



**HAL**  
open science

# Etude de la réponse immunitaire innée dirigée contre le biofilm de *Staphylococcus aureus*

Aizat Iman Abdul Hamid

► **To cite this version:**

Aizat Iman Abdul Hamid. Etude de la réponse immunitaire innée dirigée contre le biofilm de *Staphylococcus aureus*. Santé. Université Clermont Auvergne, 2022. Français. NNT : 2022UCFAC076 . tel-04098669

**HAL Id: tel-04098669**

**<https://theses.hal.science/tel-04098669v1>**

Submitted on 16 May 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.

UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE  
Année 2021-2022

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE –  
AGRONOMIE – ENVIRONNEMENT

# THESE

Présentée par **ABDUL HAMID Aizat Iman**

A l'Université Clermont Auvergne pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITE**

(Spécialité : **Biologie santé**)

Soutenue le **25 janvier 2022**

---

**Etude de la réponse immunitaire innée  
dirigée contre le biofilm de *Staphylococcus aureus***

---

**Membres du jury :**

**Rapporteurs :** M BELOIN Christophe, Directeur de Recherche, Institut Pasteur  
Mme CELLI Susanna, Chargé de Recherche, Institut Pasteur

**Examineurs** Mme GUITON Rachel, MCU, Université Clermont Auvergne  
M SAPIN Vincent, Professeur, Université Clermont Auvergne  
M VALOUR Florent, MCU, Université Claude Bernard Lyon 1

**Directrice de thèse :** Mme GUEIRARD Pascale, Professeure, Université Clermont Auvergne

Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement (LMGE)  
Université Clermont Auvergne, UMR CNRS 6023  
1 Impasse Amélie Murat, 63178 Aubière, France







## REMERCIEMENTS

---

---

Je souhaite tout d'abord remercier chaleureusement les membres du jury d'avoir accepté et pris le temps d'évaluer mon travail de thèse. Merci aux rapporteurs, **Christophe Beloin** et **Susanna Celli** ; aux examinateurs, **Rachel Guitton**, **Vincent Sapin** et **Florent Valour**.

En premier lieu, je tiens à remercier très sincèrement **Pascale Gueirard** pour ton investissement tout au long de ces quatre années passées ensemble, que ce soit une simple invitation pour un café, de l'aide pour une manip ou la correction du manuscrit/des articles. Depuis le début de Master 2 jusqu'à la fin de ma thèse, tu m'as poussé et m'a « challengé » à devenir une meilleure personne, autant sur le plan scientifique qu'humain (mais surtout scientifique). Je n'oublierai jamais TOUTES les heures passées devant le microscope à rester fasciné par les images des cellules en mouvement ... jusqu'à ce qu'un potentiel problème arrive, nous obligeant à tout arrêter, mais avec ton aide nous avons tout surmonté. Le duo de CHOC ! Maintenant je ne me lasserai jamais de la microscopie intravitale et de toutes les belles choses et les belles découvertes que celle-ci peut apporter. Merci de ton accompagnement durant mes premières pas dans ma carrière scientifique. Tu as toujours su me rassurer dans mes moments de doute, m'encourager et me « booster » lorsqu'il le fallait. Je te souhaite plein de réussite dans ta nouvel équipe et dans tous tes projets à venir. Ta fascination et curiosité du monde du vivant resteront avec moi peu importe où je serai. Je te souhaite plein de bonheur à toi et ta jolie famille et encore, merci merci merci ! Grace à toi, je serai toujours « ZEN » 😊.

Merci aux collaborateurs du projet IMMUNOFILM-Staph, j'ai été ravie de travailler avec vous durant mon projet de thèse. A l'équipe lyonnaise ; **Andréa Cara**, **Alan Diot**, **Jérôme Josse** et **Frédérique Laurent**, je vous remercie vivement pour vos précieux conseils, votre bonne humeur et votre accueil chaleureux lors de mes nombreuses visites. A **Elisabeth Billard**, un très grand merci pour ta joie de vivre et ta disponibilité pour mes nombreux questionnements. Ton aide précieuse au cytomètre très tard le soir m'a permis parfois de finir à 20 h au lieu de 22 h ! Je tiens à remercier également **Paul Verhoeven** pour d'avoir pris le temps pour la construction du mutant Agr.

A toutes et tous les stagiaires qui ont contribué à ce projet ; **Léo Sauvat**, merci pour ta bonne humeur en permanence, ta vision de clinicien et tout ton aide apportée durant ma première année de thèse. J'espère que notre intérêt commun pour les infections à staphylocoques restera dans un contexte d'étude au laboratoire et ne sera jamais la cause de notre rencontre à



l'hôpital. A **Inès Feki, Tessa Amblard et Marie Hospital**, merci pour votre aide apportée au niveau expérimental et aussi de gestion. Les études *in vivo* mobilisent parfois un village entier pour bien se dérouler. Je vous souhaite plein de courage pour la suite de vos études.

Aux différents plateformes que j'ai fréquentées durant ces 4 années, sans vous cette thèse n'aurait pas été possible. Les filles du CICS : **Christelle Blavignac, Claire Szczepaniak, Lorraine Novais-Gameiro et Sophie Alamarguy** ; **Caroline Vachias et Sophie Desset** du CLIC ; **Pierre Pouchin** de la plateforme d'analyse d'image, **Christelle Damon-Soubeyrand** de la plateforme Anipath, **Bertrand Evrard** de l'équipe Unité Nutrition Humaine ainsi que l'Unité de Stabulation Animale : **Abdelkrim Alloui, Constance Gonnet et Clarisse Berthot**, un grand merci pour vos conseils techniques et scientifiques, et surtout pour votre accueil chaleureux et votre patience durant mes nombreuses passages dans vos locaux. Grâce à vous, j'ai gardé un bon rythme de marche tout au long de ma thèse et j'ai atteint largement l'objectif de 10 milles pas par jour.

Je remercie vivement **Chritiane Forrestier** de m'avoir accueilli dans son équipe. Mon arrivée à CMES dès le M2 n'était que le début d'une belle aventure. Vos questionnements critiques et pertinents, tout en restant bienveillants, durant mes présentations aux réunions de labo m'ont permis d'entraîner mon esprit critique. Je voulais également vous remercier de m'avoir proposé les vacances de l'enseignement à la faculté de médecine. Les quelques heures de TD que j'ai réalisées m'ont fait découvrir une passion pour l'enseignement que je n'avais pas eu avant.

Merci à tous les personnels de l'équipe **CMES** pour votre disponibilité et votre bienveillance durant cette expérience inoubliable ; **Sylvie Miquel, Damien Balestrino, Marjolaine Vareille-Delarbre, Joan Artigas Alejo, Philippe Bouchard, Geneviève Bricheux, Isabelle Batisson, Claire Aumeran, Ousman Traire, Alexandre Lautrette, Bertrand Souweine, Nicholas Charbonnel, Florence Donnadiou, Manjyot Kaur, Yoann Ménard, Damien Tortuel, Marie-Pierre Lettoy**, merci pour tous les échanges autour du café et vos nombreuses conseils lors des réunions. Toutes les connaissances et les compétences développées à vos côtés me seront précieuses pour la suite de mon projet professionnel.

A l'équipe du midi : **Valérie Lyonnet, Laurence Nakusi, Maeva Sanvoisin, Maxime Duval, Thomas Merciecca et Laura Joseph**, toute une thèse ne serait pas suffisante pour exprimer ma gratitude de vous avoir rencontrés. Tout simplement MERCI ! ... de m'avoir aidé, de m'avoir soutenu, de m'avoir encadré, de m'avoir fait rire, de m'avoir prêté une oreille





lorsque j'en avais besoin, et surtout de m'avoir permis de vous embêter durant ces quatre années. Vous allez me manquer terriblement.

Je tiens à remercier également les personnels du laboratoire **M2iSH** pour leur gentillesse, leur bonne humeur et toute leur aide apportée durant la thèse. Même si nous sommes loin (d'un étage) maintenant, je me rappellerai toujours l'ambiance conviviale et amicale de tout le monde que j'ai pu croiser. Vous avez rendu mon arrivée en thèse encore plus chaleureux que ce qu'il était déjà.

Merci également à **Frédéric Delbac** et à toute l'équipe **IHP** de m'avoir accueilli et intégré durant ma dernière année de thèse. Mon temps d'adaptation à des nouveaux locaux a été rendu plus court grâce à vous, votre disponibilité et votre aide.

Aux amis doctorants ou non, que je ne vois pas assez souvent à cause de la thèse, tout d'abord désolé. Et ensuite merci du fond de mon cœur d'avoir rempli ces trois années de rire. Je tiens à remercier particulièrement **Ruben Halifa, Damien Dufour, Mélusine Monrose, Thomas Sauvaître, Pierre Boccon, Alex Jourdain, James Wilmouth** et **Roxane Autissier**. J'ai passé d'excellents moments avec vous, que ce soit au labo, au bar ou chez Ruben. Je croise les doigts pour vos futures soutenances de thèse même si vous n'en avez pas besoin. A **Xuân-Thi Nguyen, Louis Debar** et **Julia Bruyère**, merci pour les cafés (ou chocolats chauds pour certaines) sur la terrasse et les soirées derrière une pinte. J'ai passé de très bons moments en votre compagnie.

Et bien entendu, merci à ma famille qui me soutient de loin. **Mak** and **Abah**, thank you for raising me to be the strong, independent, and persevering person that I am today. I don't think that I would have succeeded this far otherwise. To **Afiq** and **Luqman**, I have so much to tell you after all these years. I hope you are all doing well, and we can see each other IRL very soon.



# RESUME

---

---

## Etude de la réponse immunitaire innée dirigée contre le biofilm de *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* est une bactérie pathogène opportuniste chez les mammifères, et responsable de la grande majorité des infections bactériennes du tissu cutané chez l'Homme. La production d'une grande variété de facteurs de virulence va permettre à cette espèce bactérienne d'atteindre les couches les plus profondes de la peau et de provoquer des infections présentant une large gamme de manifestations cliniques. Ces infections représentent un véritable enjeu de santé publique en raison de leur fréquence élevée et de l'émergence généralisée de souches de *S. aureus* résistantes à l'antibiothérapie. Chez l'Homme, une infection cutanée à *S. aureus* est à l'origine d'une réaction inflammatoire locale caractérisée par le recrutement de cellules phagocytaires telles que des polynucléaires neutrophiles (PNN) et des monocytes/macrophages (MO/MΦ) au site d'infection. Ces cellules immunitaires, avec d'autres types cellulaires de la peau, vont contribuer à l'élimination de l'agent pathogène du tissu infecté. Cependant, *S. aureus* a développé de nombreuses stratégies pour contourner, désactiver ou même tuer les cellules immunitaires de l'hôte, notamment en effectuant la transition du mode de vie planctonique vers le mode de vie biofilm. Ce dernier correspond à la forme bactérienne communautaire. Il confère aux bactéries une résistance accrue aux agents antimicrobiens et aux attaques du système immunitaire de l'hôte. Le travail présenté dans ce manuscrit a eu pour objectif de mieux comprendre comment les bactéries organisées en biofilm sont capables de résister aux attaques du système immunitaire inné de l'hôte, encore appelé « immuno-échappement », dans le contexte d'une infection cutanée.

Une approche expérimentale innovante utilisant le modèle d'infection du pavillon de l'oreille de la souris a été mise en place. En utilisant l'approche de microscopie confocale, nous avons pu suivre et quantifier par imagerie intravitale, la dynamique de la réponse immunitaire innée anti-biofilm aussi bien à l'échelle tissulaire que cellulaire. Nous avons ainsi démontré un recrutement précoce important de phagocytes au niveau du tissu cutané de l'oreille, avec une dynamique de recrutement spécifique à la forme biofilm. Ce phénotype dit « biofilm » a ensuite été caractérisé en utilisant l'approche de cytométrie en flux, et a permis de démontrer que les PNN représentent la population majeure de phagocytes recrutés au niveau du tissu de l'oreille. L'analyse des propriétés fonctionnelles de ces cellules a permis d'identifier une cinétique d'activation spécifique à la forme biofilm durant les premières jours de l'infection, avec un état qualifié de « suractivé » des PNN au temps 48h après l'infection. Enfin, une étude exploratoire des interactions entre des cellules dendritiques et *S. aureus* réalisée *in vitro* a permis de mettre en évidence des premières différences dans les réponses induites par la forme planctonique ou biofilm. A terme, une meilleure connaissance de ces premières étapes de la réponse immunitaire innée nous permettra de contribuer à la mise au point de stratégies thérapeutiques alternatives à l'antibiothérapie pour lutter contre les infections par le biofilm de *S. aureus*, notamment en ayant recours à des thérapies immunomodulatrices.

**Mots-clés :** *S. aureus*, biofilm, réponse immunitaire innée, inflammation, polynucléaire neutrophile, macrophage, cellules dendritique, souris, imagerie intravitale



# ABSTRACT

---

---

## *Study of the innate immune response directed against the biofilm of Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* are opportunistic pathogenic bacteria in mammals, responsible for the vast majority of bacterial infections of the skin tissue in humans. The production of a wide variety of virulence factors allows this bacterial species to gain access to the deepest layers of the skin and to cause infections with a wide range of clinical manifestations. These infections represent a real public health issue due to their high frequency and the generalized emergence of *S. aureus* strains resistant to antibiotherapy. In humans, *S. aureus* skin infection causes a local inflammatory response characterized by the recruitment of phagocytic cells, such as polymorphonuclear neutrophils (PNN) and monocytes/macrophages (MO/MΦ) at the infection site. These immune cells, along with other cell types in the skin, contribute to the elimination of the pathogen from the infected tissue. However, *S. aureus* has developed numerous strategies to evade, deactivate, or kill host immune cells. This includes the transition from the planktonic lifestyle to the biofilm lifestyle, the latter corresponding to the growth of microbes in bacterial communities. Biofilms confer to bacteria an increased resistance to antimicrobial agents and to attacks by the host immune system. The work presented in this manuscript has aimed to better understand how bacteria organized in biofilms are able to resist to attacks by the host innate immune system, also called “immune evasion”, in the context of skin infections.

An innovative experimental technique using the mouse ear pinna infection model was set up. Using confocal microscopy, this approach made it possible to monitor and quantify by intravital imaging the dynamics of the innate anti-biofilm immune responses, both at the tissue and cellular level. We thus demonstrated a considerable early recruitment of phagocytes in the skin tissue of the ear pinna, with cellular recruitment dynamics specific to the biofilm form. This so-called “biofilm” phenotype was then characterized using the flow cytometry approach and made it possible to show that PNN represent the major population of phagocytes detected in the tissue of the ear tissue. The analysis of the functional properties of these recruited cells made it possible to identify an activation kinetic specific to the biofilm form during the first days of the infection. This was characterised by a state considered as “over-activated” of the PNN at the 48-hour time point after the infection. Finally, an exploratory study of the interactions between dendritic cells and *S. aureus* carried out *in vitro* made it possible to highlight the first differences in the responses induced by the planktonic or biofilm form of growth. Ultimately, a better understanding of these first stages of the innate immune response would allow us to contribute to the development of alternative therapeutic strategies to antibiotics such as immunomodulatory therapies, in order to better fight against *S. aureus* biofilm infections.

**Keywords:** *S. aureus*, biofilm, innate immune response, inflammation, polymorphonuclear neutrophils, macrophages, dendritic cells, mice, intravital imaging



# TABLE DES MATIERES

---

---

Remerciements .....	4
Résumé .....	7
Abstract.....	8
Table des matières .....	9
Liste des abréviations .....	16
Liste des Figures.....	19
Liste des Tableaux.....	21
Introduction.....	22
PARTIE 1 – TRAVAIL BIBLIOGRAPHIQUE.....	24
I. Les infections cutanées à <i>Staphylococcus aureus</i> .....	25
1. Généralités.....	25
2. Epidémiologie.....	25
2.1 Prévalence.....	25
2.2 Infections liées aux soins.....	26
2.3 Symptômes cliniques.....	26
2.3.1 L'impétigo.....	26
2.3.2 La cellulite .....	26
2.3.3 La folliculite.....	27
2.3.4 L'abcès cutané.....	27
2.3.5 Les manifestations dermatologiques dues à une infection systémique .....	27
2.4 Traitements .....	27
II. Physiopathologie des infections cutanées à <i>Staphylococcus aureus</i> .....	28
1. Physiologie de la peau.....	28
1.1 Anatomie .....	28
1.1.1 L'hypoderme.....	29





1.1.2 Le derme .....	29
1.1.2.1 Le derme papillaire.....	29
1.1.2.2 Le derme réticulaire.....	30
1.1.3 L'épiderme.....	30
1.1.4 Les annexes de la peau .....	31
1.2 Les cellules de la peau saine.....	31
1.2.1 Les kératinocytes.....	32
1.2.2 Les mélanocytes .....	32
1.2.3 Les fibroblastes .....	32
1.2.4 Les cellules myéloïdes.....	33
1.2.4.1 Les cellules de Langerhans .....	33
1.2.4.2 Les cellules dendritiques du derme .....	33
1.2.4.3 Les mastocytes .....	33
1.2.4.4 Les macrophages .....	34
1.2.4.1 Les polynucléaires éosinophiles .....	34
1.2.4.2 Les polynucléaires neutrophiles .....	34
1.2.5 Les cellules lymphoïdes.....	35
1.2.5.1 Les Lymphocytes T $\alpha\beta$ .....	35
1.2.5.2 Les Lymphocytes T $\gamma\delta$ .....	35
1.2.5.3 Les cellules lymphoïdes innées .....	35
1.2.5.4 Les lymphocytes B .....	36
2. Physiologie de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	36
2.1 Généralités .....	36
2.2 La paroi bactérienne .....	37
2.3 Les facteurs de virulence.....	37
2.3.1 La capsule .....	37
2.3.2 Les molécules de surface.....	38



2.3.3 Les toxines .....	39
2.3.3.1 Les exfoliatines.....	39
2.3.3.2 Les toxines formant des pores.....	39
2.3.3.3 Les superantigènes.....	42
2.3.4 Les enzymes.....	42
2.3.4.1 La coagulase.....	42
2.3.4.2 La staphylokinase.....	42
2.3.4.3 Les lipases.....	43
2.3.4.4 Les protéases.....	43
2.3.4.5 Les nucléases.....	44
2.3.5 La staphyloxanthine.....	44
2.3.6 Les protéines impliquées dans la réponse immunitaire.....	44
2.3.6.1 Chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus et FPR-like 1 inhibitory proteins.....	44
2.3.6.2 Staphylococcal complement inhibitor.....	45
2.4 Le biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	45
2.4.1 Généralités.....	45
2.4.2 Les étapes de formation.....	46
2.4.2.1 L'attachement.....	46
2.4.2.2 La multiplication.....	46
2.4.2.3 La dispersion précoce ou exode.....	48
2.4.2.4 La maturation.....	48
2.4.2.5 La dispersion.....	49
2.5 Régulation de la synthèse des facteurs de virulence et transition vers la forme biofilm.....	49
2.5.1 Les systèmes à deux composants.....	49
2.5.1.1 Le système <i>agr</i> .....	49
2.5.1.2 WalKR.....	50



2.5.1.3 SaeSR.....	51
2.5.1.4 SrrAB.....	51
2.5.1.5 ArlRS .....	51
2.5.2 Les seconds messagers nucléotidiques .....	52
2.5.3 Les facteurs de transcription .....	53
2.5.3.1 La famille des protéines SarA .....	53
2.5.3.2 Le facteur Sigma B.....	54
2.6 Rôle du biofilm <i>in vivo</i> .....	55
III. La réponse immunitaire innée dirigée contre <i>Staphylococcus aureus</i> .....	55
1. Introduction .....	55
2. Les effecteurs de la réponse immunitaire innée .....	56
2.1 Le système du Complément .....	56
2.2 Les composants cellulaires de la réponse immunitaire innée dirigée contre <i>Staphylococcus aureus</i> .....	57
2.2.1 Reconnaissance de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	57
2.2.2 Internalisation de <i>Staphylococcus aureus</i> par une cellule non phagocytaire...58	
2.2.3 Les kératinocytes.....	58
2.2.4 Les fibroblastes .....	59
2.2.5 Les cellules endothéliales .....	59
2.2.6 Les cellules myéloïdes.....	60
2.2.6.1 Les cellules de Langerhans .....	60
2.2.6.2 Les cellules dendritiques du derme .....	60
2.2.6.3 Les cellules dendritiques plasmacytoïdes et inflammatoires .....	61
2.2.6.4 Les mastocytes .....	61
2.2.6.5 Les monocytes/macrophages.....	62
2.2.6.6 Les polynucléaires neutrophiles .....	63
2.2.7 Les lymphocytes de l'immunité innée.....	66



2.2.7.1 Les Lymphocytes T $\alpha\beta$ .....	66
2.2.7.2 Les Lymphocytes T $\gamma\delta$ .....	66
2.2.7.3 Les cellules NK .....	67
2.2.7.4 Les cellules lymphoïdes innées .....	67
3. L'immuno-échappement par le staphylocoque : mécanismes.....	67
3.1 Inhibition du système du complément .....	67
3.2 Détournement de l'extravasation et de la chimiotaxie cellulaire.....	68
3.3 Inhibition de la dégradation.....	69
3.4 Echappement des compartiments lytiques.....	70
3.5 Survie intracellulaire .....	71
3.5.1 Phagocytes professionnels .....	71
3.5.2 Cellules non-phagocytaires.....	72
3.6 Induction de la mort cellulaire programmée par <i>Staphylococcus aureus</i> .....	73
3.7 Immuno-échappement par le biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	74
IV. Les différents modèles d'étude d'infections cutanées à <i>Staphylococcus aureus in vivo</i>	75
1. Les modèles d'infection épicutanée.....	75
2. Les modèles d'infection par voie intradermique .....	76
3. Les modèles d'infection sous-cutanée .....	77
4. Les modèles d'infection de plaies cutanées .....	77
5. Les modèles humanisés.....	78
PARTIE 2 – TRAVAIL PERSONNEL.....	79
I. Objectifs du travail .....	80
II. Mise en place d'un modèle d'infection cutanée pour étudier la dynamique de la réponse immunitaire innée dirigée contre le biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	82
III. Mise en place d'un modèle d'infection sur support abiotique par le biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> pour mimer les infections sur matériel médical <i>in vivo</i> .....	96





IV. Caractérisation <i>in vivo</i> de la dynamique de la réponse inflammatoire précoce dirigée contre le biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> : étude des propriétés fonctionnelles des polynucléaires neutrophiles.....	117
V. Revue bibliographique : analyse <i>in vivo</i> des interactions entre les cellules dendritiques de la peau et <i>Staphylococcus aureus</i> .....	138
VI. Analyse <i>in vitro</i> des interactions entre les cellules dendritiques et <i>Staphylococcus aureus</i> sous forme planctonique ou biofilm .....	156
1. Introduction .....	156
2. Matériels et méthodes .....	156
2.1 Souches bactériennes et conditions de culture.....	156
2.2 Réalisation des courbes de croissance.....	156
2.3 Détermination du titre bactérien .....	156
2.4 Evaluation de la biomasse bactérienne par cristal violet.....	157
2.5 Maturation des BMDC .....	157
2.6 Infections des BMDC par <i>S. aureus</i> sous forme planctonique ou de biofilm .....	158
2.6.1 Préparation de l'inoculum planctonique.....	158
2.6.2 Préparation de l'inoculum « biofilm ».....	158
2.6.3 Mise en contact des bactéries avec les BMDC .....	158
2.6.4 Invasion de <i>S. aureus</i> dans les BMDC .....	159
2.6.5 Production des cytokines par les BMDC infectées par <i>S. aureus</i> .....	159
2.7 Détermination de la concentration en cytokines par ELISA .....	159
3. Résultats .....	159
3.1 Caractérisation du mutant $\Delta$ agr de <i>Staphylococcus aureus</i> SH1000 .....	159
3.2 Comparaison de la capacité d'internalisation des cellules dendritiques de <i>Staphylococcus aureus</i> SH1000 sous forme planctonique ou biofilm.....	160
3.3 Comparaison de la réponse cytokinique des cellules dendritiques après l'infection par la forme planctonique ou biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> SH1000 .....	160
Discussion et perspectives .....	162



I. Etude de la réponse inflammatoire anti-biofilm par imagerie intravitale dans le modèle d'infection du pavillon de l'oreille de la souris.....	162
II. Caractérisation de la réponse inflammatoire précoce dirigée contre la forme biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> chez la souris.....	167
III. Etude des interactions entre le biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> et les cellules dendritiques pour la mise en place de la réponse adaptative .....	174
Conclusion .....	178
Références bibliographiques.....	179
Bibliographie personnelle.....	214



## LISTE DES ABREVIATIONS

ABSSI : <i>Acute Bacterial Skin and Skin Structure Infections</i>	DO : Densité optique
AD : Dermatite atopique	Eap : Protéine d'adhésion extracellulaire
ADN : Acide désoxyribonucléique	Efb : Protéine de liaison au fibrinogène extracellulaire
ADNe : ADN extracellulaire	ET : Exfoliatine
Agr : <i>Accessory Gene Regulator</i>	FAK : Kinase d'adhésion focale
AIP : <i>AutoInducing Peptide</i>	FAME : <i>Fatty Acid Modifying Enzyme</i>
AMP : Peptide antimicrobien	FcR : Récepteur Fc
Arg-1 : Arginase-1	FLIPr/FLIPr-like : <i>FPR-Like 1 Inhibitory Protein</i>
ARN : Acide ribonucléique	FnBP : Protéine d'adhésion à la fibronectine
Arl : <i>Autolysis Regulated Locus</i>	FPR : Récepteur des peptides formylés
Atl : Autolysine	FSP-1 : <i>Fibroblast-Specific Protein-1</i>
Aur : Auréolysine	G-CSF : <i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>
Bap : <i>Biofilm-Associated Protein</i>	GM-CSF : <i>Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
Bbp : Protéine de liaison à la sialoprotéine osseuse	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène
BMDC : DC dérivée de la moelle osseuse de souris	HBD : <i>Human β Defensin</i>
BPI : <i>Bactericidal/Permeability-Increasing protein</i>	Hla : Hémolysine α
B reg : Lymphocyte B régulateur	Hlb : Hémolysine β
CBA : <i>Columbia Blood Agar</i>	Hld : Hémolysine δ
CCL : <i>C-C motif Chemokine Ligand</i>	Hlg : Hémolysine γ
CCR : <i>C-C chemokine Receptor type</i>	HNP : <i>Human Neutrophil Peptide</i>
cDC : Cellule dendritique conventionnelle	ICAM-1 : <i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
c-di-AMP : di-adénosine monophosphate cyclique	IFN : Interféron
CHIPS : <i>CHemotaxis Inhibitory Protein of Staphylococcus</i>	Ig : Immunoglobuline
Cif : Protéine d'adhésion au fibrinogène	IL : Interleukine
CMHII : Complexe majeur d'histocompatibilité de type II	ILC : Cellule lymphoïde innée
Cna : Protéine d'adhésion au collagène	iNOS : <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
CPA : Cellule présentatrice d'antigène	LPS : Lipopolysaccharide
CR : Récepteur du complément	LTA : <i>Lipo-Teichoic Acid</i>
CXCR : <i>C-X-C motif chemokine Receptor</i>	LTi : <i>Lymphoid Tissue Inducer</i>
DARC : <i>Duffy antigen/chemokine receptor</i>	MΦ : Macrophage
DC : Cellule dendritique	Mac-1 : <i>Macrophage-1 antigen</i>
DETC : <i>Dendritic Epidermal T Cell</i>	MASP : <i>MBL ASsociated Protein</i>
	MBD : <i>Mouse β Defensin</i>



MBL : Lectine liant le mannose  
 MCP : *Monocyte Chemoattractant Protein*  
 MDSC : *Myeloid-Derived Suppressor Cells*  
 MEC : Matrice extracellulaire bactérienne  
 MET : *Macrophage Extracellular Traps*  
 MO : Monocyte  
 MPO : Myéloperoxydase  
 MprF : *Multiple Peptide Resistance Factor*  
 MRSA : *S. aureus* méticilline résistant  
 MRSA-C : Souche communautaire de MRSA  
 MRSA-H : MRSA acquise en milieu hospitalier  
 MSSA : *S. aureus* méticilline sensible  
 NAG : polysaccharide N-acétylglucosamine  
 NAM : Acide N-acétylmuramique  
 NEAT : *NEAr iron Transporter*  
 NET : *Neutrophil Extracellular Trap*  
 NLRP : *NOD-, LRR- family Pyrin domain containing protein*  
 NO : Oxyde nitrique  
 NOD : *Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein*  
 NOX2 : NADPH oxydase  
 $O_2^-$  : ion superoxyde  
 PAMP : *Pathogen Associated Molecular Pattern*  
 PBS : Tampon phosphate salin  
 pDC : DC plasmacytoïde  
 PDGF : *Platelet-Derived Growth Factor*  
 PE : Polynucléaire éosinophile  
 PFP : Protéine formant des pores  
 PFT : Toxine formant des pores  
 PGD2 : Prostaglandine D2  
 PGE2 : Prostaglandine E2  
 PGN : Peptidoglycane  
 PIA : *Polysaccharide Intercellular Adhesin*  
 Pls : Protéine de surface sensible à la plasmine  
 Pmt : *Phenol-soluble Modulin Transporter*  
 PNN : Polynucléaire neutrophile  
 PRR : *Pattern Recognition Receptor*  
 PSGL-1 : *P-Selectin Glycoprotein Ligand-1*  
 PSM : *Phenol-Soluble Modulin*  
 PVL : Leukotoxine de Panton-Valentine  
 QS : *Quorum Sensing*  
 RIP-1 : *Receptor-Interacting Protein 1*  
 RNS : Espèce réactives de l'azote  
 ROS : Espèce réactives de l'oxygène  
 Rot : *Repressor Of Toxins*  
 RSH : *RelA/SpoT Homologue*  
 $\sigma^B$  : Facteur Sigma B  
 SAE : *S. aureus Exoprotein Expression*  
 SA<sub>g</sub> : Toxine superantigénique  
 Sak : Staphylokinase  
 SALT : *Skin-Associated Lymphoid Tissue*  
 Sar : *Staphylococcal Accessory Regulator*  
 SasG : Protéine de surface G  
 Sbi : *S. aureus Binder of IgG*  
 SCIN : *Staphylococcal Complement INhibitor*  
 ScpA : Staphopaine A  
 Sdr : *Serine-aspartate repeat protein*  
 sgRNA : ARN guide  
 SNARF : Seminaphtharhodafleur  
 SOD : Superoxyde dismutase  
 SPIN : *Staphylococcal Peroxidase INhibitor*  
 SR : *Scavenger Receptor*  
 Srr : *Staphylococcal Respiratory Regulator*  
 SSL : *Staphylococcal Superantigen-Like*  
 SspA : Sérine protéase V8  
 SspB : Staphopaine B  
 Spl : Homologue de SspA  
 SVF : Sérum de veau fœtal  
 TGF $\beta$  : *Transforming Growth Factor  $\beta$*   
 TLR : *Toll-Like Receptor*  
 TNF : Facteur de nécrose tumorale  
 T reg : Lymphocyte T régulateur





TS : Trypticase soja

TSST-1 : *Toxic Shock Syndrom Toxin 1*

UV : Ultraviolet

VCAM-1 : *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*

VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

WTA : *Wall Teichoic Acid*



## LISTE DES FIGURES

---

---

- Figure 1 : Schémas de classification des infections dites « cutanées » à *S. aureus* : infections de la peau et des tissus mous.**
- Figure 2 : Anatomie de la peau.**
- Figure 3 : Les différentes couches de l'épiderme.**
- Figure 4 : La distribution des cellules immunitaires dans la peau.**
- Figure 5 : Structure de *S. aureus*.**
- Figure 6 : La classification des molécules de surface de *S. aureus*.**
- Figure 7 : Mécanisme de formation des pores par les PSM de *S. aureus*.**
- Figure 8 : Mécanisme de formation des pores transmembranaires par les PFT de *S. aureus*.**
- Figure 9 : Mécanisme d'action des superantigènes.**
- Figure 10 : Les étapes de la formation du biofilm de *S. aureus*.**
- Figure 11 : Les protéines impliquées dans la phase précoce de la formation du biofilm chez *S. aureus*.**
- Figure 12 : Implication de l'ADNe et des PSM dans la formation du biofilm de *S. aureus*.**
- Figure 13 : Réseau d'interaction des principaux régulateurs globaux de *S. aureus*.**
- Figure 14 : L'organisation du circuit de *quorum sensing* (QS) chez *S. aureus*.**
- Figure 15 : L'organisation moléculaire du système SaeRS.**
- Figure 16 : La région promotrice de SarA et son réseau de régulation.**
- Figure 17 : Les trois voies d'activation du système du complément.**
- Figure 18 : Internalisation de *S. aureus* par les cellules non-phagocytaires.**
- Figure 19 : Développement et fonction de la lignée cellulaire T auxiliaire.**
- Figure 20 : Polarisation des MΦ vers un phénotype M1 ou M2 en réponse à *S. aureus*.**
- Figure 21 : Assemblage de NOX2 et de la cascade de la production des ROS.**
- Figure 22 : Extravasation des PNN au site d'infection et mécanismes de dégradation de *S. aureus*.**
- Figure 23 : La réponse immunitaire cutanée contre *S. aureus* médiée par l'IL-17.**
- Figure 24 : Les protéines immunomodulatrices sécrétées par *S. aureus* peuvent avoir plusieurs effets sur les PNN.**



**Figure 25 : Modèle d'échappement de *S. aureus* du compartiment phagosomal en lien avec l'action synergique de la Hld et de la Hlb.**

**Figure 26 : Le mécanisme de l'édition du génome médiée par CRISPR/Cas9 chez les bactéries.**

**Figure 27 : Caractérisation du mutant  $\Delta$ agr de *S. aureus* SH1000.**

**Figure 28 : Evaluation de la capacité des BMDC à internaliser la souche WT de *S. aureus* SH1000 sous sa forme planctonique ou biofilm.**

**Figure 29 : Dosage des cytokines produites par les BMDC après contact avec la souche WT de *S. aureus* SH1000 sous sa forme planctonique ou biofilm.**



## **LISTE DES TABLEAUX**

---

---

**Tableau 1 : Tableau récapitulatif des différents composants du SALT, leurs fonctions, leurs localisations, leurs marqueurs spécifiques, leurs facteurs d'activation, les cytokines libérées et les molécules/facteurs exprimés.**

**Tableau 2 : Composition des différentes leukotoxines de *S. aureus*, leurs récepteurs et leurs cellules cibles.**

**Tableau 3 : Les AMP à activité antimicrobienne contre *S. aureus*, leurs cellules sécrétrices, les cellules sur lesquelles elles peuvent induire un effet chimiotactique, et les facteurs activant leur expression.**





# INTRODUCTION

---

---

Les infections de la peau et des tissus mous, appelées infections cutanées dans ce manuscrit, regroupent des infections bactériennes de la peau, des muscles et des tissus conjonctifs sous-jacents. Au cours des dernières décennies, une augmentation significative de la prévalence des infections cutanées à la fois dans la communauté et dans les établissements de santé a été observée. Ces infections représentent un pourcentage considérable de renvois aux services d'urgence et d'hospitalisations dans les pays développés, contribuant à une morbidité et à un coût socio-économique élevé. L'espèce bactérienne *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) est le micro-organisme pathogène le plus souvent impliqué dans ces infections. En effet, l'augmentation de la prévalence de cette espèce bactérienne a été principalement attribuée à l'expansion de la population vieillissante cumulant des comorbidités, et à l'émergence de souches bactériennes communautaires résistantes à la méticilline. Les infections causées par ces souches résistantes posent un défi supplémentaire aux cliniciens, en raison des taux élevés d'échecs thérapeutiques et de récurrences.

*S. aureus* est responsable d'infections cutanées aiguës ou chroniques. Une lésion cutanée constitue souvent la porte d'entrée de ce pathogène dans l'organisme, et représente un point de départ pour sa dissémination chez l'hôte. Au cours de ces infections, le système immunitaire est mobilisé pour défendre l'hôte contre l'agent pathogène envahissant. La première réaction de défense est la mise en place d'une réponse inflammatoire majoritairement constituée de phagocytes tels que des monocytes/macrophages (MO/MΦ) et des polynucléaires neutrophiles (PNN). Ces cellules de l'immunité innée sont dotées de la capacité à internaliser et à dégrader les bactéries. De plus, la peau représente une niche particulière du système immunitaire, en raison de la présence de nombreuses autres types de cellules immunitaires et « non-immunitaires » résidentes qui participent à la réponse inflammatoire et à la réponse immunitaire en général. L'ensemble de ces acteurs vont contribuer à la dégradation et à l'élimination de la bactérie chez l'hôte.

Cependant, un élément de physiopathologie essentiel à prendre en compte au cours de ces infections cutanées est la capacité de *S. aureus* à former des biofilms. Ces derniers correspondent à la forme bactérienne communautaire, souvent impliquée dans les infections chroniques de type ostéomyélite, parodontite, infections sur dispositifs médicaux invasifs et infections chroniques de plaie cutanée. Ce mode de vie confère à la bactérie une résistance



accrue aux agents antimicrobiens, tout en servant de réservoir pour la dissémination bactérienne au sein de l'organisme infecté. Par ailleurs, il a été démontré que la forme biofilm de *S. aureus* est capable de résister aux attaques du système immunitaire de l'hôte, notamment à celles médiées par les cellules de l'immunité innée telles que les phagocytes. Les bactéries du biofilm possèdent également la capacité de moduler activement cette réponse à leur avantage. L'ensemble de ces mécanismes favorisent la persistance de la bactérie chez l'hôte et la chronicisation de l'infection.

L'objectif de notre travail a été de mieux comprendre comment les bactéries organisées en biofilm sont capables de résister aux attaques du système immunitaire inné de l'hôte dans le contexte d'une infection cutanée. Nous avons voulu comparer la réponse inflammatoire induite par la forme biofilm et la forme isolée, encore appelée planctonique, dans un modèle murin d'infection du tissu cutané de l'oreille. Nous avons également étudié *in vitro* les interactions entre *S. aureus* et la cellule dendritique, un autre composant cellulaire essentiel de la réponse immunitaire innée aussi impliqué dans la mise en place de la réponse adaptative dirigée contre le biofilm de *S. aureus*.

Au cours de la première partie de ce travail, nous présenterons une revue bibliographique sur les infections cutanées à *S. aureus*, leur physiopathologie, leur immunobiologie et le rôle du biofilm dans ces infections. Nous aborderons en particulier les différentes données existantes sur la réponse immunitaire innée dirigée contre *S. aureus* et les mécanismes mis en place par la bactérie pour détourner cette réponse. Les différents modèles d'étude existants chez le rongeur pour mieux comprendre la physiopathologie de ces infections cutanées à *S. aureus* seront présentés.



## **PARTIE 1 – TRAVAIL BIBLIOGRAPHIQUE**

---

---



# I. Les infections cutanées à *Staphylococcus aureus*

## 1. Généralités

*S. aureus* est une bactérie pathogène opportuniste retrouvée de manière commensale chez les mammifères. Chez l'Homme, cette espèce bactérienne colonise de manière asymptomatique certaines niches tissulaires telles que la peau, les narines et les muqueuses (Haag et al., 2019), tout en étant responsable d'un grand nombre d'infections allant d'infections cutanées modérées à des infections plus sévères parfois, comme des septicémies ou des endocardites. Les infections de la peau et des tissus mous (ou infections cutanées) sont les plus fréquentes et se manifestent sous plusieurs formes telles que l'impétigo, les furoncles, les abcès ou encore la cellulite (Tong et al., 2015).

## 2. Epidémiologie

### 2.1 Prévalence

*S. aureus* est l'agent pathogène le plus fréquemment retrouvé dans les infections cutanées chez l'Homme. Environ 30% de la population est porteur sain. Cependant, les infections par des souches résistantes à la méticilline (MRSA) sont associées à une morbidité et à une mortalité augmentée, et constituent un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale. Depuis l'apparition des souches communautaires méticilline résistantes (MRSA-C), la prévalence de *S. aureus* dans les infections cutanées a considérablement augmentée (David and Daum, 2010; Esposito et al., 2016). Aux Etats-Unis, une étude menée en 2008 auprès de plusieurs services d'urgence a montré une prévalence des MRSA pouvant aller jusqu'à 60% dans les infections cutanées, avec la majorité des cas causées par le clone MRSA-C USA300 (Talan et al., 2011; Tong et al., 2015). Cependant, une baisse du nombre des infections à MRSA acquises en milieu hospitalier (MRSA-H) et aux MRSA-C a été observée depuis 2010 aux Etats Unis (Klein et al., 2017; Poulakou et al., 2019).

En Europe, une distribution plus diversifiée des clones MRSA-C est observée ainsi qu'une variation de la prévalence des infections à MRSA en fonction du pays étudié. De manière générale, le nombre d'infections à MRSA, tous types confondus, a augmenté entre 2007 et 2015 chez les enfants et les personnes âgées, alors que leur prévalence en France, au Royaume-Uni et en Allemagne reste en dessous de 10% (Otter and French, 2010; Bouchiat et al., 2017; Cassini et al., 2019).





## 2.2 Infections liées aux soins

Depuis l'isolement de la pénicilline en 1940, l'utilisation des antibiotiques a rapidement été suivie par l'apparition de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques dans les établissements de santé. Un exemple connu concernant *S. aureus* est l'apparition des MRSA en 1961, seulement un an après l'introduction de la pénicilline en thérapeutique. Ces souches ont tout d'abord été isolées à l'hôpital, mais les années 1990 ont vu l'émergence de souches MRSA-C. Deux types d'infections à staphylocoque sont décrites chez l'Homme : les infections acquises en milieu communautaire, et les infections nosocomiales ou infections acquises en milieu hospitalier (Ventola, 2015). Alors que les souches méticilline sensibles (MSSA) peuvent également être à l'origine de ces deux types d'infections, nous distinguons une population concernée différente, un mode de transmission particulier et un type d'infection majoritaire chez les infections acquises en milieu hospitalier ou en milieu communautaire. En effet, ces dernières concernent majoritairement des infections cutanées, qui se transmettent donc par le contact, et touchent les sujets immunocompétents, notamment les enfants et les adolescents. Cependant, les infections invasives telles que les endocardites et les bactériémies, chez les patients âgés ou immunodéprimés, sont caractéristiques des infections acquises à l'hôpital. Les risques de transmission augmentent à l'occasion d'un acte chirurgical ou avec l'utilisation de matériel médical tels que les cathéters ou les prothèses (Boucher and Corey, 2008; David and Daum, 2010; P R and M, 2013).

## 2.3 Symptômes cliniques

### 2.3.1 L'impétigo

L'impétigo est une infection de l'épiderme fréquemment retrouvée chez les enfants. Elle est souvent localisée autour de la bouche, des narines ou des extrémités, et se manifeste sous une forme bulleuse ou non bulleuse. Sous sa forme non bulleuse, de petites vésicules et pustules associées à un érythème cutané sont présentes, donnant lieu à des croûtes jaunes après l'éclosion des pustules. Sous sa forme bulleuse, l'impétigo se présente sous la forme de bulles remplies de sécrétions jaunâtres donnant lieu à de grandes lésions cutanées lors de leur rupture. L'impétiginisation correspond à une infection secondaire par *S. aureus* de plaies chroniques ou de dermatoses préexistantes (due à l'eczéma, à la varicelle, etc.). Elle conduit à l'apparition de lésions caractéristiques de l'impétigo (Bangert et al., 2012; Tong et al., 2015; Giudice, 2020).

### 2.3.2 La cellulite

La cellulite survient suite à l'entrée de micro-organismes pathogènes dans les couches profondes de la peau, conduisant à une infection aiguë du derme ou du tissu sous-cutané. Elle



présente les caractéristiques habituelles de l'inflammation, à savoir douleur, chaleur, rougeur et gonflement, mais peut aussi devenir purulente, avec le développement de pustules et d'abcès. D'autres infections cutanées peuvent également être désignées par le terme « cellulite », avec par exemple l'érysipèle, une infection superficielle du derme caractérisée par une zone rouge vif et bien délimitée de la peau ; ou encore la fasciite nécrosante, une infection grave du tissu sous-cutané associée à de l'œdème, de la nécrose, des douleurs intenses et de la fièvre. Ce type d'infection présente un taux de mortalité élevé (Raff and Kroshinsky, 2016).

### 2.3.3 La folliculite

La folliculite est une infection superficielle du follicule pilo-sébacé caractérisée par la présence de pustules centrées autour d'un poil, et associée à un érythème. Le furoncle correspond à la forme profonde et nécrosante d'une folliculite, conduisant à la formation d'un abcès. Cette infection disparaît généralement sans séquelle, mais peut devenir chronique chez certains patients, avec le développement de furoncles sur différentes parties du corps pendant plusieurs mois ou plusieurs années (Demos et al., 2012; Giudice, 2020).

### 2.3.4 L'abcès cutané

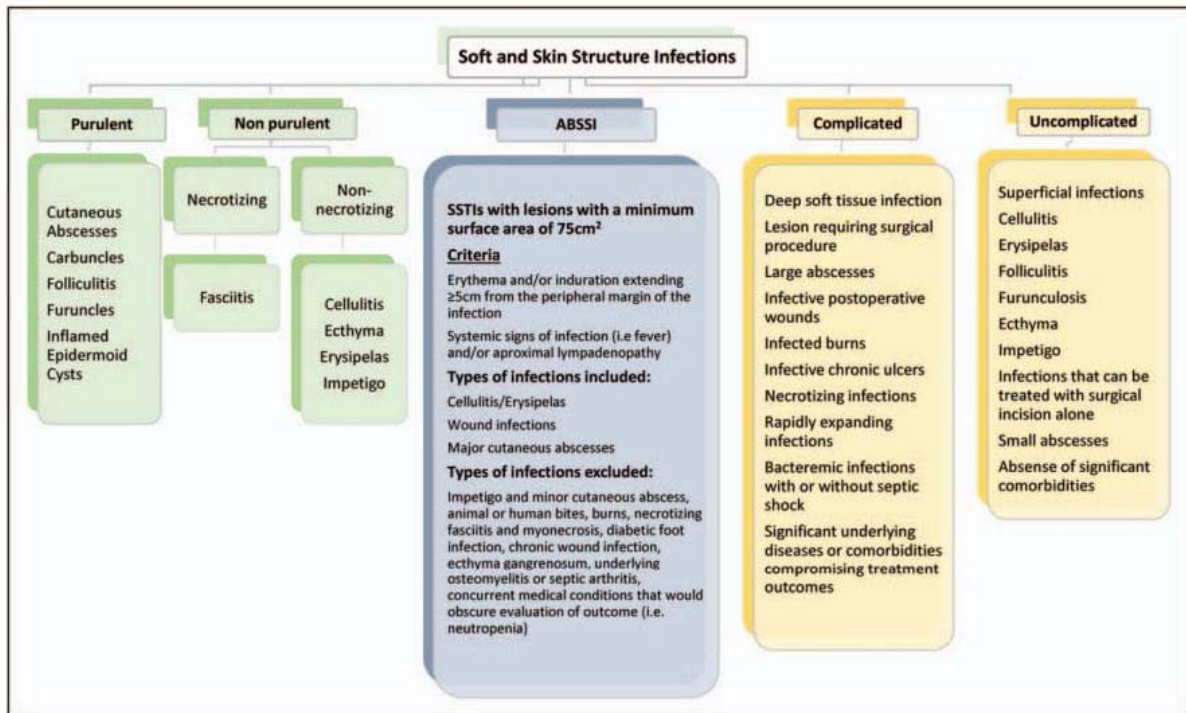
La formation d'un abcès cutané est généralement associée à la présence de *S. aureus*. Il s'agit d'une collection de pus formé à partir d'un placard érythémateux inflammatoire douloureux. Il peut être accompagné des atteintes cutanées citées précédemment (Giudice, 2020).

### 2.3.5 Les manifestations dermatologiques dues à une infection systémique

Une infection cutanée locale à *S. aureus* peut également entraîner l'apparition de symptômes cutanés à distance. Par exemple, le syndrome du choc toxique, dû à la production de différentes toxines staphylococciques, est non seulement caractérisé par de la fièvre et de l'hypotension, mais aussi par une desquamation touchant la paume, les doigts des mains et la sole des pieds. Le syndrome de la peau ébouillantée est également dû à une production de toxines par *S. aureus*. Cette maladie touche principalement les nouveau-nés et les jeunes enfants, et se manifeste sous la forme d'ulcérations croûteuses et écarlates associées à un décollement de la peau (Giudice, 2020).

## 2.4 Traitements

Plusieurs schémas de classification des infections cutanées sont proposés, basés sur le taux de progression, la profondeur de l'atteinte cutanée et également sa sévérité sur le plan clinique, ce afin de faciliter la prise en charge du patient et l'attribution d'une thérapie adaptée



**Figure 1 : Schémas de classification des infections dites « cutanées » à *Staphylococcus aureus* : infections de la peau et des tissus mous (Poulakou et al., 2019).** La société américaine des maladies infectieuses propose une classification selon l'état purulent ou non des lésions (en vert) afin de simplifier le diagnostic et faciliter la prise en charge des infections cutanées. L'agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux ont créé l'abréviation ABSSI (*Acute Bacterial Skin and Skin Structure Infections*) (en bleu) qui permet de caractériser une infection selon la superficie des lésions. Cette abréviation est utilisée comme référence dans les essais cliniques de nouveaux médicaments pour traiter les infections cutanées. Enfin, Esposito *et al.* classifient les infections cutanées selon la nécessité ou pas d'une prise en charge en milieu hospitalier et/ou une intervention chirurgicale (en orange).

(Figure 1). La société américaine des maladies infectieuses propose une classification selon l'état purulent ou non des lésions. Dans ce cas, les glycopeptides comme la vancomycine, la télavancine ou linézolide (famille des oxazolidinones), la daptomycine (famille des lipopeptides), ou les céphalosporines de cinquième génération comme la ceftaroline sont recommandés pour les patients hospitalisés pour une infection cutanée purulente sévère. A l'opposé, les  $\beta$ -lactamines sont recommandées pour les infections non-purulentes, mais la vancomycine pourrait être adaptée dans certains cas d'infections sévères comme la fasciite nécrosante. Une classification selon la profondeur de l'atteinte cutanée est également proposée, permettant ainsi de déterminer la nécessité d'une prise en charge en milieu hospitalier et/ou une intervention chirurgicale. En effet, les infections cutanées dites « non-complicées » correspondent à des infections superficielles, alors que les infections dites « compliquées » impliquent les tissus mous plus profonds, nécessitent une chirurgie de grande ampleur, avec des traitements qui rejoignent ceux des infections purulentes sévères. De manière générale, les infections dites « non-complicées » ne nécessitent ni hospitalisation, ni antibiothérapie, mais un drainage des abcès peut s'avérer être nécessaire. Dans le cas d'un impétigo, le recours à des antibiotiques locaux tels que l'acide fusidique ou la mupirocine est recommandé (Tong et al., 2015; Poulakou et al., 2019). Cependant, selon l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé, une antibiothérapie par voie générale à visée anti-staphylococcique et anti-streptococcique serait nécessaire pour les formes plus graves de l'impétigo tels que l'impétigo bulleux, ou lorsque plus de 2% de la surface cutanée est atteinte (Jean-Marie et al., 2004).

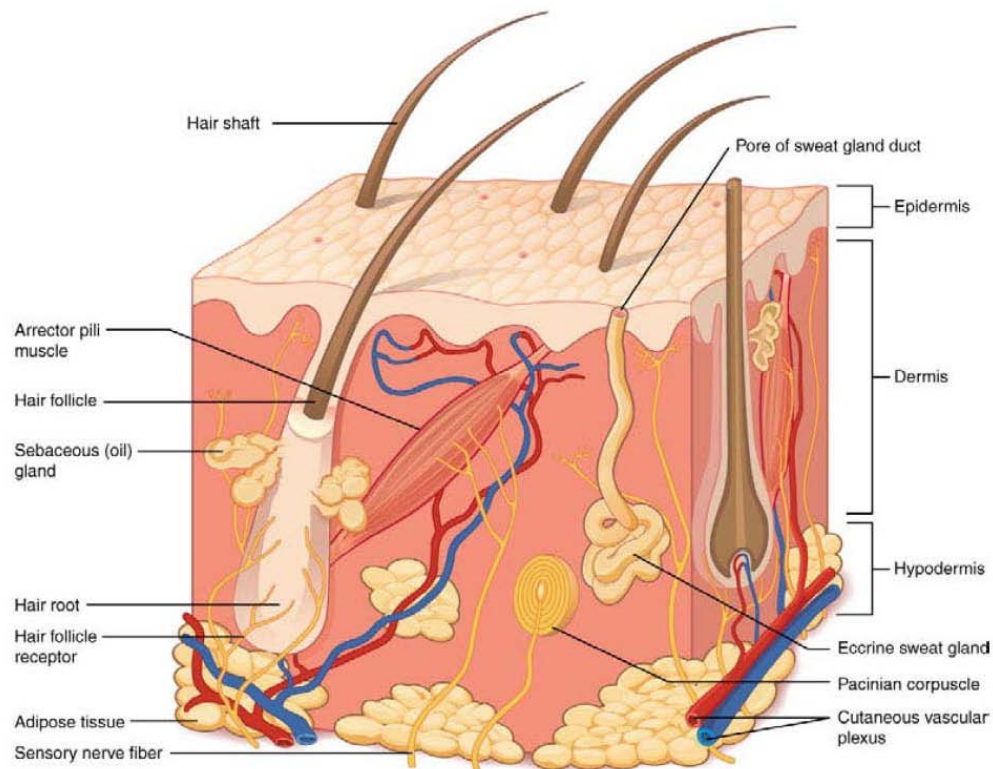
## II. Physiopathologie des infections cutanées à *Staphylococcus aureus*

### 1. Physiologie de la peau

#### 1.1 Anatomie

La peau est constituée de plusieurs couches de cellules et de tissus, qui sont reliées aux structures sous-jacentes par le tissu conjonctif (Figure 2). D'une épaisseur de 1,5mm de moyenne, elle contient de l'eau, des protéines, des matières grasses et des minéraux. Ses propriétés sont multiples car elle assure entre autres :

- la protection du corps contre des agressions physiques, chimiques et biologiques de l'environnement
- la thermorégulation du corps en conservant ou en évacuant la chaleur
- la perception de l'environnement par le toucher
- la défense contre des agents pathogènes de par sa fonction « immunitaire ».



**Figure 2 : Anatomie de la peau (Anatomy and Physiology - OpenStax).** La peau est constituée de trois couches principales : l'épiderme, composé de plusieurs couches de kératinocytes très denses ; le derme, composé de tissu conjonctif et qui héberge les annexes de la peau (glandes sébacées et sudoripares, follicules pileux, fibres nerveuses sensorielles ; l'hypoderme, qui est majoritairement composé de tissu adipeux et de tissu conjonctif.

La peau est structurée en trois couches successives du plan le plus profond vers le plus superficiel : l'hypoderme, le derme et l'épiderme.

#### 1.1.1 L'hypoderme

L'hypoderme (également appelé couche sous-cutanée) est la couche la plus profonde de la peau, située directement sous le derme (Figure 2). C'est un tissu conjonctif richement vascularisé qui contient beaucoup de tissu adipeux. Ce dernier est lui-même constitué de cellules appelées adipocytes qui sont spécialisées dans le stockage des lipides et qui vont permettre à cette couche de constituer une réserve de graisse et d'énergie pour l'organisme. Cette couche cutanée contribue à la fois à l'isolation thermique du corps et à sa protection contre des forces mécaniques grâce à ses propriétés élastiques (Arda et al., 2014; Uy Gonzales and Fuchs, 2017).

