Hafner J, *et al.* Effectiveness of a bundled intervention of decolonization and prophylaxis to decrease Gram positive surgical site infections after cardiac or orthopedic surgery: systematic review and meta-analysis. BMJ. 13 juin 2013;346:f2743.

Schweizer ML, Chiang H-Y, Septimus E, Moody J, Braun B, Hafner J, *et al.* Association of a bundled intervention with surgical site infections among patients undergoing cardiac, hip, or knee surgery. JAMA. 2 juin 2015;313(21):2162-71.

Selbach M, Backert S. Cortactin: an Achilles' heel of the actin cytoskeleton targeted by pathogens. Trends Microbiol. avr 2005;13(4):181-9.

Sendi P, Proctor RA. *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. Trends Microbiol. févr 2009;17(2):54-8.

Shinji H, Yosizawa Y, Tajima A, Iwase T, Sugimoto S, Seki K, *et al.* Role of fibronectin-binding proteins A and B in in vitro cellular infections and in vivo septic infections by *Staphylococcus aureus*. Infect Immun. juin 2011;79(6):2215-23.

Shompole S, Henon KT, Liou LE, Dziewanowska K, Bohach GA, Bayles KW. Biphasic intracellular expression of *Staphylococcus aureus* virulence factors and evidence for Agr-mediated diffusion sensing. Mol Microbiol. août 2003;49(4):919-27.

Shu M, Wang Y, Yu J, Kuo S, Coda A, Jiang Y, *et al.* Fermentation of Propionibacterium acnes, a commensal bacterium in the human skin microbiome, as skin probiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. PLoS One. 2013;8(2):e55380.

Siegmund A, Afzal MA, Tetzlaff F, Keinhörster D, Gratani F, Paprotka K, *et al.* Intracellular persistence of *Staphylococcus aureus* in endothelial cells is promoted by the absence of phenol-soluble modulins. Virulence. déc 2021;12(1):1186-98.

Siegwald L, Touzet H, Lemoine Y, Hot D, Audebert C, Caboche S. Assessment of Common and Emerging Bioinformatics Pipelines for Targeted Metagenomics. PLOS ONE. 4 janv 2017;12(1):e0169563.

Sim BLH, McBryde E, Street AC, Marshall C. Multiple site surveillance cultures as a predictor of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. Infect Control Hosp Epidemiol. août 2013;34(8):818-24.

Simor AE. Staphylococcal decolonisation: an effective strategy for prevention of infection? Lancet Infect Dis. déc 2011;11(12):952-62.

Sinha B, François PP, Nüsse O, Foti M, Hartford OM, Vaudaux P, *et al.* Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1. Cell Microbiol. sept 1999;1(2):101-17.

Sivaraman K, Venkataraman N, Cole AM. *Staphylococcus aureus* nasal carriage and its contributing factors. Future Microbiol. oct 2009;4(8):999-1008.

Sivasubramaniam R, Douglas R. The microbiome and chronic rhinosinusitis. World J Otorhinolaryngol Head Neck Surg. sept 2018;4(3):216-21.

Soe YM, Bedoui S, Stinear TP, Hachani A. Intracellular *Staphylococcus aureus* and host cell death pathways. Cell Microbiol. mai 2021;23(5):e13317.

Soto NE, Vaghjimal A, Stahl-Avicolli A, Protic JR, Lutwick LI, Chapnick EK. Bacitracin versus mupirocin for *Staphylococcus aureus* nasal colonization. Infect Control Hosp Epidemiol. mai 1999;20(5):351-3.

Splith K, Neundorf I. Antimicrobial peptides with cell-penetrating peptide properties and vice versa. Eur Biophys J. avr 2011;40(4):387-97.

Steed LL, Costello J, Lohia S, Jones T, Spannhake EW, Nguyen S. Reduction of nasal *Staphylococcus aureus* carriage in health care professionals by treatment with a nonantibiotic, alcohol-based nasal antiseptic. Am J Infect Control. août 2014;42(8):841-6.

Strobel M, Pförtner H, Tuchscherr L, Völker U, Schmidt F, Kramko N, *et al.* Post-invasion events after infection with *Staphylococcus aureus* are strongly dependent on both the host cell type and the infecting *S. aureus* strain. Clin Microbiol Infect. sept 2016;22(9):799-809.