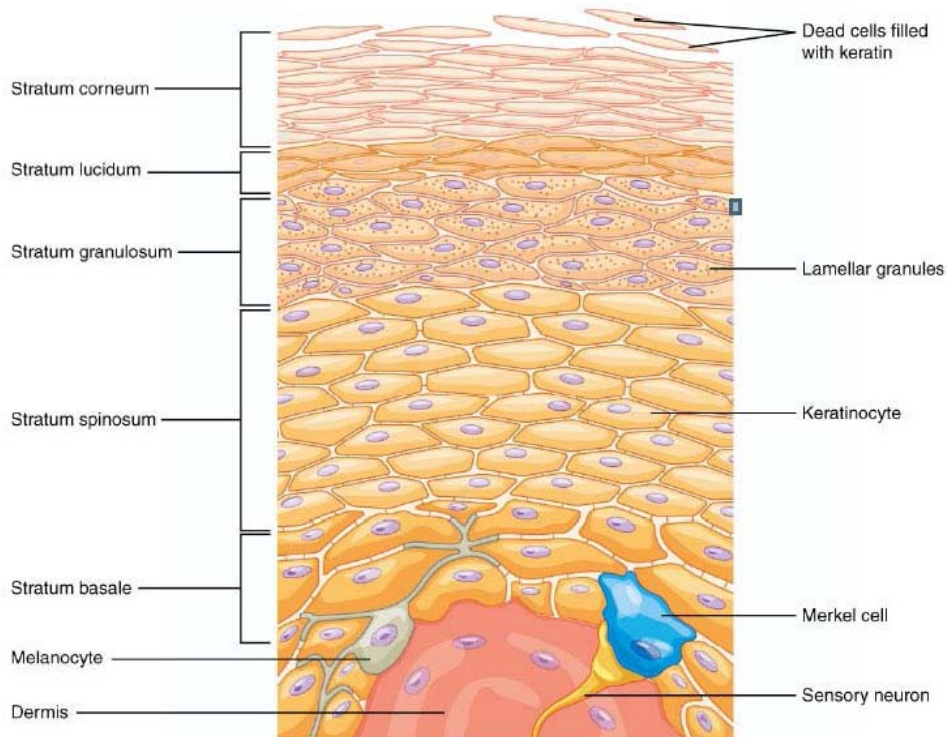
#### 1.1.2 Le derme

Le derme est la couche intermédiaire entre l'hypoderme et l'épiderme (Figure 2). Le derme est constitué de deux couches de tissu conjonctif composées de fibres d'élastine et de collagène produits par les fibroblastes : le derme papillaire (superficiel) et le derme réticulaire (profond). Distribué dans ces couches, on retrouve des cellules du système immunitaire telles que des  $M\Phi$ , des cellules dendritiques du derme (dDC), des mastocytes et des lymphocytes. La riche vascularisation de cette couche supporte plusieurs fonctions. Elle permet à la première ligne de défense de l'organisme de répondre efficacement à tout signal de danger. L'épiderme dépourvu de capillaires y puise l'énergie et les nutriments nécessaires pour assurer son activité cellulaire. Enfin, le derme participe de façon importante à la thermorégulation à côté des glandes sudoripares (Arda et al., 2014; Uy Gonzales and Fuchs, 2017).

##### 1.1.2.1 Le derme papillaire

La couche papillaire est constituée de tissu conjonctif lâche fait de fibres de collagène et d'élastine formant un maillage lâche. Cette couche superficielle du derme se projette dans la couche basale de l'épiderme pour former des petites protubérances appelées papilles dermiques. Dans la couche papillaire se trouvent des fibroblastes, un petit nombre d'adipocytes et une abondance de petits vaisseaux sanguins. Cette couche contient également des capillaires lymphatiques, des fibres nerveuses et des récepteurs tactiles appelés corpuscules de Meissner. Enfin, le collagène présent est capable de retenir l'eau, jouant un rôle dans l'hydratation de la peau (Arda et al., 2014; Uy Gonzales and Fuchs, 2017).





**Figure 3 : Les différentes couches de l'épiderme (Anatomy and Physiology - OpenStax).**

L'épiderme est constitué de cinq couches majoritairement composées de cellules épithéliales. Elles se distinguent les unes des autres par la morphologie des cellules présentes dans les différentes couches, ainsi que par leur état de différenciation et leur activité métabolique. Dans la couche basale, deux autres types cellulaires se trouvent dispersés parmi les cellules souches. Le premier type est la cellule de Merkel, qui fonctionne comme un récepteur, et qui est responsable de la stimulation des nerfs sensoriels permettant au cerveau de percevoir le toucher. Ensuite, les mélanocytes sont des cellules productrices de mélanine. Ce pigment donne sa couleur aux cheveux et à la peau et aide également à protéger les cellules de l'épiderme des dommages causés par les rayons ultraviolets.

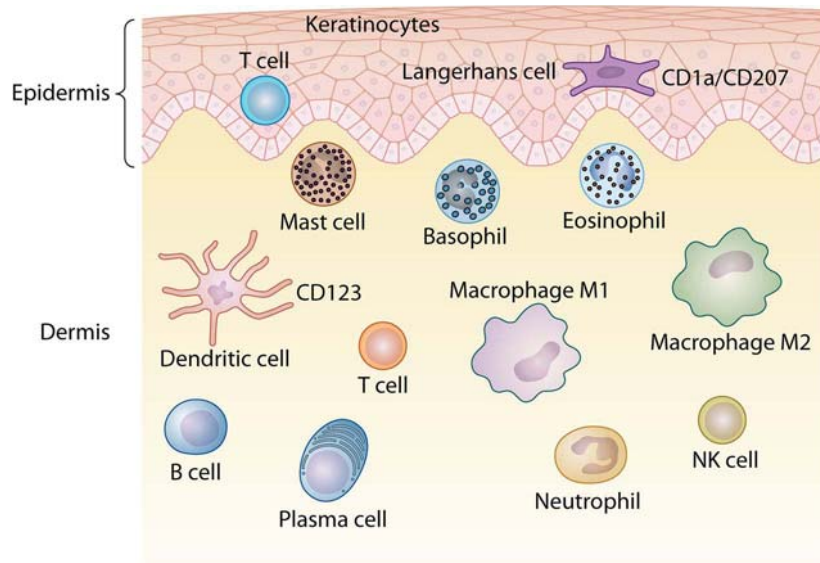
### 1.1.2.2 Le derme réticulaire

Sous-jacente à la couche papillaire se trouve la couche réticulaire qui est beaucoup plus épaisse, et composée de tissu conjonctif dense et irrégulier. Cette couche est bien vascularisée et possède de nombreuses terminaisons nerveuses sensorielles. La couche réticulaire apparaît sous la forme d'un filet grâce à un maillage serré de fibres d'élastine et de collagène entrelacées. Ces fibres d'élastine fournissent une certaine élasticité à la peau, permettant le mouvement, alors que les fibres de collagène fournissent la structure et la résistance à la traction, avec des brins de collagène s'étendant à la fois dans la couche papillaire et l'hypoderme (Arda et al., 2014; Uy Gonzales and Fuchs, 2017).

### 1.1.3 L'épiderme

L'épiderme correspond à la structure la plus externe de la peau (Figure 3). Il est non vascularisé et se compose de cinq couches de cellules épithéliales (Arda et al., 2014; Uy Gonzales and Fuchs, 2017). De la plus profonde à la plus superficielle, ces couches sont :

- la couche basale (*stratum basale*) : la couche épidermique la plus profonde ; elle attache l'épiderme à la lame basale, en dessous de laquelle se trouvent les couches du derme. La lame basale est une monocouche de cellules composées de cellules souches permettant la régénération de la peau grâce à de nombreuses divisions cellulaires (la quasi-totalité des cellules sont en mitose). Au fur et à mesure des divisions, les cellules produites vont migrer en direction de la couche la plus externe de l'épiderme. La majeure partie de cette couche est composée de kératinocytes qui sont reliés entre eux *via* des desmosomes. Les cellules de la lame basale se lient au derme par des fibres de collagène pour former la membrane basale. La présence des papilles dermiques augmente la force de la connexion entre l'épiderme et le derme.
- la couche épineuse (*stratum spinosum* ou couche de Malpighi) : la couche la plus épaisse de l'épiderme ; elle est composée de 8 à 10 couches de kératinocytes qui sont plus volumineux et plus étirés horizontalement. Intercalées parmi les kératinocytes de cette couche se trouvent les cellules de Langerhans (LC), un type de cellule dendritique capable de détecter la présence de bactéries, de particules étrangères, et de cellules endommagées.
- la couche granuleuse (*stratum granulosum*) : cette couche présente un aspect granuleux en raison des modifications que subissent les kératinocytes lorsqu'ils sont poussés hors de la couche épineuse. En effet, les kératinocytes s'aplatissent, leurs membranes cellulaires s'épaississent et génèrent de grandes quantités de kératine



**Figure 4 : La distribution des cellules immunitaires dans la peau (Quaresma, 2019).** A l'état basal, la peau est colonisée par de nombreuses cellules myéloïdes et lymphoïdes. Elles interagissent avec les autres cellules de la peau afin de maintenir l'homéostasie tissulaire, et agissent comme des sentinelles en détectant de manière permanente les antigènes environnementaux. Certaines de ces cellules migrent vers les ganglions lymphatiques pour induire une tolérance périphérique aux antigènes tissulaires, ou pour initier une réponse immunitaire.

fibreuse, et de kératohyaline qui s'accumulent sous forme de granules lamellaires dans les cellules. Les noyaux et les autres organites cellulaires se dégradent lors de la mort cellulaire, laissant la kératine, la kératohyaline et les membranes cellulaires qui formeront la couche claire et la couche cornée.

- la couche claire (*stratum lucidum*) : il s'agit d'une couche lisse d'aspect translucide. Les kératinocytes qui composent cette couche sont anucléés et aplatis. La transformation des grains de kératohyaline en filaggrine donne à ces cellules leur transparence et constitue une barrière pour l'eau.
- la couche cornée (*stratum corneum*) : le remplacement des organites des cellules épithéliales par des filaments denses de kératine (phénomène de kératinisation/cornification) conduit à la formation d'une couche composée de cellules « mortes » et aplaties appelées cornéocytes. Elles sont dites « mortes » mais demeurent biologiquement actives. Elles sont reliées entre elles par un ciment interlipidique formé d'acide gras, de cholestérol et de céramides, ainsi que par des cornéodesmosomes. Ces cellules étroitement juxtaposées et jointives empêchent la pénétration des microbes, aident à la déshydratation des tissus sous-jacents, et offrent une protection mécanique contre l'abrasion cutanée.

#### 1.1.4 Les annexes de la peau

Les annexes de la peau sont les poils, les glandes sébacées et les glandes sudoripares (Figure 2). Les poils sont ancrés au niveau des follicules pileux du derme et couvrent presque intégralement le corps humain. Ils jouent un rôle très important dans la thermorégulation. La glande sébacée adjacente au poil est une glande intradermique. Elle synthétise le sébum, un constituant majeur du film hydrolipidique. Ce film protège la peau et évite son dessèchement. La glande sudoripare sécrète la sueur et permet ainsi à l'organisme de lutter contre l'hyperthermie. En effet, lorsque la température du corps s'élève, comme lors d'une activité physique ou au cours d'une maladie infectieuse, la sueur émise s'évapore à la surface de la peau et contribue, avec la vasodilatation, au refroidissement du corps (Arda et al., 2014).

### 1.2 Les cellules de la peau saine

La peau est un organe composé de plusieurs types cellulaires qui participent aux réponses immunitaires innées et adaptatives. Le système immunitaire de la peau comprend à la fois des cellules cutanées et des cellules immunitaires professionnelles qui, ensemble, constituent le SALT (*Skin-Associated Lymphoid Tissue*) (Figure 4). En effet, en plus des cellules immunitaires elles-mêmes, certaines cellules de la peau, telles que les kératinocytes et les

Cell	Function(s)	Location(s)	Marker(s)	Activation	Cytokine(s) produced	Expressed molecules/factors
Keratinocyte	Mechanical barrier, keratin production, immune function	Epidermis	CLSP, AE1, AE3	IFN- $\gamma$	IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-19, IL-20, TGF- $\beta$ , IL-20, IL-23, GM-CSF, G-CSF	TLR, MHC-I, MHC-II, defensins, cathelicidins
Langerhans cell	Antigen-presenting cell, migration and recruitment to the secondary lymphoid organs, and antigenic presentation to T lymphocytes	Epidermis	CD1a, CD207	Infectious and noninfectious antigens	IL-12, IL-23, IL-6, TNF	Fc and mannose receptors, B7, ICAM-1, IL-12, MHC-II
Dermal dendrocyte	Antigen-presenting cell, phagocytosis, regulation of collagen synthesis, and homeostasis of the dermis	Dermis	FXIIIa	Infectious and noninfectious antigens	IL-12, IL-23, IL-6, TNF	Fc and mannose receptors, B7, ICAM-1, IL-12, MHC-II
Plasmacytoid dendritic cell	Antigen-presenting cell	Dermis	CD123, BDCA-2/CD303	IL-3, CD40, virus, bacterium, CpG oligonucleotides	IL-12	TLR7, TLR9
Inflammatory dendritic cell	Antigen-presenting cell	Epidermis, dermis	CD206	Microbial and endogenous antigens	IL-12	MHC-II, CD11c, BDCA1, CD40, CD80/86
T CD4 Th1 cell	T helper lymphocyte; coordinates immune function	Mainly in the dermis and rare in the epidermis	CD3, CD4	IL-12	IFN- $\gamma$	T-Bet, STAT1, STAT4
T CD4 Th2 cell	T helper lymphocyte; coordinates immune function	Dermis; rare in epidermis	CD3, CD4	IL-4	IL-4, IL-5, IL-13	GATA 3, STAT6
T CD4 Th3 cell	T helper lymphocyte; coordinates immune function	Dermis	CD3, CD4	IL-4, IL-10, TGF- $\beta$	IL-4, IL-10, TGF- $\beta$	—
T CD4 Th17 cell	T helper lymphocyte; coordinates immune function	Dermis	CD3, CD4	IL-6, IL-1, IL-23	IL-17, IL-22	RORY, STAT3
T CD4 Th22 cell	T helper lymphocyte; coordinates immune function	Dermis	CD3, CD4	TNF- $\alpha$ , IL-6	IL-22, FGF- $\beta$ , IL-13, TNF- $\alpha$	—
T CD4 Th9 cell	T helper lymphocyte; coordinates immune function	Dermis	CD3, CD4	IL-4, TGF- $\beta$	IL-9, IL-10, IL-21	STAT6, IRF4, PU.1
T CD4 Th25 cell	T helper lymphocyte; coordinates immune function	Dermis	CD3, CD4	IL-25, Act1	IL-4, IL-13, IL-25, Act1	—
Treg cell	Control of the immune response	Dermis	FoxP3	IL-2, TGF- $\beta$	IL-10, TGF- $\beta$	FoxP3, STAT5
T CD8	Elimination of intracellular microorganisms and infected cells	Dermis, epidermis	CD3, CD8	IL-2, IL-12, IFN I	IFN- $\gamma$	Perforin, granzyme
T $\gamma\delta$ cell	Elimination of intracellular microorganisms and infected cells; cell death	Dermis	TCY $\delta$	IL-2, IL-12	IL-17, IFN- $\gamma$	MHC-I
NKT cell	Elimination of lipid antigens	Dermis	CD56, CD16	IL-12, IL-18	IL-4, IL-17, IFN- $\gamma$	MHC-I
NK cell	Innate immunity against viruses and intracellular bacteria	Dermis	CD57	IL-12, IL-15	IFN- $\gamma$	MHC-I
ILC	Innate immunity	Dermis	CD127	IL-12, IL-18, IL-23, IL-25, IL-33, TGF- $\beta$	IL-1, IL-23, IL-25, IL-33, TSLP	Id2, T-bet, GATA 3, RORY
B cell	Humoral immune response	Dermis	CD19, CD20	IL-2, IL-4, IL-6, IL-11, IL-13, TNF- $\alpha$ , BAFF	Antibodies	TLR5, TLR7, TLR9, B7, MHC, CD40
Plasma	Synthesis and release of antibodies	Dermis	CD138	IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , BAFF	Antibodies	IRF4, AP-1, PU.1
Breg cell	Control of the immune response	Dermis	CD5, CD21, CD24	IL-2, IL-4, IL-5	IL-10, TGF- $\beta$	TLR4
M1 macrophage	Phagocytosis, antigen presentation, bactericidal action	Dermis	CD68, CD80	IFN- $\gamma$	IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , iNOS	JAK1, JAK2, STAT1, STAT2
M2 macrophage	Phagocytosis, antigen presentation, regenerative effects	Dermis	CD163, arginase-1, CD86, MHC-II, VEGF	IL-4, IL-13	IL-10, TGF- $\beta$ , arginase-1	JAK1, JAK2, JAK3, STAT6
Mast cell	Hypersensitivity reaction, vasodilation, chemotaxis, inflammation	Dermis around the vessels	CD117/C-kit	IL-3, IL-5, IL-13	TNF, IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, CCL3, CCL4, IL-3, GM-CSF	TLRs, NF- $\kappa$ B, NFAT, AP-1
Basophil	Hypersensitivity reaction, vasodilation, chemotaxis, inflammation	Dermis	BB1, 2D7, J175-7D4	IL-3, IL-5, GM-CSF, histamine releasing factor	IL-4, IL-13	TLR2, TLR4
Eosinophil	Hypersensitivity reaction, vasodilation, chemotaxis, inflammation, IgE production	Dermis	CD9, CD23, CD32, IL-13	IL-5, IL-13, GM-CSF	IL-3, IL-5, IL-8, IL-10, leukotrienes, GM-CSF, hydrolases	Fc receptor
Neutrophil	Innate immunity, phagocytosis	Dermis, epidermis	CD11c+, CD13+, CD15+, CD16+, CD33+, CD63+, CD62L+, CD66+	C3, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF	ROS, proteolytic enzymes	TLRs, lectin receptor, mannose receptor
Endothelial cell	Inflammation, immune response, infections	Dermis	CD31, ICAM-1/CD54, Tie-2/Tek, VCAM-1/CD106, VE cadherin	IL-1, IL-6, TNF	TNF, IL-1, IL-6, IL-8, IL-15, IL-17, IL-18, G-CSF, GM-CSF, VEGF	TLR2, TLR4, NF $\kappa$ B, JAK/STAT
Fibroblast	Inflammation, immune response, infections	Dermis	TE-7, vimentin, FSP-1 (S100A4), anti-SFA	IL-1, TNF- $\alpha$	PGE $_2$ , GM-CSF, IL-8, MIP-2, PDGF, TGF- $\beta$ , FGF- $\beta$	

**Tableau 1 : Tableau récapitulatif des différents composants du SALT, leurs fonctions, leurs localisations, leurs marqueurs spécifiques, leurs facteurs d'activation, les cytokines libérées et les molécules/facteurs exprimés (Quaresma, 2019).**

mélanocytes, peuvent également influencer les réponses immunitaires locales en libérant des cytokines, des chimiokines et des peptides antimicrobiens (AMP). Le Tableau 1 résume les différents composants cellulaires ainsi que leurs fonctions dans le système immunitaire cutané (Nguyen and Soulika, 2019; Quaresma, 2019).

#### 1.2.1 Les kératinocytes

Les kératinocytes, cellules majoritaires de la peau, sont présentes dans toutes les couches de l'épiderme. Elles synthétisent la kératine, une protéine insoluble responsable de l'imperméabilité de la peau et participent à la différenciation d'autres cellules immunitaires résidentes de la peau telles que les LC et les DETC (*Dendritic Epidermal T Cell*) via la sécrétion des interleukines (IL)-34 et IL-7 respectivement (Takashima et al., 1995; Wang et al., 2012). Ils participent également au maintien de l'homéostasie et à la réparation tissulaire en produisant des facteurs cruciaux tels que l'IL-33 en réponse au stress hypo-osmotique ainsi que de l'IL-6 et de l'IL-1 $\beta$  en réponse à une exposition aux ultraviolets (UV) (Tang et al., 2017; Pietka et al., 2019).

#### 1.2.2 Les mélanocytes

Les mélanocytes représentent 2 à 4 % de la population épidermique et sont distribués au niveau de la couche basale de l'épiderme et des follicules pileux. Leur fonction est de synthétiser des pigments mélaniques qui confèrent à la peau sa pigmentation et aux kératinocytes une fonction de protection contre les dommages causés à l'ADN par les rayons UV (Quaresma, 2019).

#### 1.2.3 Les fibroblastes

Les fibroblastes sont localisés dans le derme. Ils interviennent dans la production des fibres de collagène et d'élastine dans la peau et participent au renouvellement de la matrice extracellulaire. Le collagène est une protéine fibreuse qui résiste à la traction. Cette protéine joue un rôle clé dans le processus de cicatrisation et confère à la peau ses propriétés d'hydratation et de souplesse. *A contrario*, l'élastine confère à la peau son élasticité et lui permet de revenir en place après un étirement. Enfin, les fibroblastes synthétisent l'acide hyaluronique, un composant majeur de la matrice extracellulaire. Ce glycosaminoglycane présente un aspect gélatineux en présence d'eau en raison de sa forte hygroscopie (Bautista-Hernández et al., 2017; Nguyen and Soulika, 2019).



## 1.2.4 Les cellules myéloïdes

### 1.2.4.1 Les cellules de Langerhans

Les LC représentent le seul type de cellules myéloïdes de l'épiderme. Phénotypiquement, elles sont caractérisées par l'expression à leur surface du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMHII), du CD1a et d'une lectine de type C connue sous le nom de Langerine (CD207). Dans leur cytoplasme, on note la présence de granules de Birbeck. A l'état basal, les LC sont ancrées dans l'épiderme par des interactions avec les kératinocytes. Elles détectent en permanence des signaux provenant de l'environnement extérieur en émettant des projections. Ces cellules maintiennent un état de tolérance vis-à-vis des bactéries commensales de la peau et migrent continuellement vers les ganglions lymphatiques drainants (dLN) pour initier des réponses immunitaires adaptatives spécifiques (Deckers et al., 2018; Nguyen and Soulika, 2019).

### 1.2.4.2 Les cellules dendritiques du derme

Les dDC sont localisées dans le derme et expriment à leur surface les marqueurs CD207 et CX3CR1. Il existe deux sous-populations de dDC : les cellules dendritiques conventionnelles de type 1 (cDC1) et les cellules dendritiques conventionnelles de type 2 (cDC2). En plus des marqueurs cités précédemment, les cDC1 murines expriment le récepteur de chimiokines CXCR1, ainsi que CD103, mais n'expriment pas le marqueur myéloïde CD11b, contrairement aux cDC2. Ces dernières sont plus nombreuses dans la peau murine et expriment également CD301b (ou MGL2), ainsi que des niveaux plus élevés de CX3CR1 par rapport aux cDC1 (Nguyen and Soulika, 2019; Tsepkenko et al., 2019). Les dDC sont également impliquées dans le maintien de la tolérance entre l'hôte et les bactéries commensales résidentes de la peau. Enfin, il a été démontré que les cDC2 peuvent détecter des antigènes présents au niveau des follicule pileux pour activer des lymphocytes T régulateurs (T reg) (Tordesillas et al., 2018).

### 1.2.4.3 Les mastocytes

Les mastocytes constituent l'une des populations cellulaires les plus abondantes de la peau. Ils se retrouvent dans le derme et expriment les marqueurs de surface CD63 et CD203, deux marqueurs également présents chez les polynucléaires basophiles. Les mastocytes contiennent des granules remplis de médiateurs préformés tels que la sérotonine, la prostaglandine D2 (PGD2), et les leucotriènes. Ces granules peuvent contenir des cytokines telles que le facteur de nécrose tumorale (TNF) $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-8 et des facteurs de croissance comme le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). Ils sont classiquement connus pour leur implication dans les réactions allergiques car ils libèrent de grandes quantités d'histamine





lors de leur activation mais jouent également un rôle dans la prolifération des fibroblastes et dans l'angiogenèse. Ainsi, ils contribuent indirectement au remodelage de la matrice extracellulaire et la réparation tissulaire (Nguyen and Soulika, 2019; Quaresma, 2019).

#### 1.2.4.4 Les macrophages

Les M $\Phi$  résidents du derme contribuent à l'homéostasie tissulaire en éliminant les débris cellulaires et en réprimant la réponse inflammatoire *via* la synthèse d'IL-10 (Nguyen and Soulika, 2019). Ils ont deux origines distinctes. Ceux qui colonisent la peau avant la naissance et qui se renouvellent à partir d'un progéniteur local constitue la population de M $\Phi$  résidents de la peau. Phénotypiquement, ils sont caractérisés par une expression élevée des marqueurs CD64, F4/80, CD36, CD6, CD169 et CD115. La contribution des M $\Phi$  à la cicatrisation des plaies a été bien étudiée. En effet, celle-ci est significativement retardée chez des souris déplétées en M $\Phi$  (Fang et al., 2007; Mirza et al., 2009). Il a été montré que les M $\Phi$  contribuent à la cicatrisation en produisant du VEGF qui favorise l'angiogenèse et la prolifération des fibroblastes, et en sécrétant du TGF $\beta$  (*Transforming Growth Factor  $\beta$* ) qui mène à une réparation tissulaire accélérée (Das et al., 2015; Shook et al., 2016).

#### 1.2.4.1 Les polynucléaires éosinophiles

Les polynucléaires éosinophiles (PE) sont des cellules résidentes du derme contenant des granules chargés d'enzymes impliquées dans la réponse immunitaire au cours des infections parasitaires. Ces granules contiennent également une variété de cytokines et de chimiokines préformées qui seront libérées suite à leur activation par la cytokine IL-5, ou suite à leur liaison au fragment Fc des Immunoglobulines (Ig)E. Tout comme les mastocytes, ils produisent du PGD2 et des leucotriènes, mais leur implication dans le maintien de l'homéostasie n'est pas clairement élucidé (Nguyen and Soulika, 2019; Quaresma, 2019).

#### 1.2.4.2 Les polynucléaires neutrophiles

Les PNN se trouve en faible quantité dans une peau saine, et ne sont pas considérés comme des cellules résidentes de la peau. Ils sont recrutés par diapédèse depuis la circulation sanguine vers le site d'infection où ils participent à la reconnaissance, à la phagocytose et à l'élimination de l'agent pathogène (cf paragraphe III.2.3.2 Les cellules myéloïdes). Lors d'une blessure du tissu cutané, ils contribuent à la réparation tissulaire en promouvant entre autres la prolifération des kératinocytes et des fibroblastes ainsi que l'angiogenèse (Theilgaard-Mönch et al., 2004; Nguyen and Soulika, 2019).



## 1.2.5 Les cellules lymphoïdes

### 1.2.5.1 Les Lymphocytes T $\alpha\beta$

Les lymphocytes T  $\alpha\beta$  résident en permanence dans le tissu cutané mais peuvent également se retrouver dans d'autres organes tels que les poumons ou tout le long du tractus gastro-intestinal. Chez la souris comme chez l'homme, ces lymphocytes se retrouvent dans l'épiderme et dans le derme. Ce sont des lymphocytes T mémoire qui possèdent une plus longue durée de vie que les lymphocytes T circulants classiques. Ils sont dérivés de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> effecteurs ou CD8<sup>+</sup> cytotoxiques, auparavant infiltrés dans le tissu lors d'une infection. Après résolution de l'infection, ces cellules colonisent toute l'épaisseur de la peau mais sont plus nombreuses dans la zone d'infection initiale. La majorité des lymphocytes T  $\alpha\beta$  mémoire expriment le marqueur CD4, mais leur fonctions sont moins connues en comparaison de celles des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Ces derniers sont notamment impliqués dans les infections par le virus de l'Herpes, et ont également des propriétés anti-tumorales (Nguyen and Soulika, 2019).

### 1.2.5.2 Les Lymphocytes T $\gamma\delta$

Du fait de leur capacité à émettre des projections cytoplasmiques et de leur localisation entre les kératinocytes de l'épiderme, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont également connus sous le nom de DETC. Ces cellules sont immobiles et sont capables de détecter des antigènes solubles, des antigènes dérivés de cellules endommagées ou encore des antigènes non peptidiques, tels que des petites molécules phosphorylées ou des lipides, indépendamment de la présence des molécules du CMH (Nguyen and Soulika, 2019). Une autre population de lymphocytes T  $\gamma\delta$  est présente dans le derme, et se distingue des DETC par l'expression du récepteur V $\gamma$ 4<sup>+</sup> et par leur caractère mobile (O'Brien and Born, 2015). Classiquement, ces lymphocytes ont été considérés comme distincts des lymphocytes T  $\alpha\beta$ , mais une étude récente a montré la co-expression des récepteurs  $\alpha\beta$  et  $\gamma\delta$  dans une sous-population de lymphocytes T qui contribue à la protection contre *S. aureus* dans un modèle *in vivo* d'infection péritonéale (Edwards et al., 2020).

### 1.2.5.3 Les cellules lymphoïdes innées

Les cellules lymphoïdes innées (ILC) sont des cellules résidentes de plusieurs tissus, notamment au niveau de l'intestin et du derme de la peau. Elles jouent un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire *via* la sécrétion de cytokines. Bien que les ILC semblent avoir des fonctions comparables aux lymphocytes T effecteurs CD4<sup>+</sup>, elles se distinguent par leur capacité à répondre à des signaux « innés » tels que les cytokines, en dehors de toute spécificité antigénique. Les ILC sont actuellement classées en 3 sous-populations distinctes sur la base de



leur profil d'expression de facteurs de transcription et de cytokines (Kim, 2015; Kobayashi et al., 2020) :

- les ILC du groupe 1 (ILC1) produisent l'interféron (IFN) $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  et expriment le facteur de transcription T-bet et les récepteurs NK1.1 et CD335. Les cellules NK (*Natural Killer*) sont considérées comme des ILC1 sur la base de propriétés phénotypiques et fonctionnelles similaires.
- les ILC du groupe 2 (ILC2) produisent l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 et expriment le facteur de transcription GATA3 et le récepteur ST2
- les ILC du groupe 3 (ILC3) produisent de l'IL-17A et de l'IL-22 et expriment le facteur de transcription ROR $\gamma$ t et le récepteur IL-23R. Les LTi (*Lymphoid Tissue Inducer*) font également partie de ce groupe mais sont impliquées dans le développement des tissus lymphoïdes.

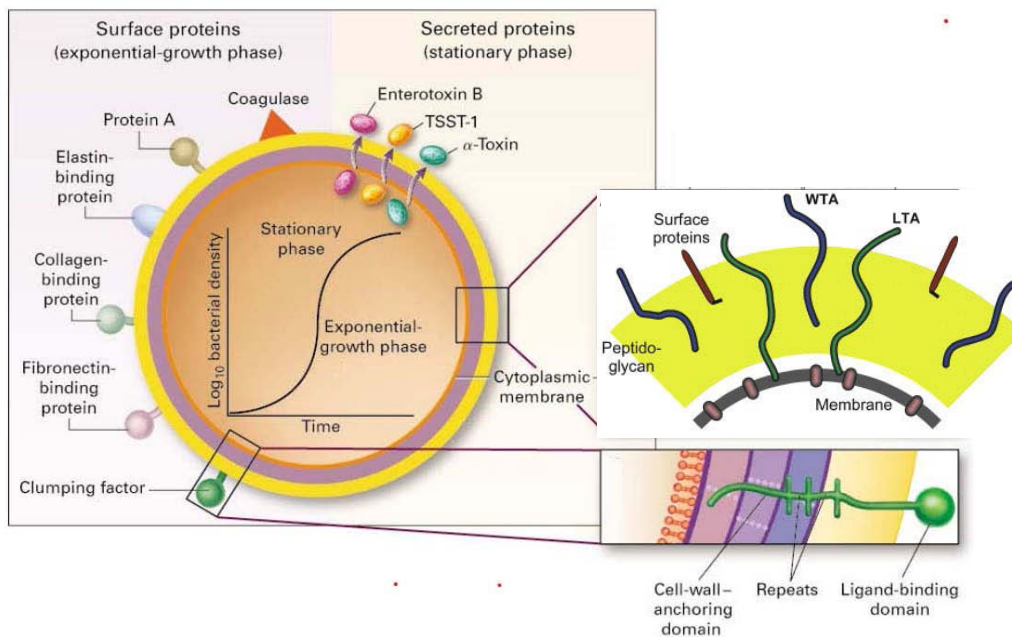
#### 1.2.5.4 Les lymphocytes B

Les lymphocytes B ne sont pas présents en grande quantité dans la peau à l'état basal, mais sont recrutés en quantité importante dans des maladies de la peau telles que l'eczéma, la leishmaniose cutanée et la sclérose cutanée. Au cours de ces maladies, les lymphocytes B sont présents dans le derme et sont associés à des concentrations élevées d'IgM, d'IgE et d'IgG. La sous-population de lymphocytes B régulateurs (B reg) contribue à la mise en place de la tolérance chez l'hôte par l'induction de lymphocytes T regs, et exerce un effet immunosuppresseur dans certaines maladies inflammatoires cutanées *via* la production d'IL-10 (Mauri and Bosma, 2012; Nguyen and Soulika, 2019).

## 2. Physiologie de *Staphylococcus aureus*

### 2.1 Généralités

*S. aureus* est un cocci immobile à Gram positif, d'environ 1  $\mu$ m de diamètre, se présentant sous forme isolée, en paires ou en amas en microscopie. Cette espèce bactérienne appartient à la famille des *Staphylococcaceae*, mais se distingue des autres staphylocoques par sa capacité à produire une coagulase et de la staphyloxanthine, un pigment donnant la coloration jaune dorée caractéristique des colonies bactériennes. *S. aureus* est une bactérie aéro-anaérobie facultative non exigeante car elle est facilement cultivable sur milieu gélosé classique comme le TSA (*Tryptic Soy Agar*) ou le CBA (*Columbia Blood Agar*). Sur ce dernier, les colonies sont entourées d'une zone d'hémolyse, témoin d'une synthèse d'hémolysines par cette bactérie (Thomer et al., 2016; Gnanamani et al., 2017).



**Figure 5 : Structure de *S. aureus* (Lowy, 1998; Xia et al., 2010).** Durant la phase exponentielle de croissance, *S. aureus* favorise l'expression des molécules de surface permettant son adhésion aux différentes surfaces rencontrées. Ces protéines sont ancrées dans une couche épaisse de peptidoglycane sur laquelle se trouve également les WTA et les LTA. A la fin de la phase exponentielle, la bactérie favorise la sécrétion des toxines afin de promouvoir sa survie au sein de l'hôte.

## 2.2 La paroi bactérienne

*S. aureus* est une espèce bactérienne entourée d'une paroi épaisse majoritairement composée de peptidoglycane (PGN) (Figure 5). Ce polymère immunogène est constitué de sous-unités alternées du polysaccharide N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM) formant des chaînes linéaires. Attachées aux résidus de NAM sont présentes des chaînes tétrapeptidiques reliées entre elles par un pont pentaglycine spécifique à *S. aureus*, et conférant une résistance mécanique importante à la bactérie. La paroi est aussi composée d'acides teichoïques qui peuvent être ancrés au PGN; on parle de WTA (*Wall Teichoic Acid*), ou à la membrane plasmique, nommés alors LTA (*Lipo-Teichoic Acid*). La présence d'une capsule polysaccharidique chez certaines souches de *S. aureus* empêche la reconnaissance de ces composés par le système immunitaire (Lowy, 1998; Vollmer et al., 2008).

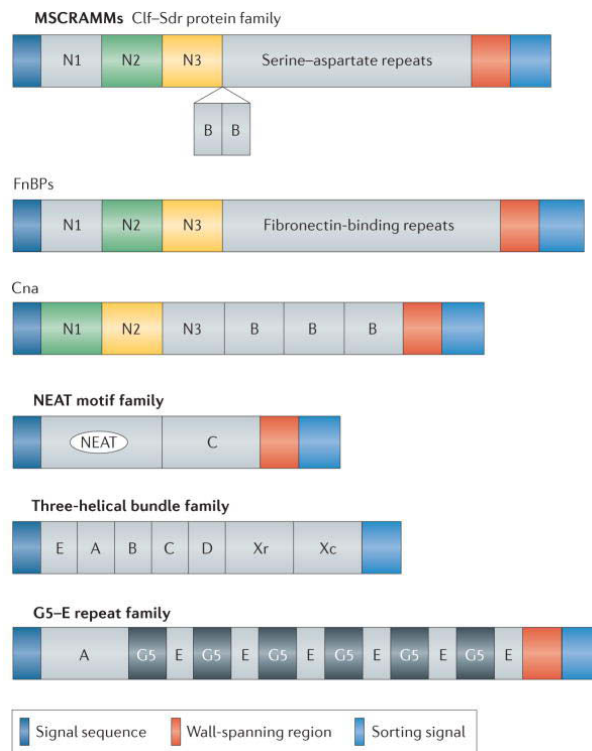
Ancrées également dans la paroi, les protéines de surface représentent un grand nombre de protéines permettant entre autres l'adhésion des bactéries à la surface des cellules ou aux composants de la matrice extracellulaire bactérienne, la formation de biofilm et l'échappement des bactéries à la réponse immunitaire de l'hôte. La famille la plus répandue est celle des MSCRAMM (*Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecule*), comprenant par exemple les protéines d'adhésion au fibrinogène (Clf A et B), à la fibronectine (FnBP A et B) et au collagène (Cna). Une liste plus détaillée ainsi que leurs rôles respectifs dans la colonisation tissulaire chez l'hôte sera abordée dans la section suivante (cf paragraphe II.2.3.2. Les molécules de surface) (Foster et al., 2014).

## 2.3 Les facteurs de virulence

### 2.3.1 La capsule

La capsule est un composant extracellulaire constitué de longues chaînes polysaccharidiques. Au sein d'une espèce, il a été décrit plusieurs types de capsules structurellement distinctes, et permettant le sérotypage des isolats bactériens. A ce jour, 13 sérotypes différents ont été identifiés, avec une plus forte prévalence des types 5 et 8 chez les isolats cliniques. La présence de la capsule n'empêche pas l'opsonisation de la paroi bactérienne par les molécules du complément (cf paragraphe III.2.1 Le système du complément) ou les anticorps, mais constitue un obstacle à la reconnaissance de ces molécules par les phagocytes. *In vivo*, une corrélation a été établie entre la présence d'une capsule chez les isolats et une virulence augmentée. De même, les souches hautement encapsulées (possédant une capsule





**Figure 6 : La classification des molécules de surface de *S. aureus* (Foster et al., 2014).** Les produits de traduction primaire de toutes les protéines ancrées dans la paroi cellulaire contiennent une séquence peptide signal au niveau de leur l'extrémité N-terminale (bleu, à gauche), une région couvrant la paroi (rouge), et un signal de tri au niveau de leur extrémité C-terminale (bleu, à droite). L'analyse structurale des molécules de surface présentées a facilité la classification de ces protéines en quatre groupes distincts : les MSCRAMM, les protéines de la famille NEAT, la protéine A (*Three-helical bundle family*) et la famille de répétition de motifs G5-E.

épaisse) présentent un taux de létalité augmenté chez l'animal comparé à une souche possédant une capsule peu épaisse (O'Riordan and Lee, 2004).

### 2.3.2 Les molécules de surface

L'interaction du staphylocoque avec les cellules de l'hôte se fait *via* des molécules d'adhésion présentes à la surface de la bactérie. Ces protéines sont classées en plusieurs groupes selon des critères structuraux et fonctionnels (Figure 6). Elles peuvent être ancrées à la paroi ou sécrétées par la bactérie. Les protéines MSCRAMM possèdent un peptide signal en position N-terminale permettant l'adressage de la protéine à la membrane suite à sa synthèse, et une région d'ancrage à la paroi et à la membrane cytoplasmique en position C-terminale. Ces deux dernières sont séparées par un motif d'acides aminés LPXTG qui, une fois clivé par la sortase A, conduit à la formation d'une liaison covalente avec le PGN. Les principales protéines de cette famille sont les protéines FnbpA et FnbpB, ClfA et ClfB, Cna, ainsi que la protéine de liaison à la sialoprotéine osseuse (Bbp) et les protéines de la famille Sdr (*Serine-aspartate repeat protein*). Durant la colonisation bactérienne, ces molécules permettent non seulement l'adhésion aux molécules de la matrice extracellulaire, mais participent également à l'invasion de certains types cellulaires comme les cellules endothéliales et les cellules épithéliales (Foster et al., 2014).

Les protéines de la famille NEAT possèdent un ou plusieurs motifs NEAT (*NEAr iron Transporter*) leur permettant de capturer l'hème de l'hémoglobine. Elles permettent donc à la bactérie de capturer le fer de l'environnement, conduisant ainsi à une meilleure survie de la bactérie chez son hôte. Des études ont décrit des propriétés redondantes avec les protéines FnBP et Clf comme l'adhésion à la fibronectine et au fibrinogène, ainsi que la capacité à inactiver la fraction C3b du complément (Foster et al., 2014).

La protéine A est classée à part, de par sa structure caractérisée par la présence de 5 domaines extracellulaires notés A, B, C, D et E. Ces domaines sont capables de se fixer aux fragments Fc des IgG et des IgM, empêchant ainsi la reconnaissance de la bactérie par les récepteurs Fc (FcR) des PNN. L'expression de la protéine A augmente la virulence de *S. aureus* dans les endocardites. En effet, cette protéine facilite l'agrégation plaquettaire *via* son interaction avec le facteur von Willebrand. Ce facteur de virulence est également impliqué dans les pneumonies à staphylocoque où la protéine A est capable de se lier au récepteur du TNF $\alpha$  des cellules épithéliales pulmonaires, induisant une réponse pro-inflammatoire et une destruction de l'épithélium respiratoire (Foster et al., 2014).



Enfin, les protéines de la famille de motifs répétés G5-E regroupent la protéine de surface G (SasG) et la protéine de surface sensible à la plasmine (Pls). Ces protéines contiennent un domaine extracellulaire composé d'un domaine A et un domaine B. Ce dernier est lui-même composé d'une répétition d'un nombre variable de séquences G5 (~80 résidus) espacées par le domaine E, une séquence de 50 résidus. Pour SasG, trois à 10 répétitions ont été observées dans différents souches de *S. aureus*. Les ligands de ces protéines ne sont pas encore connus mais des études ont montré leur implication dans la liaison aux cellules épithéliales et la formation des biofilms (Roche et al., 2003; Bateman et al., 2005; Foster, 2020).

### 2.3.3 Les toxines

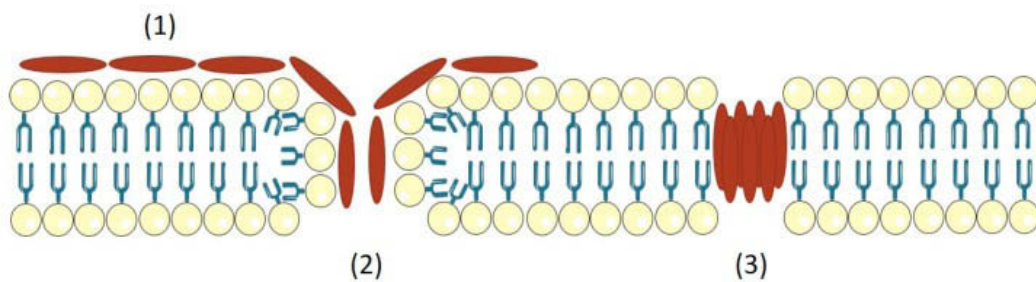
Le caractère « pathogène » de *S. aureus* provient de sa capacité à sécréter de multiples toxines capables d'affaiblir l'organisme colonisé. Elles promeuvent la survie et la prolifération de la bactérie au sein de son hôte *via* ses capacités à déstabiliser l'organisation tissulaire, à tuer certaines cellules de l'hôte, et à contourner les attaques du système immunitaire (Oliveira et al., 2018).

#### 2.3.3.1 Les exfoliatines

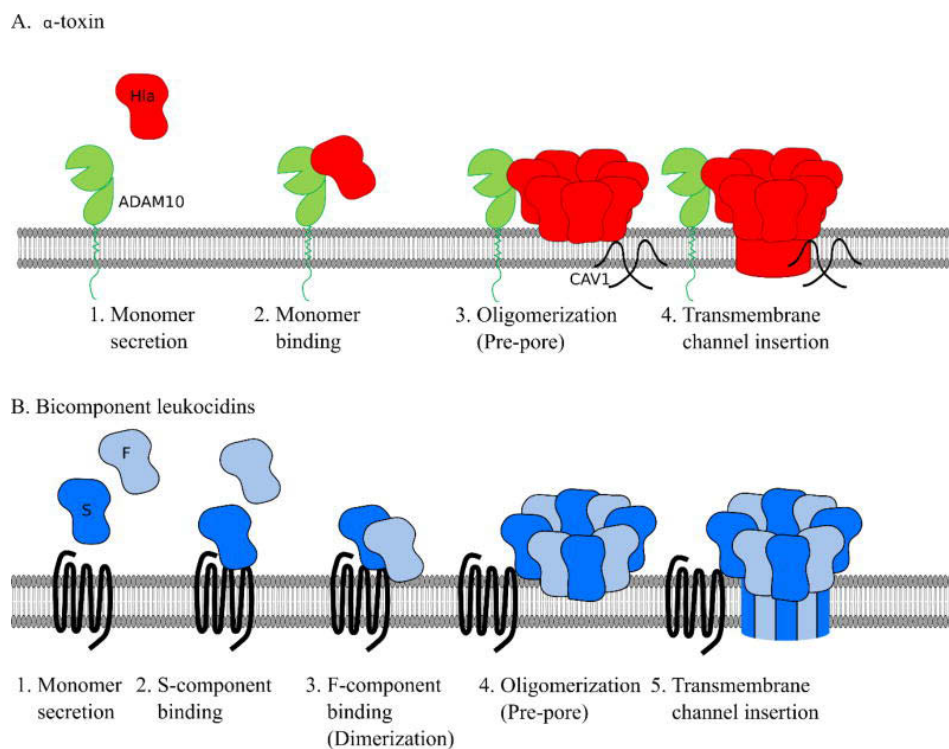
Les exfoliatines sont des toxines épidermolytiques regroupant les exfoliatines A/B/C/D (ETA, ETB, ETC, ETD) codées par les gènes *eta*, *etb*, *etc*, et *etd* respectivement. Elles sont responsables d'atteintes cutanées locales telles que l'impétigo bulleux, ou plus généralisées comme le syndrome de la peau ébouillantée. Ce sont des sérine protéases ciblant la desmogléine-1, une cadhérine du desmosome qui maintient l'adhésion entre les kératinocytes, entraînant une desquamation et la formation de cloques au niveau des couches superficielles de la peau. Environ 5% des souches de *S. aureus* expriment ces toxines, mais ETA et ETB sont les plus fréquemment retrouvées chez l'Homme (Bukowski et al., 2010; Oliveira et al., 2018).

#### 2.3.3.2 Les toxines formant des pores

Les toxines formant des pores (PFT) font partie de la grande famille des protéines formant des pores (PFP), qui incluent entre autres la perforine et la protéine C9 du complexe d'attaque membranaire du système de complément. Chez *S. aureus*, les PFT regroupent les hémolysines et les leukotoxines qui induisent la formation de pores membranaires à la surface des cellules et mènent à leur lyse. Elles sont classées sur la base de la structure de leurs pores transmembranaires. En effet, les  $\alpha$ -PFT forment une structure de type hélice  $\alpha$  alors que les pores formés par les  $\beta$ -PFT sont sous la forme d'un tonneau  $\beta$ . Les hémolysines et les leukotoxines font partie de ce deuxième groupe (Seilie and Wardenburg, 2017).



**Figure 7 : Mécanisme de formation des pores par les PSM de *S. aureus* (Oliveira et al., 2018).** Les PSM sont capables de s'agréger à la surface de la membrane lipidique des cellules grâce à leur caractère amphipatique (1), ce qui peut entraîner une désintégration de la membrane (2). Les PSM ont une tendance à s'agréger en oligomères et à former un pore de manière transitoire au niveau de la membrane des cellules (3).



**Figure 8 : Mécanisme de formation des pores transmembranaires par les PFT de *S. aureus* (Seilie and Wardenburg, 2017).** La Hla de *S. aureus* est sécrétée sous forme de monomères solubles (rouge) et possède une affinité pour le récepteur Adam10. A la surface de la cellule, la toxine s'oligomérisse en heptamères pour former un pré-pore. Ce dernier est stabilisé par la cavéoline-1. Enfin, le pore transmembranaire en tonneau  $\beta$  est formé au sein de la membrane. Les leukocidines sont également sécrétées sous la forme de monomères. Le composant S (bleu foncé) confère la spécificité au récepteur membranaire. Suite à sa liaison, le composant F (bleu clair) est recruté pour former des hétérodimères. Le pré-pore est formé par l'oligomérisation en octamères de ces dimères avant la formation du canal transmembranaire.

## Les $\alpha$ -PFT

### *Les « Phenol-Soluble Modulins »*

Les PSM (*Phenol-Soluble Modulins*) sont des petits peptides capables de former des pores transmembranaires. Cette propriété est due à leur caractère amphipathique qui leur permet de s'agréger en oligomères et leur confère une affinité naturelle pour les lipides (Figure 7). Cette activité est récepteur indépendant. La présence des PSM est plus fréquente chez les MRSA-C que chez les MRSA-H. L'export de ces peptides est dépendant du transporteur Pmt (*Phenol-soluble Modulin Transporteur*), qui protège la bactérie des effets lytiques des PSM. Chez *S. aureus*, deux familles de PSM ont été décrites : les PSM $\alpha$ , comprenant les PSM $\alpha$  1 à 4 et l'hémolysine  $\delta$  (Hld); et les PSM $\beta$ , comprenant les PSM $\beta$  1 et 4. Cette classification qui repose sur la base des longueurs des séquences peptidiques permet également de distinguer ces deux familles selon leur pouvoir cytolytique. En effet, les PSM $\alpha$ 1 à 4 et la Hld ont respectivement une capacité prononcée et modérée à lyser les PNN et les érythrocytes humains, alors que les PSM $\beta$  sont non lytiques. La pathogénicité accrue des PSM $\alpha$  se reflète dans la capacité des MRSA-C à provoquer des infections cutanées et des bactériémies dans des modèles animaux. D'autres fonctions de ces PSM incluent la structuration des biofilms de *S. aureus* (cf paragraphe II.2.4 Le biofilm de *S. aureus*) et l'activation de la réponse pro-inflammatoire, notamment chez les PNN (cf paragraphe III.3.2 Extravasation et chimiotaxie cellulaire) (Peschel and Otto, 2013; Otto, 2014; Oliveira et al., 2018).

## Les $\beta$ -PFT

### *L'hémolysine $\alpha$*

L'hémolysine  $\alpha$  (Hla) est sécrétée sous forme de monomères mais s'oligomérisent en heptamères suite à la reconnaissance de sa cible, le récepteur membranaire ADAM10 (Figure 8). L'effet de cette toxine a été démontré chez plusieurs types cellulaires tels que les lymphocytes T et B, les MO/M $\Phi$ , les érythrocytes, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales. La liaison de cette toxine à ces dernières mène à l'activation de ADAM10 et à une dégradation des cadhérines E *via* son activité métalloprotéase (Seilie and Wardenburg, 2017).

### *L'hémolysine $\beta$*

Le mécanisme de formation des pores par l'hémolysine  $\beta$  (Hlb) repose sur une activité enzymatique. En effet, il s'agit d'une sphingomyélinase ciblant la sphingomyéline présente sur la membrane des cellules de l'hôte. Son activité cytotoxique a été décrite chez les kératinocytes, les PNN, les MO et les lymphocytes T. *In vitro*, cette toxine diminue la capacité des cellules endothéliales activées par le TNF $\alpha$  à produire l'IL-8, et inhibe la capacité migratoire des PNN

<b>Toxine</b>	<b>Sous-unité S</b>	<b>Sous-unité F</b>	<b>Récepteur cible (de la sous-unité S)</b>	<b>Cellule cible</b>	<b>Espèce cible</b>
<b>HlyA/B</b>	HlyA	HlyB	CCR2 CXCR1/2 DARC (sur les érythrocytes)	PNN MO MΦ Erythrocytes	Homme Souris
<b>HlyC/B</b>	HlyC	HlyB	C5aR1/2	PNN MO MΦ	Homme Lapin Souris
<b>LukED</b>	LukE	LukD	CCR5 CXCR1/2 DARC (sur les érythrocytes)	PNN MO MΦ DC Lymphocyte T Erythrocytes	Homme Souris
<b>PVL</b>	LukS-PVL	LukF-PVL	C5aR1/2	PNN MO MΦ	Homme Souris
<b>LukAB</b>	LukA	LukB	CD11b	PNN MO MΦ DC	Homme Lapin Souris

**Tableau 2 : Composition des différentes leukotoxines de *S. aureus*, leurs récepteurs et leurs cellules cibles (Spaan et al., 2017).** La majorité des récepteurs ciblés par les leukotoxines appartiennent à la famille des récepteurs du complément et des chimiokines : C5aR1, C5aR2, CXCR1, CXCR2, CCR2, CCR5 et DARC. A l'exception du DARC, ces récepteurs sont exprimés chez les leucocytes à des niveaux très élevés, et sont impliqués dans l'activation et la migration cellulaire. Le CD11b est un composant de l'intégrine Mac-1 qui est fortement exprimée chez les phagocytes. Ce récepteur est impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires critiques telles que la chimiotaxie et la phagocytose.

vers un endothélium activé par le TNF- $\alpha$ , ainsi que sa traversée. Dans un modèle d'endocardite chez le lapin, l'expression de l'Hlb augmente la capacité des bactéries à former des biofilms (Otto, 2014; Oliveira et al., 2018).

### Les leukotoxines

Les leukotoxines, également appelées leucocidines, sont des toxines à deux composants formant des pores. Chez *S. aureus*, cinq leukotoxines différentes ont été identifiées, chacune formée par l'oligomérisation de deux composés distincts, nommés S et F (Figure 8). La spécificité cellulaire de ces toxines est dépendante du composé S et de la reconnaissance de son récepteur cible. Or, chaque leukotoxine possède ses propres sous-unités S et F. Ces toxines ciblent plusieurs types de cellules immunitaires, notamment les phagocytes et certains lymphocytes, chez l'Homme et également chez d'autres mammifères (Tableau 2).

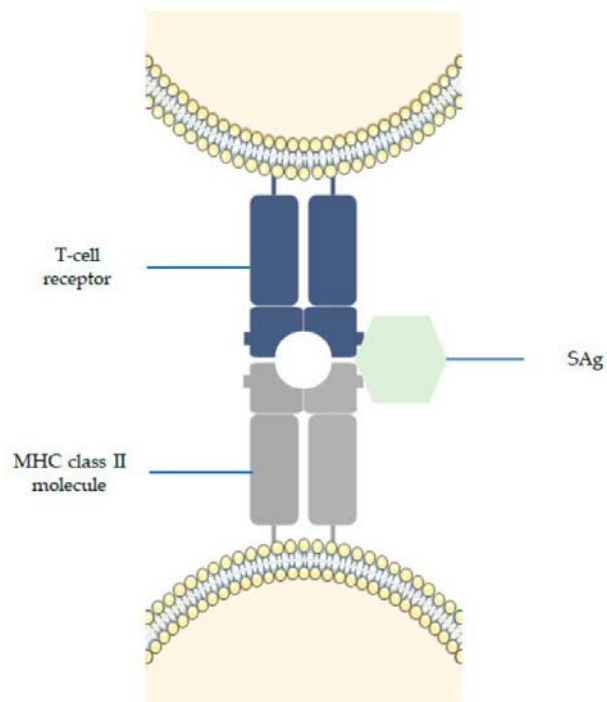
Tout d'abord, l'hémolysine  $\gamma$  (Hlg) est formée de l'association des sous-unités peptidiques HlgA ou HlgC (composé S) avec la sous-unité HlgB (composé F). En effet, il existe deux combinaisons possibles pour former l'Hlg : HlgA/HlgB ou HlgB/HlgC. L'interchangeabilité du composé S confère une activité lytique différentielle face aux érythrocytes. La lyse de ces derniers permet aux bactéries de capturer le fer du milieu environnant, assurant ainsi une meilleure survie à la bactérie dans la circulation sanguine (Spaan et al., 2015).

La leukotoxine LukED (composée des sous-unités LukE et LukD) est également capable de lyser les érythrocytes. LukE cible les phagocytes, mais également les lymphocytes T et les DC immatures *via* le récepteur CCR5 (*C-C chemokine Receptor type 5*) (Oppermann, 2004).

La leukotoxine de Panton-Valentine (PVL) cible spécifiquement les cellules immunitaires chez l'Homme et chez le lapin, en raison de la spécificité additionnelle de sa sous-unité F (LukF-PV) pour le récepteur CD45. L'expression de cette toxine a été associée à des infections sévères et potentiellement mortelles chez les sujets sains. En effet, les gènes codant les protéines S et F (LukS-PV et LukF-PV) sont présents seulement chez 5% des isolats cliniques, mais sont retrouvés chez la majorité des SARM-C (85%), notamment dans le cas d'infections cutanées et de pneumonies nécrosantes (Yoong and Torres, 2013).

LukAB est la toxine la plus récemment découverte son rôle dans les infections *in vivo* reste peu connu. Contrairement aux autres leukotoxines qui s'oligomérisent suite à la reconnaissance du récepteur membranaire, la formation des hétérodimères de LukA/LukB a été décrite avant leur oligomérisation à la surface des cellules cibles. De plus, un effet synergique





**Figure 9 : Mécanisme d'action des superantigènes (Oliveira et al., 2018).** Les superantigènes se lient aux molécules du CMHII et à une région variable du récepteur des lymphocytes T, ce qui conduit à une stimulation non spécifique des lymphocytes T.

de cytotoxicité a été constaté sur les PNN lorsque cette toxine est co-exprimée avec la PVL (Spaan et al., 2017; Oliveira et al., 2018).

#### 2.3.3.3 Les superantigènes

La famille des toxines superantigéniques (SAg) regroupe plus d'une vingtaine de protéines, avec notamment la TSST-1 (*Toxic Shock Syndrom Toxin 1*), les entérotoxines staphylococciques et 11 SSL (*Staphylococcal Superantigen-Like*) (SEIK à SEIQ et SEIU à SEIX). Ces superantigènes induisent une interaction non spécifique entre les domaines V $\beta$  des lymphocytes T et le CMHII. Il en résulte l'activation et la prolifération des lymphocytes T sans nécessiter la présentation antigénique (Figure 9). La libération des cytokines pro-inflammatoires en grande quantité par les lymphocytes activés va provoquer le syndrome du choc toxique staphylococcique caractérisé par de la fièvre, des diarrhées, des vomissements et la défaillance simultanée des organes (Otto, 2014; Oliveira et al., 2018).

#### 2.3.4 Les enzymes

##### 2.3.4.1 La coagulase

Deux coagulases ont été décrites chez *S. aureus*, la staphylocoagulase et le facteur von Willebrand. Elles possèdent toutes les deux la capacité à s'associer à la prothrombine humaine par leur extrémité N-terminale pour former le complexe staphylothrombine. Ce dernier est une enzyme responsable de la polymérisation du fibrinogène en fibrine, favorisant l'agrégation plaquettaire ainsi que l'interaction entre *S. aureus* et les plaquettes. Ces deux coagulases sont impliquées dans l'inhibition de la phagocytose bactérienne, dans la formation des abcès et dans l'adhésion de *S. aureus* à des cathéters (Cheng et al., 2010; Vanassche et al., 2013).

##### 2.3.4.2 La staphylokinase

L'action de la Staphylokinase (Sak) permet de contrer la formation des caillots de fibrine qui normalement limitent la croissance bactérienne au niveau cutané. *S. aureus* est capable d'immobiliser le plasminogène à sa surface. L'enzyme Sak convertit alors le plasminogène en plasmine, une peptidase intervenant dans le processus de fibrinolyse, et permet la dislocation des caillots et la formation de foyers septiques secondaires. La bactérie inhibe son opsonisation grâce à l'activité sérine protéase de la plasmine associée à sa paroi. Cette dernière est en effet capable de cliver et d'inactiver les IgG et la fraction C3b du complément (Mölkänen et al., 2002; Rooijackers et al., 2005b).



#### 2.3.4.3 Les lipases

De nombreuses lipases sont sécrétées par *S. aureus*, dont les plus abondantes appartiennent à la famille Geh : SAL1, SAL2, et SAL3. Ces lipases possèdent une spécificité pour les chaînes courtes (SAL1 et SAL3) et les chaînes longues (SAL2) des triglycérols stockés dans le tissu adipeux (Kumar et al., 2021). Alors que les acides gras issus de cette hydrolyse peuvent avoir une activité antimicrobienne au niveau cutané, des études récentes ont montré que les lipases peuvent produire des acides gras libres à partir de métabolites lipidiques de l'hôte, métabolites qui seront ensuite incorporés dans les fragments lipidiques de la paroi de *S. aureus*. Cette incorporation rend la bactérie résistante au triclosan, un agent antibactérien à large spectre couramment utilisé dans le traitement des infections à *S. aureus* (Cadieux et al., 2014; Delekta et al., 2018). De plus, l'association des lipases et d'une enzyme appelée FAME (*Fatty Acid Modifying Enzyme*) permet l'estérification des acides gras en cholestérol et une meilleure colonisation du tissu cutané. Les lipases ont également été décrites dans l'inhibition de l'activation des MΦ par une hydrolyse des lipopeptides bactériens, inhibant ainsi la reconnaissance de *S. aureus* par le TLR2 (Chen and Alonzo, 2019). Enfin, les lipases ont une activité anti-phagocytaire sur les PNN humains en empêchant l'émission de pseudopodes par ces cellules (Sargison et al., 2021).

#### 2.3.4.4 Les protéases

*S. aureus* sécrète principalement 10 enzymes protéolytiques. Il s'agit notamment d'une métalloprotéase (auréolysine, Aur), d'une sérine protéase V8 (SspA), de deux cystéine protéases (staphopaine A (ScpA) et staphopaine B (SspB)), et de six homologues de SspA (SplA/B/C/D/E/F). Les protéases sont sécrétées sous forme de proenzymes dépourvues d'activité protéolytique, ou possédant une faible activité. La maturation des protéases nécessite ainsi un clivage du précurseur réalisé par les protéases elles-mêmes : l'Aur active la ScpA, qui active à son tour la SspB (Rice et al., 2001). Ces enzymes possèdent plusieurs cibles chez l'Homme, par exemple la fibronectine, le fibrinogène et le kininogène qui sont clivés spécifiquement par la SspB, ainsi que l'élastine, les chaînes lourdes des immunoglobulines et l' $\alpha$ 1-antitrypsine qui peuvent être ciblés par les deux cystéine protéases. Les protéinases peuvent moduler l'activité de certains facteurs de virulence. Par exemple, SspA et Aur clivent respectivement la protéine A et la ClfB présentes à la surface de la bactérie, empêchant l'association de la bactérie aux protéines de la matrice et facilitant sa dissémination. Aur a également été impliquée dans la stabilité de Hla et des PSM chez les MRSA-C (Kolar et al., 2013; Otto, 2014).



#### 2.3.4.5 Les nucléases

Les nucléases sécrétées par *S. aureus* catalysent l'hydrolyse de l'ADN et de l'ARN. Deux types ont été décrits chez cette bactérie : Nuc1 et Nuc2. Seule Nuc1 est présente chez toutes les souches de *S. aureus*. Ces enzymes jouent un rôle au cours de la maturation du biofilm en dégradant l'ADN extracellulaire (ADNe). Or, ce composant de la matrice extracellulaire bactérienne est essentiel au maintien de la structure du biofilm car il permet la formation de la structure tridimensionnelle des biofilms et une dispersion précoce des bactéries (cf paragraphe II.2.4 Le biofilm de *S. aureus*) (Moormeier and Bayles, 2017; Sultan et al., 2019). Il a aussi été démontré que l'expression des nucléases par la forme planctonique et biofilm de *S. aureus* dégrade les NET (*Neutrophil Extracellular Traps*), permettant ainsi à la bactérie d'échapper à la dégradation (Berends et al., 2010; Bhattacharya et al., 2020).

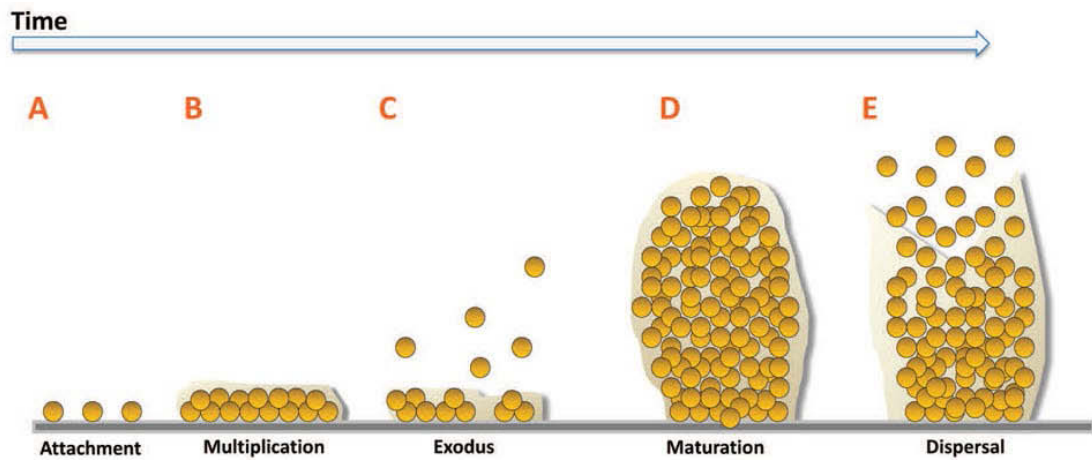
#### 2.3.5 La staphyloxanthine

La staphyloxanthine n'est pas seulement le pigment responsable de la coloration jaune typique des colonies de *S. aureus*, mais est aussi un facteur de virulence important. Sa production améliore la résistance de la bactérie aux facteurs environnementaux tels que les rayonnements UV et les espèces réactives de l'oxygène (ROS). L'activité anti-oxydante de cette molécule protège la bactérie contre la dégradation au sein des PNN et de l'activité des AMP (Xue et al., 2019; Kwiatkowski et al., 2020).

#### 2.3.6 Les protéines impliquées dans la réponse immunitaire

##### 2.3.6.1 Chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus et FPR-like 1 inhibitory proteins

La protéine CHIPS (*CHemotaxis Inhibitory Protein of Staphylococcus*) est une protéine sécrétée ayant une affinité pour le récepteur du complément (CR) C5aR et le récepteur des peptides formylés 1 (FPR) des PNN, des MO/MΦ et des DC (cf paragraphe III.2 Les effecteurs de la réponse immunitaire innée). Ces deux récepteurs sont impliqués dans la chimiotaxie des cellules immunitaires *via* la liaison avec leurs ligands respectifs, la fraction C5a du complément et les peptides formylés. Ces derniers peuvent être issus de la lyse des bactéries ou des cellules hôtes. La fixation des CHIPS sur ces récepteurs empêche ainsi la fixation de leurs propres ligands, inhibant ainsi le recrutement de ces cellules immunitaires vers le site d'infection (Dorward et al., 2015). Les protéines FLIPr et FLIPr-like (*FPR-Like 1 Inhibitory Proteins*) sont également capables d'inhiber la chimiotaxie des cellules immunitaires en se liant sur le récepteur FPR1 des PNN et des MO/MΦ. De plus, elles ont une affinité pour le récepteur FPR2.



**Figure 10 : Les étapes de la formation du biofilm de *S. aureus* (Moormeier and Bayles, 2017).** Le développement du biofilm de *S. aureus* est décrit en cinq étapes : A) l'attachement, B) la multiplication, C) l'exode, D) la maturation et E) la dispersion. Après l'adhésion des bactéries à une surface biotique ou abiotique (A), les bactéries se multiplient pour former des microcolonies entourées d'une matrice composée d'ADNe et de protéines (B). Une fois à confluence, une sous-population de bactéries exprimant des nucléases est libérée après dégradation de l'ADNe (C). Le biofilm se développe à partir des microcolonies restantes. Le processus de maturation est caractérisé par une division rapide des bactéries et une synthèse importante de MEC (D). Enfin, des bactéries peuvent se détacher du biofilm grâce à l'action de protéases et/ou des PSM pour aller coloniser de nouvelles surfaces (E).

L'activation des FPR par ces molécules (CHIPS, FLIPr et FLIPr-like) inhibe l'activation des PNN (Spaan et al., 2013).

#### 2.3.6.2 Staphylococcal complement inhibitor

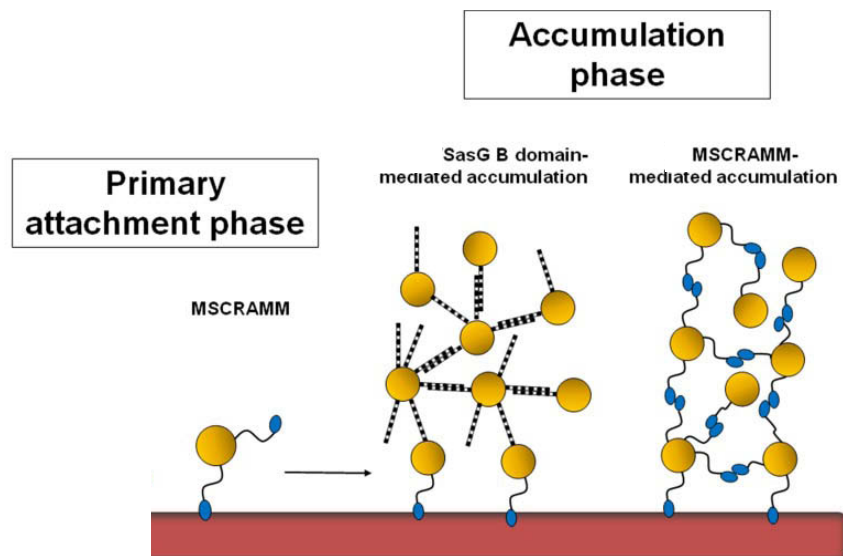
Les deux protéines SCIN (*Staphylococcal Complement INhibitor*), SCIN-B et SCIN-C, sont des inhibiteurs de toutes les voies du complément (cf paragraphe III.2.1 Le système du complément) en agissant sur le facteur commun aux deux voies, la C3 convertase. Ces protéines sont retrouvées chez 90 % des isolats humains. En effet, l'interaction avec la C3 convertase déposée à la surface des bactéries inhibe le clivage du complément C3 en C3a et C3b (Rooijackers et al., 2006). Cette inhibition a pour conséquence d'inhiber le recrutement des PNN au site d'infection par la fraction C3a, d'empêcher la phagocytose après l'opsonisation par la fraction C3b, et de bloquer l'activation de la C5 convertase (Sultan et al., 2018).

### 2.4 Le biofilm de *Staphylococcus aureus*

#### 2.4.1 Généralités

Dans un environnement pauvre en nutriments, les bactéries sont retrouvées non pas sous la forme isolée, flottante en milieu liquide appelée forme planctonique, mais exclusivement sous la forme communautaire appelée biofilm. Le biofilm désigne ainsi des agrégats de bactéries adhérentes à une surface englobées dans une matrice extracellulaire (MEC) composée d'eau, d'ADNe, de protéines et de polysaccharides. Chez l'Homme, les bactéries forment du biofilm lorsqu'elles subissent des conditions de stress induites notamment par le traitement antibiotique ou les attaques du système immunitaire de l'hôte. En effet, *S. aureus* est reconnu pour sa capacité à provoquer des infections chroniques en raison de sa capacité à former des biofilms, notamment sur des dispositifs médicaux invasifs tels que des cathéters, des prothèses articulaires et des implants cardiaques. Cette forme de croissance confère aux bactéries une résistance à la fois aux agents antimicrobiens et aux attaques du système immunitaires de l'hôte tout en servant également de réservoir pour la dissémination bactérienne au sein de l'organisme (Costerton et al., 1999; Donlan and Costerton, 2002). La formation du biofilm de *S. aureus* se décompose en 4 étapes clés : l'attachement, la multiplication, la maturation et la dispersion (Figure 10). S'ajoute également dans le cas de *S. aureus* une étape de dispersion précoce ou exode décrite en 2014 (Moormeier et al., 2014), et indépendante des mécanismes impliqués dans la phase finale de dispersion des biofilms. Chaque étape est régulée de manière précise et nécessite l'expression de facteurs spécifiques de *S. aureus* pour parvenir à l'élaboration de cette structure complexe (Moormeier and Bayles, 2017).





**Figure 11 : Les protéines impliquées dans la phase précoce de la formation du biofilm chez *S. aureus* (Speziale et al., 2014).** L'attachement de *S. aureus* à une surface biotique (rouge) est médié par les MSCRAMM. Durant la phase de multiplication, l'adhésion interbactérienne permettant l'accumulation des bactéries en biofilm est assurée par les MSCRAMM et par le domaine B de SasG.

## 2.4.2 Les étapes de formation

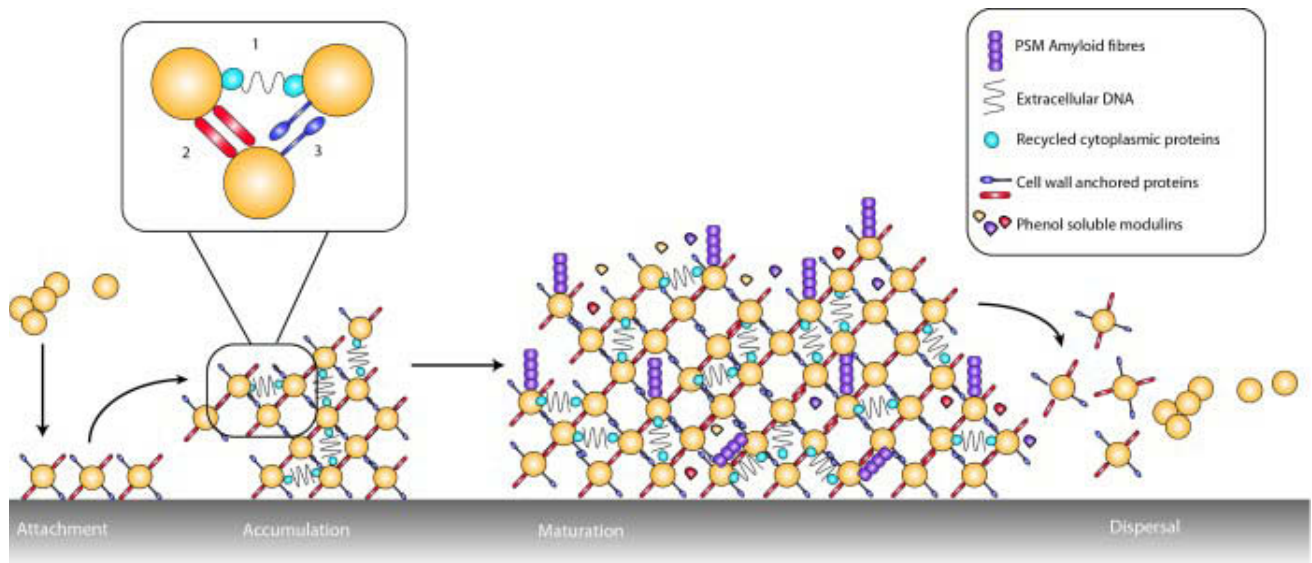
### 2.4.2.1 L'attachement

La formation du biofilm de *S. aureus* est initiée par l'attachement des bactéries sous forme planctonique à une surface de nature abiotique ou biotique. Cette dernière correspond aux substrats retrouvés dans la matrice extracellulaire ou à la surface des cellules de l'hôte, comme la fibronectine, le fibrinogène, le collagène ou les récepteurs membranaires. L'adhésion à ces molécules est majoritairement médiée par les protéines de surface de la famille des MSCRAMM, qui offrent également la possibilité de se lier aux protéines adsorbées sur les biomatériaux, facilitant ainsi la mise en place du biofilm sur les implants (Foster et al., 2014; Moormeier and Bayles, 2017). En l'absence des molécules de l'hôte, *S. aureus* est capable d'adhérer aux surfaces abiotiques, telles que le plastique ou le métal d'un dispositif médical, via des interactions hydrophobes ou électrostatiques. En effet, il a été montré que la capacité de fixation et de formation du biofilm est influencée par les charges de surface des supports tels que le polystyrène (Kennedy and O'Gara, 2004). De plus, l'inhibition de l'incorporation des résidus positivement chargés de D-alanine aux WTA et aux LTA par les enzymes codées par l'opéron *dlt* provoque une augmentation de la charge négative de la surface bactérienne, diminuant ainsi son adhésion au polystyrène et au verre (Gross et al., 2001).

De même, les autolysines (Atl) participent à l'attachement de la bactérie aux surfaces abiotiques (polystyrène et verre) (Biswas et al., 2006). Ce sont des hydrolases du PGN par ailleurs impliquées dans la division cellulaire, la lyse bactérienne, et le renouvellement de la paroi bactérienne (Osipovitch et al., 2015). Sur une surface hydrophobe de type polystyrène, Houston *et al.* ont montré une diminution de la capacité d'adhésion des bactéries par les mutants délétés pour le gène *atl* (Houston et al., 2011).

### 2.4.2.2 La multiplication

Suite à leur adhésion, les bactéries vont ensuite se diviser et s'accumuler pour former un amas bactérien. Durant cette phase de multiplication, les liaisons inter-bactériennes sont essentielles afin de protéger les bactéries nouvellement formées du détachement, et d'assurer ainsi la continuité de la formation du biofilm. Dans un premier temps, ces liaisons sont assurées par la production de protéines de surface, notamment certaines MSCRAMMS et la SasG (Figure 11). Il a été démontré que l'accumulation des bactéries au cours de cette étape est également dépendante du polysaccharide PIA (*Polysaccharide Intercellular Adhesin*). Des homologues de cet exopolysaccharide existent chez d'autres bactéries telles que *E. coli*, *P. fluorescens* et *Y. pestis*, avec un rôle dans la formation du biofilm clairement démontré. Le PIA



**Figure 12 : Implication de l'ADNe et des PSM (Phenol Soluble Modulins) dans la formation du biofilm de *S. aureus* (Hobley et al., 2015).** La formation d'un biofilm est caractérisée par la sécrétion d'une MEC riche en ADNe et en protéines. Les interactions entre les bactéries au sein de cette matrice sont médiées par divers facteurs, dont notamment l'ADNe qui relie les protéines cytoplasmiques entre elles (1), les protéines CWA qui reliait la surface des bactéries adjacentes (2 et 3), et les peptides PSM qui s'agrègent pour former les fibres  $\beta$ -amyloïdes.

est un composant majeur de la MEC. En effet, sa charge positive lui permet de se lier à la surface des bactéries et aux WTA (Nguyen et al., 2020). De plus, une délétion du locus *ica* (opéron codant la PIA) inhibe la formation du biofilm (Cramton et al., 1999). Cependant, l'implication de la PIA dans la formation de biofilm semble être souche dépendante, car la délétion de *ica* dans la souche MSSA UAMS-1 ou dans certaines MRSA n'induit pas de défaut dans la formation du biofilm aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Francois et al., 2003; Beenken et al., 2004; Fitzpatrick et al., 2005; Moormeier et al., 2014).

Dans ce cas où le biofilm se développe de manière PIA indépendante, d'autres protéines sont alors impliquées dans l'accumulation des bactéries. Par exemple, la protéine A présente à la surface des bactéries favorise l'agrégation bactérienne dans un milieu liquide, et la formation du biofilm dans des conditions statiques et en flux. De plus, le développement du biofilm est rétabli chez les mutants *spa* (*Staphylococcus aureus Protein A*) par l'ajout de la protéine A de manière exogène, indiquant que cette fonction ne nécessite pas un ancrage de cette protéine à la paroi bactérienne (Merino et al., 2009). Par ailleurs, des études sur l'attachement de *S. aureus* à une surface abiotique, sur l'agrégation bactérienne et sur la formation du biofilm ont montré que la protéine de surface Bap (*Biofilm-Associated Protein*) est impliquée dans l'accumulation des bactéries durant cette étape. L'absence de l'opéron *ica* chez les souches bactériennes n'a pas d'impact sur les fonctions de Bap, montrant un mécanisme de fonctionnement de la protéine indépendant de la PIA. Initialement isolée à partir de souches issues de mammites bovines, cette protéine n'a jamais été retrouvée chez les isolats cliniques chez l'Homme (Trotonda et al., 2005; Lasa and Penadés, 2006).

Dans un deuxième temps, la stabilité de la MEC du biofilm est assurée par l'ADNe issu de la mort cellulaire et de l'action des autolysines bactériennes Atl. En effet, la charge polyanionique de l'ADN permet de lier les molécules composant la MEC (Figure 12). De plus, la lyse des bactéries résulte en le relargage de certaines protéines contribuant à la stabilité de la MEC telles que les PSM, la Hlb, et les protéines associées au nucléoïde, chacune étant capable de se lier à l'ADNe. La sensibilité des biofilms aux traitements par les protéases témoigne du rôle essentiel du composant protéique de la MEC durant cette phase précoce de la formation du biofilm (Moormeier et al., 2014). En effet, il a été décrit que les PSM s'agrègent à la surface des bactéries pour former des fibres amyloïdes. Alors que la forme monomérique des PSM est impliquée dans la lyse des cellules immunitaires et la dispersion du biofilm grâce à son activité de surfactant, la structuration en fibres a été proposé comme mécanisme d'inactivation de ces mêmes protéines cytolytiques (Schwartz and Boles, 2013; Hobley et al., 2015). Cependant,



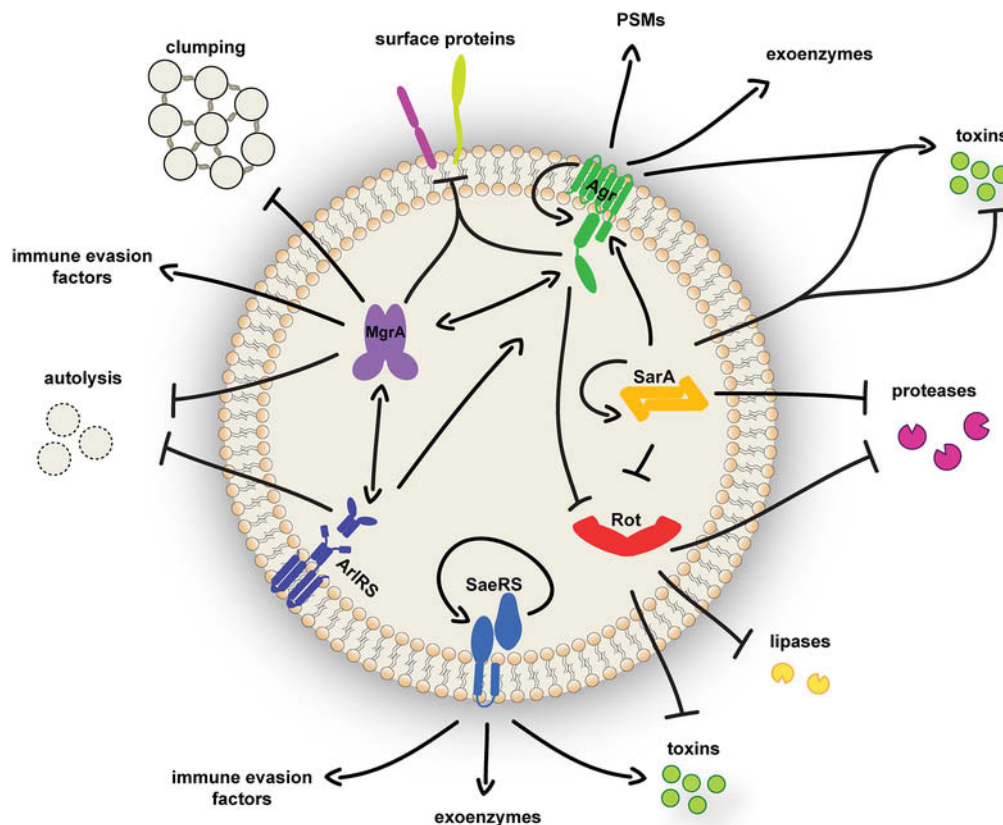
Schwartz et al., ont montré que la formation des fibres amyloïdes est dépendante de la présence de l'ADNe dans des biofilms formés *in vitro* (Schwartz et al., 2016).

#### 2.4.2.3 La dispersion précoce ou exode

L'observation de la formation du biofilm par microscopie en temps réel a mis en évidence une étape de dispersion précoce permettant la restructuration du biofilm et la formation de micro-colonies de bactéries (Figure 10) (Moormeier et al., 2014). Cet exode se fait *via* l'action des nucléases sur l'ADNe en permettant une dégradation partielle de la MEC. Cependant, l'expression du gène *nuc* est observée uniquement dans une sous-population de bactéries du biofilm, ce qui empêche la dégradation totale de la MEC. Cette expression est sous le contrôle du système de régulation de la virulence *sae* (*S. aureus Exoprotein Expression*) (cf paragraphe II.2.5.1 Les systèmes à deux composants), et est indépendant des mécanismes impliqués dans la dispersion tardive du biofilm. Ceci suggère une expression ordonnée de ces différents effecteurs pendant le développement du biofilm. Le processus qui gouverne cette coordination reste cependant encore inconnu (Moormeier et al., 2014; Moormeier and Bayles, 2017).

#### 2.4.2.4 La maturation

Costerton *et al.* ont décrit la structure tridimensionnelle des biofilms matures comme étant des « champignons » ou des « tours » traversées par des canaux aqueux permettant l'acheminement de l'oxygène et des nutriments dans les différentes régions du biofilm ainsi que l'élimination des déchets (Costerton et al., 2003). La maturation correspond à la multiplication et à l'agrégation des bactéries à partir des micro-colonies restantes, suite à l'exode, conduisant à la formation des piliers caractéristiques des biofilms (Figures 10 et 12). Durant cette étape, des conditions environnementales différentes dues à la présence de gradients d'oxygène et de nutriments dans l'ensemble de la communauté bactérienne potentialise le développement de sous-populations métaboliquement distinctes. Dans un modèle *in vitro* de biofilm de staphylocoque (*S. aureus* et *S. epidermidis*), quatre profils métaboliques ont été identifiés : des bactéries en croissance aérobie, des bactéries en fermentation, des bactéries dormantes (bactéries à croissance lente et métaboliquement inactives) ou encore des bactéries mortes. Les bactéries présentes à la surface supérieure (riche en oxygène) et inférieure (riche en nutriments) du biofilm sont métaboliquement actives. Cependant, la majorité des cellules sont dormantes et situées dans un environnement anoxique (Rani et al., 2007). Cette diversité s'étend également à l'expression protéique. En effet, une étude a montré l'hétérogénéité de certaines protéines de surface dans les différentes sous-populations de bactéries au sein du biofilm (Brady et al., 2007). Ces différentes sous-populations bactériennes présentes au sein



**Figure 13 : Réseau d'interaction des principaux régulateurs globaux de *S. aureus* (Jenul and Horswill, 2018).** Chez *S. aureus*, la régulation des facteurs de virulence est soumise à un réseau complexe qui intègre les signaux dérivés de l'hôte et de l'environnement dans une réponse coordonnée. Les systèmes à deux composants (Agr, SaeRS, ArlRS) permettent de percevoir les changements environnementaux et de les transformer en un programme de régulation. Couplé à ces différents systèmes de régulation, *S. aureus* possède également des facteurs de transcription cytoplasmiques (Rot, SarA, MgrA) qui peuvent à la fois réguler les systèmes à deux composants ou être régulés par ces derniers. Les facteurs de virulence associés à chaque voie de régulation sont également indiqués.

d'un biofilm mature permettent non seulement une meilleure adaptation aux conditions environnementales mais sont également associées à une résistance accrue aux agents antimicrobiens (Lewis, 2005, 2010; Archer et al., 2011).

#### 2.4.2.5 La dispersion

A partir de ce biofilm mature, des bactéries isolées ou des agrégats bactériens peuvent, à leur tour, se détacher pour assurer la dissémination des bactéries vers de nouveaux sites de colonisation (Figures 10 et 12). Ce détachement peut être causé par des forces mécaniques dues à un flux de liquide ou par l'expression des protéases et des PSM. Chez *S. aureus*, un certain nombre de régulateurs globaux contrôle l'expression de ces effecteurs de dispersion, notamment SarA, SigB et SaeRS (cf paragraphe II.2.5.1 Les systèmes à deux composants). Le mieux caractérisé reste le système *agr* (*Accessory Gene Regulator*), un système de régulation dépendant de la densité bactérienne et de l'accumulation de molécules signal appelées auto-inducteurs (cf paragraphe II.2.5.1.1 Le système *agr*). Les protéases impliquées dans cette étape de dispersion sont les protéines Aur, SspA et les staphopaines qui sont capables de dégrader les composants protéiques de la MEC telles que FnBPs, Bap et ClfB (Lister and Horswill, 2014; Moormeier and Bayles, 2017). Le caractère amphipatique des PSM leur permet d'agir comme un détergent à la surface des biofilms, conduisant à la dispersion (Peschel and Otto, 2013). En effet, des mutants isogéniques de *S. aureus* délétés pour la production de PSM $\alpha$ , de PSM $\beta$  or de Hld produisent un biofilm plus épais que leur souche parentale. De même, l'induction du système *agr* est corrélée à une dispersion du biofilm durant les phases tardives de son développement (Periasamy et al., 2012).

### 2.5 Régulation de la synthèse des facteurs de virulence et transition vers la forme biofilm

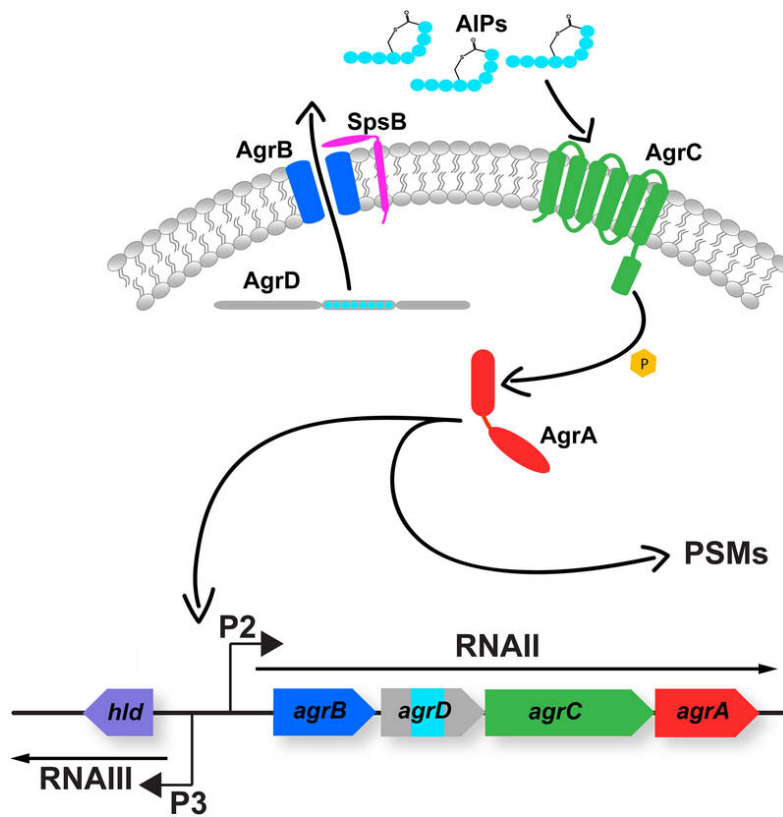
Afin d'assurer les fonctions décrites précédemment, la bactérie doit coordonner l'expression de ses facteurs de virulence de manière précise. Pour se faire, *S. aureus* dispose d'un réseau complexe de systèmes de régulation capables de répondre à une multitude de signaux provenant de son environnement ou de l'hôte colonisé (Figure 13). Deux groupes majeurs de régulateurs sont décrits chez *S. aureus* : les facteurs de transcription et les systèmes à deux composants (Jenul and Horswill, 2018).

#### 2.5.1 Les systèmes à deux composants

##### 2.5.1.1 Le système *agr*

Chez *S. aureus*, le système de régulation *agr* est à l'origine du « quorum sensing », une voie de communication inter-bactérienne. L'agrégation et la multiplication des bactéries





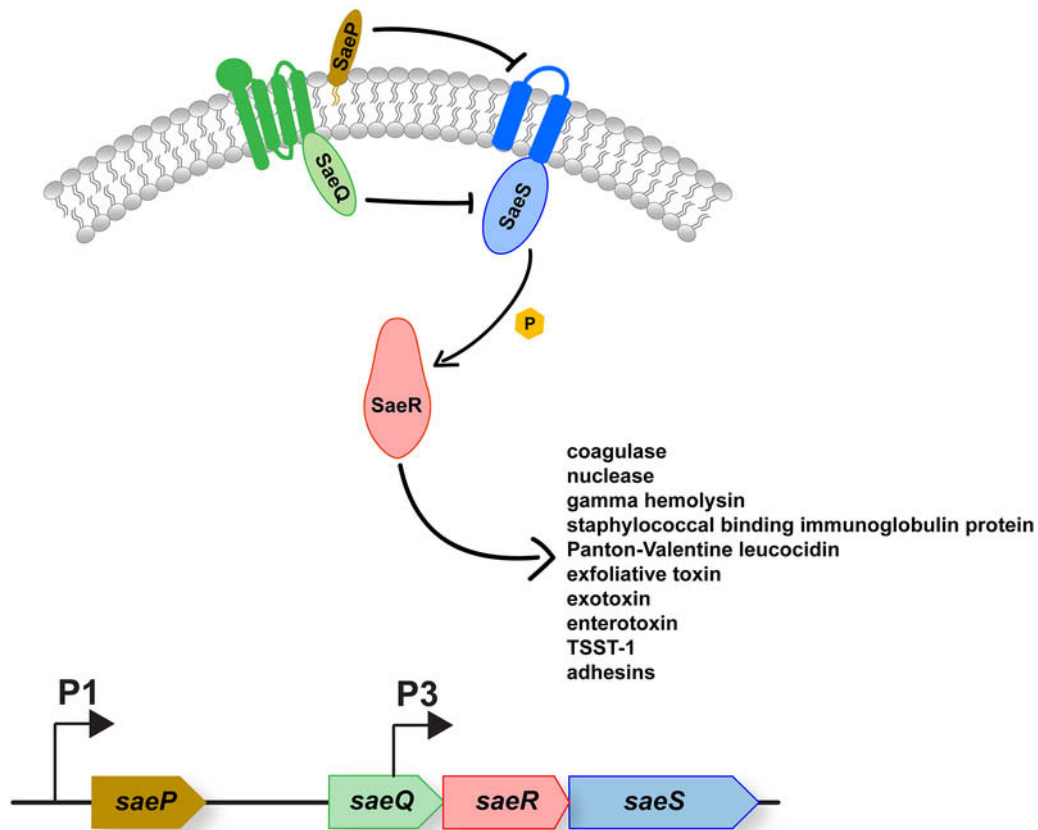
**Figure 14 : L'organisation du circuit de *quorum sensing* (QS) chez *S. aureus* (Jenul and Horswill, 2018).** Le système *agr* est constitué de deux transcrits adjacents, ARNII et ARNIII, dont l'expression est respectivement sous le contrôle des promoteurs P2 et P3. L'opéron codant ARNII est constitué de quatre gènes *agrABCD* codant les différents éléments du QS. Le gène *agrD* code un pro-peptide immature qui est clivé par la peptidase transmembranaire AgrB. Cette dernière assure également le transport du peptide mature dans le milieu extracellulaire. La fixation de l'AIP sur les domaines extracellulaires de l'histidine kinase transmembranaire AgrC induit l'autophosphorylation du résidu histidine en C-terminal de ce récepteur. Ce résidu phosphate est ensuite transféré sur le résidu aspartate de la protéine cytoplasmique AgrA. Sous sa forme phosphorylée, AgrA est capable de se lier aux promoteurs P2 et P3, induisant l'expression de l'ARNII et de l'ARNIII, ce qui amplifie l'induction de ce système et conduit à la régulation de l'expression des gènes ciblés par l'ARNIII. AgrA est également capable de promouvoir l'expression des PSM par une fixation directe aux promoteurs des opérons codant les PSM $\alpha$  et  $\beta$ .

conduit à l'accumulation du peptide signal AIP (*AutoInducing Peptide*) dans le milieu extracellulaire. Une fois la concentration seuil en AIP atteinte, le système de régulation *agr* est activé. De ce fait, ce système est faiblement exprimé en début de croissance, mais l'augmentation de la densité bactérienne à la fin de la phase exponentielle et de la phase stationnaire est couplée à l'induction de ce système (Jenul and Horswill, 2018).

L'ARNIII est l'effecteur principal de ce système (Figure 14). Il régule l'expression de certains gènes cible et code le PSM Hld. Il est impliqué dans la régulation d'un grand nombre de facteurs de virulence tels que les toxines et les protéines de surface. Cette régulation est médiée directement au niveau transcriptionnel ou au niveau traductionnel en interagissant directement avec le transcrite du gène cible. Ces interactions sont possibles grâce à la structure secondaire complexe de l'ARNIII qui est composée de plusieurs motifs en tige-boucle riches en cytosine. Ces régions sont reconnues comme initiant l'interaction avec la séquence Shine-Dalgarno des ARNm cibles qui pourrait avoir plusieurs effets selon l'ARNm. Par exemple, l'hybridation de l'ARNIII avec l'ARNm codant la Hla conduit à une déformation du motif en tige boucle de l'ARNm, permettant ainsi la reconnaissance du ribosome au site d'initiation de la traduction (Gupta et al., 2015). De manière inverse, cette hybridation peut également empêcher la fixation du ribosome sur l'ARNm, comme c'est le cas pour l'ARNm de la protéine A (Benito et al., 2000). La régulation par l'ARNIII se fait également de manière indirecte *via* son interaction avec des ARNm de régulateurs globaux tels que *rot*, *SarHI* et *SarT* (cf paragraph II.2.5.2 Les facteurs de transcription).

#### 2.5.1.2 WalKR

Le locus *walKR* est un système à deux composants essentiel à la viabilité de *S. aureus*. Il est principalement impliqué dans la régulation du métabolisme de la paroi bactérienne, mais a également été décrit dans la formation du biofilm. En particulier, la fixation de WalR aux promoteurs des autolysines AtIA et LytM augmente leur expression, permettant une modification de la composition de la paroi cellulaire. Ces modifications ont été associées à une diminution de l'efficacité de certains antibiotiques (Wu et al., 2020). Dans un modèle murin d'infection par la souche HG001, l'expression constitutive de WalR a cependant été associée à une induction de la réponse inflammatoire et à une meilleure clairance bactérienne. Cette souche présentait également une activation du système *saeSR*, conduisant à une régulation positive des gènes codant les FnBP, les leukotoxines et les protéines impliquées dans l'évasion immunitaire telles que CHIPS et SCIN (Delauné et al., 2012).



**Figure 15 : L'organisation moléculaire du système SaeRS (Jenul and Horswill, 2018).** L'activation de ce système a été démontré en réponse à certaines protéines des PNN telles que les HNP1 à 3 (*Human Neutrophil Peptide1-3*) et la calprotectine. L'histidine-kinase SaeS (bleu) phosphoryle son régulateur de réponse SaeR (rouge). Le SaeR phosphorylé peut alors se lier à la région promotrice des gènes cibles et induire l'expression de nombreux facteurs de virulence. Le système est inhibé par l'action combinée de SaeP (marron) et de SaeQ (vert). L'opéron *sae* se compose de quatre gènes, *saeP*, *saeQ*, *saeR* et *saeS*. Les quatre gènes sont transcrits à partir du promoteur P1. De plus, la quantité de transcrits de *saeS* et de *saeR* est augmentée *via* la transcription à partir du promoteur P3 qui est situé dans la région codante de *saeQ*.

### 2.5.1.3 SaeSR

L'organisation du système à deux composants SaeRS ressemble à celle du système *agr* (Figure 15). Il est composé de l'histidine kinase transmembranaire SaeS et du régulateur de la réponse SaeR. L'opéron codant ce système contient 4 gènes *saeP*, *saeQ*, *saeR* et *saeS*. Ces 3 derniers sont sous le contrôle du promoteur P3, mais l'autoinduction du promoteur P1 par le système conduit également à l'expression des 4 gènes (Jenul and Horswill, 2018). Cet opéron est inhibé à pH faible (5,5), et lorsque la concentration en sels est augmentée (NaCl 1M) (Weinrick et al., 2004; Geiger et al., 2008). De plus, il a été montré que la présence d'acides gras d'origine humaine inhibe l'induction du système *saeRS* (Neumann et al., 2016). Cet effet inhibiteur n'a pas été observé chez une souche mutante *saeP*, suggérant son rôle dans la régulation de SaeRS (Adhikari and Novick, 2008). Son activation augmente l'expression de plusieurs exoprotéines essentielles à la virulence de *S. aureus*.

### 2.5.1.4 SrrAB

La régulation des facteurs de virulence par le système à deux composants *srrAB* (*Staphylococcal Respiratory Regulator*) a d'abord été décrite dans des conditions de faible concentration en oxygène. Le locus *srrAB* code l'histidine kinase SrrB et le régulateur de réponse SrrA. Une étude récente a montré que SrrAB confère une résistance au peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) *via* une régulation positive des gènes codant une catalase et une réductase impliquées dans la résistance des bactéries au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Mashruwala and Boyd, 2017). Les mutants *srrAB* sont également atténués dans leur capacité à former un biofilm. En effet, l'activation de ce système conduit à une diminution de la concentration en transcrit du gène d'autolysine *atlA*, empêchant l'accumulation de l'ADNe par la lyse bactérienne (Mashruwala et al., 2017).

### 2.5.1.5 ArlRS

Le locus *arl* (*Autolysis Regulated Locus*) a été décrit comme un répresseur impliqué dans l'inhibition du processus d'autolyse. Il intervient également dans la répression du système *agr* en diminuant l'expression de RNAII et de RNAIII. La protéine responsable de cette régulation est la protéine ArlR ; elle est capable de se lier aux séquences spécifiques de l'ADN en amont des promoteurs des gènes cibles. ArlS est la protéine transmembranaire, mais le signal environnemental détecté par ce système n'est pas connu. L'induction de ce système chez *S. aureus* conduit à une régulation positive des sérine protéases extracellulaires (Fournier et al., 2001). D'un point de vue métabolique, ArlRS active les gènes permettant l'utilisation des acides aminés comme source de carbone, conférant aux bactéries une résistance contre la calprotectine. Cette dernière est un peptide antimicrobien possédant un effet inhibiteur de la croissance de *S.*

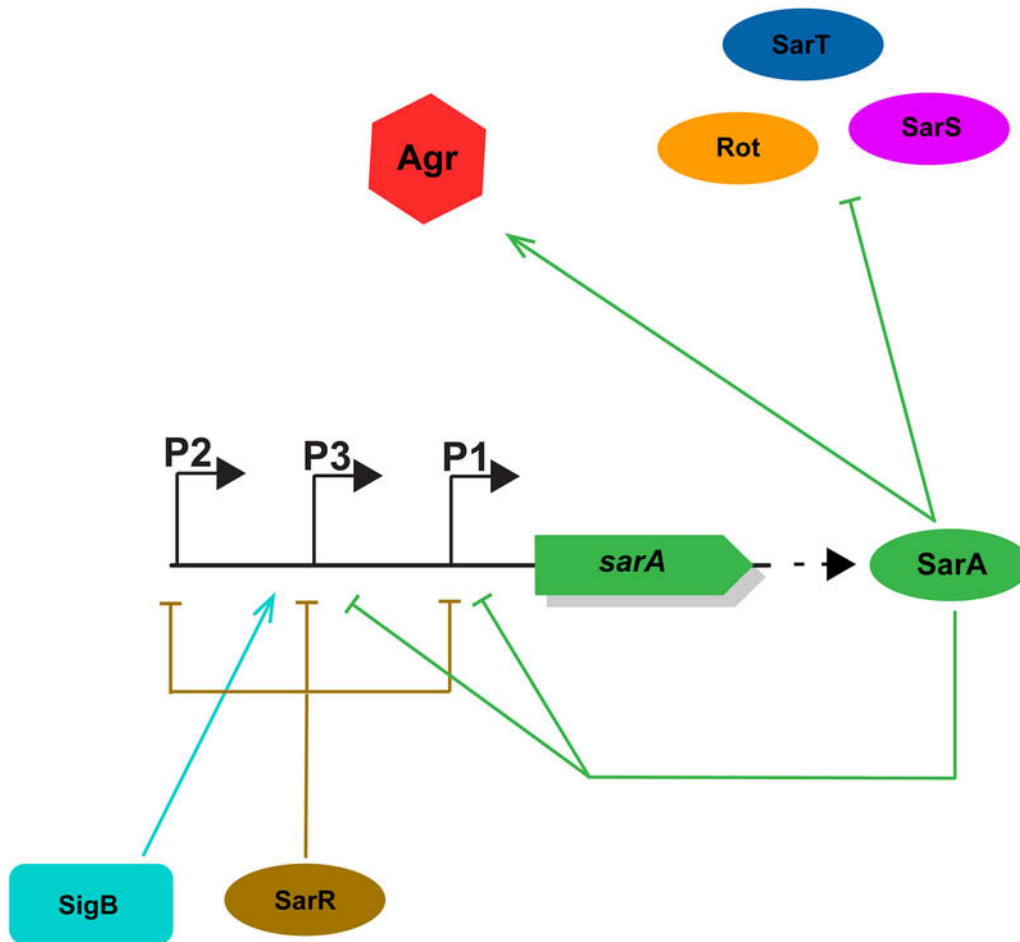


*aureus* plus marqué lorsque le glucose est utilisé comme source d'énergie principale (Corbin et al., 2008).

### 2.5.2 Les seconds messagers nucléotidiques

Chez la plupart des bactéries, la carence en nutriments provoque la réponse stringente, une réponse initiée par la synthèse rapide des alarmones avec notamment le guanosine tétraphosphate (ppGpp) et le pentaphosphate (pppGpp), également appelés (p)ppGpp. Chez *S. aureus*, (p)ppGpp est synthétisé par l'enzyme RSH (*RelA/SpoT Homologue*) lors d'une carence en acides aminés ou par les deux alarmones synthétases RelP et RelQ lors d'un stress exercé au niveau de la paroi bactérienne. La synthèse de (p)ppGpp s'accompagne d'une diminution de la concentration en guanosine triphosphate intracellulaire, ce qui conduit à une régulation négative de plusieurs processus métaboliques et une inhibition de la répression du système *agr*. Cependant, la contribution de ces alarmones à la virulence de *S. aureus* semble être *agr* indépendante. *In vitro*, la production d'alarmones RSH dépendante induit une augmentation de l'expression des gènes *psm*, indépendamment du système *agr*, et est corrélée à une meilleure survie bactérienne au sein des PNN (Geiger et al., 2012). De la même manière, Salzer et al. ont montré que le (p)ppGpp favorise la formation du biofilm chez la souche HG001 délétée pour le système *agr* (Salzer et al., 2020).

Le di-adénosine monophosphate cyclique (c-di-AMP) est une molécule de second messenger récemment découverte, et principalement produite principalement par des bactéries à Gram-positif (Corrigan et al., 2011). Chez *S. aureus*, le c-di-AMP est synthétisé à partir de deux molécules d'ATP par l'enzyme diadénylate cyclase. Les souches bactériennes ne possédant pas l'enzyme responsable de la dégradation des c-di-AMP, la phosphodiesterase GdpP, possèdent des concentrations intracellulaires élevées en cette molécule, ce qui entraîne un défaut de croissance mais aussi une résistance accrue au stress acide et aux antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines (Zeden et al., 2018). Corrigan et al. ont également montré une augmentation de la biomasse du biofilm chez une souche déficiente en phosphodiesterase GdpP (Corrigan et al., 2011). Ces résultats montrent un mécanisme de résistance et d'adaptation à un environnement acide comparables à ceux décrits pour la survie bactérienne à l'intérieur des phagolysosomes, même si un lien direct n'a pas été démontré (Zhou and Fey, 2020).



**Figure 16 : La région promotrice de SarA et son réseau de régulation (Jenul and Horswill, 2018).** SarA est exprimé à partir de trois promoteurs différents, conduisant à l'expression de trois transcrits chevauchants. SarA se lie à son propre promoteur et régule automatiquement sa propre expression. Le facteur sigma B (bleu) entraîne l'expression de *sarA* (vert) en se liant au promoteur P3. La liaison de SarR (marron) aux trois promoteurs inhibe la transcription de *sarA* et empêche l'autorégulation par SarA. Enfin, SarA est un activateur du système Agr (rouge) et peut également fonctionner comme un régulateur négatif des trois protéines SarH1, SarT et Rot.

### 2.5.3 Les facteurs de transcription

#### 2.5.3.1 La famille des protéines SarA

##### SarA

La protéine SarA (*Staphylococcal Accessory Regulator A*) est produite tout au long de la croissance bactérienne et module l'expression de nombreux gènes de manière indirecte ou directe. Il a été montré que la fixation de cette protéine dans la région promotrice du système *agr* est associée à l'activation de l'expression des gènes codant les hémolysines, mais à la répression du gène codant la Protéine A (Figure 16). SarA est également connue pour son rôle dans la régulation de la synthèse des protéases. En effet, l'inactivation du locus *sarA* conduit à une augmentation de la production des protéases extracellulaires, ayant pour effet une diminution de la capacité de *S. aureus* à former des biofilms, ainsi qu'une diminution de l'accumulation de Hla, des PSM et de certaines molécules de surface. Dans des modèles d'infection sur cathéter *in vivo*, la virulence du mutant *sarA* est diminuée (Zielinska et al., 2012).

##### SarR

SarR est un homologue de la protéine SarA possédant globalement les effets inverses à ceux de SarA. Elle se lie aux promoteurs du locus *sarA* afin d'inhiber sa transcription. Elle possède également une affinité augmentée pour la région promotrice du système Agr comparée à SarA, conduisant à une saturation et à une répression des régions promotrices.

##### SarT et SarU

La transcription de *sarT* est réprimée par SarA et par le système Agr. Chez un mutant *sarT*, la quantité d'ARNIII du système *agr* est augmentée, ce qui témoigne d'une boucle de rétroaction négative entre ces deux composants. De plus, SarT est également un régulateur négatif de *sarU* via sa liaison à la région promotrice de ce gène. Contrairement à SarT, l'expression de l'ARNIII est diminuée chez un mutant *sarU*, indiquant un rôle opposé de cette protéine dans la régulation du système Agr (Jenul and Horswill, 2018).

##### SarH1

SarH1, appelé encore SarS, est également réprimée par SarA et par le système Agr, tout comme SarT. Cependant, ce dernier active l'expression de SarH1, conduisant à une répression de la production de Hla et de ETA, avec une régulation positive du gène codant la Protéine A. L'activité de cette protéine a été démontrée durant la phase exponentielle de la croissance





bactérienne, mais est ensuite réprimée en phase post-exponentielle par l'action double de SarA et de Agr.

### Rot

La protéine Rot (*Repressor Of Toxins*) intervient dans la régulation d'un grand nombre de gènes. Une analyse par puces à ADN a montré que Rot activerait plus de 80 gènes et en réprimerait plus de 60. Par exemple, elle réprime l'expression de l'exfoliatine ETB, tout en augmentant celle de la Protéine A et de SarH1, *via* une fixation directe à leur promoteur. Rot interagit également avec le système Agr. En effet, l'ARNIII inhibe l'expression du gène *rot*. De plus, la synthèse de Rot est réprimée pendant la phase stationnaire par une liaison directe de SarA et du Facteur Sigma B ( $\sigma^B$ ) à son promoteur (Saïd-Salim et al., 2003).

### MgrA

Le facteur de transcription MgrA est impliqué dans la régulation positive de la synthèse des exoprotéines telles que les protéases, les nucléases et les leukotoxines, mais dans la répression de la synthèse des protéines de surface comme la Protéine A, la FnbB et la SasG. Elle possède donc certaines activités similaires au système de régulation Agr. Cependant, il a été montré que la délétion de *mgrA* induit soit la stimulation, soit l'inhibition de la formation du biofilm. Ces effets opposés pourraient s'expliquer par le recours à des souches différentes au cours des études réalisées (Jenul and Horswill, 2018).

#### 2.5.3.2 Le facteur Sigma B

Les facteurs sigma permettent à l'ARN polymérase de reconnaître des régions promotrices spécifiques et sont nécessaires à l'initiation de la transcription. Alors que les facteurs primaires régulent l'expression des gènes de ménage, les facteurs alternatifs permettent à *S. aureus* de répondre aux variations de l'environnement. Chez *S. aureus*, le facteur  $\sigma^B$  est connu pour réguler l'expression d'environ 200 gènes durant la phase stationnaire de croissance, avec des gènes impliqués dans la réponse au stress, notamment ceux des gènes codant les facteurs de virulence, ou des gènes impliqués dans la formation du biofilm, la persistance bactérienne et la résistance aux antibiotiques. Globalement, le facteur  $\sigma^B$  réprime l'expression de certains facteurs de virulence comme les protéases, la Hla, et la TSST-1. Ces régulations peuvent avoir lieu de manière indirecte en faisant intervenir d'autres systèmes de régulation tels que le système *agr* et *sarA* (Tuchscher et al., 2015).