Sugimoto S, Iwamoto T, Takada K, Okuda K-I, Tajima A, Iwase T, *et al.* Staphylococcus epidermidis Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction. J Bacteriol. avr 2013;195(8):1645-55.

Switalski LM, Patti JM, Butcher W, Gristina AG, Speziale P, Höök M. A collagen receptor on *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with septic arthritis mediates adhesion to cartilage. Mol Microbiol. janv 1993;7(1):99-107.

Tan NC-W, Foreman A, Jardeleza C, Douglas R, Tran H, Wormald PJ. The multiplicity of *Staphylococcus aureus* in chronic rhinosinusitis: Correlating surface biofilm and intracellular residence. The Laryngoscope. 2012;122(8):1655-60.

Tan NC-W, Foreman A, Jardeleza C, Douglas R, Vreugde S, Wormald P-J. Intracellular *Staphylococcus aureus*: the Trojan horse of recalcitrant chronic rhinosinusitis? Int Forum Allergy Rhinol. avr 2013;3(4):261-6.

Tran Van Nhieu G, Isberg RR. Bacterial internalization mediated by beta 1 chain integrins is determined by ligand affinity and receptor density. EMBO J. mai 1993;12(5):1887-95.

Tranchemontagne ZR, Camire RB, O'Donnell VJ, Baugh J, Burkholder KM. *Staphylococcus aureus* Strain USA300 Perturbs Acquisition of Lysosomal Enzymes and Requires Phagosomal Acidification for Survival inside Macrophages. Infect Immun. janv 2016;84(1):241-53.

Tremblay J, Singh K, Fern A, Kirton ES, He S, Woyke T, *et al.* Primer and platform effects on 16S rRNA tag sequencing. Front Microbiol. 2015;6:771.

Tribelli PM, Luqman A, Nguyen M-T, Madlung J, Fan S-H, Macek B, *et al. Staphylococcus aureus* Lpl protein triggers human host cell invasion via activation of Hsp90 receptor. Cell Microbiol. janv 2020;22(1):e13111.

Truong-Bolduc QC, Bolduc GR, Medeiros H, Vyas JM, Wang Y, Hooper DC. Role of the Tet38 Efflux Pump in *Staphylococcus aureus* Internalization and Survival in Epithelial Cells. Infect Immun. nov 2015;83(11):4362-72.

Truong-Bolduc QC, Khan NS, Vyas JM, Hooper DC. Tet38 Efflux Pump Affects *Staphylococcus aureus* Internalization by Epithelial Cells through Interaction with CD36 and Contributes to Bacterial Escape from Acidic and Nonacidic Phagolysosomes. Infect Immun. févr 2017;85(2):e00862-16.

Truong-Bolduc QC, Villet RA, Estabrooks ZA, Hooper DC. Native efflux pumps contribute resistance to antimicrobials of skin and the ability of *Staphylococcus aureus* to colonize skin. J Infect Dis. 1 mai 2014;209(9):1485-93.

Tuchscherr L, Bischoff M, Lattar SM, Noto Llana M, Pförtner H, Niemann S, *et al.* Sigma Factor SigB Is Crucial to Mediate *Staphylococcus aureus* Adaptation during Chronic Infections. PLoS Pathog. avr 2015;11(4):e1004870.

Tuchscherr L, Heitmann V, Hussain M, Viemann D, Roth J, von Eiff C, *et al. Staphylococcus aureus* small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. J Infect Dis. 1 oct 2010;202(7):1031-40.

Tuchscherr L, Löffler B. *Staphylococcus aureus* dynamically adapts global regulators and virulence factor expression in the course from acute to chronic infection. Curr Genet. févr 2016;62(1):15-7.

Tuchscherr L, Löffler B, Proctor RA. Persistence of *Staphylococcus aureus*: Multiple Metabolic Pathways Impact the Expression of Virulence Factors in Small-Colony Variants (SCVs). Front Microbiol. 2020;11:1028.

Tung H s, Guss B, Hellman U, Persson L, Rubin K, Rydén C. A bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal Sdr family. Biochem J. 1 févr 2000;345 Pt 3:611-9.