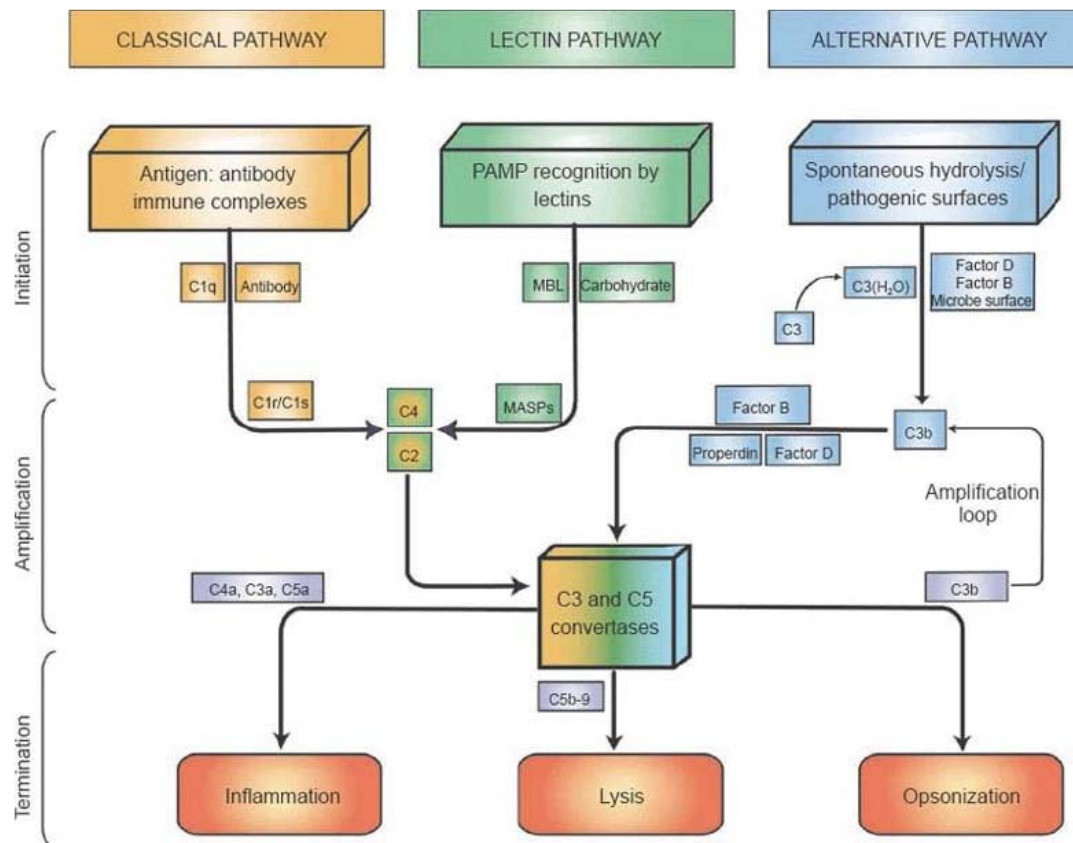
## 2.6 Rôle du biofilm *in vivo*

La formation du biofilm va contribuer à la persistance de la bactérie chez son hôte et à la chronicisation de l'infection par *S. aureus*. Une fois établies, les bactéries intégrées dans un biofilm bénéficient d'un certain nombre d'avantages comparées aux bactéries sous la forme planctonique. La MEC est capable de séquestrer et de concentrer les nutriments environnementaux tels que le carbone, l'azote et le phosphate (Beveridge et al., 1997). De plus, les bactéries du biofilm sont résistantes aux traitements antimicrobiens comme les antibiotiques qui pénètrent difficilement les biofilms (Hall-Stoodley and Stoodley, 2009). Singh *et al.* ont montré par exemple une pénétration limitée des  $\beta$ -lactamines et de la vancomycine au sein des biofilms de *S. aureus* et de *S. epidermidis* (Singh et al., 2010). Le phénotype dormant de certaines bactéries au sein du biofilm contribue également à cette résistance aux agents antibactériens par un mécanisme autre que celui classiquement décrit (Lewis, 2010). Les biofilms constituent également une barrière physique pour les effecteurs du système immunitaire, notamment pour les phagocytes, empêchant ainsi la phagocytose et la clairance bactérienne ; on parle de « phagocytose frustrée » (Costerton et al., 1999). Plusieurs études ont montré la capacité des biofilms de *S. aureus* à moduler la réponse inflammatoire vers un profil anti-inflammatoire (cf paragraphe III.3 L'immuno-échappement par le staphylocoque : mécanismes) (Thurlow et al., 2011; Hanke and Kielian, 2012; Gries and Kielian, 2017; Heim et al., 2020). Ainsi, les biofilms à *S. aureus* sont impliqués dans de multiples infections récurrentes : ostéomyélites, endocardites, infections cutanées chroniques ou encore dans des infections sur implants médicaux (Archer et al., 2011).

## III. La réponse immunitaire innée dirigée contre *Staphylococcus aureus*

### 1. Introduction

La réponse immunitaire désigne l'ensemble des mécanismes développés par l'organisme pour se protéger notamment des agressions microbiennes et des proliférations malignes. On appelle système immunitaire l'ensemble des cellules et tissus de l'hôte assurant cette réponse immunitaire. Les cellules du système immunitaire sont appelées, de manière générale, les leucocytes. Ce système participe ainsi au maintien de l'intégrité de l'organisme en évoluant constamment face aux multiples micro-organismes présents dans l'environnement et aux stratégies qu'ils ont développés pour contrecarrer celles de l'hôte. Cependant, de nombreux micro-organismes font partie de notre flore commensale et sont donc nécessaires à notre



**Figure 17 : Les trois voies d'activation du système du complément (Dunkelberger and Song, 2010).** Le système du complément peut être activé par trois voies principales : la voie classique, la voie des lectines et la voie alterne. La voie classique est initiée par la reconnaissance du complexe antigène-anticorps par la sous-unité C1q du complexe C1. Ce dernier est capable d'interagir directement avec le pathogène de manière anticorps indépendant. Le complexe C1 est également composé de deux sérine protéases, C1s et C1r, qui sont activées à la suite de cette reconnaissance. Cette activation conduit au clivage de C4 et C2, puis à la formation de la C3 convertase composée des sous-unités C4b et C2a. Cette convertase est la même pour la voie des lectines. Dans ce cas, le clivage de C4 et C2 se produit après la liaison de certains résidus glycosidiques, comme le mannose, le NAG et le fucose qui se trouvent dans la paroi PGN ou sur les WTA et LTA, et par la lectine liant le mannose (MBL). La MBL est associée aux deux sérines protéases, MASP-1 et MASP-2 (*MBL ASSociated Protein*), qui exercent le même rôle que C1s et C1r. La C3 convertase ainsi formée clive ensuite C3 en C3a et C3b. Cette dernière peut elle-même s'associer à la C3 convertase pour former la C5 convertase, C4bC2aC3b, qui à son tour clive la fraction C5 en C5a et C5b. La voie alternative (AP) est activée suite à l'autohydrolyse de C3 et au clivage du facteur B en Bb et Ba par le facteur D. La C3 convertase de l'AP, C3bBb se forme par la suite directement à la surface bactérienne. Le recrutement d'une autre molécule de C3b conduit à la formation de la C5 convertase de l'AP, C3bBbC3b. La présence de C3b sert également à amplifier l'activation du complément par l'AP. Les trois voies aboutissent à la formation des convertases, qui à leur tour génèrent les principaux effecteurs du système du complément : les anaphylatoxines (C4a/C3a/C5a), le complexe d'attaque membranaire (MAC) et les opsonines (par exemple, C3b).

équilibre, impliquant la capacité du système immunitaire à faire la distinction entre antigènes du soi, et intrus/micro-organismes/antigènes du non-soi. Les micro-organismes responsables d'infections sont qualifiés de « pathogènes ». Toute réponse immunitaire débute par la reconnaissance de l'agent infectieux par le système immunitaire pour ensuite développer des réponses adaptées destinées à l'éliminer. Les réponses mises en place dépendent alors de la nature de l'agent infectieux, de la localisation de l'infection et de la génétique de l'hôte (Monie, 2017a).

Les premières barrières de défense de l'organisme sont la peau et les muqueuses. Elles permettent la protection du milieu intérieur vis à vis de l'extérieur. La pénétration des micro-organismes au travers de ces barrières déclenche la première ligne de défense du système immunitaire : la réponse immunitaire innée. Celle-ci, constituée principalement du système du complément et de cellules phagocytaires, permet à l'organisme de se défendre de manière « innée » et immédiate. Elle est génétiquement héritée et donc présente dès la naissance. L'immunité innée est ainsi qualifiée de « naturelle » mais aussi de « non spécifique » car ses modes d'action sont invariables et ne s'adaptent pas aux micro-organismes rencontrés. Elle se mobilise rapidement en tout point de l'organisme, et assure la défense de l'hôte en combattant directement le pathogène ou en informant l'organisme de sa présence. Grâce à des systèmes de défense moléculaires et cellulaires, une deuxième ligne de défense plus spécifique se met en place à la suite de cette première réponse : l'immunité adaptative, impliquant des cellules lymphocytaires. La coopération de ces systèmes de défense par interaction directe ou par l'intermédiaire de médiateurs cellulaires tels que des cytokines et des chimiokines permet ainsi un meilleur contrôle de l'infection (Monie, 2017a). Dans ce manuscrit, nous nous concentrerons uniquement sur la réponse immunitaire innée dirigée contre *S. aureus*.

## 2. Les effecteurs de la réponse immunitaire innée

### 2.1 Le système du Complément

Le système du complément est l'un des premiers mécanismes à se mettre en place suite à l'entrée d'un agent pathogène dans l'organisme. Il s'agit d'un réseau complexe de plus de trente protéines sériques et membranaires qui peuvent déclencher des réponses immunitaires inflammatoires et cytolytiques efficaces contre des organismes infectieux (bactéries, virus, parasites). La majorité des protéines du complément sont plasmatiques et s'activent selon différents modes de reconnaissance de micro-organismes (Monie, 2017b). On distingue 3 voies majeures d'activation du complément (Figure 17) :



- la voie classique, activée par la reconnaissance d'un complexe antigène-anticorps
- la voie alterne, activée par la reconnaissance directe des micro-organismes
- la voie des lectines, activée par la reconnaissance de certains sucres à la surface des micro-organismes.

L'activation des trois voies aboutit à la formation des convertases, qui à leur tour, génèrent les principaux effecteurs du système du complément conduisant à l'induction de l'inflammation, la lyse directe de l'agent pathogène ainsi que son opsonisation. En effet, les fractions C3a et C5a sont considérées comme des anaphylatoxines : elles induisent des réactions caractéristiques de l'anaphylaxie. Ces deux peptides se fixent sur les récepteurs couplés aux protéines G, C3aR et C5aR, qui sont présents à la surface des PNN et des MO/MΦ, ce qui stimule la chimiotaxie de ces phagocytes, et conduit à leur activation (production de cytokines, de ROS et dégranulation) (Dunkelberger and Song, 2010). La lyse de l'agent pathogène est médiée par le complexe d'attaque des membranes (MAC). Ce dernier est formé à partir de la fraction C5b qui induit le recrutement des autres composants (C6-C9) formant un pore dans la membrane plasmique de la bactérie, et conduisant à la mort de cette dernière par choc osmotique. Cependant, le CAM n'est pas efficace sur les bactéries à Gram positif en raison de leur épaisse paroi. Enfin, la fraction C3b joue un rôle d'opsonine en se fixant à la surface de la bactérie afin de permettre sa reconnaissance par les phagocytes (Monie, 2017b).

## 2.2 Les composants cellulaires de la réponse immunitaire innée dirigée contre *Staphylococcus aureus*

### 2.2.1 Reconnaissance de *Staphylococcus aureus*

La reconnaissance de *S. aureus* par les cellules du SALT est médiée par les PRR (*Pattern Recognition Receptors*). Ce sont des récepteurs des cellules de l'hôte qui reconnaissent différents composants bactériens tels que, dans le cas de *S. aureus*, les WTA et LTA, le PGN, les lipopeptides et l'ADN. Ces molécules sont regroupées sous l'appellation PAMP (*Pathogen Associated Molecular Patterns*). Plusieurs PRR ont été impliqués dans la reconnaissance des composants de *S. aureus*, mais le TLR2 (*Toll-Like Receptor*) et NOD2 (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2*) sont les mieux caractérisés dans le contexte des infections cutanées par cette bactérie. Le TLR2 se trouve sur la membrane cellulaire de la cellule hôte et s'hétérodimérise avec le TLR1 et le TLR6 pour reconnaître les lipopeptides triacylés et diacylés (comme le LTA qui est diacylé) respectivement. Les TLR 1, 2 et 6 se trouvent sur la membrane cellulaire de différents types cellulaires de la peau, notamment les



<b>Peptide antimicrobien</b>	<b>Source</b>	<b>Effet chimiotactique</b>	<b>Régulation</b>
<b>Défensines <math>\beta</math> (HBD)</b>	Kératinocytes M $\Phi$ DC Fibroblastes	DC Lymphocytes T	Cytokines pro-inflammatoires, TLR, Récepteur de facteurs de croissance.
<b>Cathélicidine (LL-37)</b>	Kératinocytes M $\Phi$ PNN Glandes sudoripares Mastocytes Adipocytes Fibroblastes	PNN MO Lymphocytes T	Cytokines pro-inflammatoires, TLR, Vitamine D
<b>RNase7</b>	Kératinocytes		Cytokines pro-inflammatoires, TLR
<b>REG3A</b>	Kératinocytes		
<b>Dermcidine</b>	Glandes sudoripares		Constitutive
<b>Défensines <math>\alpha</math> (HNP)</b>	PNN	M $\Phi$ DC Lymphocytes T	Constitutive
<b>Calprotectine (psoriasine)</b>	PNN Kératinocytes		Constitutive et inducible

**Tableau 3 : Les AMP à activité antimicrobienne contre *S. aureus*, leurs cellules sécrétrices, les cellules sur lesquelles elles peuvent induire un effet chimiotactique, et les facteurs activant leur expression (Liu et al., 2018).**

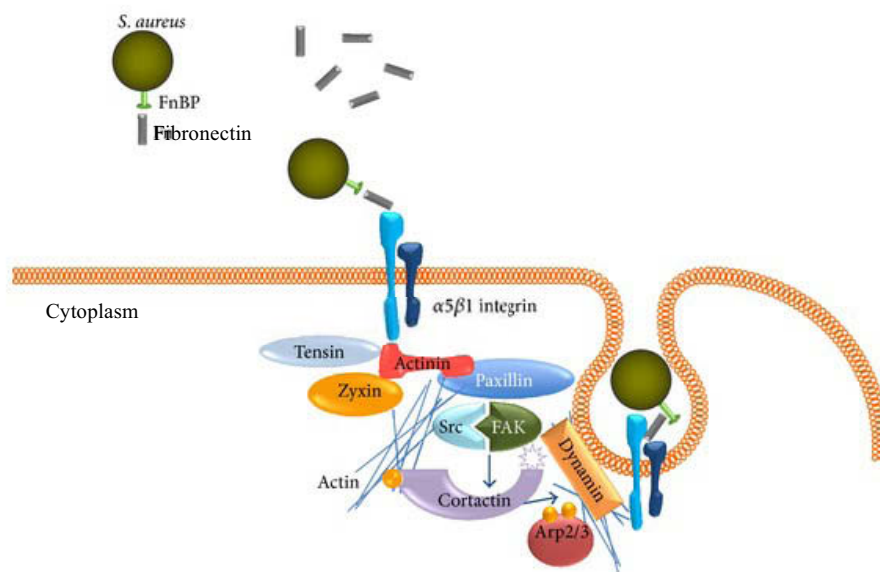
kératinocytes, les LC, les MO/MΦ, les DC, les mastocytes, les cellules endothéliales, les fibroblastes et même les adipocytes. Ainsi, de nombreux types cellulaires de la peau sont capables de contribuer à la défense de l'hôte contre *S. aureus*. D'autre part, le TLR9 présent au niveau de la membrane des endosomes participe à la reconnaissance des motifs CpG de l'ADN double brin de *S. aureus*. NOD2 est également un PRR intracellulaire. Il reconnaît le muramyl dipeptide, un produit de dégradation du PGN de *S. aureus* (Pietrocola et al., 2011; Liu et al., 2018). Les TLR et NOD2 conduisent à l'activation du facteur de transcription NF-κB qui initie la production de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines, de molécules d'adhésion et d'AMP impliqués dans la défense de l'hôte contre les infections cutanées à *S. aureus* (Tableau 3). Or, les souris déficientes en TLR2 et NOD2 sont plus susceptibles aux infections cutanées par *S. aureus* (Miller et al., 2006; Hruz et al., 2009); cette reconnaissance et les événements qui en découlent constituent une étape importante de la réponse immunitaire innée dirigée contre *S. aureus*.

#### 2.2.2 Internalisation de *Staphylococcus aureus* par une cellule non phagocytaire

*S. aureus* envahit différents types de cellules non phagocytaires comme les cellules épithéliales et endothéliales, les fibroblastes et les kératinocytes. Ces cellules internalisent activement la bactérie après son adhésion à leur surface. Cette adhésion est médiée soit par les TLR membranaires, soit par liaison des intégrines aux adhésines présentes au niveau de la paroi cellulaire (Figure 18). Après leur internalisation, les bactéries sont détectées au sein de vésicules d'endocytose assimilées aux phagosomes des phagocytes. Malgré l'absence de propriétés microbicides de ces vésicules, celles-ci peuvent acidifier leur contenu jusqu'à un pH égal à 4,5 et posséder certains marqueurs endosomaux. En effet, ces vésicules présentent initialement le marqueur d'endosome précoce Rab5, puis mûrent en endosome tardifs possédant les marqueurs membranaires Rab7 et LAMP1. Cependant, la capacité d'acidification et de fusion de ces vésicules d'endocytose avec les lysosomes sont variables ; elles peuvent être le reflet d'effets spécifiques cellule-hôte dépendants et souche bactérienne dépendants (Alva-Murillo et al., 2014; Horn et al., 2018).

#### 2.2.3 Les kératinocytes

La contribution des kératinocytes à la réponse inflammatoire a été largement étudiée. Dans la peau humaine, les kératinocytes expriment presque tous des TLR intracellulaires et extracellulaires, et sont une source majeure d'AMP tels que les défensines β (HBD-1, HBD-2 et HBD-3 chez l'Homme ou MBD chez la souris), les cathélicidines (LL-37), la psoriasine et la RNase7 qui ont une activité bactériostatique ou bactéricide vis-à-vis de *S. aureus*.



**Figure 18 : Internalisation de *S. aureus* par les cellules non-phagocytaires (Alva-Murillo et al., 2014).** En plus de la reconnaissance par les TLR, les phagocytes non professionnels peuvent aussi interagir avec les bactéries *via* les intégrines présentes à leur surface. Parmi les MSCRAMM, les FnBP ont un rôle essentiel dans l'internalisation de *S. aureus* par les cellules hôtes. Les FnBP se lient à la fibronectine de la matrice extracellulaire, assurant l'adhésion du staphylocoque. La fibronectine recrute les intégrines  $\alpha5\beta1$  et permet d'assurer le pontage entre les FnBP de *S. aureus* et les intégrines présentes à la surface de la cellule. L'activation de l'intégrine  $\alpha5\beta1$  induit le recrutement d'un complexe multiprotéique permettant la réorganisation du cytosquelette grâce à son interaction avec les polymères d'actine. Ce complexe est composé d'actinine, de paxilline, de zyxine, de tensine, de kinase d'adhésion focale (FAK), et de Src kinase. La phosphorylation de la cortactine, une protéine liant l'actine, par ces deux kinases permet son interaction avec le complexe Arp2/3 pour favoriser la polymérisation de l'actine. Il est proposé que l'association de la dynamine à la cortactine conduit à la formation d'une vésicule d'endocytose permettant l'internalisation de la bactérie.

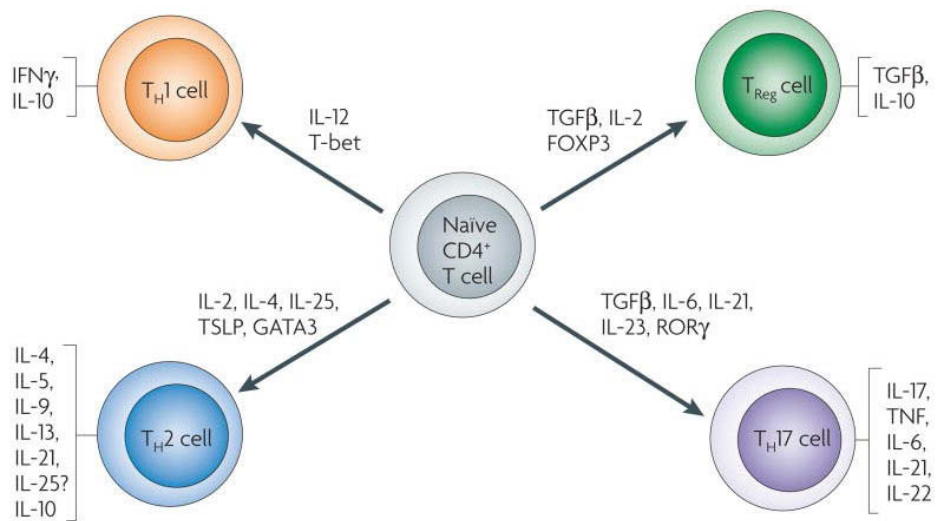
L'expression des AMP peut être induite par des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$ , l'IL-17 et l'IL-22, après contact avec la bactérie ou au cours de la cicatrisation (Miller and Cho, 2011; Bitschar et al., 2017). Les kératinocytes produisent une large variété de cytokines telles que les cytokines de la famille IL-1 $\alpha/\beta$ , l'IL-6, le TNF $\alpha$  et l'IL-10. A l'état basal, ces cellules produisent de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18 sous leur forme inactive. L'activation de l'inflammasome suite à une infection par *S. aureus* conduit à l'activation de ces cytokines. Ces dernières jouent alors un rôle dans le recrutement des PNN au site de l'infection, dans l'activation des lymphocytes T et des DC, ainsi que dans l'expansion clonale des lymphocytes B (Miller et al., 2007; Quaresma, 2019). Certaines études ont démontré l'implication du TLR3 des kératinocytes humains et de son ligand, l'ARN double brin, dans la production d'IL-8, de TNF $\alpha$ , d'IL-18 et d'interféron de type I (IFN $\alpha/\beta$ ), favorisant une réponse immunitaire pro-inflammatoire de type Th1 (Figure 19) (Lebre et al., 2003; Prens et al., 2008). L'expression des chimiokines CXCL1 et CXCL8 par les kératinocytes joue un rôle dans le recrutement des PNN vers l'épiderme, alors que CCL2 (*C-C motif Chemokine Ligand 2*), connu sous le nom de MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1*) favorise le recrutement des MO circulants (Niebuhr et al., 2010; Bitschar et al., 2017; Quaresma, 2019).

#### 2.2.4 Les fibroblastes

Les fonctions immunomodulatrices des fibroblastes ont également été bien décrites. Classiquement, elles interviennent dans la production des fibres de collagène et d'élastine de la peau et participent à la dégradation de la matrice extracellulaire de l'hôte. Tout comme les kératinocytes, elles expriment plusieurs PRR et synthétisent certains AMP (LL-37, HBD-1 et HBD-2) (Bautista-Hernández et al., 2017). Kirker et al., ont montré que les fibroblastes cutanés humains peuvent synthétiser des cytokines et des facteurs de croissance tels que l'INF $\gamma$ , l'IL-6, l'IL-8, le TGF $\beta$  et le VEGF lorsqu'ils sont exposés à des surnageants de cultures de *S. aureus* sous forme planctonique ou en biofilm (Kirker et al., 2012).

#### 2.2.5 Les cellules endothéliales

L'endothélium constitue l'une des premières lignes de défense contre les agents infectieux présents dans le sang. A l'échelle cellulaire, les cellules endothéliales jouent un rôle clé dans le recrutement des cellules immunitaires du sang vers les tissus infectés par l'expression de diverses molécules d'adhésion, de cytokines et de chimiokines. L'endothélium constitue l'une des premières lignes de défense contre les agents infectieux dans le sang. Au cours de la phase initiale de l'inflammation, les cellules endothéliales expriment les TLR (principalement TLR2 et TLR4) à de faibles concentrations. L'activation de ces cellules conduit à une expression plus



**Figure 19 : Développement et fonction de la lignée cellulaire T auxiliaire (Anthony et al., 2007).** Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs peuvent se différencier en plusieurs types de cellules effectrices et régulatrices au cours d'une infection. Les cytokines produites par les DC présentatrices d'antigènes régulent le devenir des lymphocytes T auxiliaires (Th1, Th2, Th17, T reg). Des cytokines et des facteurs de transcription spécifiques contribuent à la différenciation et à l'expansion de ces populations cellulaires. Leur activation joue un rôle majeur pour déterminer si une réponse immunitaire contribuera à la protection de l'hôte ou à l'inflammation « pathologique ». L'induction d'une réponse Th1 et Th17 contribue à l'inflammation et à la mise en place d'une réaction de défense antibactérienne et antivirale. La réponse Th17 contribue également à la réparation tissulaire. La réponse Th2 induit une réponse adaptative humorale (médiée par les lymphocytes B) et contribue à la mise en place d'une réponse antiparasitaire alors que les T reg participent à l'inhibition de la réponse pro-inflammatoire et au maintien de l'homéostasie.

élevée de TLR2 et de TLR4, et aussi des sélectines E et P à leur surface. Ces adhésines sont exprimées de manière constitutive au niveau des membranes des cellules endothéliales. Une augmentation de leur expression favorise l'interaction entre ces molécules et les leucocytes sanguins, permettant leur recrutement au site d'infection. Lors d'une infection par *S. aureus*, l'activation des cellules endothéliales par les cytokines du milieu inflammatoire comme le TNF $\alpha$ , l'IFN $\gamma$  et l'IL-1 $\beta$  conduit à l'augmentation de l'expression d'autres adhésines à la surface de la cellule comme VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) et ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*), mais aussi certaines cytokines/chimiokines telle que l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, CCL2 et CCL5 (Beekhuizen and van de Gevel, 2007; Quresma, 2019).

### 2.2.6 Les cellules myéloïdes

#### 2.2.6.1 Les cellules de Langerhans

En plus du TLR2, les LC expriment également le récepteur CD207 qui fait partie des PRR. Ce récepteur se lie à certains résidus glycosidiques présents au niveau des WTA de *S. aureus*. Dans un modèle d'infection épicutanée chez des souris exprimant le CD207 humain, l'infection par une souche de *S. aureus* exprimant le résidu  $\beta$ -N-actéylglucosamine sur les WTA induit une augmentation de la transcription des gènes codant les cytokines IL-6 et IL-17 et la chimiokine CXCL1 (van Dalen et al., 2019). Une autre étude a démontré la capacité des LC humaines purifiées à produire les cytokines IL-6, IL-10, TNF $\alpha$  et IL-8 en réponse à différents activateurs des TLR (Flacher et al., 2006). Aussi, les LC ont été impliquées dans la différenciation des cellules Th17 (Figure 19), ainsi que dans l'accumulation de cellules T productrices d'IL-17 dans la peau (Mathers et al., 2009 ; Kobayashi et al., 2015). Ces cytokines vont favoriser entre autres le recrutement des PNN au site d'infection, et l'induction d'une réponse lymphocytaire de type Th17 (Mathers et al., 2009). Suite à leur activation, les LC expriment les molécules co-stimulatrices CD80 et CD86, et migrent vers les dLN où elles initient les réponses immunitaires adaptatives en présentant l'antigène aux lymphocytes T naïfs. Elles exercent ainsi leurs fonctions de cellules présentatrices d'antigène (CPA) et activent les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (Polak et al., 2014).

#### 2.2.6.2 Les cellules dendritiques du derme

De la même manière que les LC, les dDC sont des CPA professionnelles capables de migrer vers les dLN pour initier les réponses immunitaires adaptatives. Elles induisent une réponse de type Th1 et Th17 respectivement par la sécrétion des cytokines IL-12 et IL-23 (Wu and Xu, 2014; Kashem et al., 2017; Honda et al., 2019). Dans un modèle d'infection d'oreille



de souris, il a été démontré qu'une sous population de cDC1 EpCAM<sup>+</sup>CD59<sup>+</sup>Ly-6D<sup>+</sup> favorise le recrutement des PNN par la production de VEGF (Janela et al., 2019).

#### 2.2.6.3 Les cellules dendritiques plasmacytoïdes et inflammatoires

Les DC plasmacytoïdes (pDC) et les DC inflammatoires sont des sous-populations de DC retrouvées dans la peau exclusivement dans des conditions inflammatoires.

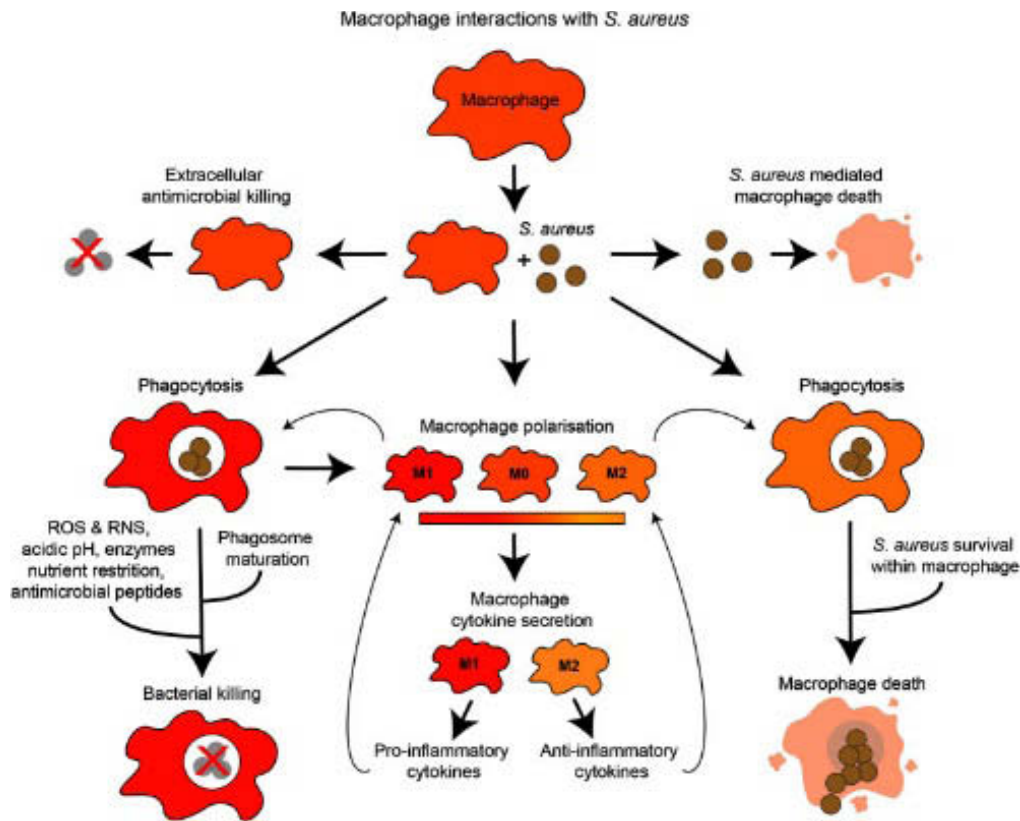
Les DC inflammatoires représentent une population très hétérogène de cellules CMHII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>, et se distinguent de la population résidente des DC par l'absence des marqueurs CD14, CD1c, CD1a et CD207 (Kashem et al., 2017; Collin and Bigley, 2018). Leur rôle dans l'infection cutanée par *S. aureus* n'est pas bien documenté, mais il a été montré que des souris infectées par *Listeria monocytogenes* présentent une accumulation de DC dans la rate, avec production de TNF $\alpha$  et de iNOS (*Inducible Nitric Oxide Synthase*). Ces DC inflammatoires ont également été décrites dans un modèle murin de leishmaniose cutanée où elles contribuent à la mise en place d'une réponse de type Th1 (Serbina et al., 2003; León et al., 2007).

Les pDC sont présentes dans la circulation sanguine ou dans des tissus lymphoïdes à l'état basal, mais peuvent se retrouver dans la peau suite à une infection par *S. aureus*. Il a été proposé que les pDC reconnaissent l'ADN bactérien *via* les TLR endosomaux TLR7/9, induisant la libération d'IFN $\alpha$ , de TNF $\alpha$  et d'IL-6 (Parcina et al., 2008; Michea et al., 2013; Wu and Xu, 2014).

#### 2.2.6.4 Les mastocytes

L'activation du TLR2 des mastocytes murins ou humains par le LTA entraîne la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF $\alpha$  et l'IL-8 (Imajo et al., 2009), et de leucotriènes (Bąbolewska et al., 2012). Les leucotriènes sont des médiateurs inflammatoires dérivés des lipides qui sont impliqués dans le recrutement des leucocytes. Imajo *et al.* ont également montré que la reconnaissance de LTA par les mastocytes humains a pour conséquence d'augmenter l'expression du CR3 à leur surface, permettant ainsi une meilleure reconnaissance de la fraction C3b responsable de l'opsonisation de *S. aureus* (Imajo et al., 2009). Dans un modèle murin d'inflammation de l'oreille, l'injection intradermique du PGN de *S. aureus* chez des souris déficientes en mastocytes induit une inflammation moins importante que chez les souris sauvages (Supajatura et al., 2002).



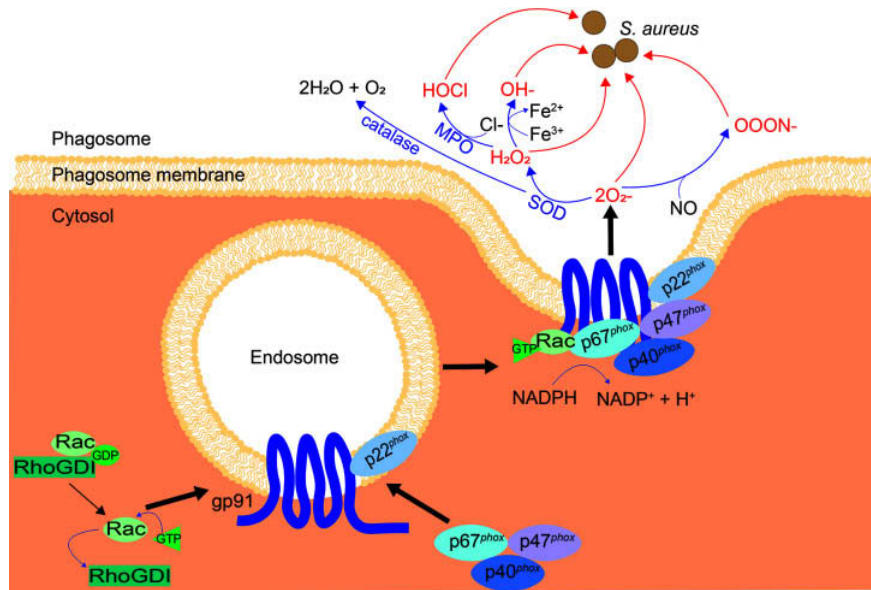


**Figure 20 : Polarisation des MΦ vers un phénotype M1 ou M2 en réponse à *S. aureus* (Pidwill et al., 2021).** La présence de *S. aureus* influence la polarisation des MΦ et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires. La phagocytose de *S. aureus* par les MΦ conduit à la lyse bactérienne (gauche) grâce à différents mécanismes antimicrobiens. *S. aureus* peut également échapper à ces mécanismes (droite), proliférer à l'intérieur du MΦ, puis provoquer sa mort par apoptose. Des études plus récentes ont montré que différents phénotypes de MΦ peuvent être identifiés par l'expression du CMHII, de CD163, de l'arginase et de l'iNOS. Les MΦ M1 sont associés à une réponse pro-inflammatoire et sont caractérisés par l'expression de CMHII et de l'iNOS. A l'inverse, les MΦ M2 sont associés à une réponse anti-inflammatoire et sont caractérisés par l'expression de CD163 et de l'arginase. Une expansion de la population des MΦ M2 est associée à des infections établies évoluant vers la chronicité, telles que les infections par les biofilms.

#### 2.2.6.5 Les monocytes/macrophages

Les MΦ ont deux origines distinctes. Les MΦ résidents du derme sont les premiers phagocytes professionnels à rentrer en contact avec *S. aureus* suite à sa traversée de la barrière épithéliale. D'autres MΦ sont issus du recrutement et de la différenciation des MO circulants. Ces derniers expriment le récepteur membranaire Ly6C et sont recrutés dans la peau de manière CCR2 dépendante. Durant leur différenciation en MΦ, l'expression de CCR2 est diminuée, alors que celle de CD64 est augmentée (Nguyen and Soulika, 2019). Le recrutement des MO/MΦ est également médié par les peptides formylés de *S. aureus*, par la fraction C5a du complément et par d'autres protéines produites par les cellules environnantes à l'issue de leur activation, notamment CCL20 (*Macrophage Inflammatory Protein 3*), l'IL-6, l'IL-1β, l'IL-8 et les facteurs de croissance GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) et G-CSF (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*). L'arrivée des MΦ sur le site d'infection est suivi de la reconnaissance des différents composants de *S. aureus*, ce qui conduit à la fois à l'activation des MΦ et à la phagocytose de l'agent pathogène. Pour se faire, les MΦ expriment à leur surface les TLR2/9 et également d'autres PRR comme les FcR, les CR (CR3 et CR4 qui reconnaissent la fraction C3b) et les SR (*Scavenger Receptor*) (Pidwill et al., 2021). Ces derniers sont une famille de récepteurs membranaires capables de reconnaître une large variété de PAMP, et dans certains conditions, de jouer le rôle de co-récepteurs pour les TLR (Areschoug and Gordon, 2009).

L'activation des MΦ contribue à l'élimination de l'agent pathogène et à l'amplification de la réponse inflammatoire en favorisant la phagocytose et en libérant des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires. En effet, deux catégories de MΦ se distinguent *in vitro*. La population pro-inflammatoire dite « M1 » et la population anti-inflammatoire dite « M2 » (Figure 20). Alors que les MΦ sont capables d'exprimer *in vivo* à la fois les marqueurs M1 et M2, chaque population est associée à un profil d'expression précis. D'une part, les MΦ de type M1 expriment l'iNOS et le CMHII et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNFα, l'IL-1β et l'IL-6. D'autre part, les MΦ de type M2 sont associés à une réponse anti-inflammatoire et pro-fibrotique caractérisée par la production d'IL-10 ou de TGFβ (Quaresma, 2019). L'état de polarisation du MΦ semble exercer une influence majeure sur la résolution de l'inflammation ou la persistance de l'infection à *S. aureus*. Dans un modèle d'infection sous-cutanée par *S. aureus*, les MΦ contribuent au recrutement des leucocytes par la sécrétion de plusieurs chimiokines telles que CXCL1, CXCL2, CCL2, CCL3, CCL4 et de la cytokine IL-1β (Abtin et al., 2014). Lors d'une infection par voie intradermique par une MRSA (biotype



**Figure 21 : Assemblage de la NADPH oxydase (NOX2) et de la cascade de la production des ROS (Pidwill et al., 2021).** Lorsqu'ils sont inactifs, les composants du NOX2, le gp91<sup>phox</sup> et p22<sup>phox</sup>, sont situés à la surface de vésicules, tandis que la protéine Rac inactive le complexe cytosolique p67<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> et p40<sup>phox</sup>. Lors de l'activation, les sous-unités cytosoliques sont recrutées au gp91<sup>phox</sup> et au p22<sup>phox</sup>. L'inhibition de Rac par RhoGDI est levée, permettant l'association de Rac avec le GTP et son recrutement au p67<sup>phox</sup>, et complétant la formation de NOX2. Les vésicules exprimant NOX2 fusionnent avec la membrane du phagosome et produisent l'ion superoxyde O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Ce dernier est converti en d'autres ROS : en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suite à l'action de la superoxyde dismutase (SOD) et en OOON<sup>-</sup> suite à l'action de des ions O<sub>2</sub><sup>-</sup> avec le NO. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est converti en HOCl par la MPO, en H<sub>2</sub>O + O<sub>2</sub> par la catalase et en OH<sup>-</sup> par la réaction entre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

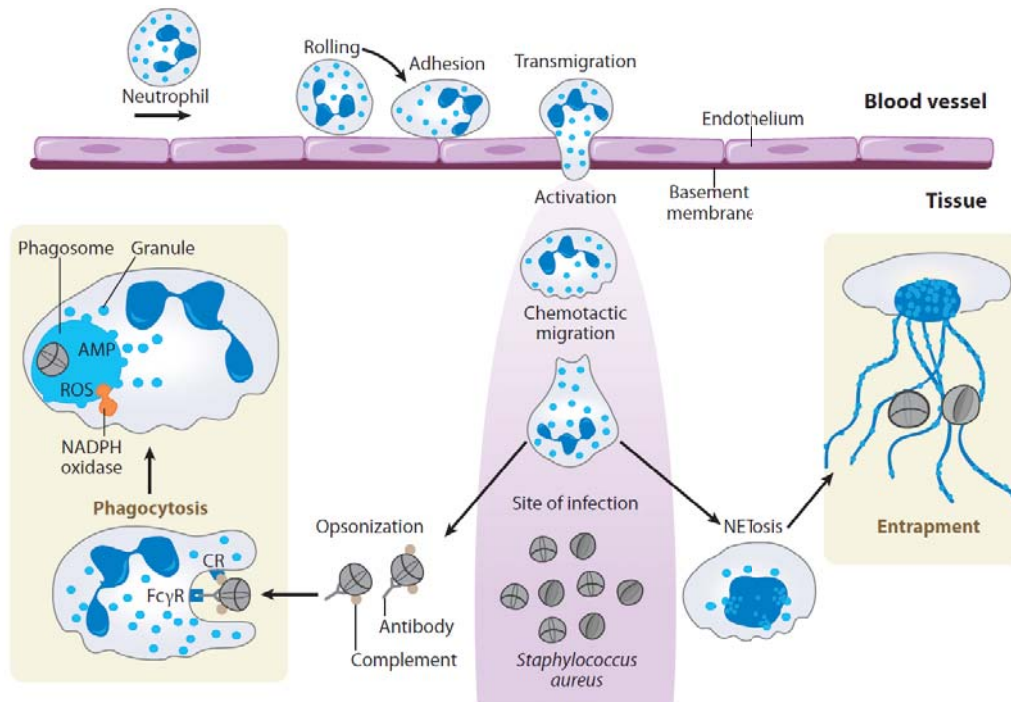
21777), une polarisation des MΦ vers le phénotype M1 conduit à la formation d'un abcès cutané et à un renforcement de la réponse inflammatoire de l'hôte. A l'inverse, la polarisation des MΦ vers un phénotype M2 dans une modèle de brûlure cutanée ne leur permet pas de contrôler l'infection bactérienne (Asai et al., 2010).

Les MΦ inflammatoires internalisent *S. aureus* par phagocytose. Ils possèdent ensuite de nombreuses mécanismes effecteurs capables de dégrader la bactérie à l'intérieur du phagosome. Parmi ces mécanismes, il faut citer la libération des ROS, des espèces réactives de l'azote (RNS), d'enzymes et de peptides antimicrobiens, ainsi que l'acidification du phagolysosome et l'autophagie. Les MΦ peuvent aussi cibler les bactéries extracellulaires avec des MET (*Macrophage Extracellular Traps*) (Pidwill et al., 2021).

La production de ROS est considérée comme le mécanisme central de la destruction des bactéries par les MΦ. La NADPH oxydase (NOX2) est une enzyme située sur la membrane du phagosome, permettant de catalyser la production des ROS qui participent au phénomène d'explosion oxydative chez ces phagocytes. La synthèse des ROS à l'intérieur des phagosomes est induite suite à l'activation de certains récepteurs membranaires tels que les FcR ou l'intégrine Mac-1 (*Macrophage-1 antigen*). Cette dernière est formée suite à une hétérodimérisation de CD11b et de CD18 à la surface des MΦ, et est capable de reconnaître un large panel de protéines de l'hôte telles que des récepteurs (ICAM-1), des enzymes (élastase, myéloperoxydase, et plasminogène), et également certains médiateurs inflammatoires (la fraction C3b du complément). L'engagement du ligand par Mac-1 initie différentes réponses chez les phagocytes, comme l'adhésion, la migration, la phagocytose, l'explosion oxydative et la dégranulation (Podolnikova et al., 2015; Pidwill et al., 2021). Il existe une variété de ROS différents (Figure 21) capables d'endommager l'ADN bactérien, et conduisant à leur dégradation. De plus, les phagocytes produisent des RNS catalysées par iNOS. Cette enzyme n'est exprimée qu'en réponse à des stimuli inflammatoires comme l'IFN $\gamma$ . Les RNS peuvent avoir un effet néfaste sur le métabolisme bactérien, la réplication et la réparation de l'ADN (Pidwill et al., 2021). Cependant, chez des souris déficientes en iNOS infectées par *S. aureus*, aucune augmentation significative du nombre de bactéries intracellulaires n'est observée, tandis que des souris déficientes en NOX2 présentent une charge bactérienne intracellulaire significativement augmentée associée à une mortalité plus élevée (Surewaard et al., 2016).

#### 2.2.6.6 Les polynucléaires neutrophiles

Les PNN jouent un rôle central dans la défense anti-bactérienne. Les maladies génétiques associées à des PNN non fonctionnels prédisposent généralement les individus à des infections



**Figure 22 : Extravasation des PNN au site d'infection et mécanismes de dégradation de *S. aureus* (Spaan et al., 2013).** Le processus de diapédèse est constitué de trois étapes clés : le roulement des PNN à la surface de l'endothélium activé, puis leur adhésion ferme à l'endothélium, ce qui les arrête et permet leur transmigration à travers l'endothélium. Dans les tissus, les PNN sont dirigés vers les bactéries par un gradient chimiotactique, suivi d'une reconnaissance de ces bactéries et de leur phagocytose. À l'intérieur du phagosome des PNN (gauche), les bactéries sont tuées par les AMP libérées lors de la fusion des granules et par les ROS. Les PNN peuvent aussi subir le « NETosis » qui permet de capturer et de tuer les bactéries de manière extracellulaire.

bactériennes et fongiques. Par exemple, les personnes atteintes de granulomatose chronique, une maladie génétique caractérisée par l'incapacité des PNN et d'autres phagocytes à produire l'ion superoxyde ( $O_2^-$ ), contractent souvent des infections graves et récurrentes à *S. aureus*. Ces infections se manifestent souvent par des abcès qui peuvent finalement se transformer en granulomes qui vont affecter le fonctionnement des organes et qui doivent finalement être enlevés chirurgicalement (Chiriaco et al., 2016; Vor et al., 2020).

Lors d'une réponse inflammatoire, les PNN sont recrutés depuis la circulation sanguine jusqu'au site d'inflammation grâce à l'effet chimiotactique des composants bactériens (peptides formylés), des cytokines (IL-8), des chimiokines (CXCL1) et des fractions du complément (C3a et C5a) présents dans l'environnement tissulaire inflammatoire. De plus, l'augmentation de l'expression des sélectines E et P ainsi que de ICAM-1 suite à l'activation des cellules endothéliales favorise le recrutement des PNN par le phénomène de diapédèse (Figure 22). Ces molécules d'adhésion sont capables d'interagir avec PSGL-1 (*P-Selectin Glycoprotein Ligand-1*) et Mac-1 à la surface des PNN. Les mécanismes de reconnaissance des composants bactériens par cette population de cellules restent similaires à ceux décrits pour les MΦ. Ainsi, l'ensemble de ces signaux résulte en l'activation des PNN, conduisant à une phagocytose efficace de *S. aureus* dès leur arrivée au site d'infection, ainsi qu'à une amplification de la réponse inflammatoire par la sécrétion des cytokines (Spaan et al., 2013). Cho et al. ont montré que les PNN sont une source majeure d'IL-1 $\beta$  lors d'une infection intradermique par *S. aureus*, et que cette production est dépendante des récepteurs TLR2, NOD2 et FPR1 (Cho et al., 2012). De plus, les PNN isolés de la moelle osseuse de souris sont capables de produire du TNF $\alpha$ , du CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), du CXCL2 (MIP-2) et du CXCL1 suite à une stimulation par *S. aureus* préalablement opsonisé *in vitro* (Van Ziffle and Lowell, 2009). La redondance de la production de ces cytokines avec celles produites par les MΦ ne semble pas anodine. En effet, dans un modèle murin d'infection par *S. aureus* d'une poche d'air sous-cutanée, la délétion du gène *syk* spécifiquement chez les PNN conduit à une diminution de production des cytokines/chimiokines citées précédemment. Une augmentation de la charge bactérienne est également observée en comparaison des souris sauvages (Van Ziffle and Lowell, 2009).

En plus du mécanisme de dégradation bactérienne par les ROS dépendant de NOX2, la phagocytose déclenche, chez les PNN, la dégranulation spécifique (Figure 22). En effet, ces cellules possèdent un arsenal d'agents antimicrobiens très efficaces, stockés dans des granules, et qui ne seront libérés que lors de leur activation. Ce processus implique la fusion des granules cytoplasmiques avec la membrane du phagosome. Les granules peroxydase-négatif, incluant

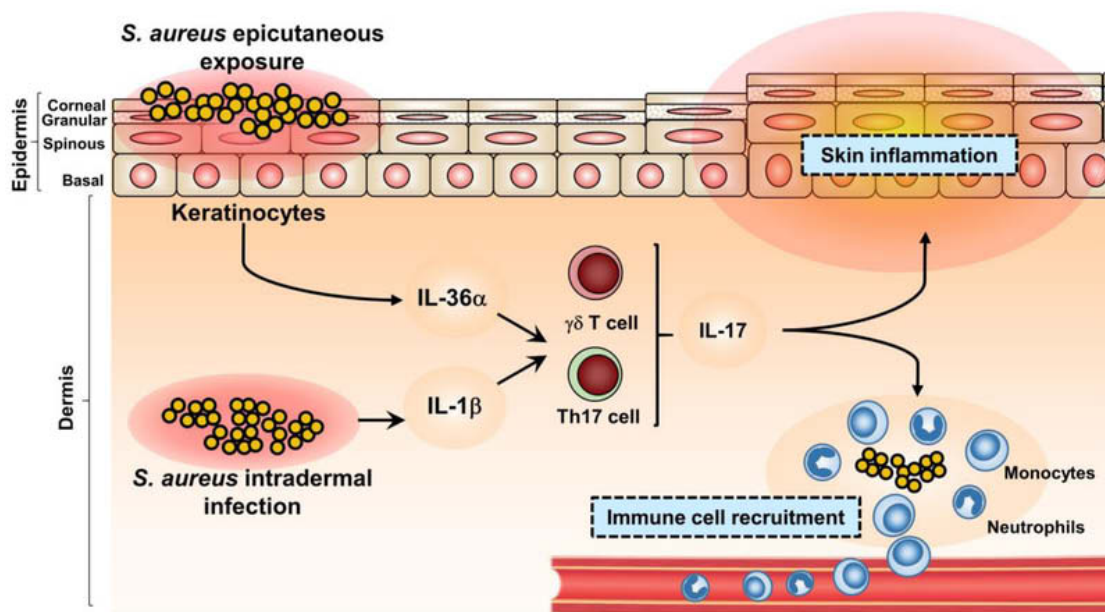


les vésicules de sécrétion, les granules de gélatinase et les granules spécifiques, sont un réservoir de protéines membranaires fonctionnellement importantes, telles que CR3, les FPR1/2 et les intégrines  $\beta 2$ . Les granules peroxydase-positif (granules primaires ou azurophiles) contiennent la majeure partie des agents antimicrobiens des PNN avec les  $\alpha$ -défensines, la LL-37, la protéinase-3, l'élastase et le lysozyme. Ces facteurs anti-microbiens ont plusieurs effets sur *S. aureus*, avec notamment la dégradation de la paroi (action du lysozyme ou des exoprotéines telles que l'élastase), et l'explosion oxydative au sein du phagosome (action de la MPO). Certains groupes de protéines sont directement bactéricides et bactériostatiques comme la protéine BPI (*Bactericidal/Permeability-Increasing protein*) qui attaque principalement la membrane bactérienne, ou les défensines qui interfèrent avec la machinerie de synthèse de la paroi cellulaire. Enfin, la lactoférine et la calprotectine sont capables de séquestrer le fer et le zinc respectivement, conduisant à un effet bactériostatique sur *S. aureus* (Spaan et al., 2013; Vor et al., 2020).

En 2004, grâce à l'utilisation de la microscopie en temps réel, Brinkmann et al. ont mis en évidence un autre mécanisme de dégradation bactérienne (Brinkmann et al., 2004). Celui-ci consiste à piéger physiquement les bactéries dans des structures en forme de toile composées de chromatine décondensée, d'histones et de granules libérés par les PNN (Figure 22). Ces pièges, appelés NETs, empêchent ainsi la dissémination des agents pathogènes et contribuent à leur dégradation grâce aux différents agents antimicrobiens contenus dans les granules des PNN (Vor et al., 2020). Bien que certaines étapes essentielles de la formation des NET (« *NETosis* ») aient été décrites, les mécanismes de leur initiation, les voies d'activation et les fonctions effectrices sont encore mal connus. L'activation *in vitro* du « *NETosis* » peut être initiée par différents stimuli tels que l'acétate de myristate de phorbol, le lipopolysaccharide (LPS), l'IL-8 et différentes bactéries (Spaan et al., 2013). Yipp et al., en utilisant l'imagerie intravivante par microscopie confocale, ont observé le « *NETosis* » dans la peau suite à une infection par *S. aureus*. Ce processus est régulé par le TLR2 et joue un rôle important pour limiter la dissémination bactérienne *via* la circulation sanguine (Yipp et al., 2012).

La résolution de l'inflammation s'opère lorsque les PNN rentrent en mort cellulaire programmée par apoptose et sont ensuite dégradés par les M $\Phi$  *via* le processus d'efferocytose. Ce dernier permet de limiter l'inflammation et la libération du contenu des granules des PNN qui peuvent causer des dommages tissulaires chez l'hôte. Ces PNN apoptotiques expriment des signaux permettant leur reconnaissance et leur phagocytose par les M $\Phi$  comme la phosphatidylsérine et l'annexine-1. Les PNN apoptotiques orientent par ailleurs les M $\Phi$  vers un





**Figure 23 : La réponse immunitaire cutanée contre *S. aureus* médiée par l'IL-17 (Liu et al., 2018).** La production d'IL-17 dépend de l'activation des cellules résidentes de la peau comme les MΦ, les dDC et les kératinocytes qui peuvent sécréter un large panel de cytokines, avec notamment l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, IL-23 et l'IL-36 $\alpha$ . Il est proposé que la profondeur de l'infection cutanée à *S. aureus* influence le profil de cytokines majoritairement produites durant l'infection. En effet, une exposition épicutanée de *S. aureus* induit une production d'IL-36 $\alpha$ , notamment par les kératinocytes, alors qu'une infection intradermique induit une production d'IL-1 $\beta$  par les MΦ. Ces deux cytokines peuvent conduire à la synthèse d'IL-17 par diverses cellules de la peau, comme les DETC (chez la souris), les cellules Th17 (T  $\gamma\delta$  et T CD4 $^{+}$ ) et les cellules NK. L'IL-17 active les récepteurs IL-17 à la surface des kératinocytes, entraînant la production d'AMP et de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines et de molécules d'adhésion qui favorisent le recrutement des PNN circulants vers le site de l'infection cutanée. La signalisation médiée par l'IL-17 conduit également à la production de GM-CSF et de G-CSF qui favorisent la granulopoïèse des PNN dans la moelle osseuse et peut-être localement dans la peau. Les PNN forment un abcès afin de contrôler et de limiter la propagation de l'infection dans la peau, ce qui est finalement nécessaire pour la clairance bactérienne.

phénotype M2. Ces MΦ vont sécréter des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGFβ qui participent à la résolution de l'inflammation et qui favorisent la réparation tissulaire (Kobayashi et al., 2010; Bouchery and Harris, 2019).

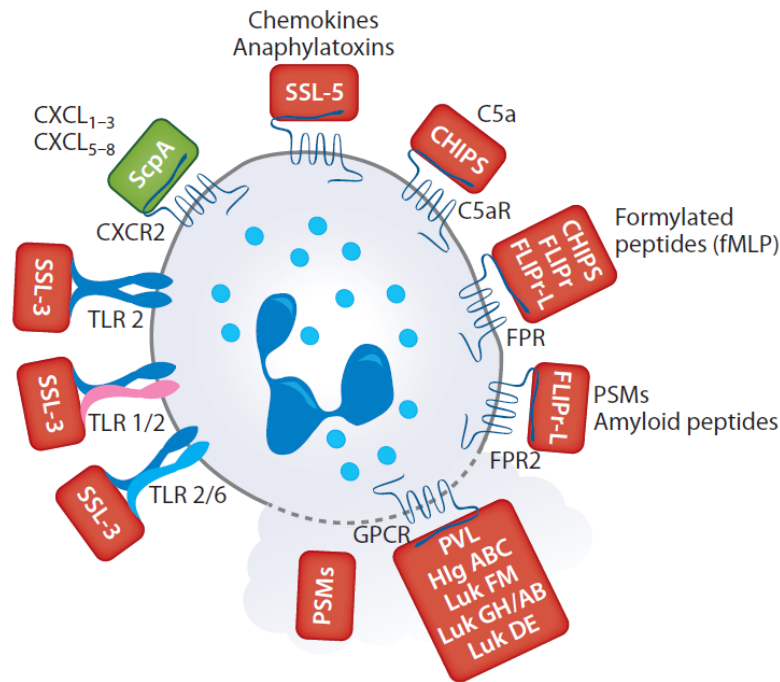
## 2.2.7 Les lymphocytes de l'immunité innée

### 2.2.7.1 Les Lymphocytes T αβ

Dans un modèle murin d'infection sous-cutanée par *S. aureus*, il a été montré que les lymphocytes αβ sont essentiels au recrutement des PNN au niveau des abcès formés par l'infection. Chez des souris mutantes déficientes en lymphocytes αβ, la diminution du recrutement observée corrèle avec la diminution de la synthèse des chimiokines CXCL1 et CXCL2. Cependant, dans cette étude, l'absence de cette population cellulaire induit une meilleure clairance des bactéries, témoignant d'un effet délétère des lymphocytes αβ ou des PNN lors d'une infection par *S. aureus* (McLoughlin et al., 2006). Chez l'Homme, ces lymphocytes contribuent à la physiopathologie de certaines maladies de la peau telles que le psoriasis, maladie chez laquelle la sécrétion d'IL-17 est décrite comme favorisant l'inflammation tissulaire (Nguyen and Soulika, 2019).