Uehara Y, Nakama H, Agematsu K, Uchida M, Kawakami Y, Abdul Fattah AS, *et al.* Bacterial interference among nasal inhabitants: eradication of *Staphylococcus aureus* from nasal cavities by artificial implantation of Corynebacterium sp. J Hosp Infect. févr 2000;44(2):127-33.

Van Belkum A, Riewarts Eriksen NH, Sijmons M, Van Leeuwen W, Van den Bergh M, Kluytmans J, *et al.* Coagulase and protein A polymorphisms do not contribute to persistence of nasal colonisation by *Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol. mars 1997;46(3):222-32.

VandenBergh MF, Yzerman EP, van Belkum A, Boelens HA, Sijmons M, Verbrugh HA. Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: redefining the persistent carrier state. J Clin Microbiol. oct 1999;37(10):3133-40.

Vasquez JE, Walker ES, Franzus BW, Overbay BK, Reagan DR, Sarubbi FA. The epidemiology of mupirocin resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a Veterans' Affairs hospital. Infect Control Hosp Epidemiol. juill 2000;21(7):459-64.

Verhoeven P, Grattard F, Carricajo A, Cazorla C, Lucht F, Garraud O, *et al.* Identification of *Staphylococcus aureus* persistant carriers in clinical practice by quantification of bacterial load in nasal swabs. In Lyon; 2012a.

Verhoeven PO, Berthelot P, Chapelle C, Gagnaire J, Grattard F, Pozzetto B, *et al.* Letter to the editor: *Staphylococcus aureus* screening and decolonization in orthopaedic surgery and reduction of surgical site infections. Clin Orthop Relat Res. nov 2013;471(11):3709-11.

Verhoeven PO, Gagnaire J, Botelho-Nevers E, Grattard F, Carricajo A, Lucht F, *et al.* Detection and clinical relevance of *Staphylococcus aureus* nasal carriage: an update. Expert Rev Anti Infect Ther. janv 2014;12(1):75-89.

Verhoeven PO, Gagnaire J, Haddar CH, Grattard F, Thibaudin D, Afiani A, *et al.* Identifying Hemodialysis Patients With the Highest Risk of *Staphylococcus aureus* Endogenous Infection Through a Simple Nasal Sampling Algorithm. Medicine (Baltimore). avr 2016;95(14):e3231.

Verhoeven PO, Grattard F, Carricajo A, Lucht F, Cazorla C, Garraud O, *et al.* An algorithm based on one or two nasal samples is accurate to identify persistent nasal carriers of *Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology and Infection. juin 2012b;18(6):551-7.

Vesga O, Groeschel MC, Otten MF, Brar DW, Vann JM, Proctor RA. *Staphylococcus aureus* small colony variants are induced by the endothelial cell intracellular milieu. J Infect Dis. mars 1996;173(3):739-42.

Walker ES, Vasquez JE, Dula R, Bullock H, Sarubbi FA. Mupirocin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: does mupirocin remain effective? Infect Control Hosp Epidemiol. mai 2003;24(5):342-6.

Wang J-H, Zhang K, Wang N, Qiu X-M, Wang Y-B, He P. Involvement of phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt signaling pathway in β1 integrin-mediated internalization of *Staphylococcus aureus* by alveolar epithelial cells. J Microbiol. oct 2013;51(5):644-50.

Wang Y, Dai A, Huang S, Kuo S, Shu M, Tapia CP, *et al.* Propionic acid and its esterified derivative suppress the growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300. Benef Microbes. 1 juin 2014;5(2):161-8.

Wang Z, Kong L, Liu Y, Fu Q, Cui Z, Wang J, *et al.* A Phage Lysin Fused to a Cell-Penetrating Peptide Kills Intracellular Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Keratinocytes and Has Potential as a Treatment for Skin Infections in Mice. Appl Environ Microbiol. 15 juin 2018;84(12):e00380-18.

Wann ER, Gurusiddappa S, Hook M. The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen. J Biol Chem. 5 mai 2000;275(18):13863-71.

Washington N, Steele RJ, Jackson SJ, Bush D, Mason J, Gill DA, *et al.* Determination of baseline human nasal pH and the effect of intranasally administered buffers. Int J Pharm. 5 avr 2000;198(2):139-46.