### 2.2.7.2 Les Lymphocytes T γδ

Le rôle des lymphocytes T γδ dans la réponse immunitaire dirigée contre *S. aureus* est de plus en plus décrite (Figure 23). Une fois activées, ces cellules adoptent une morphologie ronde et sont capables de sécréter des cytokines et des facteurs de croissance. Elles contribuent à la défense antimicrobienne de la peau majoritairement par la production d'IL-17 qui favorise le recrutement des PNN, par la production d'autres cytokines dans l'environnement inflammatoire (IL-1α, IL-1β, and TNF), et par la production de β-défensines par les kératinocytes (Karauzum and Datta, 2017; Marchitto et al., 2019; Nguyen and Soulika, 2019). Dans un modèle d'infection sous-cutanée, des souris déficientes en lymphocytes T γδ (mais pas en lymphocytes αβ) présentent des lésions cutanées beaucoup plus importantes avec un nombre de bactéries plus élevé et un recrutement altéré des PNN par rapport aux souris sauvages (Cho et al., 2010; Dillen et al., 2018; Peng et al., 2020). Marchitto et al. ont montré que ces cellules sont également recrutées depuis le dLN. Leur stimulation *ex vivo* conduit à la production d'autres cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-22, le TNFα et l'IFNγ (Marchitto et al., 2019). L'importance des lymphocytes T γδ, ou du moins de la réponse Th17 dans les infections cutanées à *S. aureus* est d'autant plus accentuée chez les patients atteints du syndrome d'hyper IgE ou chez les patients infectés par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH). Ces patients possèdent



**Figure 24 : Les protéines immunomodulatrices sécrétées par *S. aureus* peuvent avoir plusieurs effets sur les PNN (Spaan et al., 2013).** *S. aureus* synthétise des protéines immunomodulatrices telles que la protéase ScpA et les CHIPS. Elles se fixent sur des récepteurs membranaires impliqués dans la chimiotaxie (CXCR2 et C5aR respectivement) des PNN, ce qui empêche la fixation des chimiokines et de la fraction C5a du complément. *S. aureus* produit également des superantigènes SSL qui se fixent sur les TLR, empêchant la reconnaissance des PAMP. Les FLIPr ou FLIPr-L sont capables de se fixer sur les récepteurs FPR afin d'inhiber la reconnaissance des molécules formylées, molécules dont les PSM font partie. Cela permet aux PSM d'exercer leur effet cytolytique sur la membrane des PNN.

un défaut de différenciation de lymphocytes Th17 conduisant à une susceptibilité accrue aux infections cutanées à *S. aureus* (Iwamoto et al., 2019).

#### 2.2.7.3 Les cellules NK

Les cellules NK sont connues pour leur capacité à tuer les cellules infectées ou transformées suite à une infection virale. Au repos, elles expriment constitutivement un certain nombre de récepteurs de cytokines (comme par exemple le récepteur à l'IL-12). Lors d'une infection bactérienne, elles sont recrutées depuis la circulation sanguine et sont activées par l'IL-12 produite par les MO et les DC, conduisant à la production d'IFN $\gamma$  et de TNF $\alpha$ . Les cellules NK contribuent ainsi à la mise en place d'une réponse inflammatoire de type Th1 au cours d'une infection par *S. aureus* (Haller et al., 2002; McSharry and Gardiner, 2010).

#### 2.2.7.4 Les cellules lymphoïdes innées

Les ILC répondent à la présence des cytokines de l'environnement inflammatoire par la sécrétion de leurs propres cytokines. Par exemple, la majorité des cellules produisant l'IL-17, dont les ILC3, sont dépendantes de la présence d'IL-1 $\beta$  et d'IL-23 (Beck et al., 2020; Valle-Noguera et al., 2021). De manière intéressante, dans un modèle d'infection épicutanée par *S. aureus*, le traitement des souris déficientes en lymphocytes T  $\gamma\delta$  par un anticorps monoclonal anti-CD90 conduit à une déplétion des ILC et induit une diminution du score inflammatoire du tissu infecté, en comparaison avec des souris traitées par un anticorps non spécifique (Nakagawa et al., 2017). Bien qu'ils soient connus pour leur rôle dans les infections virales et parasitaires, les ILC2 semblent également participer à la réponse immunitaire dirigée contre *S. aureus*. En effet, il a été montré que ces cellules expriment les molécules présentatrices d'antigène CMHII et CD1a, certains facteurs de croissance, ainsi que l'IL-8 (Xue et al., 2014; Hardman et al., 2021). Elles sont capables de détecter la présence de *S. aureus* par le PRR NOD2, ce qui augmente la transcription des gènes codant l'IL-6 et l'IL-8 (Hardman et al., 2021).

### 3. L'immuno-échappement par le staphylocoque : mécanismes

#### 3.1 Inhibition du système du complément

Afin d'empêcher la mise en place d'une réponse inflammatoire efficace par l'organisme, la bactérie doit tout d'abord « masquer » sa présence et limiter le recrutement des cellules inflammatoires. Pour se faire, *S. aureus* possède plusieurs protéines capables d'inhiber les différentes voies d'activation du complément (Figure 24). En temps normal, le système du complément contribue à améliorer la phagocytose par les phagocytes *via* l'opsonisation avec la



fraction C3b, ainsi que la chimiotaxie et l'activation des leucocytes par la libération des anaphylatoxines C3a et C5a. Lors d'une infection par *S. aureus*, il a été montré que la protéine d'adhésion au collagène Cna est capable d'inhiber la voie classique par sa liaison à la sous-unité C1q du complexe C1 afin d'inhiber les interactions avec les sous-unités C1s et C1r (Kang et al., 2013). De plus, la protéine d'adhésion extracellulaire (Eap) inhibe la formation de la C3 convertase de la voie classique et des lectines par sa liaison à la fraction C4b (Woehl et al., 2014). Certains mécanismes d'inhibition impliquent les facteurs de régulation du complément. En particulier, les protéines ClfA, SdrE et Sbi (*Staphylococcus aureus Binder of IgG*) sont capables de lier les facteurs de régulation I et H à la surface de la bactérie. Ces facteurs sont connus pour cliver et inactiver l'opsonine C3b (facteur I), ainsi que la dégradation de la C3 convertase de la voie alternative (facteur H) (Hair et al., 2008; Haupt et al., 2008; Sharp et al., 2012). L'opsonisation est inhibée par la transformation du plasminogène en plasmine par Sak présente à la surface de *S. aureus*, ce qui permet de cliver directement la fraction C3b du complément, et aussi les IgG (Mölkänen et al., 2002; Rooijackers et al., 2005b). Par ailleurs, certaines protéines sont capables d'interagir avec les convertases du système de complément. Par exemple, la protéine SCIN agit sur les deux types de C3 convertase du complément, alors que la protéine de liaison au fibrinogène extracellulaire (Efb) se lie aux convertases contenant la fraction C3b, à savoir la C3 convertase de la voie alternative et les deux types de C5 convertases (Rooijackers et al., 2005a; Jongerius et al., 2007). Enfin, le superantigène SSL7 inhibe la liaison de la fraction C5 à la C5 convertase, empêchant ainsi son clivage (Bestebroer et al., 2010). L'inhibition de ces convertases empêche l'activation de toutes les voies du complément, et donc la mise en place des effecteurs du système de complément.

### 3.2 Détournement de l'extravasation et de la chimiotaxie cellulaire

Les MO et les PNN sont les principales cellules inflammatoires recrutées depuis la circulation sanguine. Ils sont attirés sur site de l'inflammation *via* des facteurs chimiotactiques produits localement, notamment la fraction C5a du complément et les peptides formylés. Afin d'empêcher leur recrutement, *S. aureus* sécrète plusieurs molécules interférant avec le processus de chimiotaxie et de diapédèse. Tout d'abord, la protéine CHIPS sécrétée par *S. aureus* se lie à C5aR, inhibant la chimiotaxie dépendante de la fraction C5a (Rooijackers et al., 2006). De plus, CHIPS, ainsi que FLIPr et FLIPr-like, altèrent spécifiquement la réponse des PNN et des MO aux peptides formylés. En effet, ces molécules se fixent aux récepteurs FPR1 et FPR2, empêchant la chimiotaxie dépendante des peptides formylés. Or, ces derniers constituent un signal d'activation pour les PNN. La fixation des protéines CHIPS et FLIPr vont



également impacter la capacité de ces cellules à éliminer les bactéries (Dorward et al., 2015). En effet, dans un modèle murin d'infection intradermique par *S. aureus*, la délétion du récepteur FPR1 induit une augmentation de la taille de la lésion cutanée et une diminution de l'activité myéloperoxydase (MPO), en comparaison avec les souris sauvages (Cho et al., 2012). Enfin, la protéase ScpA clive l'extrémité N-terminale du CXCR2 à la surface des PNN, empêchant l'activation et la migration de ces cellules *via* ce récepteur (Laarman et al., 2012)

Le processus de diapédèse est également inhibé par *S. aureus*. Le roulement des PNN sur les cellules endothéliales est modulée par les superantigènes SSL5 et SSL11 qui agissent sur PSGL-1 exprimé à la surface des PNN. En se liant à PSGL-1, SSL5 bloque son interaction avec la sélectine P, et empêche le roulement des PNN à la surface des cellules endothéliales (Bestebroer et al., 2007). De plus, il a été montré que SSL5 inhibe l'activation des PNN et des MO par les fractions C3a et C5a du complément et plusieurs chimiokines telles que CXCL8, CXCL1 et CXCL12. Cette action est médiée par la liaison de SSL5 à l'extrémité N-terminale des récepteurs C3aR, C5aR et des récepteurs aux chimiokines (Bestebroer et al., 2009). Ensuite, l'adhésion des PNN à l'endothélium est ciblée par *S. aureus* *via* l'interaction de Eap à ICAM-1. Ainsi l'adhérence stable des PNN aux cellules endothéliales est empêchée et l'extravasation de ces cellules vers le tissu infecté ne peut pas avoir lieu (Chavakis et al., 2002).

### 3.3 Inhibition de la dégradation

Si la bactérie parvient à être phagocytée, elle doit ensuite empêcher les mécanismes conduisant à sa dégradation à l'intérieur du phagosome. Là encore, *S. aureus* possède tout un arsenal de protéines qui neutralisent les ROS, permettant ensuite son échappement du phagosome (Vor et al., 2020; Pidwill et al., 2021). Pour résister à la lyse par les AMP, *S. aureus* est capable de modifier la composition de sa paroi. Par exemple, l'opéron *dlt* est responsable de l'incorporation de la D-alanine dans les WTA, ce qui conduit à une modification de la charge globale de la surface bactérienne vers une charge positive, et une tolérance aux concentrations élevées d'AMP chargés positivement. Un mutant de l'opéron *dlt* est plus susceptible à la lyse par les défensines. Le gène *mprF* (*Multiple Peptide Resistance Factor*) code une lysylphosphatidylglycérol synthétase qui est impliquée dans la modification du phosphatidylglycérol membranaire, renforçant la charge positive de la paroi induite par l'opéron *dlt*. Certaines exoprotéases produites par *S. aureus* sont capables de dégrader directement les AMP comme la métalloprotéinase Aur qui agit sur le LL-37. De plus, *S. aureus* résiste au lysozyme en exprimant l'enzyme O-acétyltransférase A. Cette enzyme provoque une



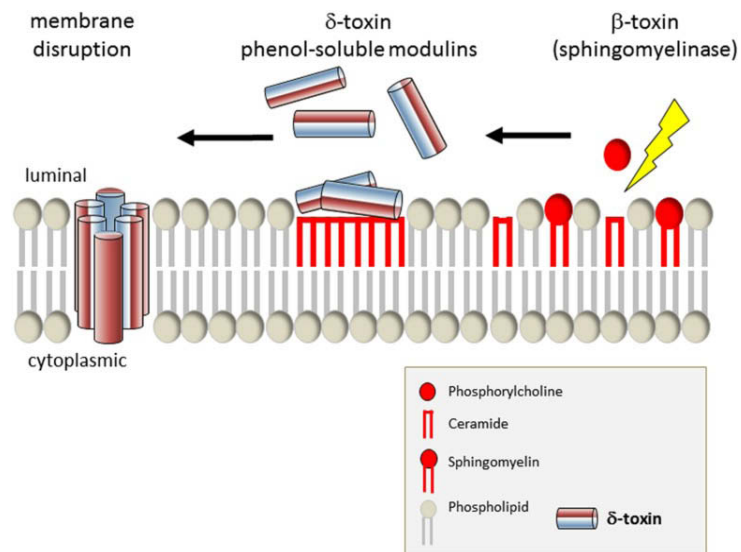


O-acétylation du PGN et conduit à une résistance à l'activité muramidase du lysozyme (Jong et al., 2019).

Pour résister à l'action des ROS, *S. aureus* produit la staphyloxanthine qui sert d'antioxydant et protège contre la destruction par l' $\text{H}_2\text{O}_2$  et l'oxygène singulet. Les bactéries dépourvues de staphyloxanthine présentent une survie altérée *in vitro* et *in vivo*. La bactérie produit également deux superoxyde dismutases, SodA et SodM, qui convertissent les radicaux  $\text{O}_2^-$  toxiques en  $\text{H}_2\text{O}_2$  et en oxygène. Les bactéries isogéniques délétées pour *sodA* et/ou *sodM* ont une virulence diminuée dans un modèle d'abcès de souris, démontrant ainsi leur rôle dans un contexte d'infection cutanée. L' $\text{H}_2\text{O}_2$  formé peut ensuite être dégradé en eau et en oxygène par KatA, une catalase staphylococcique. Cependant, une étude menée avec une souche mutante dans la production de catalase n'a montré aucune différence de virulence dans un modèle murin d'infection d'abcès cutané. Une autre protéine de type catalase produite par *S. aureus* est l'alkyl hydroperoxyde réductase (AhpC). En effet, la catalase KatA semble être importante pour la protection contre le stress oxydatif externe, tandis que l'AhpC élimine l' $\text{H}_2\text{O}_2$  produit de manière endogène. La peroxydase staphylococcique SPIN (*Staphylococcal Peroxidase INhibitor*) est un facteur de virulence régulé par le système à deux composants SaeRS (Jong et al., 2019). Elle protège *S. aureus* de la mort induite par la MPO en se liant et en inhibant cette enzyme. La bactérie a également développé des mécanismes pour résister aux RNS, avec notamment la flavohémoglobine qui piège l'oxyde nitrique (NO) dérivé de l'hôte. En réponse à l'inhibition de la respiration aérobie induite par le NO, *S. aureus* produit la lactate déshydrogénase conduisant à la fermentation lactique par les bactéries. Ce processus convertit le NADH en  $\text{NAD}^+$ , permettant le maintien de l'homéostasie d'oxydoréduction durant le stress oxydatif (Richardson et al., 2008; Vitko et al., 2015). Enfin, *S. aureus* est capable de tolérer des environnements acides, ce qui contribue à sa survie au sein des phagolysosomes (Weinrick et al., 2004). En particulier, la bactérie possède plusieurs mécanismes qui conduisent à la désacidification du microenvironnement bactérien par la production d'arginine désiminase et d'uréase (Makhlin et al., 2007; Zhou et al., 2019).

### 3.4 Echappement des compartiments lytiques

*S. aureus* survit non seulement à la phagocytose des M $\Phi$  et des PNN, mais est aussi capable de persister à l'intérieur de ces cellules en s'échappant du phagosome et en se répliquant à l'intérieur du cytoplasme. Cette échappement semble être nécessaire à l'induction de la mort de la cellule hôte par *S. aureus*. Cependant, Kobayashi *et al.* ont montré l'induction de la mort des PNN par une souche de CA-MRSA USA300 en l'absence de cet échappement, ce qui



**Figure 25 : Modèle d'échappement de *S. aureus* du compartiment phagosomal en lien avec l'action synergique de la Hld et de la Hlb (Fraunholz and Sinha, 2012).** Après clivage de la sphingomyéline en céramide et en phosphocholine par la Hlb, la Hld est capable d'interagir plus efficacement avec le feuillet externe de la membrane des cellules eucaryotes. La Hlb génère plusieurs foyers riches en céramides à la membrane des cellules, permettant à la Hld de s'accumuler dans ces domaines et conduisant à la perméabilisation de la membrane.

témoigne de la virulence augmentée de ces souches en particulier. Au sein du phagosome, *S. aureus* continue à produire les protéines nécessaires à sa survie intracellulaire (Kobayashi et al., 2010). La plupart de ces molécules sont régulées positivement par le système *agr*. En effet, il a été proposé que le confinement des bactéries dans un espace étroit comme le phagosome facilite l'accumulation du peptide signal AIP et conduit à l'activation de ce système (Carnes et al., 2010). L'ensemble des PSM $\alpha$  sont les principaux effecteurs de cet échappement phagosomal. Dans une étude menée *in vitro* par Grosz et al., les compartiments intracellulaires des mutants isogéniques de la MRSA USA300 LAC, de la USA400 MW2 ainsi que de la MSSA 6850 ont été comparés à leurs souches parentales respectives. Dans les trois fonds génétiques, les mutants du PSM $\alpha$  présentent une capacité diminuée à s'échapper du phagosomes des M $\Phi$  THP-1, tandis que l'efficacité à s'échapper du phagosome des mutants délétés pour PSM $\beta$ , Hld et PVL est comparable à celle des souches parentales. Dans la même étude, la diminution de la capacité d'échappement a également été observée chez plusieurs lignées cellulaires non-phagocytaires telles que les cellules 293, les cellules HeLa et les EAhy.926 (Grosz et al., 2014). Cependant, une étude menée antérieurement par cette équipe n'a pas montré un échappement phagosomal dépendant des PSM $\alpha$  chez des cellules HeLa infectées par la souche de laboratoire *S. aureus* RN4220. De plus, les auteurs ont montré une activité synergique de la Hld et de la Hlb dans l'échappement phagosomal de *S. aureus* chez les cellules HeLa (Figure 25) (Giese et al., 2011).

### 3.5 Survie intracellulaire

#### 3.5.1 Phagocytes professionnels

*S. aureus* a la capacité d'envahir les cellules normalement responsables de sa lyse. En effet, la bactérie préserve l'intégrité du M $\Phi$  en manipulant les processus de signalisation et de transcription cellulaire pour favoriser la survie des phagocytes infectés et éviter sa lyse. Koziel et al. ont montré que la phagocytose de *S. aureus* par les M $\Phi$  exerce un effet cytoprotecteur, qui se manifeste par la régulation positive de facteurs anti-apoptotiques tels que Bcl-2 et Mcl-1 (Koziel et al., 2009, 2013). La lyse des M $\Phi$  survient alors plus tardivement, seulement 3 à 4 jours après infection, suite à l'échappement de la bactérie et à sa réplication dans le cytoplasme (Kubica et al., 2008). Ces études suggèrent que le détournement de l'apoptose par *S. aureus* empêche l'élimination des cellules infectées, permettant ainsi la création d'une véritable niche intracellulaire pour la bactérie, une niche qui pourrait ensuite contribuer à sa dissémination *via* les cellules infectées, et ainsi à la progression de l'infection. A l'opposé de ces études réalisées sur les M $\Phi$ , la présence de *S. aureus* induit rapidement l'apoptose des PNN. Kobayashi et al.



ont montré une lyse de PNN humains dans les six premières heures suivant la phagocytose de la souche USA300 (Kobayashi et al., 2010). En cohérence avec cette étude, Greenlee-Wacker et al. ont également démontré une apoptose rapide des PNN humains, caractérisée par l'externalisation de la phosphatidylsérine et par la dépolarisation de la membrane mitochondriale, suite à l'internalisation de *S. aureus*. Cependant, ces cellules expriment de façon constante l'antigène PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) et leur caspases ne sont pas activées, deux éléments non caractéristiques de l'apoptose. La lyse des PNN infectés est dépendante de RIP-1 (*Receptor-Interacting Protein 1*), ce qui suggère une lyse par un mécanisme de nécrose régulée tel que la nécroptose programmée. Enfin, les PNN infectés présentent à leur surface la molécule CD67, ce qui empêche leur reconnaissance par les MΦ, ainsi que leur élimination par l'efferocytose (Greenlee-Wacker et al., 2014). A l'inverse, il a également été démontré que *S. aureus* retarde l'apoptose des PNN, avec une diminution de la perméabilisation de la membrane mitochondriale, une diminution du clivage de la caspase-3 et des niveaux inférieurs de dégradation de l'ADN chez les PNN hébergeant *S. aureus* (Mulcahy et al., 2020). De manière intéressante, ce retard dans l'activation de la voie de l'apoptose est dépendant d'une voie d'autophagie active, un processus de dégradation cellulaire permettant le recyclage ordonné des composants cellulaires. Durant l'autophagie, le contenu cytoplasmique des cellules eucaryotes est séquestré dans une vésicule appelée autophagosome, qui fusionne ensuite avec le lysosome pour permettre la dégradation du contenu de l'autophagosome. Il s'agit également d'un mécanisme d'élimination des micro-organismes intracellulaires. Cette association étroite entre autophagie et apoptose au cours des infections par *S. aureus* peut notamment être due au fait que ces voies partagent une molécule effectrice commune, la Mcl-1 (Voza et al., 2021).

### 3.5.2 Cellules non-phagocytaires

L'échappement de *S. aureus* du compartiment endosomal est décrit dans des cellules épithéliales d'origines différentes (HeLa, HEK293, S9), ainsi que dans des cellules endothéliales (HUVEC, Eahy.926) ou des kératinocytes (HaCaT, RHEK-1). Ces résultats suggèrent que ces différents types cellulaires constituent une niche appropriée pour la réplication de la bactérie à l'intérieur du cytoplasme (Löffler et al., 2014). Cependant, la translocation de la bactérie vers le cytoplasme de la cellule hôte semble être un processus souche dépendante, et les souches qui en sont capables sont hautement cytotoxiques pour la cellule hôte. Strobel et al. ont analysé le devenir de différentes lignées cellulaires après phagocytose de différentes souches de *S. aureus*. Toutes les souches, à l'exception de la souche non-



cytotoxique Cowan I (ATCC 12598), sont capables d'être transloquées vers le cytoplasme de la cellule hôte (Strobel et al., 2016).

Chez certaines cellules, l'échappement des autophagosomes par *S. aureus* a également été décrite. En utilisant l'approche d'imagerie en temps réel ou la microscopie électronique, une réplication cytoplasmique de *S. aureus* a été observée suite à son échappement des autophagosomes de fibroblastes murins (Mestre et al., 2010; Neumann et al., 2016). En revanche, les autophagosomes ont également été identifiés comme une niche pour la réplication intracellulaire de *S. aureus*. L'induction de l'autophagie dans les cellules HeLa et les fibroblastes murins a restauré à la fois la réplication et la cytotoxicité des souches déficientes en *agr*, ce qui indique qu'un ou plusieurs facteurs régulés par ce système sont nécessaires pour la cytotoxicité médiée par l'autophagie (Schnaith et al., 2007).

### 3.6 Induction de la mort cellulaire programmée par *Staphylococcus aureus*

Suite à sa réplication dans l'espace intracellulaire et à sa potentielle dissémination au sein de l'organisme, *S. aureus* va ensuite lyser la cellule hôte afin d'assurer sa libération dans le milieu extracellulaire.

Comme cela a déjà été présenté dans la deuxième partie de ce travail bibliographique, différentes toxines staphylococciques telles que la Hla, la PVL et les PSM sont capables de déclencher à elles seules la mort des cellules de l'hôte, et notamment celle des leucocytes. L'Hla joue un rôle déterminant dans les infections à *S. aureus*. Elle induit la lyse d'une variété de cellules de l'hôte, incluant les cellules endothéliales, les MO/MΦ, les PNN, les kératinocytes, les érythrocytes et les lymphocytes T. Par ailleurs, il est établi que Hla induit une mort cellulaire par nécrose pro-inflammatoire des MO et des kératinocytes (Motani et al., 2011; Soong et al., 2012). Ce ciblage spécifique se fait grâce à la fixation de l'hémolysine sur le récepteur ADAM-10, un récepteur principalement présent à la surface MO et des kératinocytes (Maretzky et al., 2008; Ezekwe et al., 2016). L'interaction de la toxine avec son récepteur entraîne la formation de pores dans la membrane plasmique, et modifie les flux de potassium. Cette perturbation des flux, en combinaison avec la reconnaissance des PAMP de *S. aureus* par les TLR2/4 ou des signaux de danger, induit l'activation de l'inflammasome NLRP3 (*NOD*-, *LRR*-family *Pyrin domain containing protein 3*), un complexe multiprotéique cytoplasmique (Craven et al., 2009). De plus, les toxines Hla, Hlg, et PVL ont toutes été décrites comme capables d'activer l'inflammasome NLRP3. L'assemblage de l'inflammasome conduit à l'activation de la caspase-1 qui permet le clivage de la pro-IL1β et de la pro-IL18, et la libération des cytokines matures correspondantes (Melehani and Duncan, 2016). L'activation de la caspase-1, directement liée à





l'assemblage de l'inflammasome, est capable d'induire une forme de mort cellulaire programmée pro-inflammatoire appelé pyroptose. La caspase-1 induit le clivage de l'ADN chromosomique et la lyse cellulaire, avec la libération du contenu cytoplasmique riche en facteurs pro-inflammatoires (Bergsbaken et al., 2009). En plus de la lyse induite par Hla, les cellules immunitaires peuvent aussi être lysées par d'autres toxines de *S. aureus*. Les MO/MΦ sont aussi sensibles à la toxine PVL, par un mécanisme proche de celui de l'Hla, aux PSM et à LukAB (Otto, 2014). Les toxines de *S. aureus* entraînant la lyse des PNN regroupent la PVL, les PSM, les leucotoxines LukED et LukAB. La PVL semble induire la mort des PNN par apoptose ou par nécrose, en fonction de sa concentration. Cependant, les mécanismes de mort cellulaire *via* ces toxines ne sont pas encore parfaitement compris (Genestier et al., 2005).

### 3.7 Immuno-échappement par le biofilm de *Staphylococcus aureus*

La transition de *S. aureus* vers sa forme biofilm contribue à sa persistance au sein de l'organisme. Costerton et al. ont été les premières à décrire l'inefficacité des phagocytes à accéder aux bactéries des biofilms, en parlant de « phagocytose frustrée » (Costerton et al., 1999). Plus tard, il a été décrit que les MΦ phagocytent efficacement les bactéries planctoniques de *S. aureus*, mais ont une capacité diminuée à phagocyter les bactéries associées au biofilm (Thurlow et al., 2011). De plus, le traitement des kératinocytes humains par le surnageant de culture des bactéries en biofilm a révélé une diminution de la production d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6, de CXCL-1, de CXCL8 et de GM-CSF, en comparaison du surnageant de bactéries planctoniques (Secor et al., 2011). Ces résultats sont en faveur de l'induction d'une réponse anti-inflammatoire par la forme biofilm favorisant la survie bactérienne au sein de l'hôte. Dans certaines infections chroniques associées à la colonisation par *S. aureus* comme la rhinosinusite, la présence de MΦ M2 présentant une phagocytose réduite a été décrite (Krysko et al., 2011). Chez la souris, les biofilms de *S. aureus* sont résistants à la phagocytose par les MΦ, et réduisent l'inflammation en atténuant les réponses pro-inflammatoires de l'hôte, favorisant une polarisation de ces cellules vers un phénotype de MΦ M2. Cette phagocytose diminuée a également été attribuée à la présence d'une MEC empêchant la pénétration des phagocytes au sein du biofilm. De plus, le taux de mortalité des MΦ est plus élevé dans les régions profondes du biofilm qu'en surface (Thurlow et al., 2011). En cohérence avec ces résultats, la délétion du système *agr* chez *S. aureus* USA300 LAC est à l'origine d'une augmentation de l'épaisseur et du biovolume du biofilm, avec une diminution de la capacité des PNN à pénétrer au sein des biofilms. De plus, les PNN mis en contact avec ces biofilms de bactéries mutantes présentent des prolongements cytoplasmiques évocateurs de pseudopodes, un phénotype qui n'a pas été observé pour les



biofilms sauvages (He et al., 2019). Cette altération dans la capacité des cellules phagocytaires à émettre des pseudopodes en présence d'un biofilm a déjà été décrite par Jesaitis et al. Dans ce travail, les PNN en contact avec des biofilms de *P. aeruginosa* conservent une morphologie ronde et symétrique, sans émission de pseudopodes (Jesaitis et al., 2003).

Dans un modèle d'infection à biofilm sur prothèse articulaire, une augmentation du nombre de MΦ M2 est observée (Peng et al., 2017). Dans ces modèles d'infection, l'implication des MDSC (*Myeloid-Derived Suppressor Cells*) est aussi bien décrite (Heim et al., 2014). Il s'agit d'une population hétérogène de MO (CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>neg</sup>Ly6C<sup>high</sup>) et de granulocytes (CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>) immatures qui sont de puissants inhibiteurs de l'activation des lymphocytes T. Ces cellules contribuent à la diminution de la réponse pro-inflammatoire, évidente par l'analyse par RTq-PCR de MDSC purifiés à partir du tissu infecté environnant la prothèse, 14 jours après l'infection par *S. aureus* USA300 LAC. Ces analyses ont révélé une expression augmentée de certaines molécules associées au phénotype M2 des MΦ, avec notamment l'Arginase-1 (Arg-1) et l'IL-10 (Heim et al., 2014, 2015a). L'expansion de la population du MDSC et l'induction de l'environnement anti-inflammatoire dans ces infections semble ainsi une étape crucial dans la physiopathologie des biofilms. En effet, la déplétion de ces cellules ainsi que l'administration de MΦ préalablement activés par l'IFN $\gamma$  ou le TNF $\alpha$  directement au site d'infection conduit à une meilleure clairance des biofilms chez la souris (Hanke et al., 2013; Heim et al., 2014; Yamada et al., 2020).

#### IV. Les différents modèles d'étude d'infections cutanées à *Staphylococcus aureus in vivo*

Une meilleure compréhension de l'immunobiologie de *S. aureus* apparaît essentielle dans le contexte épidémiologique actuel, afin de contribuer à développer de nouvelles approches pour prévenir et/ou traiter les infections cutanées. Pour étudier ces réponses immunitaires, des modèles animaux qui miment au mieux les différentes infections cutanées chez l'Homme ont été développés, et ont joué un rôle déterminant dans l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Cette section se concentrera sur les modèles d'infection de rongeurs existants, avec leurs modalités de mise en place et les différentes méthodes d'analyses applicables à ces modèles.

##### 1. Les modèles d'infection épicutanée

Les modèles d'infection épicutanée consistent en l'application topique de la bactérie à la surface de la peau préalablement épilée pour favoriser la colonisation bactérienne. Ces modèles



permettent d'étudier les effets d'une colonisation de l'épiderme par *S. aureus* dans un contexte de maladie inflammatoire cutanée tel que l'impétigo ou la dermatite atopique (AD). Cette dernière associe une inflammation chronique de la peau, une dysbiose de la flore cutanée, un fonctionnement anormal de la barrière cutanée, et des anomalies du système immunitaire comme celles observées chez les patients atteints du syndrome d'hyper IgE ou du VIH (Prabhakara et al., 2013)(Prabhakara et al., 2013)(Prabhakara et al., 2013)(Prabhakara et al., 2013). Chez les patients atteints d'AD, la colonisation de la peau lésionnelle par *S. aureus* aggrave la maladie (Iwamoto et al., 2019). Pour mimer au mieux les conditions observées dans une peau atteinte d'AD, une abrasion de la couche superficielle de la peau est parfois réalisée avant l'infection épicutanée par application d'une bande adhésive (Prabhakara et al., 2013; Williams et al., 2019). La sévérité de l'inflammation peut ensuite être évaluée de différentes manières, en établissant un score histologique, en mesurant l'épaisseur du derme et en dosant les IgE circulantes. L'intégrité de la barrière épithéliale peut également être mesurée en évaluant la perte d'eau transépidermique. Cette technique permet d'évaluer la fonction barrière de la peau en mesurant la quantité d'eau qui diffuse à travers une zone fixe de la couche cornée jusqu'à la surface de la peau (Akdeniz et al., 2018). Néanmoins, l'épilation de la peau par un rasoir ou des crèmes dépilatoires peut entraîner une inflammation non spécifique de la peau et influencer les résultats observés. Un modèle reproductible d'inoculation épicutanée de pavillon d'oreille de souris par *S. aureus* est proposé pour pallier à cette difficulté (Prabhakara et al., 2013). Le recours à des animaux génétiquement modifiés permet aussi d'étudier la contribution de différentes populations de cellules et de différentes cytokines à l'inflammation cutanée de type AD. Par exemple, Liu *et al* ont analysé l'effet de l'inactivation de MyD88 et de l'inhibition de la synthèse d'IL-17 par différentes populations cellulaires lors d'une infection épicutanée par *S. aureus* (Liu et al., 2017).

## 2. Les modèles d'infection par voie intradermique

Les modèles d'infection par voie intradermique permettent d'évaluer la contribution de plusieurs populations cellulaires résidentes de l'épiderme et du derme, et aussi de celles recrutées au site d'infection *via* la circulation sanguine telles que les PNN ou les MO/MΦ. Des souches bactériennes bioluminescentes et des systèmes d'imagerie optique peuvent être utilisés pour suivre *in vivo* de manière non-invasive l'évolution de la charge bactérienne, ainsi que sa dispersion au sein d'un même organisme en fonction du temps. Ces mêmes systèmes d'imagerie peuvent être utilisés pour analyser les différents composants cellulaires de l'hôte, en ayant recours à des animaux transgéniques possédant des cellules immunitaires fluorescentes (Cho et



al., 2011). D'autres lignées de souris transgéniques exprimant les protéines rapportrices IL-17A-tdTomato et/ou IL-17F-GFP permettent d'étudier la cinétique d'expression de ces cytokines en réponse à *S. aureus*. Les analyses par immunofluorescence peuvent ensuite être complétées par des analyses histologiques, des analyses par cytométrie en flux ou encore des analyses transcriptomiques et protéomiques (Marchitto et al., 2019). Enfin, le modèle d'infection par voie intradermique a également été utilisé pour étudier les mécanismes de la mémoire immunitaire en réinfectant des souris sur un site cutané différent de celui de la primo-infection (Montgomery et al., 2014).

### 3. Les modèles d'infection sous-cutanée

L'inoculation des bactéries dans la couche sous-cutanée permet de mimer les infections plus invasives telles que les abcès, la cellulite ou même celles acquises au cours d'une intervention chirurgicale (Youn et al., 2020). Dans ces modèles, l'utilisation d'implants sous forme de cathéters ou de prothèses est courante, et s'applique parfaitement à l'étude des infections à biofilm de *S. aureus*. En effet, les modèles *in vivo* d'infection par biofilm impliquent une colonisation plus invasive du tissu cutané. Les biofilms sont inoculés soit directement dans les tissus (Yee et al., 2019), soit indirectement en insérant des supports abiotiques tels que des cages tissulaires, des cathéters ou des sutures médicales, à travers des incisions ou des poches d'air préformées (Chauhan et al., 2012; Markel et al., 2019; Le et al., 2021). Ces supports peuvent être stériles au moment de l'insertion, et ensuite ensemencés avec des bactéries planctoniques pour former un biofilm, ou sont déjà pré-colonisés par le biofilm. Enfin, tout comme pour les modèles d'infection par voie intradermique, ces modèles ont également été utilisés pour étudier les effecteurs de la mémoire immunitaire innée médiée notamment par les M $\Phi$  et les DC CD207+ (Chan et al., 2017, 2018).

### 4. Les modèles d'infection de plaies cutanées

Chez l'Homme, *S. aureus* va infecter une plaie cutanée caractérisée par la présence de pus et de nécrose. Cette peau lésée représente le point d'entrée le plus commun pour cette espèce bactérienne. Ces infections peuvent être modélisées chez la souris en induisant une rupture de la barrière cutanée *via* des incisions, des plaies externes ou des brûlures suivies de l'inoculation bactérienne (Anderson et al., 2019; Hoffmann et al., 2020; Li et al., 2020; Wang et al., 2021). Ainsi, l'impact de la présence des bactéries sur le processus de réparation tissulaire peut être évalué par des analyses histologiques, par la mesure de la taille des abcès et par la détection de certaines populations cellulaires (Nguyen and Soulika, 2019). Du fait de la présence du microbiote cutané chez l'Homme, ces infections sont souvent polymicrobiennes, comme dans





le cas des infections d'ulcères chez le sujet diabétique, ou lors des infections post-opératoires. L'utilisation de souches bactériennes exprimant différentes molécules bioluminescentes permet le suivi de la charge bactérienne au site d'infection dans le contexte d'une infection polymicrobienne (Miller et al., 2019). Cependant, la composition cellulaire différente de la peau chez la souris et chez l'Homme peut entraîner des difficultés d'interprétation des résultats observés dans les différents modèles *in vivo*, et remettre en cause leur pertinence par rapport aux infections chez l'Homme. Par exemple, contrairement à la peau humaine, l'épiderme de la souris est dense en DETC. Ces dernières reconnaissent les antigènes, exprimés à la surface des kératinocytes endommagés, « stressés » ou transformés lors de l'infection, via leur TCR, pour ensuite favoriser la cicatrisation des plaies et renforcer la fonction de barrière cutanée en produisant de l'IL-17 (MacLeod et al., 2013).

## 5. Les modèles humanisés

Afin de mettre au point des modèles palliant à la différence de physiologie entre l'espèce humaine et animale, le développement de modèles animaux humanisés semble essentiel pour étudier chez l'animal les interactions entre les cellules humaines et l'espèce bactérienne *S. aureus*. *In vitro*, un équivalent de la peau humaine reconstruite en 3D et contenant des kératinocytes et des fibroblastes a été développé. L'insertion d'implants dans ce modèle 3D permet de tester l'interaction de nouveaux matériaux à utiliser pour des dispositifs médicaux invasifs, avec une barrière cutanée artificielle. De plus, l'introduction d'un agent infectieux *via* l'implant permet de mimer les infections nosocomiales dans un contexte *in vitro*. Cependant, ce modèle est dépourvu de cellules immunitaires (Bolle et al., 2020). Schulz et al., ont utilisé un modèle de xénogreffe de peau humaine chez la souris pour étudier le recrutement des PNN au niveau du greffon suite à une infection par *S. aureus* (Schulz et al., 2019). Certains auteurs ont également utilisé des lignées de souris exprimant des récepteurs humains tels que la langérine pour étudier la spécificité de certaines toxines ou de certains composants immunogènes pour leurs récepteurs, ainsi que leurs rôles biologiques *in vivo* (van Dalen et al., 2019).



## **PARTIE 2 – TRAVAIL PERSONNEL**

---

---



## I. Objectifs du travail

La revue de la littérature présentée en première partie de ce manuscrit montre que les bactéries ont une physiologie particulière au sein du biofilm, avec des mécanismes spécifiques mis en place pour résister aux attaques de l'hôte et y persister. Ces bactéries résistent aux agents antimicrobiens et sont plus difficilement accessibles aux phagocytes de par la barrière physique que constitue le biofilm. Par ailleurs, le biofilm module activement la réponse immunitaire de l'hôte, à l'origine de la notion « d'immuno-échappement », par des mécanismes qui restent encore mal connus. Dans ce contexte, il nous est apparu essentiel de mettre en évidence des caractéristiques immunitaires propres au biofilm. Pour cela, nous avons voulu comparer les réponses immunitaires induites par la forme planctonique et la forme biofilm. Toutes les études réalisées *in vitro* ont montré une réponse spécifique des cellules eucaryotes suite au traitement par des surnageants de cultures de *S. aureus* sous forme planctonique ou de biofilm (Secor et al., 2011; Kirker et al., 2012; Olender et al., 2019). Cette différence s'étend également aux biofilms d'autres espèces bactériennes comme *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *C. amycolatum* et *S. epidermidis* (Daw et al., 2012; Spiliopoulou et al., 2012; Kaya et al., 2021). Cependant, ces résultats ne sont pas nécessairement le reflet des interactions complexes qui se produisent *in vivo* dans un tissu infecté. Ces interactions peuvent ainsi être étudiées chez l'animal, et en particulier chez le rongeur, dans des modèles d'infections cutanées.

Au cours de notre travail, nous nous sommes intéressés à la première étape de la réponse immunitaire induite par une infection cutanée à *S. aureus*, et représentée par la réponse inflammatoire. Nous avons comparé *in vivo* la réponse induite par les deux formes bactériennes, la forme planctonique et la forme biofilm, afin de mieux comprendre comment les bactéries du biofilm résistent aux attaques du système immunitaire, et de mettre en évidence une éventuelle signature immunitaire propre au biofilm. Pour cela, nous avons voulu dans un premier temps mettre en place un modèle d'infection cutanée *in vivo* permettant l'analyse de la dynamique de la réponse inflammatoire dirigée contre *S. aureus*. En utilisant une approche de microscopie confocale par imagerie intravitale, le modèle d'étude mis en place nous a ensuite permis d'étudier le recrutement et les interactions des phagocytes, des cellules de l'immunité innée, avec la bactérie inoculée sous sa forme planctonique ou biofilm. Des caractéristiques propres à la réponse inflammatoire précoce induite par la forme biofilm ont ainsi pu être mises en évidence. Enfin, nous avons étudié *in vitro* les interactions entre les cellules dendritiques, des cellules clés du système immunitaire à la frontière entre la réponse immunitaire innée et adaptative, et *S. aureus* sous sa forme biofilm ou planctonique. Ces expériences ont été réalisées *in vitro* à partir



de cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris (BMDC). Elles ont eu pour objectif de mettre en évidence des réponses spécifiques induites par la forme biofilm, à l'origine de réponses immunitaires adaptatives modifiées favorisant la persistance de la bactérie, et l'évolution de l'infection vers la chronicité.





## II. Mise en place d'un modèle d'infection cutanée pour étudier la dynamique de la réponse immunitaire innée dirigée contre le biofilm de *Staphylococcus aureus*

*A mouse ear skin model to study the dynamics of innate immune responses against Staphylococcus aureus biofilms.*

Aizat Iman Abdul Hamid, Laurence Nakusi, Mickael Givskov, Young-Tae Chang, Claire Marquès, Pascale Gueirard

BMC Microbiol. 2020 Jan 29;20(1):22.

Le phénomène de « phagocytose frustré » décrit initialement lors d'une infection par un biofilm est le reflet d'un défaut d'interactions entre les principaux effecteurs cellulaires de l'immunité innée, les phagocytes, et les bactéries du biofilm (Høiby et al., 2001; Leid et al., 2002). Depuis, certaines études réalisées dans des modèles d'infection *in vivo* ont démontré l'incapacité du système immunitaire de l'hôte à éliminer les bactéries du biofilm colonisant un cathéter sous-cutané (Thurlow et al., 2011; He et al., 2019). Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer ce phénomène : une difficulté des phagocytes à pénétrer au sein du biofilm, mais aussi à lyser les bactéries si elles parviennent à infiltrer le biofilm. Cependant, aucune étude comparative du devenir des deux formes bactériennes n'a été réalisée dans ces différents modèles d'étude. Par exemple, dans l'étude menée par Thurlow et al., la charge bactérienne a été quantifiée dans un modèle de cathéter sous-cutané colonisé par *S. aureus*, en comparaison d'une infection sous-cutanée en l'absence d'implant. Il est difficile de comparer les résultats obtenus dans les deux conditions du fait de la capacité de l'espèce bactérienne à former spontanément des biofilms, notamment pour les temps d'infection tardifs (Thurlow et al., 2011).

Les différents modèles cutanés d'étude de la réponse inflammatoire anti-biofilm analysent cette réponse à des temps de cinétique donnés et dans des tissus donnés. La réponse immunitaire anti-infectieuse est cependant un processus hautement dynamique, impliquant, comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique de ce travail, l'infiltration tissulaire de différents sous-types cellulaires tels que des phagocytes. Elle se déroule sur plusieurs niveaux interconnectés, à l'échelle tissulaire (population de cellules résidentes ou recrutées), cellulaire, et intracellulaire. Aussi, pour rendre compte de cette complexité, il nous est apparu nécessaire d'étudier cette réponse immunitaire sous un angle dynamique, dans un modèle d'étude permettant de l'appréhender dans sa globalité. Dans ce contexte, nous avons mis en place un



modèle d'étude permettant non seulement de comparer la réponse immunitaire induite par la forme planctonique et la forme biofilm de *S. aureus*, mais aussi d'observer en temps réel les interactions entre les composants cellulaires de cette réponse et la bactérie dans la peau.

Dans les modèles cutanés d'étude de la réponse inflammatoire anti-biofilm couramment utilisés chez le rongeur, les sites d'inoculation sont le flanc ou la partie postérieure de l'animal, deux sites inadaptés pour étudier les réponses immunitaires innées en temps réel par microscopie confocale. Nous nous sommes alors intéressés au modèle d'infection du pavillon de l'oreille de la souris pour mimer une infection cutanée par *S. aureus* (Forestier et al., 2017). Le tissu de l'oreille présente plusieurs avantages techniques : il est fin, facilement accessible, et il permet la réalisation de protocoles simples à mettre en œuvre pour la réalisation d'expériences d'imagerie reproductibles, sur des périodes de temps prolongées.

Dans cette étude, nous proposons un modèle d'inoculation du pavillon de l'oreille de souris transgéniques possédant des cellules phagocytaires fluorescentes combiné à une approche d'imagerie intravitale par microscopie confocale pour étudier la dynamique de la réponse inflammatoire de l'hôte dirigée contre la forme planctonique ou le biofilm de la souche clinique *S. aureus* LYO-S2 rendue fluorescente. Le protocole d'acquisition et d'analyse d'images mis en place a permis d'étudier le recrutement des cellules immunitaires innées dans la peau de souris transgéniques LysM-EGFP. Nous avons pu quantifier cette réponse inflammatoire au fil du temps, et comparer la dynamique des cellules immunitaires innées recrutées après inoculation des deux formes bactériennes.



METHODOLOGY ARTICLE

Open Access



# A mouse ear skin model to study the dynamics of innate immune responses against *Staphylococcus aureus* biofilms

Aizat Iman Abdul Hamid<sup>1</sup>, Laurence Nakusi<sup>1</sup>, Mickael Givskov<sup>2</sup>, Young-Tae Chang<sup>3</sup>, Claire Marquès<sup>1</sup> and Pascale Gueirard<sup>1\*</sup> 

## Abstract

**Background:** *Staphylococcus aureus* is a human pathogen that is a common cause of nosocomial infections and infections on indwelling medical devices, mainly due to its ability to shift between the planktonic and the biofilm/sessile lifestyle. Biofilm infections present a serious problem in human medicine as they often lead to bacterial persistence and thus to chronic infections. The immune responses elicited by biofilms have been described as specific and ineffective. In the few experiments performed in vivo, the importance of neutrophils and macrophages as a first line of defence against biofilm infections was clearly established. However, the bilateral interactions between biofilms and myeloid cells remain poorly studied and analysis of the dynamic processes at the cellular level in tissues inoculated with biofilm bacteria is still an unexplored field. It is urgent, therefore, to develop biologically sound experimental approaches in vivo designed to extract specific immune signatures from the planktonic and biofilm forms of bacteria.

**Results:** We propose an in vivo transgenic mouse model, used in conjunction with intravital confocal microscopy to study the dynamics of host inflammatory responses to bacteria. Culture conditions were created to prepare calibrated inocula of fluorescent planktonic and biofilm forms of bacteria. A confocal imaging acquisition and analysis protocol was then drawn up to study the recruitment of innate immune cells in the skin of LysM-EGFP transgenic mice. Using the mouse ear pinna model, we showed that inflammatory responses to *S. aureus* can be quantified over time and that the dynamics of innate immune cells after injection of either the planktonic or biofilm form can be characterized. First results showed that the ability of phagocytic cells to infiltrate the injection site and their motility is not the same in planktonic and biofilm forms of bacteria despite the cells being considerably recruited in both cases.

**Conclusion:** We developed a mouse model of infection to compare the dynamics of the inflammatory responses to planktonic and biofilm bacteria at the tissue and cellular levels. The mouse ear pinna model is a powerful imaging system to analyse the mechanisms of biofilm tolerance to immune attacks.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, Biofilm, Planktonic form, Inflammation, Mouse, Intravital imaging

\* Correspondence: [pascale.gueirard@uca.fr](mailto:pascale.gueirard@uca.fr)

<sup>1</sup>Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, UMR CNRS 6023, Université Clermont-Auvergne, Clermont Ferrand, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



## Background

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is a common commensal Gram-positive bacterium that colonizes the skin and mucous membranes of humans. It can also shift between planktonic and biofilm lifestyles and colonize abiotic surfaces such as indwelling medical devices and prosthetic implants [1]. Inside biofilms, bacteria are embedded in an extracellular matrix and are more tolerant to antibiotics and to host immune attacks [2]. The resulting impact on human health is enormous since biofilm infections account for more than 80% of microbial infections in otherwise sterile tissue(s) and often become chronic [3].

The immune responses elicited by biofilms have been described as specific and ineffective thus promoting bacterial persistence and the establishment of chronic infections [4]. Different immune evasion mechanisms have been proposed to be involved, including phagocyte direct killing (macrophages, neutrophils), specific recruitment of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and macrophage polarization towards an anti-inflammatory phenotype [4, 5]. These results were mostly obtained during experiments performed *in vitro* in which biofilms were exposed to monocytes or neutrophils, or both [6]. In the few experiments performed *in vivo* with different rodent models, several parameters vary, such as the presence of a biomedical device, the tissue(s) that were inoculated or implanted with a bacteria-free or loaded device, the bacteria delivery mode and the inoculum dose [7]. These studies illustrate the importance of both neutrophils and monocytes/macrophages as a first line of defence against biofilm infections. However, the bilateral interactions between biofilms and myeloid cells remain poorly studied and analysis of the dynamic processes at the cellular level in tissues inoculated with biofilms is still an unexplored field. The mouse ear pinna is currently one of the most frequently used tissues to perform intravital confocal live imaging. In particular, it allows the analysis of cellular behaviour in an inflamed tissue [8]. We previously developed a concept that was potentially able to extract the biologically relevant features of the host and invasive bacteria after injection of either the planktonic or biofilm form of bacteria in the ear pinna [7]. In the present study, it was decided to use the transgenic fluorescent reporter laboratory mice line LysM-EGFP. Owing to the relative thinness of the ear pinna, the model enabled us to perform live imaging on recruited enhanced green fluorescent protein (EGFP) fluorescent leukocytes, in particular neutrophils and monocytes/macrophages. When the LysM-EGFP mouse ear pinna dermis was loaded with either planktonic or biofilm bacteria, the first results showed that the inflammatory response to *S. aureus* can be quantified in the skin.

Both bacterial forms induced a considerable inflammatory response at the injection site. However, real-time analysis showed different cellular dynamics with a limited access of recruited phagocytes to bacteria inside biofilms, resulting in less efficient phagocytosis. We also investigated the motility of resident or recruited phagocytes and observed that cells arrest at the injection site to interact with planktonic or biofilm bacteria. At early time points, biofilms slowed down phagocytes and modified their trajectory. Finally, the nature of the inoculum (planktonic or biofilm) influenced speed and straightness parameters differently, independently of cell-bacteria interactions at the injection site.

We therefore developed a mouse model of infection to compare the inflammatory response to planktonic and biofilm bacteria at the tissue and cellular levels. Our novel findings show that the dynamics of the inflammatory responses against the two bacterial forms are different.

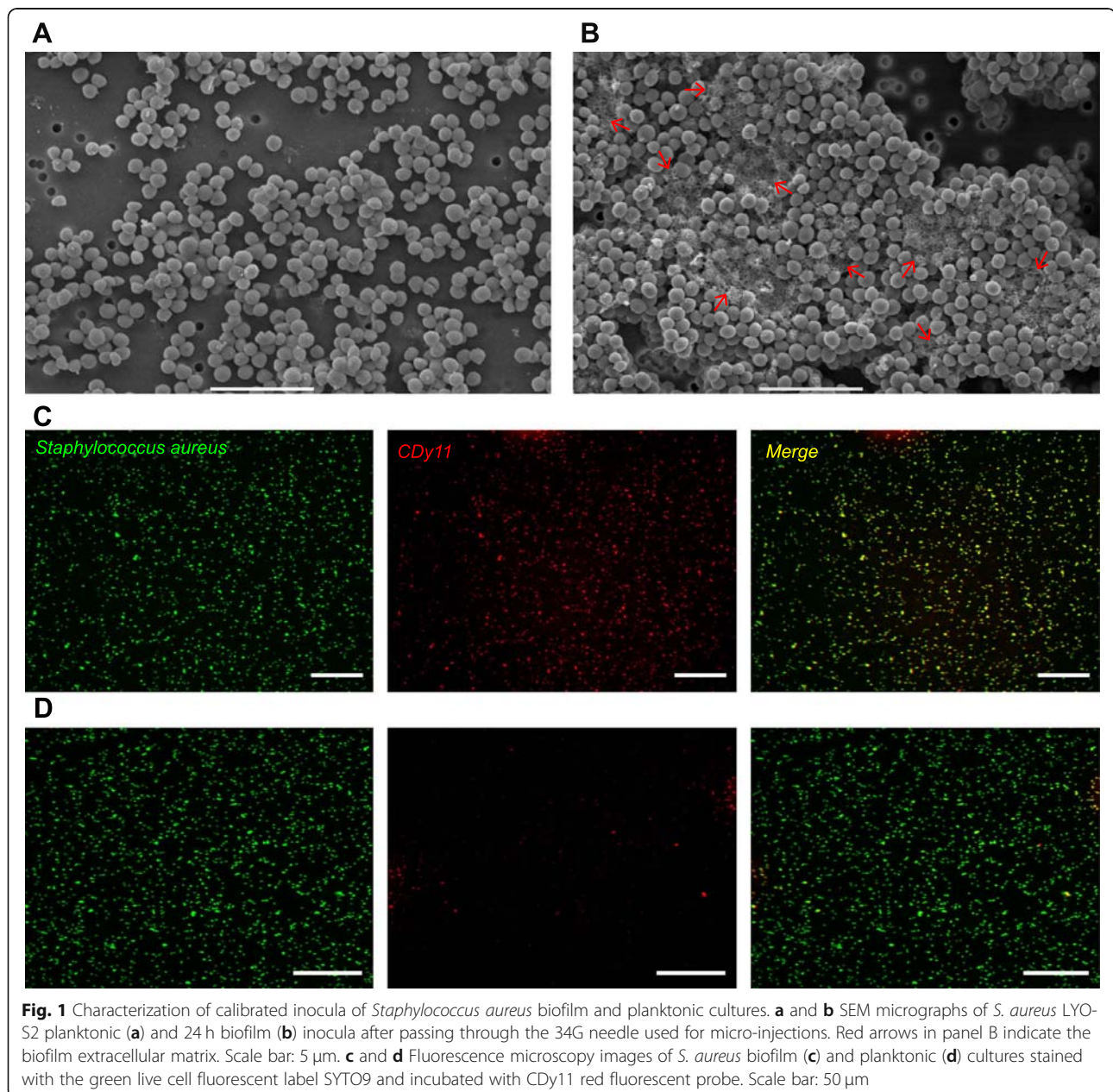
## Results

### Preparation and characterization of calibrated inocula of *Staphylococcus aureus* biofilm and planktonic cultures

A reproducible protocol of biofilm preparation was created to obtain a calibrated bacterial inoculum of  $10^7$  colony-forming units (CFUs) in 3.8  $\mu\text{L}$  of biofilm suspension (injection volume). As shown in Additional file 1: Figure S1A, titres of different aliquots of 24 h-old biofilms collected in the same well or in different wells for three independent experiments were comparable (Additional file 2: Table S1). To compare host immune responses to planktonic and biofilm forms of *S. aureus* LYO-S2 bacteria, calibrated inocula of planktonic bacteria were also prepared. The titres of the inocula were comparable for both bacterial forms and contained the expected quantity of bacteria (Additional file 1: Figure S1B and Additional file 2: Table S1). However, the morphological characteristics of the two inocula were different, even after passing through the 34-gauge (34G) needle used for micro-injection into the mouse ear tissue. Scanning electron microscopy (SEM) ultrastructural analysis showed that planktonic bacteria were either dispersed or organized in small clusters (Fig. 1a and Additional file 1: Figure S1C). In contrast, biofilms were organized in aggregates of  $29.43 \pm 7.06 \mu\text{m}$  across (Additional file 1: Figure S1D). When zoomed in, the extracellular matrix is clearly observed inside these aggregates (Fig. 1b, red arrows and Additional file 1: Figures S1E-H). However, the homogenization technique used to prepare biofilm inocula results in an inoculum containing mainly biofilm aggregates but also detached bacteria and planktonic bacteria. Future use of the term “biofilm inoculum” or “biofilm” will be in reference to this type of inoculum. Using the fluorescent probe CDy11, which targets amyloid fibrils, we observed that this biofilm matrix component was detected more abundantly in our







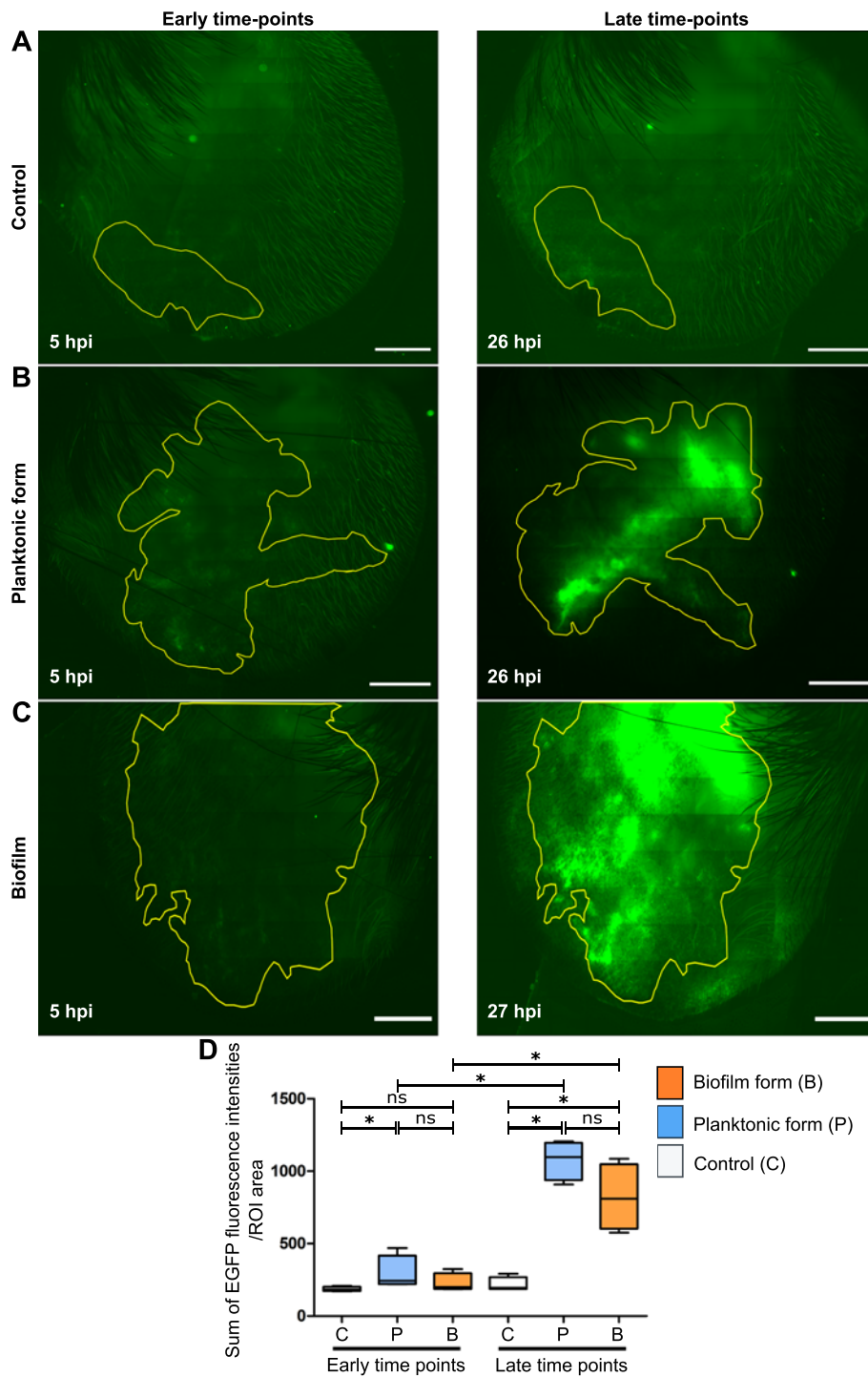
biofilm preparations than in the samples of planktonic bacteria (Fig. 1c-d) [9].