Weidenmaier C, Goerke C, Wolz C. *Staphylococcus aureus* determinants for nasal colonization. Trends Microbiol. mai 2012;20(5):243-50.

Weidenmaier C, Kokai-Kun JF, Kristian SA, Chanturiya T, Kalbacher H, Gross M, *et al.* Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. Nat Med. mars 2004;10(3):243-5.

Weinke T, Schiller R, Fehrenbach FJ, Pohle HD. Association between *Staphylococcus aureus* nasopharyngeal colonization and septicemia in patients infected with the human immunodeficiency virus. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. nov 1992;11(11):985-9.

Weinrick B, Dunman PM, McAleese F, Murphy E, Projan SJ, Fang Y, *et al.* Effect of mild acid on gene expression in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. déc 2004;186(24):8407-23.

Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, *et al.* The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet Infect Dis. déc 2005;5(12):751-62.

Wertheim HFL, Vos MC, Ott A, van Belkum A, Voss A, Kluytmans JAJW, *et al.* Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. Lancet. 21 août 2004;364(9435):703-5.

Wertheim HFL, Walsh E, Choudhurry R, Melles DC, Boelens HAM, Miajlovic H, *et al.* Key role for clumping factor B in *Staphylococcus aureus* nasal colonization of humans. PLoS Med. 15 janv 2008;5(1):e17.

Wesson CA, Liou LE, Todd KM, Bohach GA, Trumble WR, Bayles KW. *Staphylococcus aureus* Agr and Sar global regulators influence internalization and induction of apoptosis. Infect Immun. nov 1998;66(11):5238-43.

Wise SK, Den Beste KA, Hoddeson EK, Parkos CA, Nusrat A. Sinonasal epithelial wound resealing in an in vitro model: inhibition of wound closure with IL-4 exposure. Int Forum Allergy Rhinol. juin 2013;3(6):439-49.

Wollenberg MS, Claesen J, Escapa IF, Aldridge KL, Fischbach MA, Lemon KP. Propionibacterium-produced coproporphyrin III induces *Staphylococcus aureus* aggregation and biofilm formation. mBio. 22 juill 2014;5(4):e01286-01214.

Wos-Oxley ML, Plumeier I, von Eiff C, Taudien S, Platzer M, Vilchez-Vargas R, *et al.* A poke into the diversity and associations within human anterior nare microbial communities. ISME J. juill 2010;4(7):839-51.

Xia G, Kohler T, Peschel A. The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of *Staphylococcus aureus*. Int J Med Microbiol. févr 2010;300(2-3):148-54.

Yan M, Pamp SJ, Fukuyama J, Hwang PH, Cho D-Y, Holmes S, *et al.* Nasal microenvironments and interspecific interactions influence nasal microbiota complexity and *S. aureus* carriage. Cell Host Microbe. 11 déc 2013;14(6):631-40.

Yang X, Shi G, Guo J, Wang C, He Y. Exosome-encapsulated antibiotic against intracellular infections of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Int J Nanomedicine. 2018;13:8095-104.

Yang X, Xie B, Peng H, Shi G, Sreenivas B, Guo J, *et al.* Eradicating intracellular MRSA via targeted delivery of lysostaphin and vancomycin with mannose-modified exosomes. J Control Release. 10 janv 2021;329:454-67.

Yang Y-H, Jiang Y-L, Zhang J, Wang L, Bai X-H, Zhang S-J, *et al.* Structural insights into SraP-mediated *Staphylococcus aureus* adhesion to host cells. PLoS Pathog. juin 2014;10(6):e1004169.

Zanger P, Nurjadi D, Gaile M, Gabrysch S, Kremsner PG. Hormonal contraceptive use and persistent *Staphylococcus aureus* nasal carriage. Clin Infect Dis. déc 2012;55(12):1625-32.

Zhou C, Bhinderwala F, Lehman MK, Thomas VC, Chaudhari SS, Yamada KJ, *et al.* Urease is an essential component of the acid response network of *Staphylococcus aureus* and is required for a persistent murine kidney infection. PLoS Pathog. janv 2019;15(1):e1007538.

Zhou T-T, Yue Y, Zheng F, Liang X-D, Cao Q-X, Wang Y-W, *et al.* Monoclonal antibody against l-lectin module of SraP blocks adhesion and protects mice against *Staphylococcus aureus* challenge. J Microbiol Immunol Infect. juin 2021;54(3):420-8.

Zipperer A, Konnerth MC, Laux C, Berscheid A, Janek D, Weidenmaier C, *et al.* Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. Nature. 28 juill 2016;535(7613):511-6.

Zuehlke AD, Beebe K, Neckers L, Prince T. Regulation and function of the human HSP90AA1 gene. Gene. 1 oct 2015;570(1):8-16.

# Autres publications

## Par date de publication

1. Prades JM, Dubois MD, Dumollard JM, Tordella L, **Rigaill J**, Timoshenko AP *et al.*
*Morphological and functional asymmetry of the human recurrent laryngeal nerve.*
Surgical and Radiologic Anatomy. Décembre 2012; doi: 34(10):903-8.

2. **Rigaill J**, Verhoeven PO, Mahinc C, Jeraiby M, Grattard F, Fonsale N *et al.*
*Evaluation of new bioMérieux CPS media for detection of urinary tract pathogens.*
Journal of Clinical Microbiology. Août 2015; doi: 53(8):2701-2.

3. **Rigaill J**, Harzallah I, Williet N, Paul S, Roblin X.
*Golimumab pharmacokinetics in ulcerative colitis: a literature review.*
Therapeutic Advances in Gastroenterology. Janvier 2017; doi: 10(1):89-100.

4. Flamant M, **Rigaill J**, Paul S, Roblin X.
*Advances in the development of JAK inhibitors in inflammatory bowel disease.*
Drugs. Juillet 2017; doi: 77(10):1057-68.

5. Gagnaire J, Verhoeven PO, Grattard F, **Rigaill** J, Lucht F, Pozzetto B *et al.*
*Epidemiology and clinical relevance of S. aureus intestinal carriage: a systematic review.*
Expert Review of Anti-infective Therapy. Août 2017; doi: 15(8):767-85.

6. **Rigaill J**, Grattard F, Grange S, Forest F, Haddad E, Carricajo A *et al.*
*Community-acquired Staphylococcus argenteus sequence Type 2250 Bone and Joint Infection.*
Emerging Infectious Diseases. Octobre 2018; doi: 24(10):1958-61.

7. Verhoeven PO, Haddar CH, **Rigaill J**, Fonsale N, Carricajo A, Grattard F *et al.*
*Comparison of the fully automated FilmArray BCID assay to a 4-Hour culture test coupled to Mass Spectrometry for day 0 identification of microorganisms in positive blood cultures.*
BioMed Research International. Novembre 2018; doi: 2018:7013470.

8. Nicolas R, Carricajo A, Morel J, **Rigaill J**, Grattard F, Guezzou S *et al.*
*Evaluation of effectiveness and compliance with the mupirocin nasal ointment part of Staphylococcus aureus decolonization in real life using UPLC-MS/MS mupirocin quantification.*
Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Juin 2020; doi: 75(6):1623-30.

9. Legros V, Denolly S, Vogrig M, Boson B, Siret E, **Rigaill J** *et al.*
*A longitudinal study of SARS-CoV-2-infected patients reveals a high correlation between neutralizing antibodies and COVID-19 severity.*
Cellular & Molecular Immunology. Février 2021; doi: 18(2):318-27.

10. Keita A, **Rigaill J**, Pillet S, Sereme Y, Coulibaly S, Diallo F *et al.*
*Evidence of HIV-1 genital shedding after one year of antiretroviral therapy in females recently diagnosed in Bamako.*
Microorganisms. Octobre 2021; doi: 9(10):2164.

11. Maurin C, Courrier E, He Z, **Rigaill J**, Josse J, Laurent F *et al.*
*Key role of Staphylococcal Fibronectin-Binding Proteins during the initial stage of Staphylococcus aureus keratitis.*
Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. Novembre 2021; doi: 11:745659.

12. Rodriguez K, Saunier F, **Rigaill J**, Audoux E, Botelho-Nevers E, Prier A *et al.*
*Evaluation of in vitro activity of copper gluconate against SARS-CoV-2 using confocal microscopy-based high content screening.*
Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. Décembre 2021; doi: 68:126818.