#### Micro-injection of calibrated inocula of planktonic or biofilm forms of *Staphylococcus aureus* in the mouse ear pinna induces a strong inflammatory response

LysM-EGFP transgenic mice were inoculated intradermally into the ear pinna with  $10^7$  CFUs of either planktonic or biofilm mCherry-LYO-S2 fluorescent bacteria, or Trypticase Soja (TS) culture medium, which was used as a control. Inflammatory responses were followed at early (4–7 h post-injection [hpi]) and late time points (after 24 hpi) by measuring the intensity of the EGFP signal for each group

(Fig. 2a-c). The image of the ear pinna enabled us to analyse overall inflammation in the entire tissue (mosaic acquisition). To quantify this signal, we created the following protocol. A region of interest (ROI) was drawn on late time point images, where the EGFP signal was more easily detectable, and applied to early time point images. The ratio of the sum of EGFP fluorescence intensities to ROI areas was calculated with this protocol and the inflammatory response was compared at early and late time points in the two groups of infected mice (Fig. 2d and Additional file 3: Table S2). We used the same protocol for the control group and observed a non-specific recruitment of EGFP+ innate immune cells due to the physical trauma from

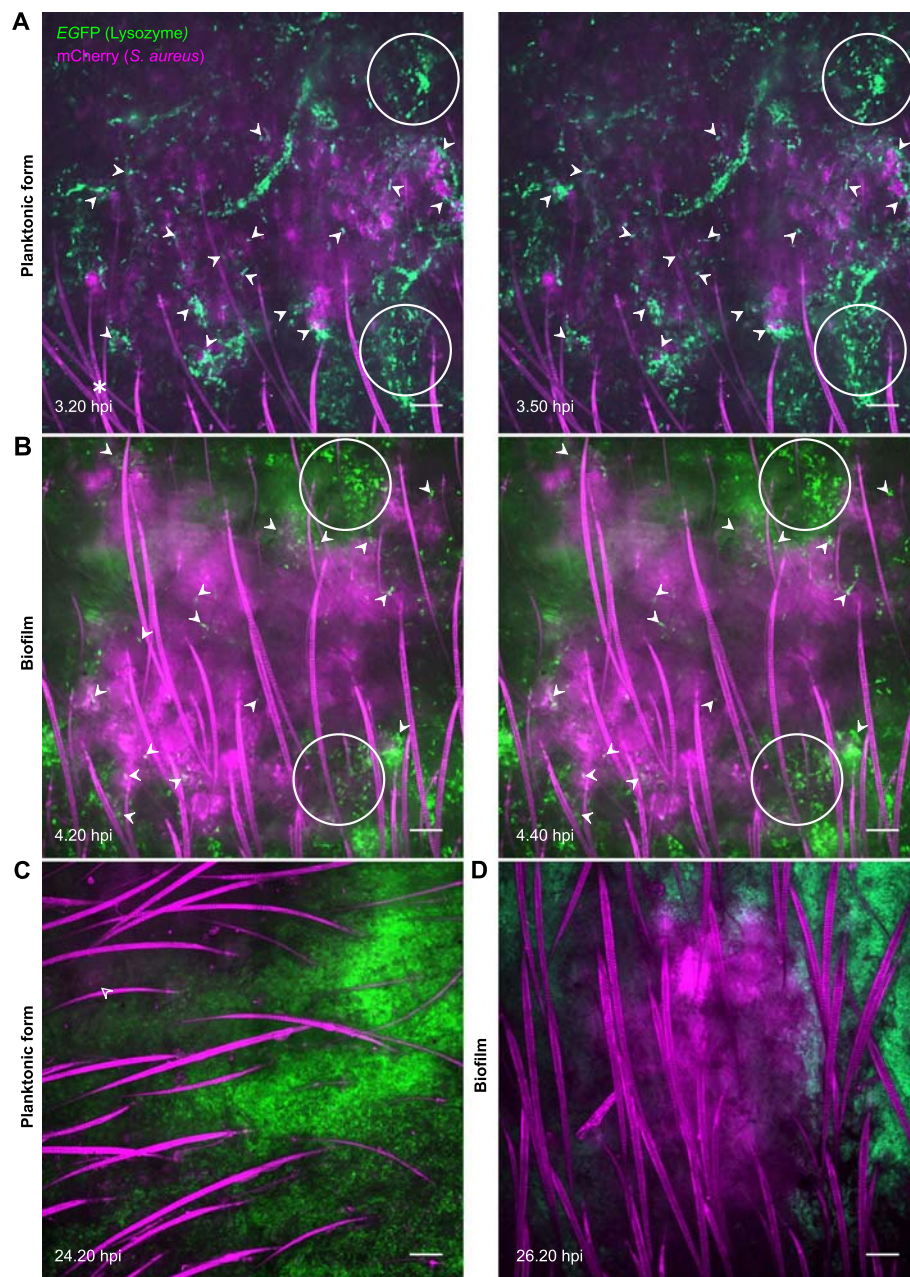




**Fig. 2** Micro-injection of calibrated inocula of *Staphylococcus aureus* in the mouse ear pinna. **a–c** Reconstituted confocal images of the mouse ear pinna tissue showing the maximal projection intensities of the EGFP signal. LyM-EGFP transgenic mice were micro-injected with TS culture medium (**a**) or *S. aureus* mCherry-LYO-S2 in its planktonic (**b**) or biofilm (**c**) form at early (4–7 hpi) and late time points (after 24 hpi). The EGFP fluorescence (green) signal corresponds to phagocytic cells (neutrophils and macrophages). The yellow line indicates the ROI where the “Sum of EGFP fluorescence intensities” was measured. Scale bar: 2 mm. One representative experiment is shown for each group of mice from four independent experiments. **d** Ratio of the sum of EGFP fluorescence intensities to ROI area. Data are expressed as median and interquartile ranges for four mice per group







**Fig. 3** Dynamics of recruited EGFP+ cells in the mouse ear pinna after inoculation of *Staphylococcus aureus*. **a** and **b** Live confocal imaging after micro-injection of *S. aureus* mCherry-LYO-S2 in its planktonic (**a**) or biofilm (**b**) form in the ear pinna of LysM-EGFP transgenic mice at early time points. Innate immune cell recruitment towards planktonic bacteria and biofilms was observed between 3.20 to 3.50 hpi and 4.20 to 4.40 hpi, respectively. A progressive recruitment of EGFP+ innate immune cells was observed at the injection site with cell-bacteria contact areas (filled white arrowheads). White empty circles show cell accumulation over time for the planktonic or biofilm inoculum at early time points. \*: autofluorescent hair (also in magenta). Scale bar: 100  $\mu$ m. (**c** and **d**) Live confocal imaging at late time points after micro-injection of planktonic (**c**) or biofilm (**d**) bacteria, at 24.20 hpi and 26.20 hpi, respectively. Empty white arrowhead indicates the presence of remaining planktonic form after 24 h (low magenta signal) whereas biofilms were still easily detectable. Scale bar: 100  $\mu$ m. **a–d** Images show average intensity projections of green (innate immune cells) and magenta (bacteria) fluorescence. One representative experiment is shown for each group of mice from three independent experiments

injection and the introduction of TS culture medium (Additional file 4: Movie S1). At early time points, both bacterial forms induced an inflammatory response, with a

statistically significant increase only in the group of mice inoculated with planktonic bacteria. Thus, planktonic bacteria induced a greater response than biofilms after 4 hpi.



Between the early and late time points, the inflammatory response was significantly greater for both bacterial forms. At late time points, the response was considerable in both groups of challenged mice compared to control mice, with no significant difference between mice inoculated with planktonic or biofilm bacteria (Fig. 2d).

#### **Dynamics of immune cell recruitment after the micro-injection of either planktonic or biofilm forms of *Staphylococcus aureus* in the mouse ear pinna are different**

LysM-EGFP transgenic mice were inoculated intradermally into the ear pinna with  $10^7$  CFUs of either planktonic or biofilm mCherry-LYO-S2 fluorescent bacteria, or with TS culture medium. We created a confocal acquisition protocol to analyse the dynamics of recruited EGFP+ cells at the inoculation sites by real-time imaging. A red autofluorescence signal is emitted by mice hairs and could not be prevented by shaving the ear pinna. Indeed, this operation would have induced a non-specific inflammatory response. In control mice, recruitment was low owing to injection trauma (Additional file 4: Movie S1). In mice inoculated with bacteria, an influx of phagocytic cells was observed at early (3 to 6 hpi) (Fig. 3a-b, white circles) and late time points (after 24 hpi) (Fig. 3c-d) for both bacterial forms. At early time points, immune cells were present over the entire surface of planktonic bacteria injection sites and multiple contact points between cells and bacteria were observed. In addition, numerous immune cells infiltrated the injection sites (Fig. 3a and Additional file 5: Figures S2A-B, white arrowheads; see also Additional file 6: Movie S2). In biofilms, the contact points were less numerous and were mainly located at the periphery of the injection site. In contrast to planktonic inocula, a small number of cells succeeded in infiltrating the biofilm (Fig. 3b and Additional file 5: Figures S2C-D, white arrowheads; see also Additional file 7: Movie S3). The fluorescent signal was less detectable for planktonic bacteria after 24 h, suggesting that bacterial lysis after phagocytosis had occurred (Fig. 3c, white empty arrowhead). For biofilms, phagocytosis seemed to be less effective, since a fluorescent signal was still clearly visible after 24 h (Fig. 3d). Overall, this real-time analysis using an intravital imaging approach shows that the dynamics of the inflammatory responses against planktonic and biofilm bacteria are different.

#### **Motility of recruited innate immune cells is different after injection of planktonic or biofilm forms of *Staphylococcus aureus* in the mouse ear pinna**

Using Imaris software, we created an analysis protocol to track the motility properties (average speed and straightness) of EGFP+ cells recruited at the injection zone

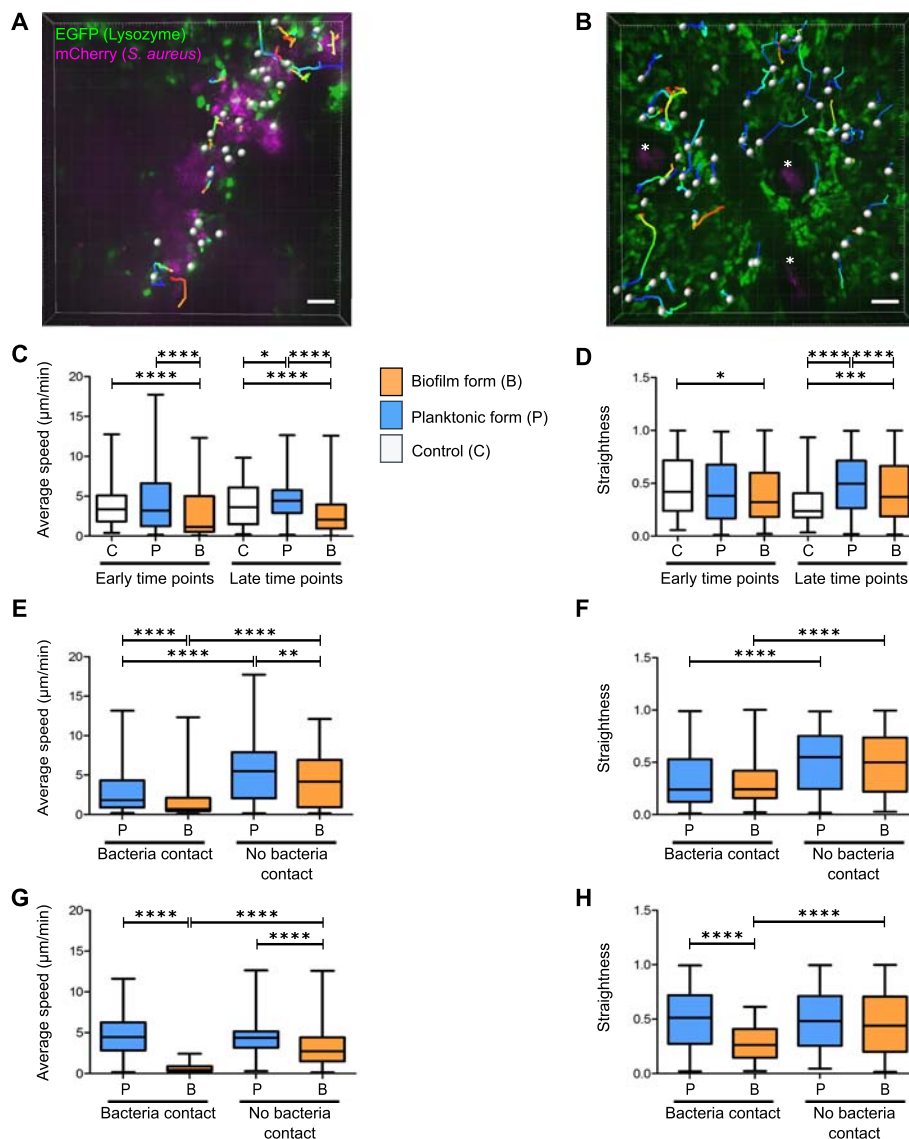
from the previously acquired time-lapse videos (Fig. 4). Using the “Spots” tool we attributed a sphere to a number of immune cells observed in the acquisition field (Fig. 4a-b, white spheres). This enabled us to establish a trajectory (Fig. 4a-b, multicoloured lines) for each sphere corresponding to the path taken by each cell over time in the ear tissue. We then compared the average speed and straightness of the trajectories of phagocytic cells in response to the two bacterial forms. In different zones of the injection site, cells interacted with bacteria (Fig. 4a) or not (Fig. 4b). We first analysed the motility of all cells in response to bacteria (planktonic or biofilm) or to TS culture medium without distinction between cells that interacted with bacteria and cells that did not. At early time points, only biofilms induced a significant decrease in cell speed, compared to control mice and mice inoculated with planktonic bacteria. Thus, biofilms slowed down recruited cells, an effect that was maintained 24 hpi. In contrast, planktonic bacteria significantly increased cell speed compared to the control group (Fig. 4c and Additional file 8: Table S3). This differential response induced by the two bacterial forms was also seen for cell trajectory straightness, which was significantly decreased at early time points only by biofilms (less straight trajectory of EGFP+ recruited cells) compared to the control group. At late time points, we observed an opposite effect, as both bacterial forms significantly increased straightness compared to the control group, with a more pronounced effect for planktonic bacteria (Fig. 4d and Additional file 9: Table S4). We further analysed the motility of cells interacting with bacteria (bacteria contact) or not (no bacteria contact) in different zones of the cutaneous injection site for the same time point (Fig. 4e-h). Cell motility was compared after inoculation of biofilm or planktonic bacteria. At early time points, the presence of the two forms of bacteria (bacteria contact) induced a significant decrease in both speed and straightness (Fig. 4e-f, Additional file 10: Table S5 and Additional file 11: Table S6). This indicates that cells arrest at the injection site to interact with inoculated bacteria. At early and late time points, cell speed was reduced in biofilms compared to planktonic cells, independently of the presence of bacteria (Fig. 4e and g, Additional file 12: Table S7). Finally, at late time points, straightness was reduced for cells interacting with biofilms, compared to planktonic inocula (Fig. 4h and Additional file 13: Table S8). Taken together, these results demonstrate that the cell dynamics of the inflammatory response are different after inoculation of biofilm or planktonic bacteria. The mouse ear pinna model evidences an inflammatory response specific to biofilms that is probably one mechanism of its tolerance to immune attacks.

#### **Discussion**

The dynamics of the implementation of immune responses during *S. aureus* infections in vivo is a key







**Fig. 4** Motility of recruited EGFP+ cells in the mouse ear pinna after micro-injection of *Staphylococcus aureus*. **a** and **b** Illustration of immune cell tracking with Imaris software using the “Spots” tool to analyse the motility of recruited immune cells. The analysis was carried out in different zones of the injection site where cells were either in contact with visible bacteria (**a**) or not (**b**). Each cell is represented by a white sphere and its trajectory in the thickness of the tissue by a multicoloured line. Images shown were taken at 4.45 hpi (**a**) and 26 hpi (**b**). \*: base of hair follicles. Scale bar: 50 µm. **c-h** Average speed and straightness of EGFP+ cells recruited to injection sites at early and late time points after inoculation of TS culture medium (control), planktonic bacteria (planktonic form) or biofilms (biofilm form). Data are expressed as median and interquartile ranges pooled from three different mice in three independent experiments for each group. Average speed (**c**) and straightness (**d**) of all cells (in contact with visible bacteria or not) in infected and control mice. Number of cells (N) analysed for each group at early and late time points, respectively: Control: N = 90 and 94 cells; Planktonic form: N = 315 and 433 cells; Biofilm form: N = 254 and 518 cells. Average speed (**e** and **g**) and straightness (**f** and **h**) of cells either in contact (bacteria contact) or not (no bacteria contact) with planktonic or biofilm bacteria at early (**e** and **f**) and late (**g** and **h**) time points. Number of cells (N) analysed at early time points that were in contact or not in contact with bacteria, respectively: Planktonic form: N = 157 and 158 cells; Biofilm form: N = 142 and 112 cells. Number of cells (N) analysed at late time points that were in contact or not in contact with bacteria, respectively: Planktonic form: N = 298 and 135 cells; Biofilm form: N = 98 and 420 cells

event. It is a determinant factor especially during planktonic-to-biofilm transition, as the bacterial persistence associated with the “chronicization” process of biofilm infection often depends on it. However, it is difficult to follow these events in mammals over time and this

hinders the clear understanding of the immune evasion mechanisms of *S. aureus* biofilms and therefore the design of preventive strategies against biofilm infections.

In the present study, we compared for the first time the dynamics of early innate immune responses to



planktonic and biofilm *S. aureus* in the skin. The skin is a common target tissue for *S. aureus* infections and the mouse ear pinna is frequently used as a cutaneous imaging site. This accessible tissue can be rapidly and easily prepared for imaging over long periods of time. Calibrated inocula were injected intradermally in a very small volume with a 34G needle to limit inflammation resulting from injection trauma. The maturation state of the biofilm culture and the bacterial inocula were two major criteria in the finalization of the protocol. We prepared “young” biofilms (24 h-old) as previous studies reported that immature biofilms are more susceptible to neutrophil attack than mature biofilms [10]. We inoculated a high number of bacteria ( $10^7$  CFUs) into the ear tissue of LysM-EGFP transgenic mice, as in previously published mouse models of *S. aureus* skin infections such as the chronic diabetic wound model and the air pouch model [11, 12]. Once drawn up, our protocol enabled us to compare qualitatively and quantitatively the innate immune responses induced by a comparable dose of planktonic or biofilm bacteria. As described above, our biofilm inoculum contained bacterial aggregates and also planktonic and detached bacteria. The phenotype of the latter is similar to that of biofilm bacteria. Indeed, previous studies have described differential gene expression profiles for *S. aureus* in its planktonic or biofilm form [13, 14]. One major difference between the two inocula was the presence of the extracellular matrix in the biofilm aggregates. Among the components of the LYO-S2 *S. aureus* biofilm matrix inoculated into mice, we detected amyloid fibrils. Small peptides called phenol-soluble modulins (PSMs) produce amyloids in *S. aureus* biofilms and notably contribute to *S. aureus* biofilm stability. They are also described as key virulence factors capable of stimulating inflammatory responses or affecting leukocyte viability or functions [15, 16], and could contribute to the specific innate immune responses observed with biofilm bacteria.

After inoculation, we used the mouse ear pinna model to follow the inflammatory response to *S. aureus* over time at the tissue level. Imaging analysis showed that bacterial inocula induced an early inflammatory response at the cutaneous injection site in LysM-EGFP transgenic mice, consisting of recruited EGFP<sup>+</sup> phagocytes, in particular neutrophils and monocytes/macrophages. We quantified this response for the first time and showed that it is significantly increased with the planktonic form after 4 h, compared to that in control mice. The absence of significant differences between the control and biofilm conditions could have been due to early phagocyte killing, as previously reported [4, 5, 17]. After 24 h, the inflammatory response was considerable and comparable for the two bacterial forms. In rodent models, neutrophils are usually the most rapidly recruited, and therefore most abundant,

cells in the proximity of biofilms [7]. In a catheter-related model, however, monocytes were the first cells to be recruited [18]. Although overall responses are comparable at late time points, we postulate that the phenotype of recruited cells in our model differs according to whether planktonic or biofilm bacteria are injected with, for example, the specific recruitment of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) for the biofilm, as described previously [19].

The mouse ear pinna model then enabled us to follow the inflammatory responses to planktonic or biofilm *S. aureus* over time at the cellular level. Analysis of the dynamics of recruited EGFP<sup>+</sup> cells at the inoculation sites by real-time imaging showed that the dynamics differed between planktonic and biofilm bacteria. Our results show that biofilm acts as a physical barrier [20]. Few cells infiltrate the biofilm, with most recruited cells being present at the periphery of the inoculum. After 24 h, when innate immune responses have been considered as set up, phagocytosis seemed to be limited. Indeed, the bacterial signal was still intense, compared to the low signal observed with planktonic bacteria at the same time point. This impairment of phagocytosis observed with biofilms is commonly known as “frustrated phagocytosis” [20]. Complementary experiments are required to quantify the bacterial load in the ear tissue over time.

The mouse ear pinna model further enabled us to obtain reproducible quantitative measurements of the speed and straightness of recruited innate immune cells. To obtain the most accurate representation of these motility parameters, stringent algorithm settings were used. Then, manual corrections were applied to cell tracks. For example, only tracks lasting three or more frames were considered during the time that cells were visible in the observation field. Tracks that converged into one were eliminated to avoid any uncertainty about the resulting cell trajectory. Likewise, cells near or exiting the border of the image volume were carefully checked to ensure that the same cell was not counted twice with two different tracks. Analysis of innate immune cell migration showed that cells behaved differently in presence of planktonic and biofilm bacteria. Study of the entire population of cells in the tissue (cells interacting or not with bacteria) showed that biofilms generally decreased cell speed and straightness. In addition, when immune cells interacted with bacteria at the injection site, biofilms generally decreased cell speed more significantly than did planktonic bacteria. A possible correlation could be made with previous observations describing immobilized neutrophils on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in vitro after loss of their pseudopodia [21]. Interestingly, biofilms also induced a remote effect on cell speed, as cells with no visible contact with bacteria



moved more slowly when the inoculum was in the biofilm form. This result suggests the potential diffusion of small molecules from the biofilm capable of influencing the behaviour of proximal recruited cells [5]. We thus provide evidence that cell motility is affected differently by planktonic and biofilm bacteria. Notably, the latter has a greater effect on speed and straightness. Further work is needed on the fine interactions between cells and bacteria in order to study phagocytic cell arrest and subsequent phagocytosis (or lack of).

## Conclusions

The mouse ear skin model proposed here detects and measures the inflammatory responses induced by biofilm and planktonic bacterial challenge over time. It has great potential to elucidate the specific mechanisms used by biofilms to circumvent host innate immune responses and therefore to develop new preventive strategies specifically targeting host immune responses during biofilm infections.

## Material and methods

### Mice and ethical statement

LysM-EGFP transgenic mice (6- to 8-week-old males and females) were obtained from the bacteria-cell interactions unit, Pasteur Institute (Paris, France), and bred in the animal care facility at Université Clermont Auvergne (Clermont-Ferrand, France). All experiments were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of Auvergne C2E2A, Clermont-Ferrand, France (agreement number: 1725) and were carried out in accordance with the applicable guidelines and regulations.

### mCherry-tagged strain construction

The *S. aureus* LYO-S2 mCherry-tagged strain was constructed after insertion of pAH9 plasmid [22] into the LYO-S2 clinical strain [23] by electroporation, as described previously [24]. The *S. aureus* LYO-S2 mCherry-tagged fluorescent strain, named *S. aureus* mCherry-LYO-S2, was selected onto Luria-Bertani (LB) agar containing erythromycin (10 µg/mL). The plasmid was maintained by growing the strain in TS culture medium containing erythromycin (10 µg/mL). Fluorescence was detected in bacterial suspensions by fluorescence microscopy.

### Bacterial growth conditions

*S. aureus* LYO-S2 or the mCherry-LYO-S2 fluorescent strain were grown in TS culture medium at 37 °C with shaking and stored at -80 °C in the same medium containing 15% glycerol. Planktonic bacteria were cultured at 37 °C in TS culture medium under aerobic conditions

and harvested after overnight growth (stationary phase). For biofilm preparations, overnight cultures were adjusted to  $2.10^7$  CFUs/mL of TS culture medium and added to 24-well cell culture plates (1 mL per well). Twenty-four-hour-old biofilms were obtained after incubation of plates at 37 °C without shaking.

### Preparation of bacterial inocula

Before injection, *S. aureus* mCherry-LYO-S2 planktonic inocula were prepared from the overnight growth, which was first homogenized. Bacterial concentration was then deduced by measuring the OD<sub>600</sub> and using the known bacterial titre of the strain at  $6.5.10^8$  CFU/OD unit. A specific volume of the overnight growth containing  $10^7$  CFUs was then withdrawn and centrifuged at 3000 x g for 5 min. The supernatant was eliminated and bacteria were resuspended in TS culture medium to obtain a final concentration of  $10^7$  CFUs per 3.8 µL of culture medium. For *S. aureus* mCherry-LYO-S2 biofilms, inocula were obtained by carefully eliminating 700 µL of the supernatant from each well in the cell culture plate. The remaining biofilm volume was then delicately homogenized and 3.8 µL, corresponding to  $10^7$  CFUs, was collected for further inoculation to mice. Serial dilutions of both planktonic and biofilm inocula were plated on LB agar plates for titration. Biofilm inocula were sonicated three times for 5 min each before dilution (Fisher Scientific, 80 W, 37 kHz). CFUs were counted after 24 h at 37 °C.

### Inoculation of bacteria into mice

Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (50 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg). A small volume (3.8 µL) of planktonic or biofilm inocula or TS culture medium were injected into the dorsal ear dermis of anesthetized mice with a 34G needle fitted to a NanoFil syringe (World Precision Instruments) [25]. A characteristic papule was observable at the injection site, evidence of an intradermal injection.

### Scanning electron microscopy observation of bacterial preparations

For electron microscopy observations, biofilms and planktonic inocula were prepared as described above and deposited on SEM Pore (Jeol filters) with a 34G needle fitted to a NanoFil syringe. After absorption, bacteria were fixed overnight at 4 °C with glutaraldehyde 1.6% in 0.2 M cacodylate buffer at pH 7.4, supplemented with ruthenium red at 0.15%. They were then rinsed in the same buffer. After post-fixation for 1 h with 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer at room temperature, samples were washed for 20 min in distilled water and dehydrated by graded ethanol from 25° to 100° (10 min each) to finish in hexamethyldisilazane (HMDS) evaporated



overnight. After drying, samples were sputter-coated with gold-palladium (JFC-1300, JEOL, Japan). Morphology analyses were made with a scanning electron microscope JSM-6060LV (Jeol, Japan) at 5 kV in high-vacuum mode.

#### Detection of amyloid fibrils in biofilm preparations

Planktonic suspensions and biofilms of *S. aureus* LYO-S2 were prepared as described previously. For planktonic bacteria,  $5.6 \cdot 10^8$  CFU were withdrawn from the overnight culture. The suspension was then centrifuged as before and bacteria were resuspended in 200  $\mu$ L of TS culture medium. For 24 h-old biofilm cultures, 700  $\mu$ L of supernatant were carefully withdrawn from the cell culture plates before homogenization of the remaining suspension. A 10  $\mu$ M stock solution of the fluorescent probe CDy11 [9] was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO). The solution was diluted in phosphate-buffered saline solution (PBS) to prepare a 100  $\mu$ M solution. Ten  $\mu$ L of the diluted probe was then added to each bacterial preparation and incubated for 45 min in the dark at room temperature. TS culture medium (800  $\mu$ L) and 2  $\mu$ L of the live cell fluorescent label SYTO9 from the LIVE/DEAD BackLight Bacterial Viability Kit (Molecular probes) were then added to each preparation and left to incubate for 15 min in the dark at room temperature. Ten  $\mu$ L of planktonic and biofilm preparation samples were deposited on glass slides for further observation by fluorescence microscopy. Image acquisition was carried out on a ZEISS Cell Observer Spinning Disk Confocal Microscope (Carl Zeiss Microscopy, Germany), with two different lasers to observe fluorescence emitted from SYTO9 and CDy11 (excitation at 488 and 590 nm, emission at 509 and 612, respectively, with exposure times set at 100 ms for both channels). Acquisition was performed with 20X (dry) objectives. Each image corresponds to the Z-projected average intensity signal for each channel.

#### In vivo confocal imaging: acquisition

##### Time-lapse video acquisition

Three to 6 hpi, mice were anesthetized by intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (50 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg). Infected ears were prepared as described previously [26] and imaged on a ZEISS Cell Observer Spinning Disk Confocal Microscope (Carl Zeiss Microscopy, Germany). Video acquisition was carried out with two different lasers to observe EGFP and mCherry fluorescence (excitation at 488 and 590 nm, emission at 509 and 612, with exposure times set at 100 and 300 ms, respectively). Acquisition was performed with 10X (dry) and 20X (dry) objectives for periods of 20 to 30 min. With the 10X objective, multiple fields of observation were required as the entire injection site was

imaged. Z-stacks and intervals between images were adjusted according to the thickness of the ear tissue. Acquisition was repeated 24 hpi. Ear tissues of control mice were inoculated with TS culture medium and imaged at the same time points.

##### Mosaic acquisition

Infected ears were also imaged on a ZEISS LSM 800 (Carl Zeiss Microscopy, Germany) confocal microscope with a 10X objective (dry). Multiple fields of observation covering the entirety of the tissue surface were imaged to get a reconstructed image of the ear. To set up acquisition parameters, multiple focal points distributed homogeneously over the acquisition zone were chosen. EGFP fluorescence signal was detected in six Z-stacks spanning 75  $\mu$ m of tissue, with an exposure time of 9.5 ms. The bright-field signal was also detected on a central stack, with an exposure time of 10 ms. Acquisition was repeated after 24 h, with imaging sessions typically lasting 30 to 45 min. Ear tissues of control mice injected with TS culture medium were also imaged with the same protocol.

#### In vivo confocal imaging: analysis

##### Time-lapse video analysis

Videos acquired with the 10X objective were first stitched together using ZEN software. Each image extracted from time-lapse videos corresponds to the Z-projected average intensity signal for each channel at the corresponding time point. Time-lapse videos at 20X and 10X were then analysed with Imaris software using the "Spots" tool. For each cell, a track was generated by the software and manually corrected according to specific criteria: number of frames superior to three and elimination of converging tracks between two different cells. Two different parameters (average speed and straightness) of immune cell dynamics were then extracted. For each time point, both parameters were analysed in different zones of the cutaneous injection site, where cells were in contact or not with the bacterial inoculum.

##### Mosaic analysis

Images acquired on the ZEISS LSM 800 confocal were stitched together using ZEN software to reconstitute an entire image of the ear tissue at early and late time points. A maximum intensity projection image was created from image Z-stacks. A ROI was then drawn manually around the EGFP fluorescent zone of the 24 h image to obtain the sum of EGFP fluorescence intensities of each pixel in the ROI. The shape of the ROI was conserved and applied to the early time point image. The ratio of the sum of intensities of EGFP fluorescence to the area of the ROI was then calculated for both time points.





The images shown represent the Z-projected maximal intensity signal of a reconstituted image of the ear tissue for the EGFP channel.

### Statistical analysis

Prism 5 software (GraphPad Software, Inc.) was used to analyse the statistical significance of data sets by the Mann-Whitney two-tailed test.  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant (symbols: \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \* $p \leq 0.05$ ; ns = non-significant).

### Supplementary information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1635-z>.

**Additional file 1: Figure S1.** Preparation and characterization of calibrated inocula of *Staphylococcus aureus* biofilm and planktonic cultures. **(A)** Titration of 3.8  $\mu$ L aliquots of 24 h-old biofilms of *S. aureus* LYO-S2. Data represent mean  $\pm$  SD of three samples per well collected from three different wells and prepared in three independent experiments. **(B)** Titration of *S. aureus* LYO-S2 planktonic and 24 h biofilm inocula on agar plates. Results are expressed as CFU numbers  $\times 10^7$  in 3.8  $\mu$ L (injection volume). Data represent mean  $\pm$  SD from 17 experiments for the planktonic form and from 27 experiments for biofilms. **(C)** Planktonic inocula after passing through a 34G needle. Scale bar: 10  $\mu$ m. **(D to H)** Biofilm inocula after passing through a 34G needle. Red arrows indicate the biofilm extracellular matrix. Scale bar: 10  $\mu$ m **(D)**, 5  $\mu$ m **(E and F)**, 2  $\mu$ m **(G and H)**.

**Additional file 2: Table S1.** Tables presenting raw data used for the preparation of calibrated *Staphylococcus aureus* biofilm and planktonic inocula.

**Additional file 3: Table S2.** Table presenting raw data used to measure the ratio of the sum of EGFP fluorescence intensities to ROI areas.

**Additional file 4: Movie S1.** Immune cells are recruited to injection sites even in the absence of bacterial challenge. In vivo confocal time-lapse imaging of immune cell migration in LysM-EGFP transgenic mice ear tissue injected with TS culture medium from 4 hpi to 4.20 hpi. Average projections of time-lapse images. Z-stacks collected 41.76 s apart. Scale bar: 100  $\mu$ m.

**Additional file 5: Figure S2.** Dynamics of recruited EGFP+ cells in the mouse ear pinna after micro-injection of *Staphylococcus aureus*. **(A and B)** Confocal images of injection sites after micro-injection of *S. aureus* mCherry-LYO-S2 in its planktonic form in the ear pinna of LysM-EGFP transgenic mice at early time points for two independent experiments. Images of innate immune cell recruitment towards planktonic bacteria were acquired at 5.15 hpi **(A)** and 3.05 hpi **(B)**. **(C and D)** Confocal images of injection sites after micro-injection of *S. aureus* mCherry-LYO-S2 in its biofilm form in the ear pinna of LysM-EGFP transgenic mice at early time points for two independent experiments. Images of innate immune cell recruitment towards biofilms were acquired at 4.20 hpi **(C)** and 3.30 hpi **(D)**. Images show average intensity projections of green (innate immune cells) and magenta (bacteria) fluorescence. Filled white arrowheads indicate cell-bacteria contact areas. \*: autofluorescent hair (also in magenta). Scale bar: 100  $\mu$ m.

**Additional file 6: Movie S2.** Numerous immune cells penetrate the injection site and interact with planktonic bacteria. In vivo confocal time-lapse imaging of immune cell migration in LysM-EGFP transgenic mice ear tissue injected with planktonic bacteria from 3.20 hpi to 3.50 hpi. Average projections of time-lapse images. Z-stacks collected 41.73 s apart. Scale bar: 100  $\mu$ m.

**Additional file 7: Movie S3.** Most immune cells arrest at the periphery of injected biofilms. In vivo confocal time-lapse imaging of immune cell migration in LysM-EGFP transgenic mice ear tissue injected with

planktonic bacteria from 4.20 hpi to 4.40 hpi. Average projections of time-lapse images. Z-stacks collected 45.15 s apart. Scale bar: 100  $\mu$ m.

**Additional file 8: Table S3.** Table presenting the average speed of all cells in infected and control mice at early and late time points. Raw data extracted from Imaris software.

**Additional file 9: Table S4.** Table presenting the straightness of all cells in infected and control mice at early and late time points. Raw data extracted from Imaris software.

**Additional file 10: Table S5.** Table presenting the average speed of cells in contact with bacteria or not in infected mice at early time points. Raw data extracted from Imaris software.

**Additional file 11: Table S6.** Table presenting the straightness of cells in contact with bacteria or not in infected mice at early time points. Raw data extracted from Imaris software.

**Additional file 12: Table S7.** Table presenting the average speed of cells in contact with bacteria or not in infected mice at late time points. Raw data extracted from Imaris software.

**Additional file 13: Table S8.** Table presenting the straightness of cells in contact with bacteria or not in infected mice at late time points. Raw data extracted from Imaris software.

### Abbreviations

CFU: Colony Forming Unit; DMSO: Dimethyl sulfoxide; EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein; EGFP+: Enhanced Green Fluorescent Protein-positive; hpi: Hours post-injection; LB: Luria-Bertani; PBS: Phosphate Buffered Saline; PSM: Phenol Soluble Modulins; ROI: Region Of Interest; SEM: Scanning Electron Microscopy; TS: Trypticase Soja

### Acknowledgements

We wish to thank Alexander R. Horswill (Department of Immunology and Microbiology, University of Colorado, Denver, USA) for pAH9 plasmid, Ivo Boneca (Bacteria-Cell interactions Unit, Pasteur Institute, Paris, France) for the LysM-EGFP transgenic mouse line, Michael Givskov and Youg-Tae Chang for the CDy11b probe, Caroline Vachias and Pierre Pouchin (Confocal Microscopy Facility ICCF, University Clermont Auvergne) for their help with setting up image acquisition settings and image analysis and processing, Christelle Blavignac for treating SEM samples and images (Centre d'Imagerie Cellulaire Santé Facility CICS, University Clermont Auvergne), Elisabeth Billard, Alan Diot, Jérôme Josse and Geneviève Milon for critical reading of the manuscript and helpful discussions, and Karim Alloui for its care of the animal housing facility.

### Authors' contributions

AIAH, CM, LN and PG performed technical experiments and statistical analysis. MG and YTC participated in the design of the amyloid fibrils' labelling method. AIAH and PG participated in the design of the study and data analysis. PG conceived the study and coordinated it. AIAH and PG wrote the initial draft of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### Funding

This work was supported by funding from Auvergne-Rhône-Alpes (AURA) region (Pack Ambition Recherche 2017-IMMUNOFILM-Staph project). The funder was not implicated in the design of the study and collection, in analysis and interpretation of data, and in writing the manuscript.

### Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article and its supplementary information files.

### Ethics approval and consent to participate

LysM-EGFP transgenic mice (6–8 weeks-old male and female) were obtained from the bacteria-cell interactions Unit, Pasteur Institute, Paris, France, and bred in the SPF animal care facility at University Clermont Auvergne (Clermont-Ferrand, France). All experiments were approved by the local Ethics Committee on Animal Experimentation of Auvergne C2E2A, Clermont-Ferrand, France (agreement number: 1725) and were carried out in agreement with the applicable guidelines and regulations.



**Consent for publication**

Not applicable for that section.

**Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

**Author details**

<sup>1</sup>Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, UMR CNRS 6023, Université Clermont-Auvergne, Clermont Ferrand, France. <sup>2</sup>Costerton Biofilm Center, department of Immunology and Microbiology, Faculty of Health Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark. <sup>3</sup>Center for Self-assembly and Complexity, IBS and Department of Chemistry, POSTECH, Pohang, Republic of Korea.

Received: 15 May 2019 Accepted: 7 November 2019

Published online: 29 January 2020

**References**

- Moormeier DE, Bayles KW. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Mol Microbiol*. 2017;104(3):365–76.
- Ricciardi BF, Muthukrishnan G, Masters E, Ninomiya M, Lee CC, Schwarz EM. *Staphylococcus aureus* evasion of host immunity in the setting of prosthetic joint infection: biofilm and beyond. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2018;11(3):389–400.
- Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, et al. Bacterial biofilm and associated infections. *J Chin Med Assoc*. 2018;81(1):7–11.
- Yamada KJ, Kielian T. Biofilm-leukocyte cross-talk: impact on immune polarization and Immunometabolism. *J Innate Immun*. 2018;22:1–9.
- Gries CM, Kielian T. Staphylococcal biofilms and immune polarization during prosthetic joint infection. *J Am Acad Orthop Surg*. 2017;25(Suppl 1):S20–4.
- Watters C, Fleming D, Bishop D, Rumbaugh KP. Host responses to biofilm. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2016;142:193–239.
- Forestier C, Billard E, Milon G, Gueirard P. Unveiling and characterizing early bilateral interactions between biofilm and the mouse innate immune system. *Front Microbiol*. 2017;8:2309.
- Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, et al. *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*. 2008;321(5891):970–4.
- Kim J-Y, Sahu S, Yau Y-H, Wang X, Shochat SG, Nielsen PH, et al. Detection of pathogenic biofilms with bacterial amyloid targeting fluorescent probe, CDy11. *J Am Chem Soc*. 2016;138(1):402–7.
- Günther F, Wabnitz GH, Stroh P, Prior B, Obst U, Samstag Y, et al. Host defence against *Staphylococcus aureus* biofilms infection: phagocytosis of biofilms by polymorphonuclear neutrophils (PMN). *Mol Immunol*. 2009;46(8–9):1805–13.
- Guo Y, Ramos RI, Cho JS, Donegan NP, Cheung AL, Miller LS. *In vivo* bioluminescence imaging to evaluate systemic and topical antibiotics against community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-infected skin wounds in mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(2):855–63.
- Torre A, Bacconi M, Sammiceli C, Galletti B, Laera D, Fontana MR, et al. Four-component *Staphylococcus aureus* vaccine 4C-staph enhances Fcγ receptor expression in neutrophils and monocytes and mitigates *S. aureus* infection in neutropenic mice. *Infect Immun*. 2015;83(8):3157–63.
- Resch A, Rosenstein R, Nerz C, Götz F. Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(5):2663–76.
- Scherr TD, Roux CM, Hanke ML, Angle A, Dunman PM, Kielian T. Global Transcriptome analysis of *Staphylococcus aureus* biofilms in response to innate immune cells. *Infect Immun*. 2013;81(12):4363–76.
- Peschel A, Otto M. Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(10):667–73.
- Zheng Y, Joo H-S, Nair V, Le KY, Otto M. Do amyloid structures formed by *Staphylococcus aureus* phenol-soluble modulins have a biological function? *Int J Med Microbiol*. 2018;308(6):675–82.
- Hirschfeld J. Dynamic interactions of neutrophils and biofilms. *J Oral Microbiol*. 2014;6:26102.
- Thurlow LR, Hanke ML, Fritz T, Angle A, Aldrich A, Williams SH, et al. *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation in vivo. *J Immunol*. 2011;186(11):6585–96.
- Heim CE, Vidlak D, Scherr TD, Koziel JA, Holzapfel M, Muirhead DE, et al. Myeloid-derived suppressor cells contribute to *Staphylococcus aureus* orthopedic biofilm infection. *J Immunol*. 2014;192(8):3778–92.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):1318–22.
- Jesaitis AJ, Franklin MJ, Berglund D, Sasaki M, Lord CI, Bleazard JB, et al. Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization of neutrophil and biofilm interactions. *J Immunol*. 2003;171(8):4329–39.
- Malone CL, Boles BR, Lauderdale KJ, Thoendel M, Kavanaugh JS, Horswill AR. Fluorescent reporters for *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Methods*. 2009;77(3):251–60.
- Marquès C, Tasse J, Pracors A, Collin V, Franceschi C, Laurent F, et al. Effects of antibiotics on biofilm and unattached cells of a clinical *Staphylococcus aureus* isolate from bone and joint infection. *J Med Microbiol*. 2015;64(9):1021–6.
- Schenk S, Laddaga RA. Improved method for electroporation of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*. 1992;94(1–2):133–8.
- Mac-Daniel L, Buckwalter MR, Gueirard P, Ménard R. Myeloid Cell Isolation from Mouse Skin and Draining Lymph Node Following Intradermal Immunization with Live Attenuated *Plasmodium sporozoites*. *J Vis Exp*. 2016;18(111):e53796.
- Amino R, Thiberge S, Blazquez S, Baldacci P, Renaud O, Shorte S, et al. Imaging malaria sporozoites in the dermis of the mammalian host. *Nat Protoc*. 2007;2(7):1705–12.

**Publisher's Note**

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:**

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

**At BMC, research is always in progress.**

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://www.biomedcentral.com/submissions)





### III. Mise en place d'un modèle d'infection sur support abiotique par le biofilm de *Staphylococcus aureus* pour mimer les infections sur matériel médical *in vivo*

*Biofilm-coated microbeads and the mouse ear skin : An innovative model for analysing anti-biofilm immune response in vivo.*

Léo Sauvat, Aizat Iman Abdul Hamid, Christelle Blavignac, Jérôme Josse, Olivier Lesens, Pascale Gueirard

PLoS One. 2020 Dec 4;15(12):e0243500.

Les infections à biofilm de *S. aureus* sur matériel invasif représentent l'une des complications les plus fréquentes et les plus graves associées à l'utilisation des biomatériaux en médecine humaine. Ces infections représentent 25,6 % de toutes les infections associées aux soins aux États-Unis. Elles nécessitent une prise en charge lourde, coûteuse et pouvant être handicapante (lavage du matériel de prothèse au bloc opératoire, antibiothérapie prolongée, changement progressif de matériel en plusieurs étapes chirurgicales, etc.). Les staphylocoques, et en particulier les espèces *S. aureus* et *S. epidermidis*, sont les bactéries les plus souvent isolées lors des infections sur implants orthopédiques (Arciola et al., 2018). La formation du biofilm à la surface de l'implant est étroitement associée au caractère récurrent des infections à *S. aureus* et à leur chronicisation. De plus, la résistance naturelle de *S. aureus* aux antibiotiques sous sa forme biofilm et le détournement de la réponse immunitaire de l'hôte par celui-ci rendent le traitement de ces infections très difficile (Seebach and Kubatzky, 2019).

L'objectif de ce travail a été d'adapter le modèle d'étude préalablement mis en place en inoculant dans le pavillon de l'oreille de la souris un biofilm de *S. aureus* adhérant à une surface abiotique. L'objectif était de mimer les infections à biofilm sur matériel invasif chez l'Homme. Nous avons utilisé un support abiotique miniaturisé en recourant à des microbilles de silice. Ce matériau se rapproche des structures de type céramique souvent retrouvées au niveau des prothèses de hanches. Le fait de recourir à des billes recouvertes de biofilm de très petite taille est de plus compatible avec la micro-injection par voie intradermique de la bactérie sur support dans le pavillon de l'oreille de la souris LysM-EGFP. Dans un premier temps, nous avons optimisé la préparation de microbilles recouvertes de biofilm, puis analysé les propriétés du biofilm présent à la surface des microbilles. Nous avons ensuite étudié la dynamique de la



réponse inflammatoire dirigée contre le biofilm adhérent. Des résultats très comparables à ceux obtenus lors de notre première étude ont été obtenus.





## RESEARCH ARTICLE

# Biofilm-coated microbeads and the mouse ear skin: An innovative model for analysing anti-biofilm immune response *in vivo*

Léo Sauvat<sup>1,2</sup>, Aizat Iman Abdul Hamid<sup>1</sup>, Christelle Blavignac<sup>3</sup>, Jérôme Josse<sup>4</sup>, Olivier Lesens<sup>1,2</sup>, Pascale Gueirard<sup>1\*</sup>

**1** Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, Université Clermont Auvergne, UMR CNRS 6023, Clermont-Ferrand, France, **2** Infectious and Tropical Diseases Department, CRIOA, CRMVT, CHU Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France, **3** Centre Imagerie Cellulaire Santé, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France, **4** CIRI—Centre International de Recherche en Infectiologie, Inserm, U1111, CNRS, UMR5308, École Normale Supérieure de Lyon, Université Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

\* [pascale.gueirard@uca.fr](mailto:pascale.gueirard@uca.fr)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Sauvat L, Abdul Hamid AI, Blavignac C, Josse J, Lesens O, Gueirard P (2020) Biofilm-coated microbeads and the mouse ear skin: An innovative model for analysing anti-biofilm immune response *in vivo*. PLoS ONE 15(12): e0243500. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243500>

**Editor:** Amitava Mukherjee, VIT University, INDIA

**Received:** August 19, 2020

**Accepted:** November 20, 2020

**Published:** December 4, 2020

**Peer Review History:** PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243500>

**Copyright:** © 2020 Sauvat et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript and its [Supporting Information](#) files.

**Funding:** PG Pack research Ambition 2017-IMMUNOFILM-Staph project (Auvergne Rhones)

## Abstract

Owing to its ability to form biofilms, *Staphylococcus aureus* is responsible for an increasing number of infections on implantable medical devices. The aim of this study was to develop a mouse model using microbeads coated with *S. aureus* biofilm to simulate such infections and to analyse the dynamics of anti-biofilm inflammatory responses by intravital imaging. Scanning electron microscopy and flow cytometry were used *in vitro* to study the ability of an mCherry fluorescent strain of *S. aureus* to coat silica microbeads. Biofilm-coated microbeads were then inoculated intradermally into the ear tissue of LysM-EGFP transgenic mice (EGFP fluorescent immune cells). General and specific real-time inflammatory responses were studied in ear tissue by confocal microscopy at early (4–6h) and late time points (after 24h) after injection. The displacement properties of immune cells were analysed. The responses were compared with those obtained in control mice injected with only microbeads. *In vitro*, our protocol was capable of generating reproducible inocula of biofilm-coated microbeads verified by labelling matrix components, observing biofilm ultrastructure and confirmed *in vivo* and *in situ* with a matrix specific fluorescent probe. *In vivo*, a major inflammatory response was observed in the mouse ear pinna at both time points. Real-time observations of cell recruitment at injection sites showed that immune cells had difficulty in accessing biofilm bacteria and highlighted areas of direct interaction. The average speed of cells was lower in infected mice compared to control mice and in tissue areas where direct contact between immune cells and bacteria was observed, the average cell velocity and linearity were decreased in comparison to cells in areas where no bacteria were visible. This model provides an innovative way to analyse specific immune responses against biofilm infections on medical devices. It paves the way for live evaluation of the effectiveness of immunomodulatory therapies combined with antibiotics.



Alpes Region) <https://aaprecherche.auvergnerhonealpes.fr/> The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

The implantation of invasive medical devices occurs routinely in almost all fields of medicine. However, these medical procedures considerably increase the risk of microbial infections for patients. In hospitals, the prevalence of nosocomial infections is therefore high (about 5%), with 32% of clinical cases being caused by foreign body-related infections (FBRI) [1]. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is the second most incriminated microorganism in nosocomial infections and the most incriminated pathogen in surgical site infections (SSIs) after prosthetic joint implantations [2]. These infections require heavy, costly and sometimes functionally deleterious surgery, associated with long-term antibiotic treatments [3]. A prosthetic joint infection, for example, will multiply by three the initial cost of surgery [4].

Like many other bacterial species, *S. aureus* is able to adhere to different types of biotic/abiotic surfaces, promoting the formation of microbial communities called biofilms. This property is one of the most important features of its pathogenicity [5]. Biofilms represent one of the two radically different lifestyles that bacteria can adopt, as opposed to the isolated and free-floating form in liquid medium called planktonic bacteria. Biofilms are the most common form of bacteria and are responsible for 80% of human chronic bacterial infections in developed countries [6]. Thus, understanding the pathophysiology of *S. aureus* FBRI and developing preventive strategies for SSIs are currently active fields of research [7].

One key element of *S. aureus* pathophysiology is the ability of biofilms to circumvent host immune attacks [8]. During *S. aureus* cutaneous infections, tissue-resident mast cells recruit neutrophils and monocytes/macrophages from the bloodstream [9] along with monocytic myeloid-derived suppressor cells (M-MDSCs) in interaction with natural killer (NK) cells to promote the first level of inflammatory responses [10]. *S. aureus* is able to decrease these innate immune responses by acting on complement activation and phagocyte recruitment, and by secreting immune-evasion proteins [8]. The planktonic to biofilm developmental transition also represents one of the primary immune-evasion mechanisms that allow neutralization of neutrophil effector functions [11]. Finally, the complexity of biofilm structure contributes to the increased resistance of biofilm bacteria to host immune defences and to appropriate antibiotic treatments, giving rise to the concept of "biofilm-related disease" [12, 13].

The few studies performed *in vivo* to analyse the inflammatory response to *S. aureus* biofilm bacteria are still in the development phase and the dynamic aspects of the responses are almost unexplored [14]. A better understanding of the different biofilm immune evasion mechanisms is therefore required to develop suitable therapeutic strategies [15].

A mouse ear skin model was previously designed to analyse the dynamics of innate immune responses against *S. aureus* biofilms. In this model, biofilms were micro-injected into the mouse ear pinna, a cutaneous tissue widely used to analyse dynamic interactions between microorganisms and resident or recruited myeloid cells by intravital imaging [16]. This mouse model evidenced inflammatory responses specific to biofilms. The aim of our work was to improve the model by introducing a support made from a comparable material to that used for orthopedic prostheses, so as to mimic biofilm infections on medical devices in humans. We chose silica microbeads as miniaturized inert supports because they have a ceramic-like structure and are compatible with the intradermal micro-injection of biofilms into the ear pinna of LysM-EGFP transgenic mice. In a first step, we optimized the preparation of biofilm-coated microbeads and then analysed biofilm properties on the surface of microbeads. We further compared the dynamics of inflammatory responses against biofilm-coated microbeads or against a mixture of uncoated microbeads and planktonic bacteria injected into the mouse ear pinna.