13. **Rigaill J**, Labetoulle R, Lleres-Vadeboin M, Grattard F, Pozzetto B, Cazorla C *et al.*
*Evaluation of the MRSA/SA ELITe MGB assay for the detection of Staphylococcus aureus in Bone and Joint Infections.*
Journal of Clinical Microbiology. Janvier 2022; doi: 60(1):e0083521

# Résumé

Le vestibule nasal (premiers centimètres de la cavité nasale) est considéré comme le principal site de colonisation par *Staphylocccus aureus* chez l'Homme. Ce travail de thèse a cependant montré que la colonisation de la cavité nasale postérieure, par *S. aureus*, était similaire en tout point à la colonisation vestibulaire. Le portage nasal de *S. aureus* est responsable d'une augmentation du risque d'infection par la bactérie. Les stratégies actuelles de décolonisation, basées avant tout sur l'utilisation topique de mupirocine, sont associées à un fort taux de rechute du portage de *S. aureus*. Nous avons pu observer la présence d'un réservoir intracellulaire de *S. aureus* sur des prélèvements de patients sains porteurs de la bactérie. La quasi absence d'activité intracellulaire de la mupirocine que nous avons mesurée sur un modèle *in vitro* de colonisation nasale, pourrait expliquer en partie les échecs de décolonisation observés avec cette molécule. Une meilleure compréhension des mécanismes à l'origine de ce réservoir pourrait permettre une meilleure prise en charge des patients porteurs de *S. aureus*. Si la voie d'internalisation principale de *S. aureus* (FnBPs-α5β1) est largement étudiée, une voie secondaire médiée par la protéine Eap de *S. aureus* et le récepteur ICAM-1 pourrait jouer un rôle important dans un contexte inflammatoire. Malgré des résultats préliminaires prometteurs, ce travail n'a pas confirmé l'implication de ces deux molécules dans l'internalisation de la bactérie. Enfin, une solution à l'absence d'activité intracellulaire de la mupirocine pourrait être la thérapie de remplacement du microbiote nasal. Les interactions entre microorganismes sont nombreuses, et certaines bactéries semblent capables d'empêcher l'implantation *de S. aureus* au niveau de la muqueuse nasale. Sur la base de données de métagénomique 16S et l'étude de compétition *in vitro*, nous avons pu mettre en évidence, pour la première fois, la capacité inhibitrice présentée par des souches de *Corynebacterium propinquum* sur la croissance et la capacité d'invasion d'une grande variété de souches de *S. aureus*.

# Abstract

The nasal vestibule (first centimeters of the nasal cavity) is considered as the main site of colonization by *Staphylococcus aureus* in humans. However, this thesis work showed that *S. aureus* colonization of the posterior nasal cavity was similar in all aspects to vestibular colonization. This nasal carriage of *S. aureus* is associated with an increased risk of infection with the bacteria. Current decolonization strategies, principaly based on the topical use of mupirocin, are associated with a high relapse rate of *S. aureus* nasal carriage. We were able to observe the presence of an intracellular reservoir of *S. aureus* on samples from healthy patients carrying the bacterium. The almost total lack of intracellular activity of mupricin that we measured on an *in vitro* model of nasal colonization could partly explain the decolonization failures observed with this molecule. A better understanding of the mechanisms at the origin of this reservoir could allow better management of patients with *S. aureus*. While the main internalization pathway of *S. aureus* (FnBPs-α5β1) is widely studied, a secondary pathway mediated by the *S. aureus* Eap protein through the ICAM-1 receptor could play an important role in an inflammatory context. Despite the promising preliminary results, this work did not confirm the involvement of these two molecules in the internalization of the bacterium. Finally, a solution to the lack of intracellular activity of muprocin could be the nasal microbiota replacement therapy. Interactions between microorganisms are numerous and certain bacteria seem capable of preventing the implantation *of S. aureus* in the nasal mucosa. Based on 16S metagenomics data and the in vitro competition study, we were able to highlight, for the first time, the inhibitory capacity of some *Corynebacterium propinquum* strains on the growth and invasion capacity of numerous *S. aureus* strains.