## Materials and methods

### Materials

**Mice and ethical statement.** C57BL/6 WT mice (6–8 week-old males and females) were purchased from Charles River Laboratories. LysM-EGFP transgenic mice (6–8 week-old males and females) were obtained from the bacteria-cell interactions unit of the Pasteur Institute (Paris, France). Mice were bred in the animal care facility at Clermont Auvergne University (Clermont-Ferrand, France). All experiments were approved by the local Ethics Committee on Animal Experimentation (Auvergne C2E2A, Clermont-Ferrand, France, agreement number: 1725) and were carried out in accordance with the applicable guidelines and regulations. All mice were provided an appropriate environment including shelter in cages, a comfortable resting area, sufficient space (not more than 5 animals per cage) and ready access to fresh water and food to maintain full health and vigour. Animal welfare was observed on a daily basis to ensure optimal conditions and treatment which avoid suffering. Littermates destined to be inoculated were housed in separate cages with access to the same facilities previously stated. The anaesthetic used during experiments was chosen in order to promote deep anaesthesia. During and after imaging sessions, mice were kept warm in order to prevent any risks related to hypothermia. Euthanasia by cervical dislocation on the anesthetized animal was performed at the end of the infection period.

**mCherry and GFP-tagged strain construction.** The *S. aureus* SH1000 mCherry-tagged strain (named mCherry-SH1000) was constructed after insertion of the pCtuf-mCherry plasmid [17] by electroporation into the SH1000 strain isolated from a corneal ulcer [18], as described previously [19]. The mCherry-SH1000 strain was then selected onto Luria-Bertani (LB) agar containing chloramphenicol (10 µg/mL). Clones were grown overnight with shaking in Trypticase Soja (TS) culture medium containing chloramphenicol (10 µg/mL) and stored at –80°C in the same medium with 15% glycerol. Fluorescence was detected in bacterial suspensions by fluorescence microscopy. The *S. aureus* SH1000 GFP-tagged fluorescent strain (named GFP-SH1000) was constructed in the same way with the pCN47-GFP plasmid [20] but using erythromycin (10 µg/mL) in place of chloramphenicol.

**Microbeads.** As an abiotic support for the preparation of biofilms (Monodisperse Silica Microspheres, Cospheric), we chose silica microspheres (microbeads) with the following characteristics: 2.0g/cc, d50 = 4.3µm, CV = 2.7%, <1% doubles. The absence of local or systemic toxicity of the silica microbeads was ascertained after intravenous injection in mice [21]. The stock sample consisted of a mixture of 50 mg of microbead powder from the commercial sample in 2 mL of PBS.

### Biofilm preparation and analysis

**Inoculum preparation.** GFP and mCherry fluorescent SH1000 strains were used in all the experiments performed. Planktonic bacterial cultures were prepared from an aliquot of frozen bacteria in Trypticase Soy (TS) culture medium supplemented with chloramphenicol or erythromycin for mCherry-SH1000 and GFP-SH1000 strains, respectively. The bacterial culture was placed overnight at 37°C with agitation under aerobic conditions.

Planktonic mCherry-SH1000 were prepared from overnight cultures. After homogenization, the bacterial concentration (Colony Forming Unit/mL or CFU/mL) of overnight cultures was estimated by measuring the Optical Density at a wavelength of 600 nm (OD<sub>600nm</sub>) and multiplying it by the known titre of the strain (1.35x10<sup>8</sup> CFU/OD<sub>600nm</sub> units). The corresponding volume of overnight culture containing 5x10<sup>6</sup> CFUs was withdrawn and centrifuged at



3000 g for 5 minutes. The pellet was resuspended in 3.8  $\mu\text{L}$  of Phosphate-Buffered Saline (PBS) containing  $10^5$  microbeads.

Biofilm inocula (mCherry and GFP-SH1000) were prepared after adjusting an overnight culture to  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 1 \pm 0.05$  in TS culture medium. The suspension was then diluted 100x and placed in at least two flat-bottomed-wells in a 24-well cell culture plate (1 mL per well). Microbeads were added to each well ( $4 \times 10^6$ ), which were then placed at  $37^\circ\text{C}$  in a humidity chamber for 24 hours at 20 rpm of horizontal agitation. The biofilm formed on the surface of the microbeads was then steam-washed for 40 minutes as described previously [22]. Biofilms were recovered by flushing and scraping the bottom of the well in 200  $\mu\text{L}$  of PBS. This suspension was then transferred to a second steam-washed biofilm well using the same biofilm recovery technique. The resulting suspension was washed twice by centrifuging at 100 g and then resuspending the pellet in 1 mL of PBS at room temperature. After the final wash, the inoculum was resuspended in 50  $\mu\text{L}$  of PBS, of which 3.8  $\mu\text{L}$  (corresponding to  $10^5$  microbeads) were used as the inoculum.

Consequently, at this stage of preparation, 3 kinds of inocula were microinjected: “planktonic bacteria and microbeads”, “biofilm-coated microbeads” and the control group consisting of  $10^5$  microbeads suspended in 3.8  $\mu\text{L}$  of PBS.

In order to quantify planktonic or biofilm inocula by titration, the samples were first diluted 10x in PBS. The diluted biofilm was vortexed for 30 seconds, sonicated for 10 minutes and then vortexed again for a further 30 seconds (Fisher Scientific, 80W, 37kHz). Inocula titrations were determined by serial dilutions and plating on LB agar medium containing chloramphenicol or erythromycin. CFUs were counted after 24 hours of incubation at  $37^\circ\text{C}$ .

Control inocula consisting of microbeads resuspended in PBS were obtained by diluting the stock sample to a concentration of  $2.6 \times 10^4$  microbeads/ $\mu\text{L}$  of PBS, verified by KOVA<sup>®</sup> cell counts, of which 3.8  $\mu\text{L}$  were used as the inoculum.

**Observation of bacterial inocula by fluorescence microscopy, flow cytometry and Scanning Electron Microscopy (SEM).** The coating efficiency of biofilms on microbeads was first studied by fluorescence microscopy (LEICA MM AF microscope, objective X63). Biofilms formed on microbeads by the mCherry-SH1000 strain were observed before and after passing through the 34G injection needle.

For flow cytometry analysis, samples of each type of inocula were studied with a FACSAria Fusion SORP (BD BioSciences) equipped with FACSDIVA 8 software (BD Sciences). A 100  $\mu\text{m}$  nozzle and a 1.5 neutral density filter were used. Excitation sources were 488 and 561 nm lasers. Emission of mCherry fluorescence was collected with a set of 600nm Long Pass and 610/20 nm Band Pass filters. All signals were collected and analysed on logarithmic scales. The threshold was set at 200 on the Forward Scatter (FSC) parameter. The gating strategy first excluded cell debris. Beads were then gated on Forward/ Side Scatter (FSC/SSC) parameters and bacteria were gated as a “non-bead” population. Data were acquired for one minute at flow rate 4 (30 $\mu\text{L}$ /minute).

For SEM analysis, mCherry-SH1000 biofilms were prepared during the process described above with 3 different samples. Two kinds of inoculum of “biofilm-coated microbeads”, were prepared as described above. The first kind of sample was analysed before inoculum passing through the 34-gauge (34G) needle used for micro-injection into the mouse ear tissue and the second after passing through the needle. The comparison between these 2 samples was necessary in order to confirm that the morphological characteristics of the inoculum are maintained after micro-injection. The last kind of sample was studied after sonication in order to confirm that biofilm aggregates were absent from the inoculum. Microdroplets of this sample were deposited on SEM Pore filters (DTM9305, Jeol) either with a 34G needle fitted to a NanoFil syringe (World Precision Instruments) (after micro-injection) [23] or a pipette (before micro-





injection) and passively diffused (slowly/gently) through it. After absorption on the filters, the bacteria were fixed for 12 hours at 4°C in 0.2 mol/L sodium cacodylate buffer, pH 7.4, that contained 1.6% glutaraldehyde. They were then washed 30 minutes in sodium cacodylate buffer (0.2 mol/L, pH 7.4) and post-fixed 1 hour with 1% osmium tetroxide in the same buffer. After rinsing for 20 minutes in distilled water, dehydration by graded ethanol was performed from 25° to 100° in progressive steps of 10 minutes to finish in hexamethyldisilazane (HMDS) for 10 minutes. Samples were then sputter-coated with gold-palladium (JFC-1300, JEOL, Japan). Observations were made with a JSM-6060LV scanning electron microscope (Jeol, Japan) at 5kV in high-vacuum mode.

**Matrix labelling with WGA-Alexa 488 and the CDy11 fluorescent probe.** Biofilms of mCherry-SH1000 were prepared according to the protocol described. Just after the steam wash, 200 µL of Wheat Germ Agglutinin (WGA)-Alexa 488 (5 µg/mL in PBS) were added to the wells and incubated for 10 minutes at 37°C. The wells were then gently rinsed with water and scraped according to the usual inoculum preparation protocol. After diluting and spreading of 10 µL of the solution on a glass slide, the samples were analysed on the Leica MMAF Imaging System Microscope at X20.

Labelling with the CDy11 fluorescent probe [16] was carried out on GFP-SH1000 biofilms. Samples were prepared as previously described. A 10 mM stock solution of the fluorescent probe was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO). The solution was then diluted in PBS to prepare a 100 µM solution. *In vitro* labelling was carried out by adding 10 µL of the diluted probe to biofilm samples, which were gently vortexed and incubated for 45 minutes in the dark at room temperature. Marked samples were then micro-injected into the ear pinna of mice. After 30 minutes, the inner side of the ear was flattened on a glass slide as previously described [24] and observed on the ZEISS Spinning Disk Cell Observer (SD) (Carl Zeiss Microscopy, Germany) confocal microscope. Video acquisition was carried out with two different lasers to observe GFP and CDy11 fluorescence (excitation at 488 and 590 nm, emission at 509 and 612 nm, with exposure times set at 100 and 300 ms, respectively). Images were acquired with the 10X objective lens. Multiple fields of observation were imaged to observe the entire injection site. *In vivo* labelling was carried out by the same method except for the 45-minute incubation period.

## Intravital imaging by confocal microscopy

**Time-lapse video and mosaic acquisition.** Mice were anaesthetized by intraperitoneal injection of a ketamine and xylazine mixture. Planktonic or biofilm inocula or PBS were injected intradermally as previously described, into the ear tissue of LysM-Enhanced Green Fluorescent Protein or LysM-EGFP transgenic mice [23]. Three to five hours after injection of the inocula, the animals were again anaesthetized. Mosaic and video time-lapse acquisition was carried out on the ZEISS LSM 800 (LSM 800) (Carl Zeiss Microscopy, Germany) and SD confocal microscopes, respectively, as previously described [25].

**Analysis of *in vivo* confocal imaging.** Images acquired on the LSM 800 were stitched together with ZEN software to reconstruct an entire image of the ear tissue at early and late time points. The images shown represent the Z-projected maximal intensity signal of a reconstituted image of the ear tissue for the EGFP channel. Images were then analysed, as previously described [25].

Images and videos acquired on the SD with the 10X objective lens were first stitched using ZEN software. Images shown correspond to the Z-projected maximum intensity signal for each channel. Time-lapse videos at 20X and 10X were analysed with Imaris software as previously described, to analyse two different parameters (average speed and straightness) of immune cell dynamics [25].



**Statistical analysis.** Data generated were analysed with Prism 5 software (GraphPad Software, Inc.) and a non-parametric Mann-Whitney two-tailed statistical test.  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant (symbols: \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \* $p \leq 0.05$ ; ns = non-significant).

## Results

### Preparation and characterization of *Staphylococcus aureus* biofilm-coated microbeads

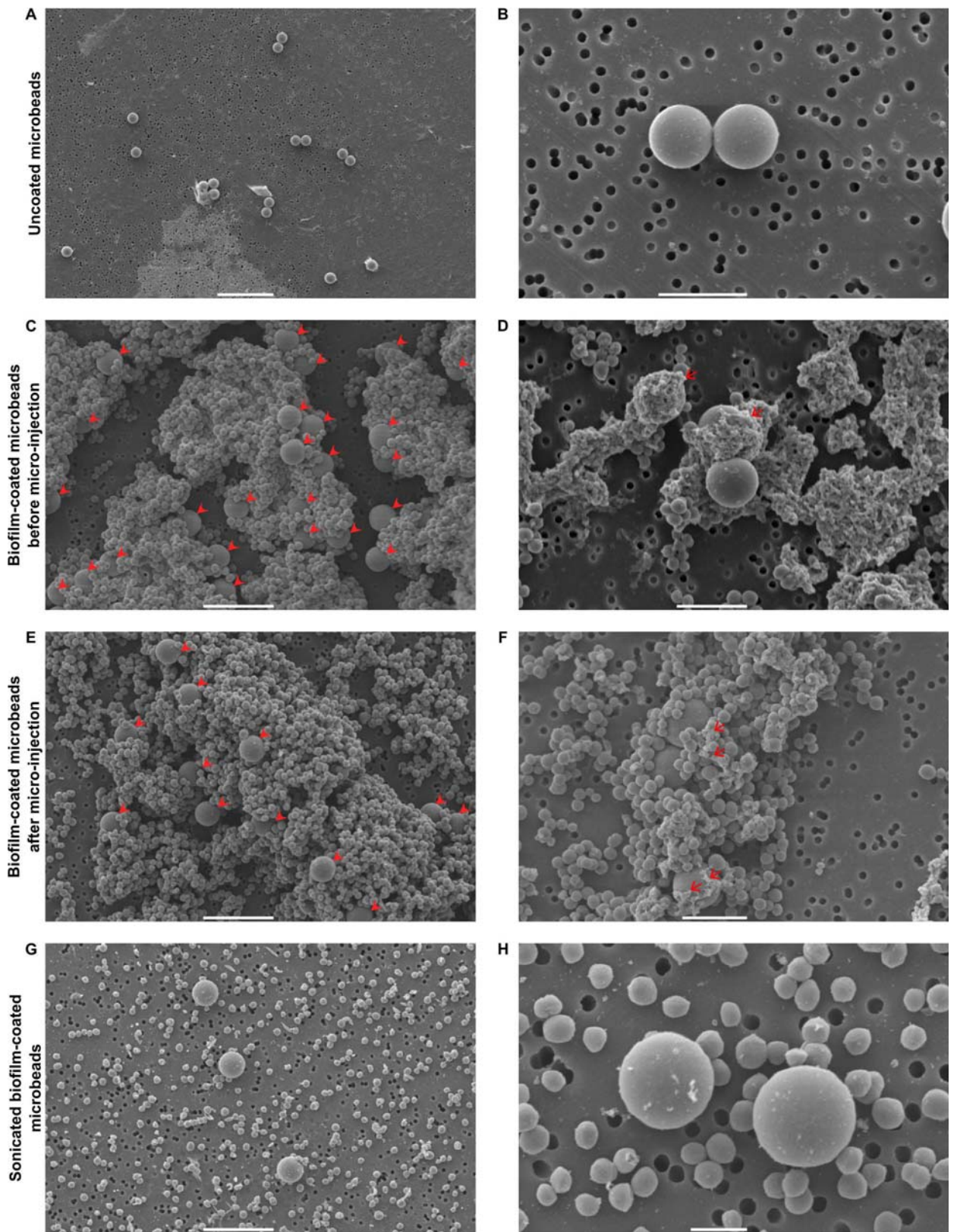
The first set of experiments enabled us to obtain calibrated inocula of mCherry-SH1000 biofilms coated on an abiotic surface. The selected inert surfaces were  $4.3 \mu\text{m}^2$  microbeads, compatible with the micro-injection of very small volumes of bacterial inocula into the mouse ear pinna, as previously described [25]. A number of crucial steps were optimized to obtain standardized preparations of biofilm-coated silica microbeads. First, as microbeads moved around in their wells, horizontal agitation was slowed down to allow the planktonic bacteria to adhere and form persistent biofilms on the surface of microbeads. Biofilm-covered microbeads were gently steamed to eliminate free-floating planktonic bacteria and also to prevent biofilms covering the microbeads from becoming detached. Different sets of uncoated (Fig 1A and 1B) or coated microbeads were imaged by confocal microscopy and by SEM to analyse biofilm coverage. After washing and homogenization, the suspension of potentially biofilm-coated microbeads was analysed at the ultrastructural level by SEM. It mainly contained microbeads trapped inside biofilm aggregates (Fig 1C and S1A Fig), and also some small clusters of detached or planktonic bacteria. Adherent viable fluorescent bacteria were also clearly visible at the surface of the microbeads by confocal microscopy (Fig 2A). At high magnification by SEM, the extracellular matrix was clearly visible at the microbead surface (Fig 1D and S1B–S1D Fig). In particular, glucidic matrix components were detected at the surface of the microbeads after labelling with WGA and observation by confocal microscopy (Fig 2A).

In parallel to the qualitative analysis carried out by SEM, we also wanted to quantitatively characterize our biofilm inoculum. To do this, a flow cytometry protocol was designed to quantify the proportion of biofilm-coated microbeads in the suspension. The number of mCherry fluorescent bacteria associated with microbeads was compared in three different samples: uncoated microbeads, a freshly prepared mix of uncoated microbeads and planktonic bacteria, and biofilm-coated microbeads. The acquisition of a great number of events ( $3.7 \times 10^6$ ) showed a high percentage (82.5%) of biofilm-coated microbeads in our inocula compared to that of control samples (Fig 2B–2D).

Thus, our biofilm inoculum, presenting the characteristics previously described, was hereafter referred to as “biofilm-coated microbeads”. Fig 1E and 1F show that the morphological characteristics of the inoculum are maintained after passing through the 34-gauge (34G) needle used for micro-injection into the mouse ear tissue. We also set up a sonication protocol to titrate our inoculum. When used on biofilm-coated microbeads, bacterial aggregates were absent from the surface of microbeads, reflecting biofilm dispersion, with only a few adherent bacteria attached to microbeads (Fig 1G and 1H), a result that therefore validates our inoculum titration protocol.

In a second set of experiments, the biofilm-coated microbead inoculum was characterized *in vivo*. A  $3.8 \mu\text{l}$  calibrated inoculum containing  $10^5$  biofilm-coated microbeads was microinjected into the ear pinna of LysM-EGFP transgenic mice. In parallel, control groups of mice received  $10^5$  uncoated microbeads mixed with planktonic bacteria just before micro-injection, hereafter designated “Planktonic bacteria & microbead” inoculum. Titration of both types of inocula revealed comparable titres, equal to  $2.04 \times 10^7 \pm 1.49 \times 10^7$  and  $1.97 \times 10^7 \pm 3.07 \times 10^7$ ,







**Fig 1. SEM micrographs of uncoated and biofilm-coated microbeads before and after microinjection, and after sonication.** SEM micrographs of uncoated microbeads at X800 (A) and X5000 (B) magnification, biofilm-coated microbeads before passing through the 34G needle used for microinjections at X2000 (C) and X4000 (D) magnification, biofilm-coated microbeads after passing through the 34G needle used for microinjections at X2000 (E) and X3700 (F) magnification, and sonicated biofilm-coated microbeads at X2000 (G) and X8000 (H) magnification. Filled red arrowheads in C and E indicate microbeads and red arrows in C and E indicate biofilm extracellular matrix. Scale bar: 20  $\mu\text{m}$  (A), 10  $\mu\text{m}$  (C, E, G), 5  $\mu\text{m}$  (B, D, F), 2  $\mu\text{m}$  (H).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243500.g001>

respectively, for biofilm-coated microbeads and planktonic bacteria & microbeads. Fluorescent bacteria coated on microbeads were visualized at the injection site by confocal microscopy as previously described [25]. Matrix components (amyloid fibrils) were also detected *in vivo* on biofilm-coated microbeads pre-incubated/pre-labelled with the fluorescent probe CDy11 *in vitro* (Fig 3B). Co-localization was sometimes observed between the green signal (bacteria) and the red signal (matrix components). In the next step, amyloid fibrils were labelled *in situ* by co-injecting biofilm-coated microbeads and the CDy11 fluorescent probe into the ear pinna. As illustrated in Fig 3B (*in vitro* labelling) and 3c (*in vivo* labelling), comparable images were observed at the injection site, in terms both of intensity of the fluorescent red signal and of fluorescence co-localization (as compared to the control in Fig 3A). This novel finding means that, using our model, it is possible for the first time to follow biofilm development *in vivo* by injecting the CDy11 fluorescent probe into the cutaneous tissue and *in situ* by labelling matrix components inside biofilm-coated microbeads.

### Characterization of inflammatory responses after the microinjection of *Staphylococcus aureus* biofilm-coated microbeads in the mouse ear pinna

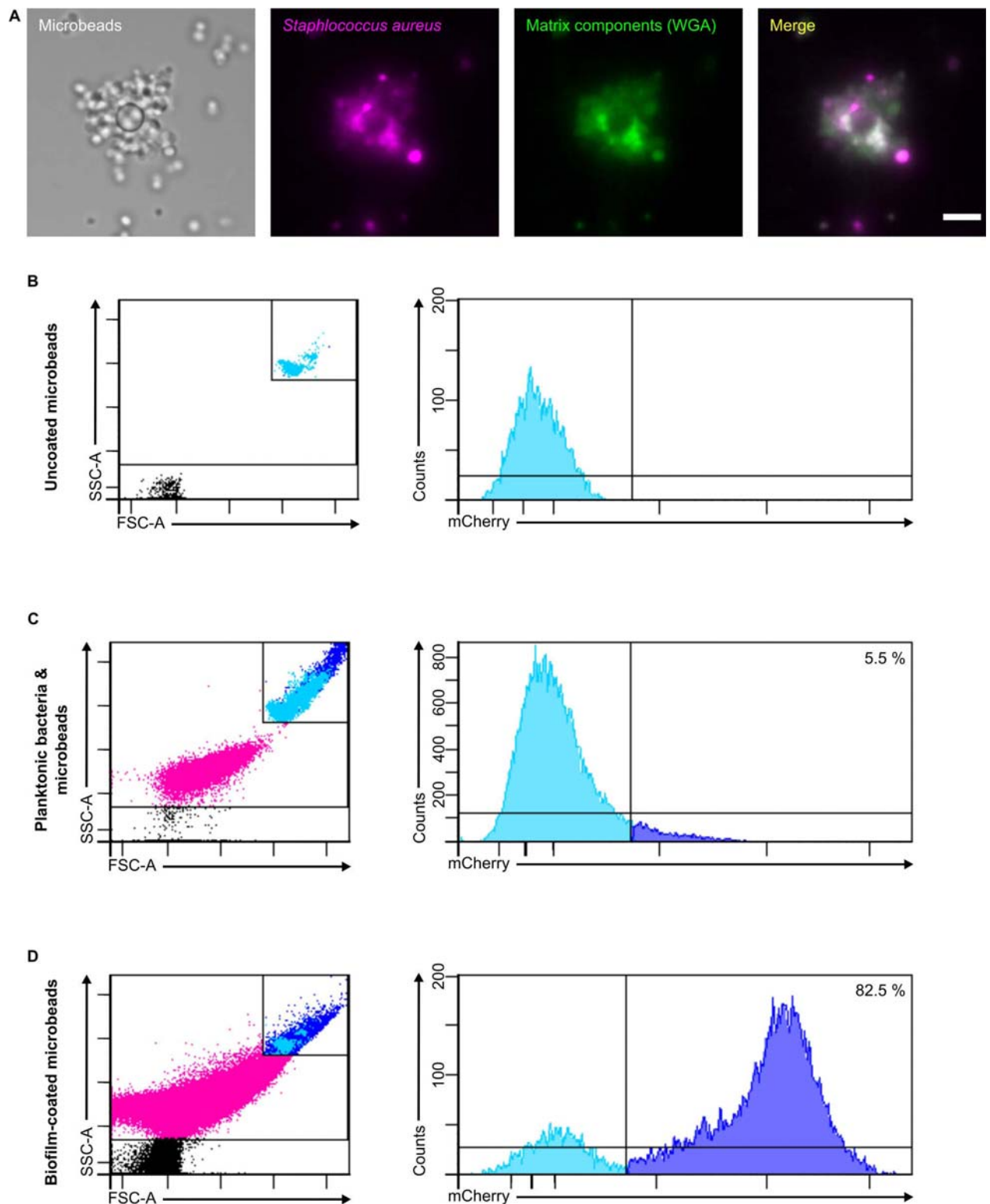
The mouse ear skin model previously developed to analyse immune responses against *S. aureus* biofilms was redesigned to make it better adapted to the context of biofilm infections on medical devices. After the addition of microbeads to the biofilm cultures, imaging protocols were applied to the new model to compare inflammatory responses at the tissue and cellular levels [25]. LysM-EGFP transgenic mice were inoculated intradermally with  $10^5$  biofilm-coated microbeads, with a mix of  $10^5$  uncoated microbeads and a theoretical preparation of  $10^7$  CFU of planktonic bacteria, or with PBS containing  $10^5$  uncoated microbeads as a control.

The inflammatory response was explored in the entire tissue at early (6h) and late (26h) time points by analysing the EGFP signal corresponding to the recruitment of innate immune cells at the injection site, as previously described [25]. At both time points, EGFP+ cells were recruited in infected mice (Fig 4A–4C), with a highly significant increase between early and late time points, and no significant difference between the “Planktonic bacteria & microbead” group and the “Biofilm-coated microbead” group at late time points. At early time-points, the EGFP signal was statistically significant only for the biofilm group (Fig 4D).

The inflammatory response was further analysed at the cellular level at early time points (4 to 6h post-infection) using the intravital imaging approach and the previously devised confocal acquisition protocol. The aim of this second set of experiments was to study the impact of the presence of microbeads on the dynamics of innate immune responses against *S. aureus* biofilms by comparing the results with our previous data [25]. In control mice inoculated with PBS, low recruitment was observed at the injection sites, owing to microinjection trauma (S1 Movie). An influx of EGFP+ phagocytic cells was observed in the two infected groups, “Planktonic bacteria & microbeads” and “Biofilm-coated microbeads” (Fig 5A and 5B, white circles, S2 and S3 Movies), and the phenotype of our previous observations without microbeads was reproduced. The recruited cells covered most of the injection area when planktonic bacteria were inoculated, with multiple contact points between cells and bacteria (Fig 5A, white arrowheads, Fig 5C and 5D) while behaving differently for the biofilm-coated microbead inoculum.







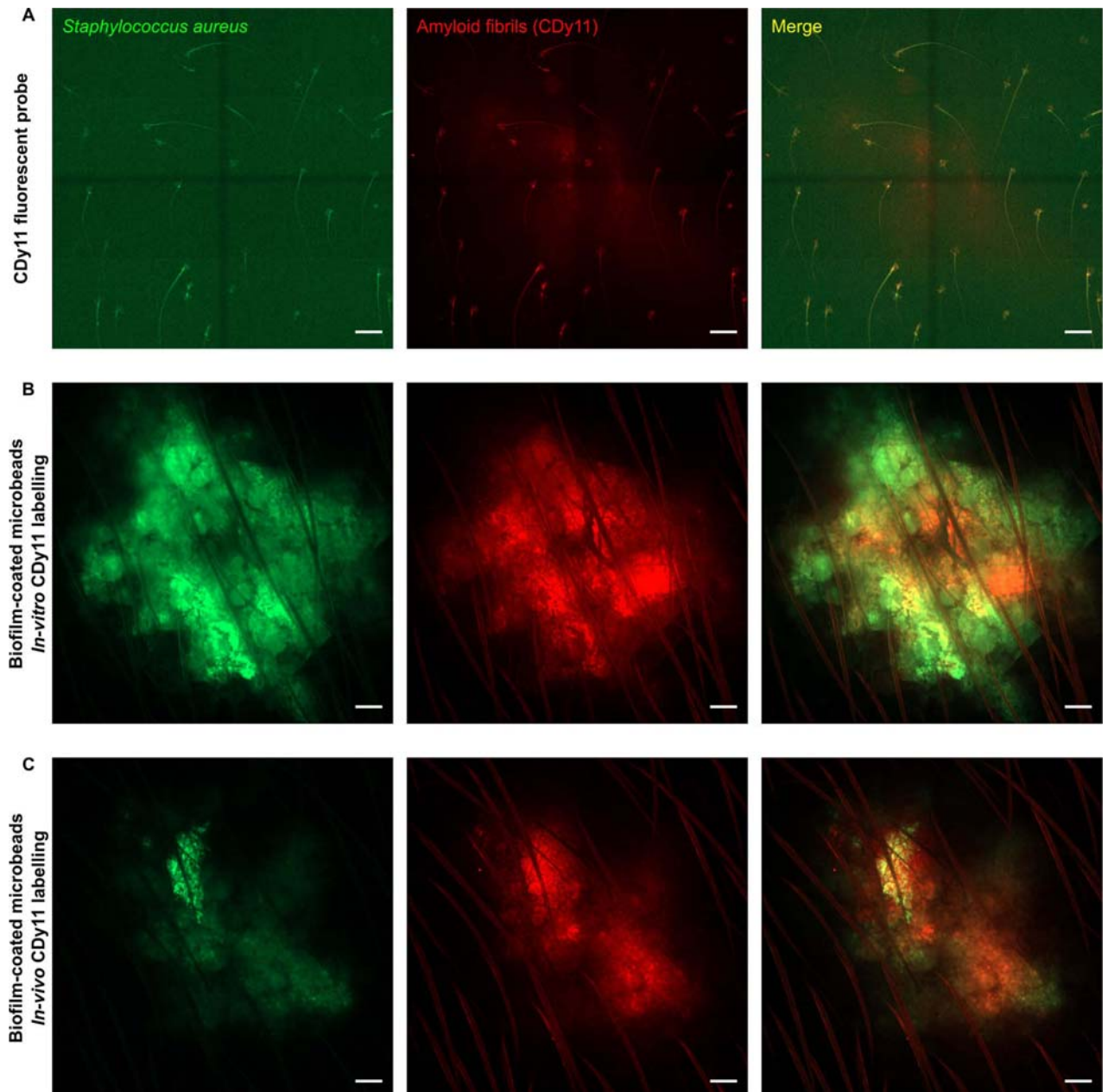
**Fig 2. Confocal images of a biofilm-coated microbead and representative flow cytometry plots verifying coating of microbeads.** Confocal images (A) of biofilm-coated microbeads, after passing through the micro-injection needle, treated with Alexa Fluor 488 WGA at X63 magnification. Images show microbeads and maximum intensity projections of mCherry (magenta) and Alexa Fluor 488 WGA (green) fluorescence. The merged image shows maximum intensity projections for both fluorescence channels. Scale bar: 5  $\mu\text{m}$ . Representative FACS plots showing the gates used to determine uncoated



microbeads (B), planktonic bacteria and microbeads (C) and biofilm-coated microbead (D) populations. The subsequent counts for each population are also presented according to their fluorescence intensities.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243500.g002>

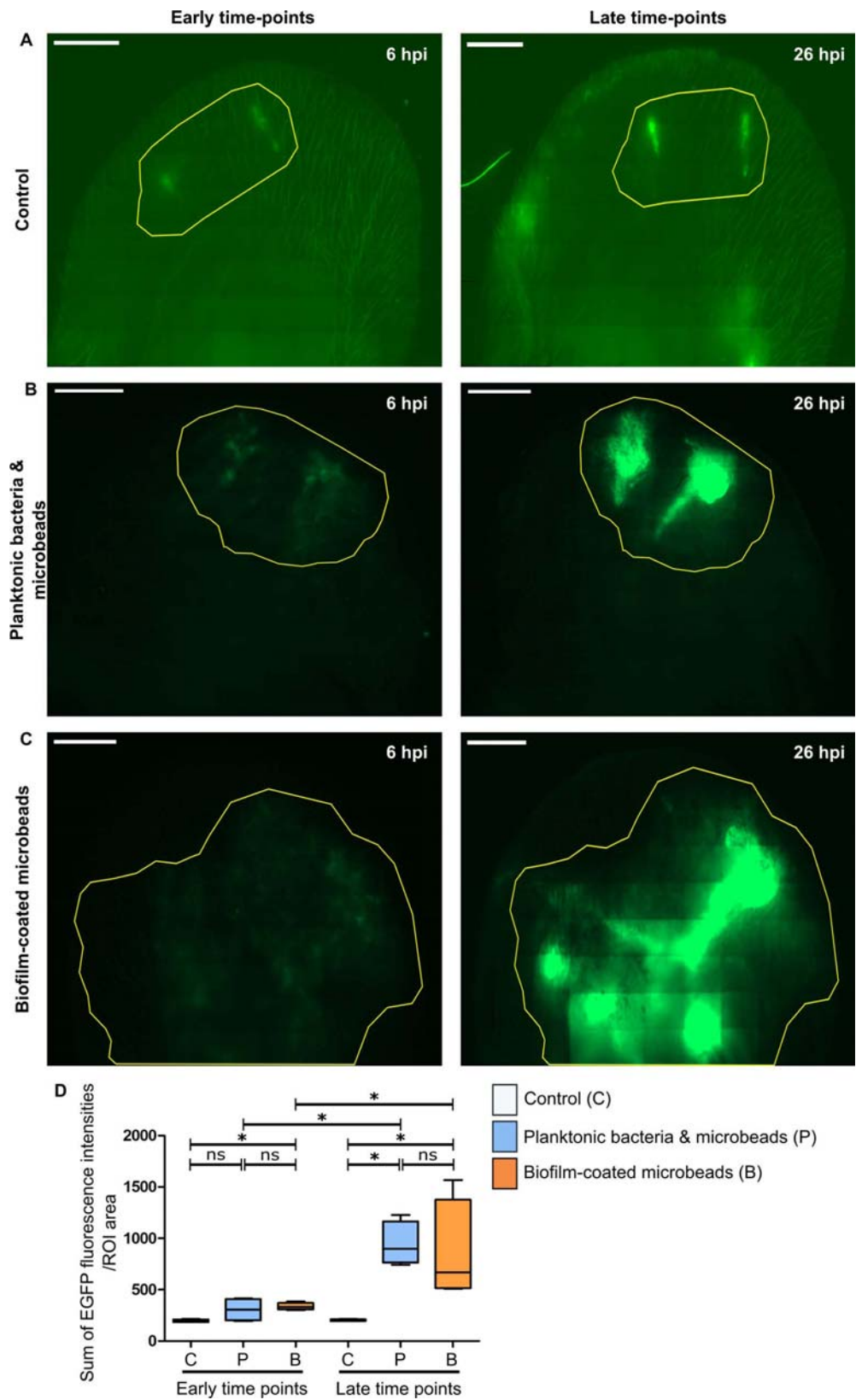
The cells clearly remained at the periphery of the inoculum, and the contact points were less numerous (Fig 5B, white arrowheads). Thus, use of biofilm-coated microbeads and of the intravital imaging approach identified a specific phenotype for the dynamics of innate immune responses against biofilms.



**Fig 3. Intravital confocal imaging of CDy11 labelled biofilm-coated microbeads.** Intravital confocal imaging after microinjection of only the CDy11 fluorescent probe (A), of biofilm-coated microbeads after *in vitro* CDy11 labelling (B) or of biofilm-coated microbeads after *in vivo* CDy11 labelling (C) in the ear pinna of WT C57BL/6 mice. (A to C) Images show maximum intensity projections of GFP (green) and CDy11 (red) fluorescence. The merged image shows maximum intensity projections for both fluorescence channels. Scale bar: 100  $\mu$ m.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243500.g003>







**Fig 4. Global inflammatory response after microinjection of different inocula into the transgenic mice ear.** Reconstituted confocal images of LyM-EGFP transgenic mice ear pinna tissue after microinjection of either PBS (control) (A), planktonic bacteria and microbeads (B) or biofilm-coated microbeads (C) at early (6 hours post-infection or 6 hpi) and late time points (after 26 hpi). Images show maximum intensity projections of EGFP (green) fluorescence that correspond to phagocytic cells (neutrophils and macrophages). The yellow line indicates the Region of Interest (ROI) where the “Sum of EGFP fluorescence intensities” was measured. One representative experiment is shown for each group of mice from four independent experiments. Scale bar: 2 mm. (D) Ratio of the sum of EGFP fluorescence intensities to ROI area. Data are expressed as median and interquartile ranges for four mice per group.  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant (symbols: \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \* $p \leq 0.05$ ; ns = non-significant).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243500.g004>

### Analysis of the dynamic properties of immune cell recruitment after microinjection of *Staphylococcus aureus* biofilm-coated microbeads into the mouse ear pinna

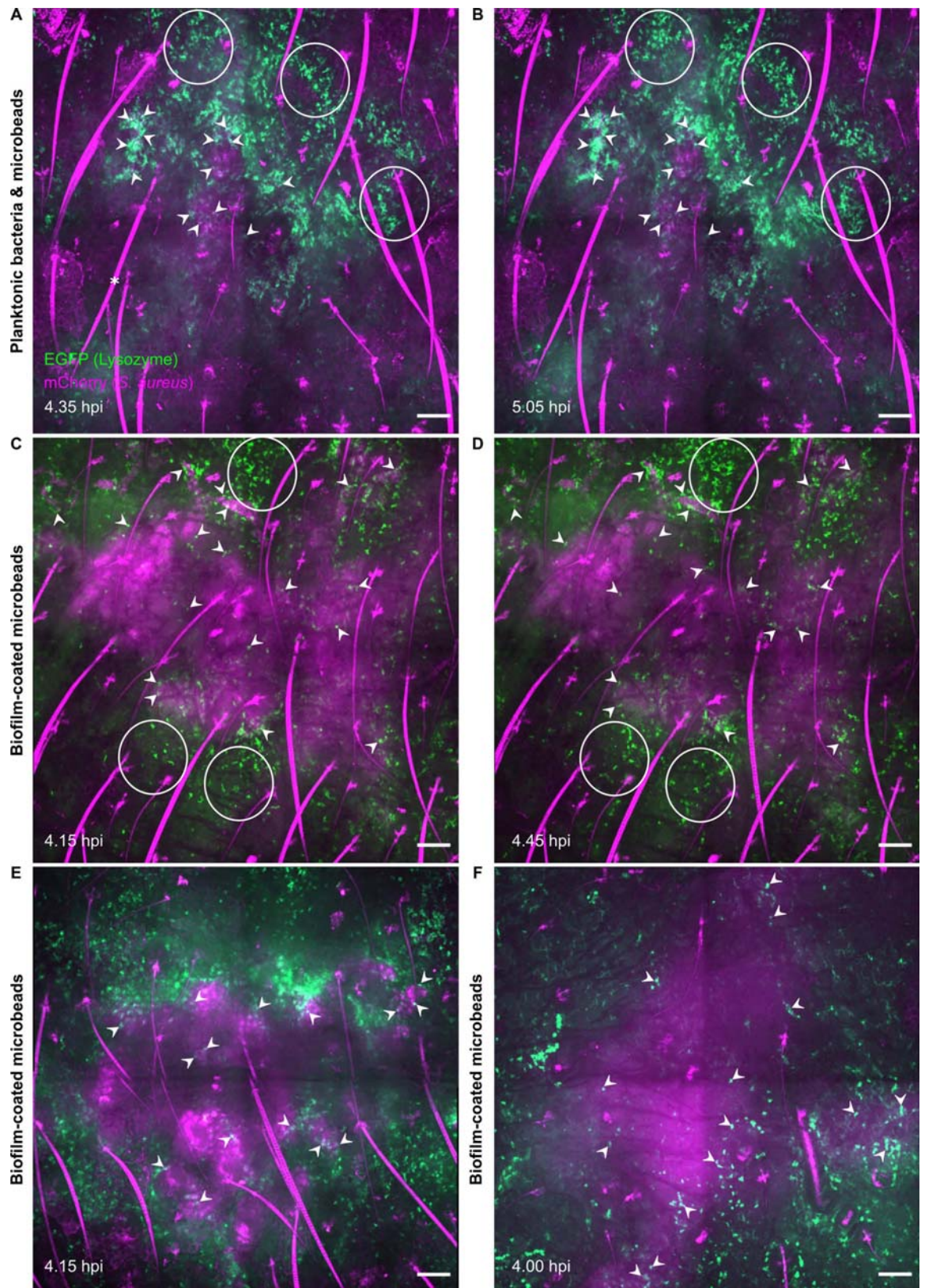
In the last set of experiments, the previously designed tracking protocol was used to analyse the motility properties of recruited EGFP+ cells [25]. The average speed and straightness of the trajectory of phagocytic cells were analysed for the three groups of mice at early time points (4 to 6h post-infection). Average speed was significantly lower for the two bacterial forms than in control mice (Fig 6A), indicating that phagocytic cells were arrested at the injection site to interact with bacteria, irrespective of the bacterial form. However, the straightness of their trajectories was significantly decreased only for the biofilm-coated microbead group (Fig 6B). A separate analysis of the motility properties of cells interacting (bacteria contact) or not (no bacteria contact) with bacteria showed that for both bacterial forms the cells significantly slowed down when in contact with bacteria. Interestingly, cells not in contact with bacteria had significantly lower speed values in the biofilm group than in the planktonic group (Fig 6C). When there was no interaction with bacteria, the trajectory straightness of the recruited cells was significantly greater for both bacterial forms (Fig 6D). Taken together, these findings enabled us to identify the specific cell dynamics of the inflammatory response against the biofilm-coated microbead inoculum and show that our model is a powerful tool to analyse the way in which biofilms can circumvent host immune attacks.

### Discussion

In this work, we devised a new ear skin model using microbeads coated by *S. aureus* biofilm to mimic biofilm infections on medical devices in humans. The model allowed us to analyse the dynamics of the inflammatory responses against *S. aureus* biofilms. Rodent laboratory models previously designed to analyse these responses used devices such as silicone implants and catheters that were pre-colonized or not [14]. To mimic *S. aureus* SSI of prosthetic joints in mice, implants [26] or steel pins colonized before insertion in the tibial region have also been used [27]. We chose microbeads as a support because their micrometric size is compatible with the mouse ear skin model. Previous studies described the specific adhesion of *S. aureus* biofilms on glass beads [28] or of *P. aeruginosa* biofilms on ceramic beads [29]. *In vitro*, 5mm diameter glass beads were also used to evaluate the efficacy of different antiseptic solutions against *P. aeruginosa* biofilm [30]. We adapted this protocol to standardize the different steps of biofilm preparation according to the microbead support (biofilm culture, analysis of biofilm formation, use of sonication). To have neutral material such as the ceramides used in orthopedic prostheses, we selected 4.3  $\mu\text{m}$  diameter silica dioxide microbeads. This choice allowed us to inoculate very small volumes of biofilm-coated microbeads into the ear tissue of mice [25]. Other groups of mice received the same volume of a mix containing an equivalent CFU number of planktonic bacteria and of uncoated microbeads, as in the biofilm-coated microbead inoculum. The major difference between the two inocula was the presence of matrix







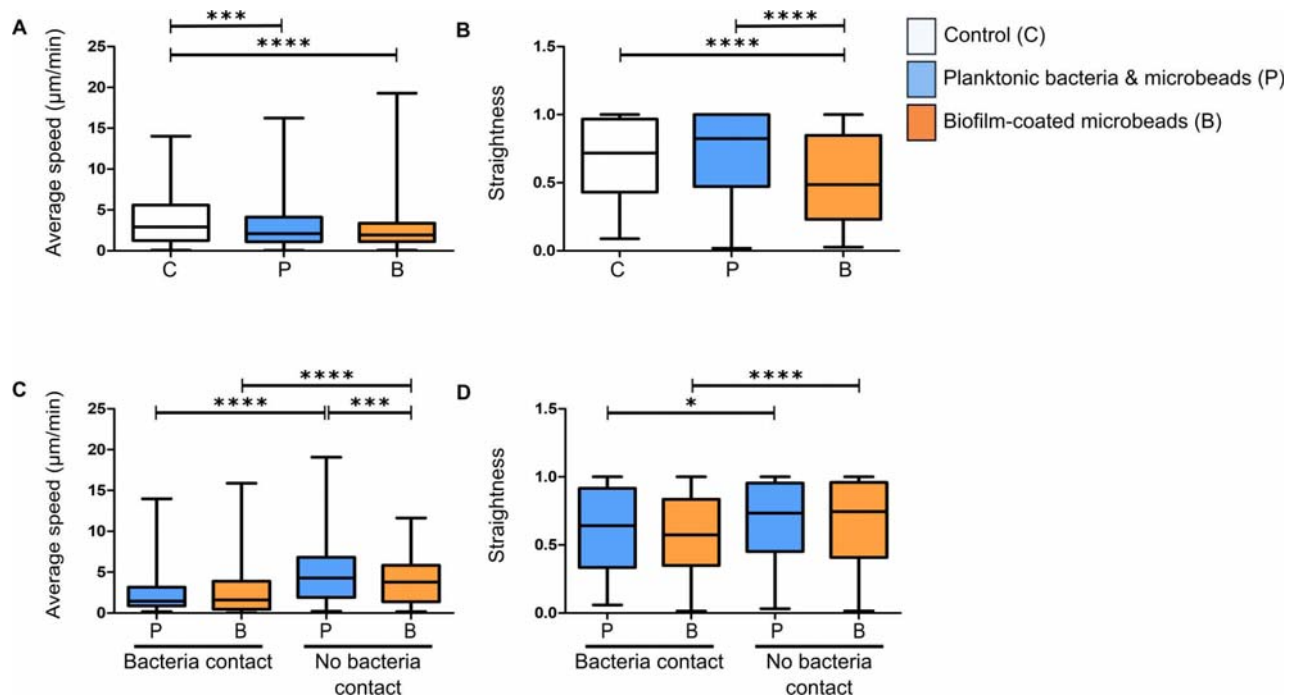


**Fig 5. Live confocal imaging of innate immune responses after microinjection of the different inocula.** Live confocal imaging after microinjection of planktonic bacteria and microbeads (A, B) in the ear pinna of LysM-EGFP transgenic mice at early time points (4–6 hpi). Innate immune cell recruitment towards injection sites was observed between 4.35 (A) to 5.05 hpi (B). Live confocal imaging after microinjection of biofilm-coated microbeads (C, D, E, F) in the ear pinna of LysM-EGFP transgenic mice at early time points (4–6 hpi). Innate immune cell recruitment towards injection sites was observed between 4.15 (C) to 4.45 hpi (D). Images show maximum intensity projections of EGFP (green) and mCherry (magenta) fluorescence. A progressive recruitment of EGFP+ innate immune cells was observed (white empty circles) at the injection sites with cell-bacteria contact areas (filled white arrowheads). \*: autofluorescent hair (also in magenta). Filled white arrowheads indicate cell-bacteria contact. Live confocal imaging of two additional experiments at early time points after microinjection of biofilm-coated microbeads, at 4.15 hpi (E) and 4.00 hpi (F). Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243500.g005>

components detectable at the surface of biofilm-coated microbeads by both SEM and the CDy11 probe. The latter is a particularly valuable tool to detect matrix components such as amyloid fibrils *in vivo*. The model we developed enabled us to compare immune responses in the skin specific to *S. aureus* planktonic form and to biofilm coated on an abiotic support. Using the CDY11 probe, we were also able to detect biofilms at the surface of microbeads *in situ* and in the cutaneous tissue, and to follow its development *in vivo*.

After inoculation, the inflammatory response to *S. aureus* was analysed at the tissue and cellular levels over time. At the tissue level, our new model showed that both bacterial forms induced a measurable inflammatory response at cutaneous injection sites in LysM-EGFP transgenic mice, as compared to control mice. EGFP+ phagocytic cells, namely neutrophils and monocyte/macrophages, were recruited and detected after 6h, and the inflammatory



**Fig 6. Analysis of average speed and straightness of innate immune cells in the mouse ear pinna.** Average speed (A and C) and straightness (B and D) of EGFP+ cells recruited to injection sites at early time points after microinjection of PBS (control), planktonic bacteria and microbeads, or biofilm-coated microbeads. Data are expressed as median and interquartile ranges pooled from three different mice in three independent experiments for each group. Average speed (A) and straightness (B) of all cells (in contact with visible bacteria or not) in infected and control mice. Number of cells (N) analysed for each group at early time points: Control: N = 190 cells; Planktonic form: N = 721 cells; Biofilm form: N = 771. Average speed (C) and straightness (D) of cells either in contact (bacteria contact) or not (no bacteria contact) with planktonic or biofilm bacteria at early time points. Number of cells (N) analysed at early time points that were in contact or not in contact with bacteria, respectively: Planktonic form: N = 238 and 386 cells; Biofilm form: N = 433 and 276 cells.  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant (symbols: \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*  $p \leq 0.05$ ; ns = non-significant).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243500.g006>



response was marked and comparable for both inocula after 26h. These results are consistent with those of previous *in vivo* studies analysing qualitatively and quantitatively the inflammatory responses against *S. aureus* biofilm in rodents, and sometimes the associated cytokine and chemokine profile [14, 31–35]. In most models, an implanted infected support was used (K-wire, catheter, pin) and large numbers of neutrophils and monocytes/macrophages were observed to migrate.

At the cellular level, using the intravital imaging approach, we confirmed our previous observations regarding the dynamics of recruitment of EGFP+ cells. A specific phenotype was clearly identified for the biofilm-coated microbead group of mice. Recruited cells had difficulty in accessing biofilm bacteria and the contact areas between phagocytes and bacteria were less numerous than in the planktonic group. These results illustrate two major characteristics of biofilm physiology: the notion that biofilms represent a physical barrier for phagocytes [31] and that consequently phagocytosis is ineffective [36].

Our new ear skin model finally enabled us to quantify the motility parameters (speed, straightness) of EGFP+ recruited phagocytes at the injection site through a maximum thickness of around 150  $\mu\text{m}$ . The analysis was performed at the tissue injection site taking into account technical parameters such as fluorescence intensity of cells, cell location and cell number [25]. For each cell, the trajectory calculated by the Imaris software was checked manually point by point. Continuous movements of each cell were also followed throughout the acquisition time to ensure that there were no automatic assignment errors by the software. The exact trajectory of immune cells was difficult to analyse when the cells were too numerous, as previously reported [37]. Analysis of the entire population of cells at the injection site (cells interacting with bacteria or not) showed that both inocula modified cell motility parameters by decreasing cell speed, as compared to the control group. However, decreased straightness of trajectory was observed only in the biofilm-coated microbead group, which indicates that the biofilm inoculum had a greater effect on cell motility than planktonic bacteria, even when the latter were co-injected with uncoated beads, because it modified both cell speed and straightness. When cells interacted with bacteria, both inocula decreased cell speed and straightness, so that engulfment and phagocytosis of bacteria (adherent or not to microbeads) occurred in all cases. This observation is consistent with previous results obtained with uncoated biofilms [25]. In the absence of visible cell-bacteria contact, the decrease in cell speed was greater in the biofilm-coated microbead group, suggestive of a biofilm effect at a distance from the recruited phagocytes. Recent reviews have reported both a direct effect of biofilm by physical interactions and an indirect effect (small molecules) on recruited immune cells [8]. The staphylococcal complement inhibitor is one example of a soluble factor that can diffuse at the early stage of biofilm formation and act as an immunomodulator [38].

In conclusion, we devised a new ear skin model of *S. aureus* biofilm infection using microbeads as a support for bacterial development. Using the intravital imaging approach, we provide evidence that the biofilm-coated microbead inoculum induces a different qualitative and quantitative inflammatory response, respectively, at the tissue and cellular levels, than the planktonic inoculum. This novel *in vivo* model of *S. aureus* biofilm infection on a material support in combination with an analysis of the dynamics of innate immune responses opens up various development perspectives. In particular, it paves the way to a better understanding of the immunobiology of biofilms and will make it possible to test in real time the efficacy of new anti- *S. aureus* biofilm therapies [39, 40].

## Supporting information

**S1 Fig. SEM micrographs of biofilm-coated microbeads.** SEM micrographs of biofilm-coated microbeads at X2000 (A), X4000 (B), X7000 (C) and X8000 (D) magnification. Filled





red arrowheads in (A) indicate microbeads and red arrows in (B), (C) and (D) indicate biofilm extracellular matrix. Scale bar: 10  $\mu\text{m}$  (A), 5  $\mu\text{m}$  (B), 2  $\mu\text{m}$  (C), 2  $\mu\text{m}$  (D).

(TIF)

**S1 Movie. Imaging of immune cell migration after microbead injection.** *In vivo* confocal time-lapse imaging of immune cell migration in LysM-EGFP transgenic mice ear tissue injected with microbeads in PBS from 5.30 hpi to 5.55 hpi. Maximum projections of time-lapse images. Z-stacks collected 77.73 seconds apart. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .

(MP4)

**S2 Movie. Imaging of immune cell migration after planktonic and microbeads injection.** *In vivo* confocal time-lapse imaging of immune cell migration in LysM-EGFP transgenic mice ear tissue injected with planktonic bacteria and microbeads from 4.35 hpi to 5.05 hpi. Maximum projections of time-lapse images. Z-stacks collected 77.11 seconds apart. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .

100  $\mu\text{m}$ .

(MP4)

**S3 Movie. Imaging of immune cell migration after biofilm-coated microbeads injection.** *In vivo* confocal time-lapse imaging of immune cell migration in LysM-EGFP transgenic mice ear tissue injected with biofilm-coated microbeads from 4.15 hpi to 4.44 hpi. Maximum projections of time-lapse images. Z-stacks collected 51.92 seconds apart. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .

(MP4)

**S1 Table. Raw data of inocula titrations.** Table presenting raw data used for the preparation of calibrated *Staphylococcus aureus* biofilm-coated microbeads and planktonic inocula.

(XLSX)

**S2 Table. Raw data used for Fig 4D.** Table presenting raw data used to measure the ratio of the sum of EGFP fluorescence intensities to ROI areas.

(XLSX)

**S3 Table. Raw data used for Fig 6A.** Table presenting the average speed of all cells in infected and control mice at early time points. Raw data extracted from Imaris software.

(XLSX)

**S4 Table. Raw data used for Fig 6B.** Table presenting the straightness of all cells in infected and control mice at early time points. Raw data extracted from Imaris software.

(XLSX)

**S5 Table. Raw data used for Fig 6C.** Table presenting the average speed of cells in contact with bacteria or not in infected mice at early time points. Raw data extracted from Imaris software.

(XLSX)

**S6 Table. Raw data used for Fig 6D.** Table presenting the straightness of cells in contact with bacteria or not in infected mice at early time points. Raw data extracted from Imaris software.

(XLSX)

## Acknowledgments

We wish to thank Alexander R. Horswill (Department of Immunology and Microbiology, University of Colorado, Denver, USA) for pAH9 plasmid, Ivo Boneca (Bacteria-Cell Interactions Unit, Pasteur Institute, Paris, France) for the LysM-EGFP transgenic mouse line, Michael Givskov and Youg-Tae Chang for the CDy11b probe, Caroline Vachias and Pierre Pouchin





(Confocal Microscopy Facility CLIC, University Clermont Auvergne) for their help with setting up image acquisition settings and image analysis and processing, Hermine Billard for help with FACS analysis (UCA Partner CYSTEM platform), Frédéric Laurent, Alan Diot and Andréa Cara for helpful discussions, and Karim Alloui for care of the animal housing facility.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Léo Sauvat, Aizat Iman Abdul Hamid, Jérôme Josse, Olivier Lesens, Pascale Gueirard.

**Data curation:** Léo Sauvat, Aizat Iman Abdul Hamid.

**Formal analysis:** Léo Sauvat, Pascale Gueirard.

**Funding acquisition:** Pascale Gueirard.

**Investigation:** Léo Sauvat, Christelle Blavignac, Olivier Lesens, Pascale Gueirard.

**Methodology:** Léo Sauvat, Aizat Iman Abdul Hamid, Jérôme Josse, Olivier Lesens, Pascale Gueirard.

**Project administration:** Pascale Gueirard.

**Resources:** Léo Sauvat, Aizat Iman Abdul Hamid, Olivier Lesens, Pascale Gueirard.

**Supervision:** Léo Sauvat, Aizat Iman Abdul Hamid, Pascale Gueirard.

**Validation:** Léo Sauvat, Aizat Iman Abdul Hamid, Jérôme Josse, Pascale Gueirard.

**Visualization:** Léo Sauvat, Aizat Iman Abdul Hamid, Jérôme Josse, Olivier Lesens, Pascale Gueirard.

**Writing – original draft:** Léo Sauvat, Aizat Iman Abdul Hamid, Pascale Gueirard.

**Writing – review & editing:** Léo Sauvat, Aizat Iman Abdul Hamid, Jérôme Josse, Olivier Lesens, Pascale Gueirard.

## References

1. National Survey of Prevalence of Nosocomial Infections and Anti-Infective Treatments in Health Facilities (2017): Regional Summary of Findings. Santé publique France, 2019. Available from <https://www.santepubliquefrance.fr>.
2. Lindeque B, Hartman Z, Noshchenko A, Cruse M. Infection after primary total hip arthroplasty. *Orthopedics*. 2014 Apr; 37(4):257–65. <https://doi.org/10.3928/01477447-20140401-08> PMID: 24762833
3. Wu H, Moser C, Wang H-Z, Høiby N, Song Z-J. Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int J Oral Sci*. 2015; 7(1):1–7. <https://doi.org/10.1038/ijos.2014.65> PMID: 25504208
4. Peel TN, Dowsey MM, Buising KL, Liew D, Choong PFM. Cost analysis of debridement and retention for management of prosthetic joint infection. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2013; 19(2):181–6. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03758.x> PMID: 22264335
5. Arciola CR, Campoccia D, Montanaro L. Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nat Rev Microbiol*. 2018; 16(7): 397–409. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0019-y> PMID: 29720707
6. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, et al. Bacterial biofilm and associated infections. *J Chin Med Assoc JCMA*. 2018; 81(1): 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012> PMID: 29042186
7. Oliveira WF, Silva PMS, Silva RCS, Silva GMM, Machado G, Coelho LCBB, et al. Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis infections on implants. *J Hosp Infect*. 2018; 98(2): 111–7. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.11.008> PMID: 29175074
8. de Vor L, Rooijackers SHM, van Strijp JAG. Staphylococci evade the innate immune response by disarming neutrophils and forming biofilms. *FEBS Lett*. 2020; <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13767> PMID: 32144756



9. Kobayashi SD, Malachowa N, DeLeo FR. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* abscesses. *Am J Pathol*. 2015 Jun; 185(6): 1518–27. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.11.030> PMID: 25749135
10. Dorhoi A, Du Plessis N. Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells in Chronic Infections. *Front Immunol*. 2017; 8: 1895. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01895> PMID: 29354120
11. Le KY, Park MD, Otto M. Immune Evasion Mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Infection. *Front Microbiol*. 2018; 9: 359. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00359> PMID: 29541068
12. Del Pozo JL. Biofilm-related disease. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2018; 16(1): 51–65. <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1417036> PMID: 29235402
13. Gries CM, Kielian T. Staphylococcal Biofilms and Immune Polarization During Prosthetic Joint Infection. *J Am Acad Orthop Surg*. 2017; 25 Suppl 1(Suppl 1): S20–S24. <https://doi.org/10.5435/JAAOS-D-16-00636> PMID: 27922945
14. Forestier C, Billard E, Milon G, Gueirard P. Unveiling and Characterizing Early Bilateral Interactions between Biofilm and the Mouse Innate Immune System. *Front Microbiol*. 2017; 8: 2309 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02309> PMID: 29209305
15. Resch A, Rosenstein R, Nerz C, Gotz F. Differential Gene Expression Profiling of *Staphylococcus aureus* Cultivated under Biofilm and Planktonic Conditions. *Appl Environ Microbiol*. 2005; 71(5): 2663–76 <https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2663-2676.2005> PMID: 15870358
16. Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, et al. *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*. 2008; 321(5891): 970–4. <https://doi.org/10.1126/science.1159194> PMID: 18703742
17. Mauthe M, Yu W, Krut O, Krönke M, Götz F, Robenek H, et al. WIPI-1 Positive Autophagosome-Like Vesicles Entrap Pathogenic *Staphylococcus aureus* for Lysosomal Degradation. *Int J Cell Biol*. 2012; 2012: 179207. <https://doi.org/10.1155/2012/179207> PMID: 22829830
18. O'Neill AJ. *Staphylococcus aureus* SH1000 and 8325–4: comparative genome sequences of key laboratory strains in staphylococcal research. *Lett Appl Microbiol*. 2010; 51(3): 358–61. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02885.x> PMID: 20618890
19. Schenk S, Laddaga RA. Improved method for electroporation of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*. 1992; 73(1–2): 133–8. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90596-g](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90596-g) PMID: 1521761
20. Charpentier E, Anton AI, Barry P, Alfonso B, Fang Y, Novick RP. Novel cassette-based shuttle vector system for gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 2004; 70(10): 6076–85. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.6076-6085.2004> PMID: 15466553
21. Chan W-T, Liu C-C, Chiang Chiau J-S, Tsai S-T, Liang C-K, Cheng M-L, et al. *In vivo* toxicologic study of larger silica nanoparticles in mice. *Int J Nanomedicine*. 2017; 12: 3421–32. <https://doi.org/10.2147/IJN.S126823> PMID: 28496319
22. Tasse J, Cara A, Saglio M, Villet R, Laurent F. A steam-based method to investigate biofilm. *Sci Rep*. 2018; 8(1): 13040. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31437-y> PMID: 30158585
23. Mac-Daniel L, Buckwalter MR, Gueirard P, Ménard R. Myeloid Cell Isolation from Mouse Skin and Draining Lymph Node Following Intradermal Immunization with Live Attenuated *Plasmodium Sporozoites*. *J Vis Exp*. 2016;(111): 53796. <https://doi.org/10.3791/53796> PMID: 27286053
24. Amino R, Thiberge S, Blazquez S, Baldacci P, Renaud O, Shorte S, et al. Imaging malaria sporozoites in the dermis of the mammalian host. *Nat Protoc*. 2007; 2(7): 1705–12. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.120> PMID: 17641635
25. Abdul Hamid AI, Nakusi L, Givskov M, Chang Y-T, Marquès C, Gueirard P. A mouse ear skin model to study the dynamics of innate immune responses against *Staphylococcus aureus* biofilms. *BMC Microbiol*. 2020; 20(1): 22. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1635-z> PMID: 31996131
26. Nishitani K, Sutipornpalangkul W, de Mesy Bentley KL, Varrone JJ, Bello-Irizarry SN, Ito H, et al. Quantifying the natural history of biofilm formation *in vivo* during the establishment of chronic implant-associated *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in mice to identify critical pathogen and host factors. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. 2015; 33(9): 1311–9. <https://doi.org/10.1002/jor.22907> PMID: 25820925
27. Prabhakara R, Harro JM, Leid JG, Harris M, Shirtliff ME. Murine immune response to a chronic *Staphylococcus aureus* biofilm infection. *Infect Immun*. 2011; 79(4): 1789–96. <https://doi.org/10.1128/IAI.01386-10> PMID: 21282411
28. Dakheel KH, Abdul Rahim R, Neela VK, Al-Obaidi JR, Hun TG, Yusoff K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilms and Their Influence on Bacterial Adhesion and Cohesion. *BioMed Res Int*. 2016; 2016: 4708425. <https://doi.org/10.1155/2016/4708425> PMID: 28078291
29. Crabbé A, De Boever P, Van Houdt R, Moors H, Mergeay M, Cornelis P. Use of the rotating wall vessel technology to study the effect of shear stress on growth behaviour of *Pseudomonas aeruginosa* PA01.



- Environ Microbiol. 2008; 10(8): 2098–110. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01631.x> PMID: [18430020](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18430020/)
30. Konrat K, Schwebke I, Laue M, Dittmann C, Levin K, Andrich R, et al. The Bead Assay for Biofilms: A Quick, Easy and Robust Method for Testing Disinfectants. PLoS One. 2016; 11(6): e0157663. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157663> PMID: [27315246](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27315246/)
  31. Thurlow LR, Hanke ML, Fritz T, Angle A, Aldrich A, Williams SH, et al. Staphylococcus aureus biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation *in vivo*. J Immunol Baltim Md 1950. 2011; 186(11): 6585–96. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002794> PMID: [21525381](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21525381/)
  32. Scherr TD, Hanke ML, Huang O, James DBA, Horswill AR, Bayles KW, et al. Staphylococcus aureus Biofilms Induce Macrophage Dysfunction Through Leukocidin AB and Alpha-Toxin. mBio. 2015; 6(4): e01021–15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01021-15> PMID: [26307164](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26307164/)
  33. Heim CE, Vidlak D, Scherr TD, Kozel JA, Holzapfel M, Muirhead DE, et al. Myeloid-derived suppressor cells contribute to Staphylococcus aureus orthopedic biofilm infection. J Immunol Baltim Md 1950. 2014; 192(8): 3778–92. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303408> PMID: [24646737](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24646737/)
  34. van Gennip M, Christensen LD, Alhede M, Qvortrup K, Jensen PØ, Høiby N, et al. Interactions between polymorphonuclear leukocytes and Pseudomonas aeruginosa biofilms on silicone implants *in vivo*. Infect Immun. 2012; 80(8): 2601–7. <https://doi.org/10.1128/IAI.06215-11> PMID: [22585963](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22585963/)
  35. Gutierrez Jauregui R, Fleige H, Bubke A, Rohde M, Weiss S, Förster R. IL-1 $\beta$  Promotes Staphylococcus aureus Biofilms on Implants *in vivo*. Front Immunol. 2019; 10: 1082. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01082> PMID: [31156635](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31156635/)
  36. Costerton JW. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. Science. 1999; 284(5418): 1318–22. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318> PMID: [10334980](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10334980/)
  37. Svensson C-M, Medyukhina A, Belyaev I, Al-Zaben N, Figge MT. Untangling cell tracks: Quantifying cell migration by time lapse image data analysis. Cytom Part J Int Soc Anal Cytol. 2018; 93(3): 357–70. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23249> PMID: [28976646](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28976646/)
  38. Sultan AR, Swierstra JW, Lemmens-den Toom NA, Snijders SV, Hansenová Maňásková S, Verbon A, et al. Production of Staphylococcal Complement Inhibitor (SCIN) and Other Immune Modulators during the Early Stages of Staphylococcus aureus Biofilm Formation in a Mammalian Cell Culture Medium. Infect Immun. 2018; 86(8): e00352–18. <https://doi.org/10.1128/IAI.00352-18> PMID: [29784858](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29784858/)
  39. Josse J, Valour F, Maali Y, Diot A, Batailler C, Ferry T, et al. Interaction Between Staphylococcal Biofilm and Bone: How Does the Presence of Biofilm Promote Prosthesis Loosening? Front Microbiol. 2019; 10: 1602. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01602> PMID: [31379772](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31379772/)
  40. Suresh MK, Biswas R, Biswas L. An update on recent developments in the prevention and treatment of Staphylococcus aureus biofilms. Int J Med Microbiol. 2019; 309(1): 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.11.002> PMID: [30503373](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30503373/)



#### IV. Caractérisation *in vivo* de la dynamique de la réponse inflammatoire précoce dirigée contre le biofilm de *Staphylococcus aureus* : étude des propriétés fonctionnelles des polynucléaires neutrophiles

*Differential early in vivo dynamics and functionality of recruited polymorphonuclear neutrophils after infection by planktonic or biofilm staphylococcus aureus*

Aizat Iman Abdul Hamid, Andréa Cara, Alan Diot, Frédéric Laurent, Jérôme Josse, Pascale Gueirard

Front Microbiol. 2021 Aug 30;12:728429.

Lors de la mise au point du modèle du pavillon de l'oreille de la souris, nous avons pu observer un recrutement important de cellules phagocytaires au site d'infection, ainsi que des interactions entre ces cellules et le biofilm de *S. aureus*. L'analyse des propriétés de déplacement des cellules recrutées par des bactéries sous forme planctonique ou biofilm a ensuite été comparée. Ces analyses ont montré que le biofilm module différemment les propriétés de déplacement des cellules rentrant en contact avec les bactéries au site d'injection. Nous avons poursuivi nos analyses en utilisant une souche de laboratoire clinique capable de produire plus de biofilm, la souche SH1000. L'objectif de cette seconde partie du travail a été de mieux caractériser la réponse inflammatoire précoce induite par le biofilm de *S. aureus*, à l'échelle tissulaire, cellulaire et moléculaire. Nous avons complété nos premières analyses de la dynamique de la réponse inflammatoire réalisées par imagerie intravitale en étudiant le phénotype des cellules recrutées (approche de cytométrie en flux), ainsi que leurs propriétés fonctionnelles. Le profil de cytokines sécrétées a été étudiée dans les deux tissus cibles : le tissu cutané de l'oreille et le ganglion lymphatique drainant, à savoir le ganglion auriculaire. Enfin, les propriétés fonctionnelles des PNN recrutés ont été comparées après inoculation des deux formes bactériennes (niveau d'expression du marqueur CD11b, production de ROS).







# Differential Early *in vivo* Dynamics and Functionality of Recruited Polymorphonuclear Neutrophils After Infection by Planktonic or Biofilm *Staphylococcus aureus*

Aizat Iman Abdul Hamid<sup>1</sup>, Andréa Cara<sup>2</sup>, Alan Diot<sup>2</sup>, Frédéric Laurent<sup>2</sup>, Jérôme Josse<sup>2</sup> and Pascale Gueirard<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, CNRS UMR 6023, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France, <sup>2</sup> Centre International de Recherche et Infectiologie, Inserm U1111, CNRS UMR 5308, École Normale Supérieure de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Fabienne Tacchini-Cottier,  
University of Lausanne, Switzerland

### Reviewed by:

Meredith Crane,  
Brown University, United States  
Guillaume Tabouret,  
Institut National de Recherche Pour  
l'Agriculture, l'Alimentation et  
l'Environnement (INRAE), France

### \*Correspondence:

Pascale Gueirard  
pascale.gueirard@uca.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Microbial Immunology,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

**Received:** 21 June 2021

**Accepted:** 05 August 2021

**Published:** 30 August 2021

### Citation:

Abdul Hamid AI, Cara A, Diot A,  
Laurent F, Josse J and Gueirard P  
(2021) Differential Early *in vivo*  
Dynamics and Functionality  
of Recruited Polymorphonuclear  
Neutrophils After Infection by  
Planktonic or Biofilm *Staphylococcus*  
*aureus*. *Front. Microbiol.* 12:728429.  
doi: 10.3389/fmicb.2021.728429

*Staphylococcus aureus* is a human pathogen known for its capacity to shift between the planktonic and biofilm lifestyles. *In vivo*, the antimicrobial immune response is characterized by the recruitment of inflammatory phagocytes, namely polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and monocytes/macrophages. Immune responses to planktonic bacteria have been extensively studied, but many questions remain about how biofilms can modulate inflammatory responses and cause recurrent infections in live vertebrates. Thus, the use of biologically sound experimental models is essential to study the specific immune signatures elicited by biofilms. Here, a mouse ear pinna model of infection was used to compare early innate immune responses toward *S. aureus* planktonic or biofilm bacteria. Flow cytometry and cytokine assays were carried out to study the inflammatory responses in infected tissues. These data were complemented with intravital confocal imaging analyses, allowing the real-time observation of the dynamic interactions between EGFP + phagocytes and bacteria in the ear pinna tissue of LysM-EGFP transgenic mice. Both bacterial forms induced an early and considerable recruitment of phagocytes in the ear tissue, associated with a predominantly pro-inflammatory cytokine profile. The inflammatory response was mostly composed of PMNs in the skin and the auricular lymph node. However, the kinetics of PMN recruitment were different between the 2 forms in the first 2 days post-infection (pi). Two hours pi, biofilm inocula recruited more PMNs than planktonic bacteria, but with decreased motility parameters and capacity to emit pseudopods. Inversely, biofilm inocula recruited less PMNs 2 days pi, but with an “over-activated” status, illustrated by an increased phagocytic activity, CD11b level of expression and ROS production. Thus, the mouse ear pinna model allowed us to reveal specific differences in the dynamics of recruitment and functional properties of phagocytes against biofilms. These differences would influence the specific adaptive immune responses to biofilms elicited in the lymphoid tissues.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, biofilm, innate immunity, polymorphonuclear neutrophils, macrophages, murine model, intravital imaging



## INTRODUCTION

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is a Gram-positive commensal bacterium that is also a leading cause of various invasive infections from soft skin tissue colonization to infections on implanted medical devices such as prosthetic joints. The wide range of staphylococcal virulence factors coupled with the apparition of community and hospital associated methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains have made infections by this bacterial species a particularly difficult therapeutic challenge (Turner et al., 2019; de Vor et al., 2020; Pidwill et al., 2021). Furthermore, the intrinsic capacity of *S. aureus* to adapt to its environment contributes toward its survival inside host tissues. An example of this type of adaptation is the capacity to form biofilms which are, contrary to the free-floating planktonic form of growth, microbial communities encased in a self-produced matrix composed of extracellular DNA (eDNA), proteins and polysaccharides (Moormeier and Bayles, 2017). According to the US Center for Disease Control, approximately 65% of human infections involve biofilms, with *S. aureus* accounting for up to 50% of pathogens isolated from prosthetic joint infections (Costerton, 2001; Ricciardi et al., 2018). Moreover, biofilms are often implicated in recurrent infections due to their increased tolerance toward antimicrobial treatments and even host immune attacks (Bjarnsholt, 2013).

Typically, polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and monocytes/macrophages (MOs/MΦs) are rapidly recruited to infected tissue by microbe derived signals like formylated peptides or chemokines such as chemokine ligand 1 (CXCL1) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (Capucetti et al., 2020; de Vor et al., 2020; Pidwill et al., 2021). These innate immune cells subsequently realize phagocytosis and efficiently kill planktonic bacteria through various effector mechanisms, including acidification of phagolysosomes and release of neutrophil extracellular traps (NETs) (de Vor et al., 2020; Pidwill et al., 2021). However, the transition to the biofilm lifestyle not only modifies the spatial distribution of *S. aureus* in colonized tissues, but is also accompanied by a shift in virulence mechanisms, both factors contributing toward the immunosuppressive nature of biofilms and thus to a recalcitrance toward elimination by innate immune phagocytes (Horn and Kielian, 2020; de Vor et al., 2020; Pidwill et al., 2021). *In vitro*, MΦs at the surface of *S. aureus* biofilms were mostly viable and retained a round morphology. However, the majority of cells that successfully penetrated biofilms were not viable, illustrating the protective barrier role that biofilms play in immune evasion (Thurlow et al., 2011; Gries et al., 2020a). Recently, most of the insights into the immune evasion mechanisms elicited by staphylococcal biofilms have been gained from *in vivo* models of skin/abscess infection or from biofilm infections on implanted medical devices (Horn and Kielian, 2020; Pidwill et al., 2021). These models have highlighted anti-inflammatory responses elicited by *S. aureus* biofilms due in part to the polarization of recruited MΦs toward an M2 anti-inflammatory phenotype, and also to the recruitment of an immature population of myeloid cells known as myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) which were present as early as day 3 in infected knee joint

tissue (Thurlow et al., 2011; Heim et al., 2018). Inversely, adoptive transfer of M1 MΦs, preactivated by IFN- $\gamma$  or TNF- $\alpha$  and *S. aureus*-derived peptidoglycan, to the infectious tissue surrounding a biofilm inoculated catheter ameliorated immune responses and biofilm clearance (Hanke et al., 2013).

Even though PMNs are key cells in the *S. aureus* innate immune responses, little is known about the specific *in vivo* interactions between PMNs and biofilms. Indeed, while many *in vitro* studies have analyzed the effects of the various virulence factors of *S. aureus* biofilms, from the expression of PMN-killing toxins to NET degradation (de Vor et al., 2020), most *in vivo* knowledge has been restricted to FACS analyses of PMN recruitment toward infected tissue. Furthermore, most models studying innate immune responses toward *S. aureus* biofilms do not include comparisons with planktonic bacteria.

Thus, the early inflammatory responses toward both forms of *S. aureus* were characterized in a previously developed mouse soft skin tissue infection model. In these works, either *S. aureus* planktonic or biofilm bacteria were intradermally inoculated into the mouse ear pinna, which allowed the study of their effects on immune cell dynamics using intravital confocal microscopy (Forestier et al., 2017; Abdul Hamid et al., 2020; Sauvat et al., 2020). The use of this type of imaging in the context of biofilm infections has rarely been done but has allowed new insights into the study of immune responses from a cellular dynamic perspective (Gries et al., 2020b). Here, classic immunology techniques were coupled with intravital confocal imaging to rigorously compare inflammatory responses and phagocyte behavior in response to either the planktonic or biofilm form of *S. aureus*. Results show that early immune responses were globally similar at the tissue and cytokine levels but were significantly changed when analyzing cellular dynamics and specific interactions with bacteria. These data were coherent with modifications in the functional properties of phagocytes recruited toward the cutaneous infection site.

## MATERIALS AND METHODS

### Mice and Ethics Statement

C57BL/6J WT mice (6–16-week-old males and females) were purchased from Charles River Laboratories. LysM-EGFP transgenic mice (6–16-week-old males and females) were obtained from the bacteria-cell interactions unit of the Pasteur Institute (Paris, France). Mice were bred in the animal care facility at Clermont Auvergne University (Clermont-Ferrand, France). All experiments were approved by the local Ethics Committee on Animal Experimentation (Auvergne C2E2A, Clermont-Ferrand, France, agreement number: 1,725) and were carried out in accordance with the applicable guidelines and regulations. All mice were provided an appropriate environment including shelter in cages, a comfortable resting area, sufficient space (not more than 5 animals per cage) and ready access to fresh water and food to maintain full health and vigor. Animal welfare was observed daily to ensure optimal conditions and treatment which avoid suffering. Littermates destined to be inoculated were housed in separate cages with access to the



same facilities previously stated. The anesthetic used during experiments was chosen to promote deep anesthesia. During and after anesthesia, mice were kept warm in order to prevent any risks related to hypothermia. Euthanasia was performed by cervical dislocation on the anesthetized animal at the end of the infection period.

## SH1000 mCherry and GFP-Tagged *Staphylococcus aureus* Strain Construction

The *S. aureus* SH1000 strain was chosen for its capacity to produce high quantities of biofilm *in vitro* (Tasse et al., 2018), and used in all the experiments presented in this work. As described previously, the SH1000 strain possess a functional *agr* system (Herbert et al., 2010). The *S. aureus* SH1000 GFP-tagged fluorescent strain (named GFP-SH1000) was constructed after insertion of the pCN47-GFP plasmid (Charpentier et al., 2004) by electroporation into the SH1000 strain (O'Neill, 2010), as described previously (Schenk and Laddaga, 1992). The GFP-SH1000 strain was then selected onto Luria-Bertani (LB) agar containing erythromycin (10 µg/mL). Clones were grown overnight with shaking in Trypticase Soy broth (TSB) containing erythromycin (10 µg/mL) and stored at -80°C in the same medium with 15% glycerol. Fluorescence was detected in bacterial suspensions by fluorescence microscopy. The *S. aureus* SH1000 mCherry-tagged fluorescent strain (named mCherry-SH1000) was constructed in the same way with the pCN47-mCherry plasmid.

## Reagents and Monoclonal Antibodies

The reagents used in this study were as follows: collagenase, Type IV (Gibco), Deoxyribonuclease I from bovine pancreas (Sigma-Aldrich), EDTA (Invitrogen), Erythromycin (Sigma-Aldrich), Gentamicin (Sigma-Aldrich), LB agar (Condalab), Liberase<sup>TM</sup> Research Grade (Roche), Pierce protease inhibitor (Thermo Fisher Scientific), PBS (Dutscher), RPMI 1640 w/stable glutamine (Dutscher), and TSB (BD Bacto). Antibodies and dyes from Miltenyi Biotec include: anti-mouse CD3ε (clone 17A2), CD335 (clone REA815), CD19 (clone REA749), CD45 (clone REA737), CD11b (clone REA592), Ly6G (clone REA526), Ly6C (clone REA796), Viability 405/452 fixable dye, REA Control-APC (clone REA 293), REA Control-FITC (clone REA 293), REA Control-PE-Vio 770 (clone REA 293), REA Control- APC-Vio 770 (clone REA 293), REA Control- APC-VioBlue (clone REA 293), and REA Control- APC-VioGreen (clone REA 293).

## Bacterial Growth Conditions and Inocula Preparation

WT (non-fluorescent), GFP and mCherry-SH1000 strains were used in all the experiments performed. WT planktonic bacterial cultures were prepared from an aliquot of frozen bacteria in 5 mL of TSB and placed overnight at 37°C with agitation under aerobic conditions. Culture media of fluorescent strains were supplemented with erythromycin (10 µg/mL).

Planktonic inocula were prepared by first homogenizing overnight cultures and then determining bacterial concentration

(CFU/mL), deduced by measuring the optical density at 600 nm ( $OD_{600\text{ nm}}$ ) and multiplying it by the known titer (CFU/ $OD_{600\text{ nm}}$ ) of the strain. The corresponding volume of overnight culture containing  $5 \times 10^6$  CFUs was withdrawn and centrifuged at  $3,000 \times g$  for 5 min. The pellet was resuspended in 3.8 µL of PBS (Phosphate-Buffered Saline) which was used as inocula.

Biofilm inocula were prepared by adjusting an overnight culture to  $OD_{600\text{ nm}} = 1 \pm 0.05$  in TSB. The suspension was then diluted 1:100 and deposited in at least two flat-bottomed-wells in a 24-well cell culture plate (1 mL per well) before being placed in a humidity chamber at 37°C for 24 h without agitation. After the incubation period, the cell culture plate was overturned to eliminate excess media. Biofilms formed at the bottom of the wells were then steam-washed for 40 min as described previously (Tasse et al., 2018) and recovered by flushing and scraping the bottom of the well in 200 µL of PBS. This suspension was transferred to the second steam-washed well to recover biofilms, using the same recovery technique to obtain a final concentration of  $5 \times 10^6$  CFUs/3.8 µL of PBS. A small aliquot of the resulting suspension, 3.8 µL, was destined as inocula.

Bacterial CFUs in the injected inocula were confirmed by serial 10-fold dilutions on LB agar plates, containing erythromycin (10 µg/mL) for fluorescent strains, incubated overnight at 37°C. Before plating, biofilm inocula were first vortexed for 30 s, sonicated for 10 min (Thermo Fisher Scientific, 80 W, 37 kHz) and then vortexed again for a further 30 s. Average titrations of planktonic and biofilm inocula were  $3.55 \times 10^6 \pm 1.58 \times 10^6$  CFUs/3.8 µL and  $4.81 \times 10^6 \pm 4.58 \times 10^5$  CFUs/3.8 µL, respectively, with no significant difference between the values (results not shown).

Control inocula corresponded to a small volume of PBS, 3.8 µL.

## Micro-Injection of Biofilm and Planktonic Inocula Into Mice

Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of a ketamine (100 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg) mixture. Planktonic or biofilm inocula or PBS were micro-injected intradermally into the mouse ear pinna, as previously described (Mac-Daniel et al., 2016). Briefly, the ventral side of the mouse ear pinna was affixed under a stereomicroscope using clear tape. A 10 µL NanoFil syringe (World Precision Instruments) fitted to a 34-gauge beveled needle was then loaded with either 3.8 µL of planktonic or biofilm bacteria (containing  $5 \times 10^6$  CFUs) or PBS. Inocula were delivered into the ear tissue by inserting the needle beneath the epidermis on the dorsal side of the ear, and injecting the loaded suspension. A characteristic papule was observable at the injection site, evidence of an intradermal injection.

## Bacterial Burden in Ear Skin Tissue and Draining Lymph Nodes

The SH1000 WT strain was used for bacterial burden analysis. At 2 h pi, mice were euthanized, and the ear pinna tissue and auricular dLNs of infected and control mice were harvested using sterile scissors and weighed. Samples were kept on ice whenever possible throughout the duration of the experiment. Ear tissue



and dLNs were first placed in 500  $\mu$ L of sterile physiological water per ear or dLN, in individual tubes. Ear tissue were then washed in a bath of ethanol and then rinsed in two consecutive baths of distilled water before being dissected into small pieces and placed in a hemolysis tube containing 500  $\mu$ L of sterile PBS. Draining lymph nodes were washed in two baths of distilled water and directly placed in a hemolysis tube containing 500  $\mu$ L of sterile PBS. Ears and dLNs were homogenized using a PRO 200 handheld tissue homogenizer (PRO Scientific). Serial 10-fold dilutions were performed on tissue homogenates and plated on LB agar plates to enumerate viable *S. aureus* per milligram of tissue. Ear tissues and dLNs from mice inoculated with biofilm bacteria were vortexed and sonicated as described above before serial dilution and plating. Experiments were repeated from day 1 to day 7 pi and at 10 days pi.

### Evaluation of Ear Swelling

Ear swelling measurements were carried out on mice inoculated with SH1000 WT strain. Mice destined to be euthanized were first anesthetized by intraperitoneal injection of a ketamine and xylazine mixture. Ear thickness measurements were carried out in triplicate by the same experimenter using an engineer's micrometer (Powerfix Profi Digital Caliper). Care was taken to measure only the outer two-thirds of the ear pinna and to not overly compress the swollen ear tissue between measurements. Due to the development of tissue necrosis at the later stages of infection, this parameter was only measured during the first 48 h pi.

### Inflammation Scoring

Upon mice euthanasia, photos were taken of the ear pinna tissue and then examined in a blinded fashion. Inflammation was scored on the basis of erythema (redness due to capillary swelling) ranging between 0 and 2. Ear tissue not presenting any signs of erythema were assigned a score of 0, while ears with any observable redness were scored between 1 and 2. The former corresponded to the presence of mild erythema over a small area of the ear tissue, while the latter referred to intense redness occupying a larger surface area on the skin.

### Multiplex Cytokine Assay

An aliquot from ear pinnae tissue and dLN homogenates generated during bacterial load experiments were centrifuged for 10 min at  $10,000 \times g$  at  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatants were stored with 1X Pierce protease inhibitor (Thermo Fisher Scientific) at  $-80^{\circ}\text{C}$  until ready for analysis. Samples destined to a multiplex cytokine assay were first thawed on ice and centrifuged a second time for 10 min at  $10,000 \times g$  at  $4^{\circ}\text{C}$ . Right and left ear pinna tissue and dLNs from the same mouse were pooled before analysis. The cytokines tested in supernatants included murine IFN- $\gamma$ , IL-12 p70, TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-6, IL-10, IL-1 $\beta$ , CXCL1, and CXCL9, and were analyzed using multiplex fluorescent bead arrays from Biorad on a BioPlex 200 Luminex system (BioRad), according to manufacturer's directions. Concentrations were expressed per mg of total protein previously established by Bradford assay (BioRad).

## Intravital Imaging Acquisition by Confocal Microscopy

### Time-Lapse Video Acquisition

Two to five hours after inoculation of either planktonic or biofilm mCherry-SH1000 bacteria into the ear tissue of LysM-EGFP transgenic mice, mice were anesthetized to observe the recruitment of EGFP + fluorescent immune cells at the injection sites (intra vital imaging). Video time-lapse acquisition was carried out as previously described (Abdul Hamid et al., 2020). Briefly, the inner side of the ear pinna was flattened on a glass slide and imaged on the ZEISS Spinning Disk Cell Observer (SD) (Carl Zeiss Microscopy) confocal microscope. Acquisition was performed with 10X (dry), 20X (dry), and 40X (oil) objectives for periods of 20–30 min. Ear tissues of control mice were inoculated with PBS and imaged at the same time points.

### Mosaic Acquisition

Infected ears were also imaged on the ZEISS LSM 800 (LSM 800) (Carl Zeiss Microscopy), 3–5 h after inoculation, as previously described (Abdul Hamid et al., 2020). Briefly, multiple fields of observation covering the entirety of the ear tissue surface were imaged with a 10X (dry) objective in order to reconstruct an image of the ear. EGFP fluorescence signal was detected in six Z-stacks while the bright-field signal was only detected on a central stack. Acquisition was repeated 24 and 48 h pi, with imaging sessions typically lasting 30–40 min. Ear tissues of control mice injected with PBS were also imaged with the same protocol.

## In vivo Confocal Image Analysis

### SD Image and Video Analysis

Time-lapse videos at 20X and 40X were analyzed with Imaris software, as previously described (Abdul Hamid et al., 2020). Briefly, tracks were generated and attributed to each immune cell in the observation field using the "Spots" tool. Three different parameters of immune cell dynamics were then extracted: average speed, straightness and displacement. All cells in time-lapse videos where bacteria were visible were analyzed. For cell perimeter analysis, EGFP + immune cells destined to be measured were first selected from 40X time-lapse videos where bacteria were visible using the ZEN 3D image viewer. Only cells with clearly delimited borders present between the first and last stacks were chosen. ROIs were then drawn on Z-projected images prior to perimeter measurements using ImageJ software.

### Mosaic Analysis

Images acquired on the ZEISS LSM 800 confocal were stitched together using ZEN software to reconstruct an entire image of the ear tissue at each time point. The images shown represent the Z-projected maximal intensity signal of a reconstituted image of the ear tissue for the EGFP channel. Images were then analyzed as previously described (Abdul Hamid et al., 2020). Briefly, a Region Of Interest (ROI) was drawn manually around the EGFP fluorescent zone of the 48-h image to obtain the sum of EGFP fluorescence intensities of each pixel in the ROI. The same ROI was applied to the other images of the same time point image and





the ratio of the sum of intensities of EGFP fluorescence to the area of the ROI was then calculated for both time points.

## Lymph Node and Ear Cell Preparation for Flow Cytometry Analysis

The GFP-SH1000 fluorescent strain was used for flow cytometry analyses. At 2, 24, and 48 h pi, mice were euthanized, and the ear tissue and dLNs of infected and control mice were harvested using sterile scissors and weighed. Samples were kept on ice whenever possible throughout the duration of the experiment. Left and right ear pinna leaflets were first dissociated before being completely submerged in 5 mL of RPMI 1640 medium containing 1 mM HEPES, 400 U/mL collagenase IV and 50  $\mu$ g/mL DNase I from bovine pancreas and placed at 37°C for 1 h. Left and right LNs were digested in the same type of medium but only for 15 min. After 15 min of incubation, ear pinna tissue was dissected into small pieces to facilitate digestion. Tissues were then ground on a 70- $\mu$ m cell strainer to obtain single-cell suspensions before being centrifuged at 300  $\times$  g for 10 min at 4°C. Cell pellets were suspended in 500  $\mu$ L of PBS containing 1% SVF and 1 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Cells were then counted and labeled according to manufacturer's directions, using the following markers: Viability Fixable Dye, CD3 $\epsilon$ , CD19, CD335, CD45, CD11b, Ly6G, and Ly6C. To define inflammatory cell populations recruited to these tissues, live single cells were gated to exclude any debris, dead cells or doublets. T lymphocytes, B lymphocytes, NK cells, and dead cells (DUMP channel) were excluded from live single cells, respectively, on the basis of the CD3 $\epsilon$ , CD19, CD335, and Viability 405/452 fixable dye specific markers. Live myeloid populations (CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) were subdivided into PMNs (Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>) and MO/M $\Phi$  (Ly6G<sup>-</sup>Ly6C<sup>hi</sup>). Samples were run on a BD LSR II (BD Biosciences), and data were analyzed with FlowLogic version 7.2.

## Ex vivo Intracellular Bacteria Analysis

The mCherry-SH1000 fluorescent strain was used for *ex vivo* intracellular bacteria analyses. At 2, 24 and 48 h pi, infected mice were euthanized, and the ear pinna tissue were harvested using sterile scissors and weighed. Samples were kept on ice whenever possible throughout the duration of the experiment. Left and right ear pinnae leaflets were first dissociated before being completely submerged in 700  $\mu$ L of PBS containing Liberase<sup>TM</sup> Research Grade (Roche), diluted 2:7, and placed at 37°C for 1 h with agitation. Fifteen mL of cold PBS were added to each tube and tissues were then ground on a 40- $\mu$ m cell strainer to obtain single-cell suspensions that were then centrifuged at 1200  $\times$  g for 5 min at 4°C. Cell pellets were suspended in 1 mL of PBS containing 5% SVF. Cell suspensions resulting from 2 infected mice per bacterial form were pooled for 24- and 48-h time points. CD11b<sup>+</sup> cells were isolated using CD11b microbeads mouse/human magnetic cell separation (Miltenyi Biotec) according to manufacturer's directions.

To assess the quantity of intracellular bacteria, a portion of sorted skin cells were centrifuged at 300  $\times$  g for 10 min at

4°C, and resuspended in 1 mL of room temperature RPMI 1640 medium containing 100  $\mu$ g/mL gentamycin. Cells were incubated for 1 h at 37°C, CO<sub>2</sub> 5% before being centrifuged again at 300  $\times$  g for 10 min at 4°C. Cells were then lysed by resuspending pellets in 500  $\mu$ L of cold ultrapure water, followed by vigorous shaking for 1 min. Serial 10-fold dilutions were performed on the resulting suspension and plated on LB agar plates to enumerate viable *S. aureus* per 10<sup>6</sup> CD11b<sup>+</sup> cells.

To characterize the distribution of intracellular bacteria, another portion of sorted skin cells were adhered to glass slides by centrifugation (800 rpm for 5 min, Thermo Shandon Cytospin 3 Centrifuge) and were fixed with 4% PFA prior to MGG staining. Glass slides were then examined by bright field microscopy (Axio Imager 2, Zeiss) and intracellular bacteria were counted in at least 100 CD11b<sup>+</sup> cells per condition, per time point.

## Neutrophil NADPH Oxidase Assay

The SH1000 WT strain was used for Neutrophil NADPH oxidase analysis. Single cell suspensions were obtained 48 h pi from mouse ear pinna tissue, as described in the flow cytometry analysis section. NADPH oxidase quantity was assessed, as described previously (Borbón et al., 2019). Briefly, cells were labeled using the following markers: CD45, CD11b, and Ly6G and then incubated for 15 min at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in PBS containing 10  $\mu$ M of dihydrorhodamine 123 (DHR) (Sigma-Aldrich) with or without 100 ng/mL of phorbol myristate acetate (PMA) (Sigma-Aldrich). Samples were run on a BD LSR II (BD Biosciences), and data were analyzed with FlowLogic version 7.2.

## Statistical Analysis

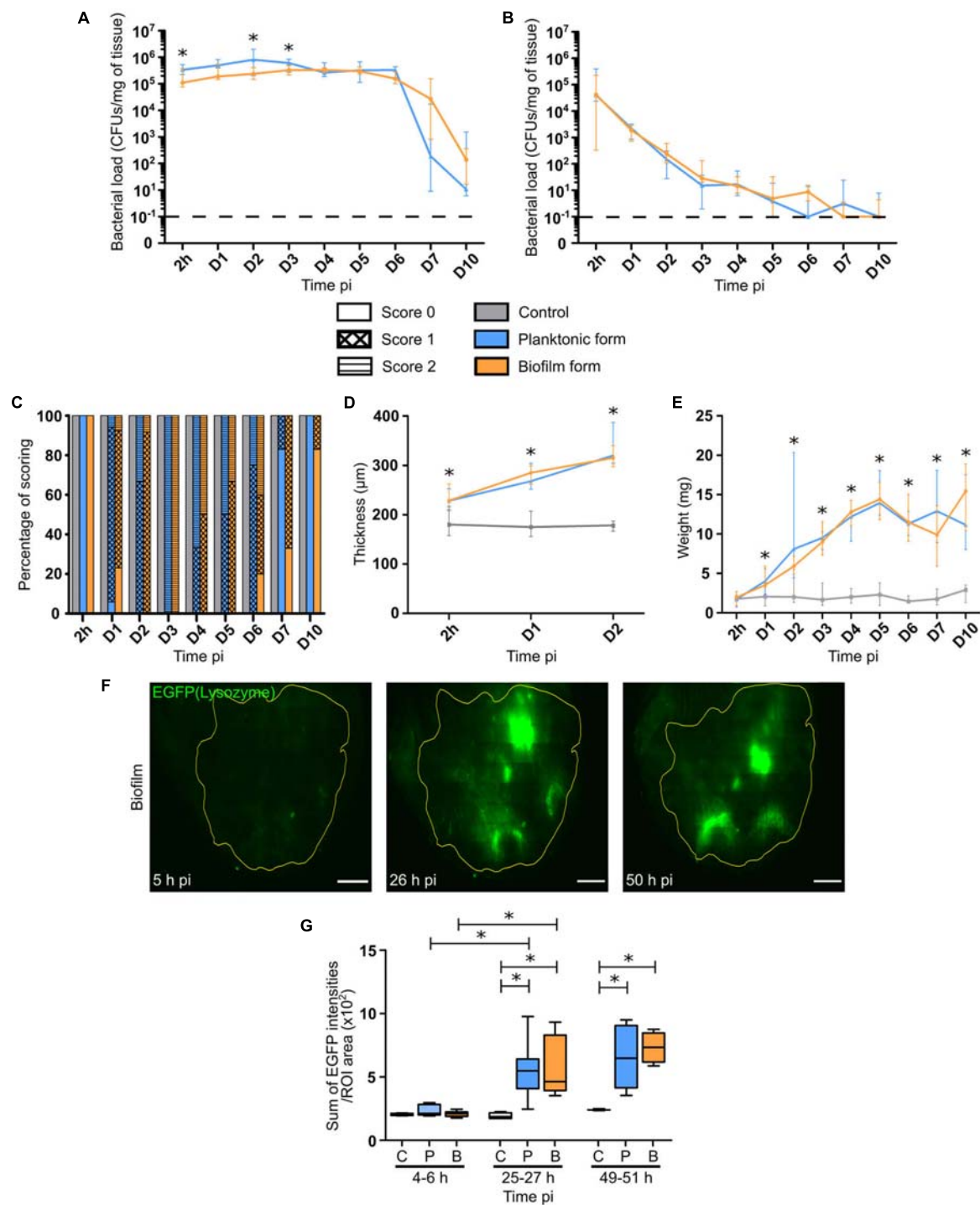
Data generated were analyzed with Prism 5 software (GraphPad Software, Inc.) and a non-parametric Mann-Whitney one-tailed or two-tailed statistical test.  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant (symbols: \*  $\leq 0.05$ ).

## RESULTS

### Comparable Bacterial Load and Inflammatory Responses in the Mouse Ear Pinna After the Micro-Injection of Either the Planktonic or Biofilm Form of *Staphylococcus aureus*

Calibrated *S. aureus* inocula were prepared and microinjected into the mouse ear pinna tissue. Bacterial load was first measured in the cutaneous ear tissue and the auricular draining lymph node (auricular dLN) following inoculation of WT C57BL/6J mice with 5  $\times$  10<sup>6</sup> CFUs of non-fluorescent planktonic or biofilm *S. aureus*. CFUs were enumerated, starting from 2 h post-infection (h pi) until day 7 pi, and then after 10 days. Bacterial load quantification showed that viable planktonic and biofilm bacteria were detected in both cutaneous ear tissue and dLNs at 2 h pi (Figures 1A,B), and were continuously present throughout the infection period. In the ear pinna tissue, bacterial loads were mostly similar and stable throughout the





**FIGURE 1 |** Bacterial load and inflammatory responses in *S. aureus* infected tissue. **(A,B)** Bacterial load quantification, expressed in CFUs/mg of tissue, from 2 h pi to day 7 pi, and at day 10 pi in the ear pinnae **(A)** and dLNs **(B)** of WT C57BL/6J mice following micro-injection of PBS (C) or WT SH1000 planktonic (P) or biofilm (B) bacteria. Dotted line represents the limit of detection (median ± IQR, number of ear pinnae:  $N_C = 8-10$  ear pinnae,  $N_P = 10-12$  ear pinnae,  $N_{BF} = 11-12$  ear pinnae, from 3 different experiments, Mann-Whitney two-tailed test,  $*p < 0.05$ ). **(C)** Evaluation of ear pinnae inflammation from 2 h pi to day 7 pi, and at day 10 pi for the 3 groups of mice, by scoring based on erythema. Results expressed as percentage of each score (Number of mice:  $N_C = 6-10$  mice,  $N_P = 4-17$  mice,  $N_{BF} = 5-13$  mice, from 3 different experiments). **(D)** Ear pinna thickness measurements from 2 h pi to day 2 pi for the 3 groups of mice (median ± IQR, number of ear pinnae:  $N_C = 4-7$  ear pinnae,  $N_P = 6-8$  ear pinnae,  $N_{BF} = 6-7$  ear pinnae, from 3 different experiments, Mann-Whitney two-tailed test,  $*p < 0.05$ ). **(E)** dLN weight measurements from 2 h pi to day 7 pi, and at day 10 pi for the 3 groups of mice (median ± IQR, number of dLNs:  $N_C = 8-10$  dLNs,  $N_P = 10-12$  dLNs,  $N_{BF} = 11-12$  dLNs, from 3 different experiments, Mann-Whitney two-tailed test,  $*p < 0.05$ ). **(F)** Reconstituted confocal images of LysM-EGFP transgenic mouse ear pinna tissue *(Continued)*



**FIGURE 1 |** Continued

following micro-injection of mCherry-SH1000 biofilm bacteria. Images correspond to the maximal projection intensities of the EGFP signal, and the yellow line indicates the ROI where the “Sum of EGFP fluorescence intensities” was measured. Scale bar: 2 mm. One representative image is shown from at least 3 independent experiments. **(G)** Ratio of the sum of EGFP fluorescence intensities to ROI areas (median  $\pm$  IQR, number of ear pinnae tissues:  $N_C = 4$ ,  $N_P = 5-8$ ,  $N_{BF} = 4-9$ , from at least 3 different experiments, Mann-Whitney two-tailed test, \* $p < 0.05$ ).

first 6 days of infection for both forms of bacteria, with the first signs of bacterial clearance appearing at day 7. Although this sharp decrease seemed more pronounced in mice inoculated with planktonic bacteria, no significant difference was observed between the two forms. At day 10 pi, a lower bacterial load was detected in both groups of infected mice, as compared to day 7 pi, but was once again comparable between the two forms. In the dLNs, bacteria were present throughout all the infection period, with similar infection kinetics. This was in line with the maintenance of bacteria in the cutaneous tissue previously observed. Indeed, CFUs were detected even at day 10 pi in the dLN in 3/10 and 3/12 samples for planktonic and biofilm bacteria, respectively. At this time point, the bacterial load was low in most of the samples and often below the detection threshold.

Certain macroscopic parameters of inflammation related to the presence of bacteria in the target tissues (ear pinnae, dLNs) were then analyzed, including redness and swelling (thickness) of ear pinna tissue and dLN weight. In control mice, no redness was observed throughout the experimental period (**Figure 1C**). The first signs of redness (**Supplementary Figure 1**) appeared 24 h pi within the infected group of mice (**Figure 1C**), where most samples had a score of 1. Redness then peaked at day 3 pi within both infected groups, and then slowly decreased to give way to tissue necrosis from day 2 pi, with a peak at day 10 pi. Interestingly, the presence of redness in the cutaneous ear tissue lasted longer in the biofilm group of mice than in the planktonic group. The ear tissue swelling was further analyzed in the first 2 days of infection. Ear thickness was significantly increased as early as 2 h pi, as compared to control mice. Values continued to increase until the second day of infection with no observable difference between the two infected groups of mice (**Figure 1D**). Lastly, the weight of dLNs significantly and constantly increased after infection, as compared to control mice, starting from day 1 pi until the end of the infection period. Again, no observable difference was observed between the two infected groups of mice (**Figure 1E**).

To follow the evolution of early inflammatory responses in the skin, a semi-quantitative measure of EGFP positive (EGFP +) phagocyte recruitment in the ear pinna tissue was realized as previously described (Abdul Hamid et al., 2020; **Figure 1F** and **Supplementary Figure 2**). The ratio of the sum of EGFP fluorescence intensities to ROI area (**Figure 1G**), measured from 2 to 48 h pi, showed that both bacterial forms did not induce a significant increase in EGFP + cell recruitment at early time points (4–6 h pi), as compared to control mice. However, after 25 and 49 h pi, a significant increase of the ratio was observed in both groups of challenged mice, as compared to control mice. In infected mice, a significant increase of cell recruitment was observed between 4–6 and 25–27 h pi, but not

between 25–27 and 49–51 h pi, meaning that the peak of cell recruitment was on day 1.

Taken together, these data show that global inflammatory responses are comparable in the target tissues after micro-injection of both bacterial forms.

### Comparable Early Cytokine and Chemokine Profiles in the Mouse Ear Pinna and the Auricular Draining Lymph Node After the Micro-Injection of Either the Planktonic or Biofilm Form of *Staphylococcus aureus*

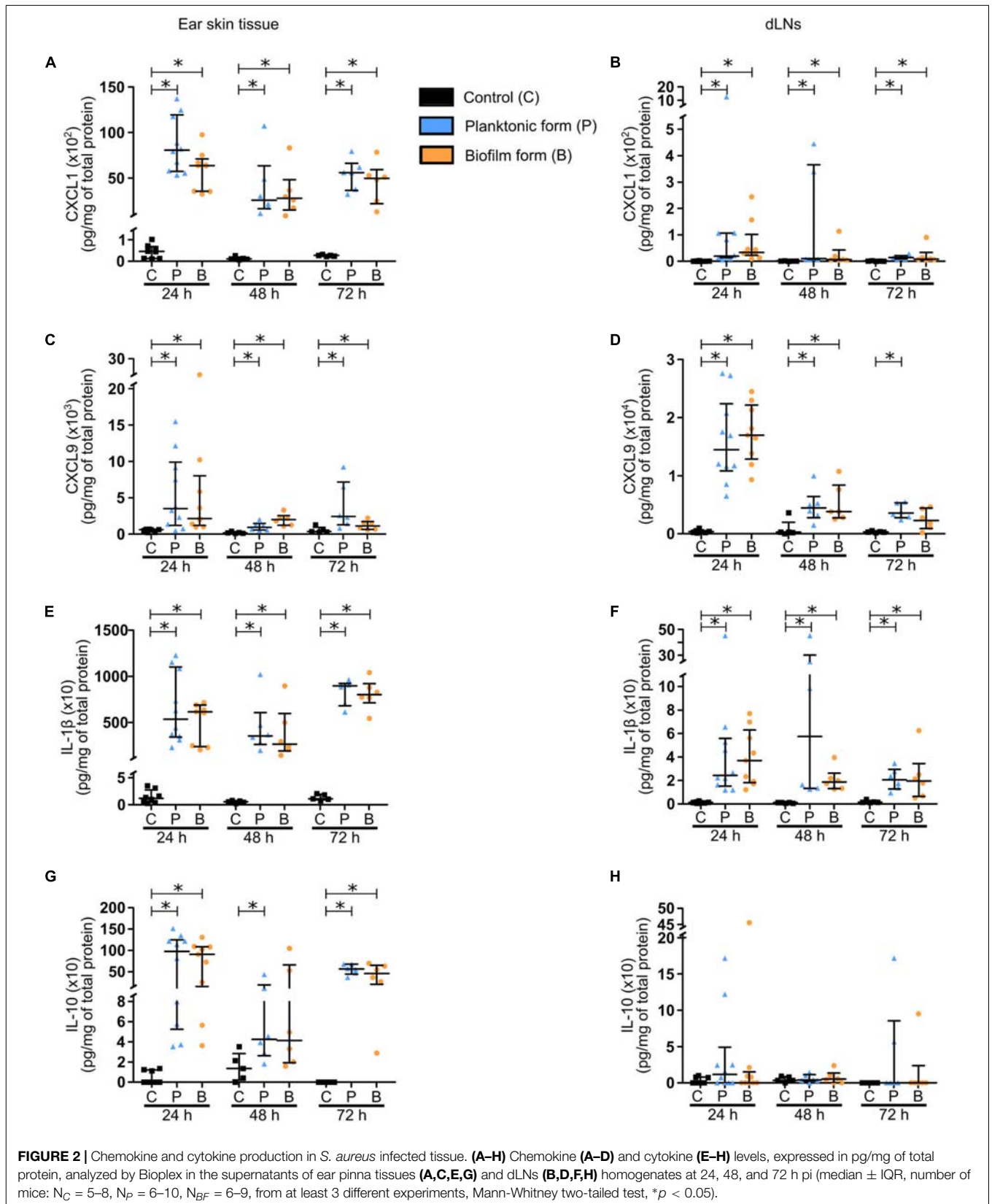
In a second set of experiments, cytokine and chemokine profiles were analyzed in ear tissue and dLN homogenates during the first few days of infection (24–72 h pi).

The chemokines analyzed were CXCL1/KC (**Figures 2A,B**) and CXCL9/MIG (**Figures 2C,D**), both responsible for the recruitment of phagocytes, namely PMNs and MOs/MΦs. Significantly higher levels of these chemokines were detected from 24 to 72 h pi in both target tissues, with higher concentrations measured in the skin than in the dLNs of infected mice. Globally, no difference was observed between the two bacterial forms, except after 72 h in the dLN where CXCL9 were comparable to those in controls.

The chemokine response was associated with a pro-inflammatory cytokine production by recruited innate immune cells. Pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  (**Figures 2E,F**) and IL-6 (**Supplementary Figures 3A,B**) were significantly increased in both target tissues, again with higher concentrations measured in the skin than in the dLNs of infected mice, and at all-time points analyzed. A larger quantity of TNF- $\alpha$  was also detected in the ear pinnae of infected mice, as compared to controls at 24 and 72 h pi (**Supplementary Figure 3C**). However, this increase was only observed at 24 h pi in the dLNs (**Supplementary Figure 3D**). Interestingly, IFN $\gamma$  concentrations were comparable in control and infected mice in cutaneous ear tissue at 24 and 72 h pi (**Supplementary Figure 3E**), but were significantly increased at both time points in dLNs of infected mice, as compared to those of control mice (**Supplementary Figure 3F**). The last pro-inflammatory cytokine analyzed was IL-17 (**Supplementary Figures 3G,H**), largely produced by Th17 cells and capable of upregulating the expression of certain proinflammatory mediators such as IL-1 $\beta$  and IL-6 in MΦs. As seen previously for IL-6, significantly higher levels of IL-17 were detected in both target tissues of infected mice, as compared to controls at 24 and 72 h pi.

Finally, concentrations of the anti-inflammatory cytokine IL-10 (**Figures 2G,H**) were significantly increased in the ear pinnae tissue of infected mice, as compared to control mice at 24 and









72 h pi, while only being significantly increased after inoculation of planktonic bacteria at 48 h pi.

Altogether, these results reveal early pro-inflammatory and anti-inflammatory responses in both target tissues at the molecular level, with IL-1 $\beta$ , IL-10, and CXCL1 being majorly produced in the cutaneous ear tissue, and CXCL9 largely detected in the dLN. These responses were globally comparable for both bacterial forms.

### Differential Early Dynamics of Recruited Phagocytes in the Mouse Ear Pinna After the Microinjection of Either the Planktonic or Biofilm Form of *Staphylococcus aureus*

The very early dynamics of inflammatory responses observed in the skin were further analyzed by using an intravital confocal imaging approach, as previously described (Abdul Hamid et al., 2020). The first goal was to reproduce our previous results described for the *S. aureus* LYO-S2 clinical strain with the SH1000 laboratory strain in terms of cell recruitment and behavior of recruited cells after biofilm infection. Briefly,  $5 \times 10^6$  CFUs of planktonic or biofilm mCherry-SH1000 were intradermally inoculated in the ear pinna tissue of LysM-EGFP transgenic mice. Time-lapse videos of cutaneous injection sites were then acquired during the first few hours following infection (from 2 to 5 h pi).

Using this laboratory strain, we observed a considerable influx of EGFP + phagocytes at injection sites, as early as 2 h pi for both bacterial forms. Cells recruited in response to the planktonic form were capable of invading the injection sites and creating bacteria cell interaction zones (Figure 3A, Supplementary Figures 4A,B, and Supplementary Movie 1). In contrast, cells that were recruited toward biofilm injection sites behaved differently, as previously described (Abdul Hamid et al., 2020). Indeed, EGFP + innate immune cells were arrested at the periphery of biofilm injection sites, with only few cells capable of penetrating the biofilm (Figure 3B, Supplementary Figures 4C,D, and Supplementary Movie 2).

The motility parameters (average speed, trajectory straightness, displacement) of recruited EGFP + phagocytes both in contact or not with bacteria at the injection site were also studied using Imaris software, as previously described (Abdul Hamid et al., 2020). SH1000 biofilms impacted cell motility similarly to previous observations, with a significant decrease in average speed and straightness of cells recruited toward biofilm bacteria, as compared to the planktonic form (Figures 3C,D). This means that cells were more heavily arrested and had a non-linear trajectory in biofilm-inoculated sites, as compared to planktonic-inoculated sites. The displacement of cell trajectories, representing the straight-line distance of the cell from the first timepoint to the last, was also analyzed in both infected conditions (Figure 3E). A significant decrease of this parameter was detected following biofilm inoculation, as compared to planktonic condition. This result was coherent with the decrease in straightness of cell trajectories observed with biofilm inocula.

Interestingly, observations made during intravital confocal microscopy experiments revealed that cells in contact with

biofilms behaved differently from those in contact with planktonic bacteria, with a diminished capacity to emit pseudopods and retaining a round morphology (Figures 3E,G and Supplementary Figures 4E–H). Quantitative data were obtained by measuring the perimeter of EGFP + phagocytes in contact with either bacterial form with ImageJ software. Using this methodology, a significant decrease of cell perimeter in the presence of the biofilm inoculum was observed, as compared to planktonic inocula (Figure 3H). This result obtained *in vivo* was coherent with observations made *in vitro*, where PMNs in contact with *Pseudomonas aeruginosa* biofilms conserved their round shape (Jesaitis et al., 2003).

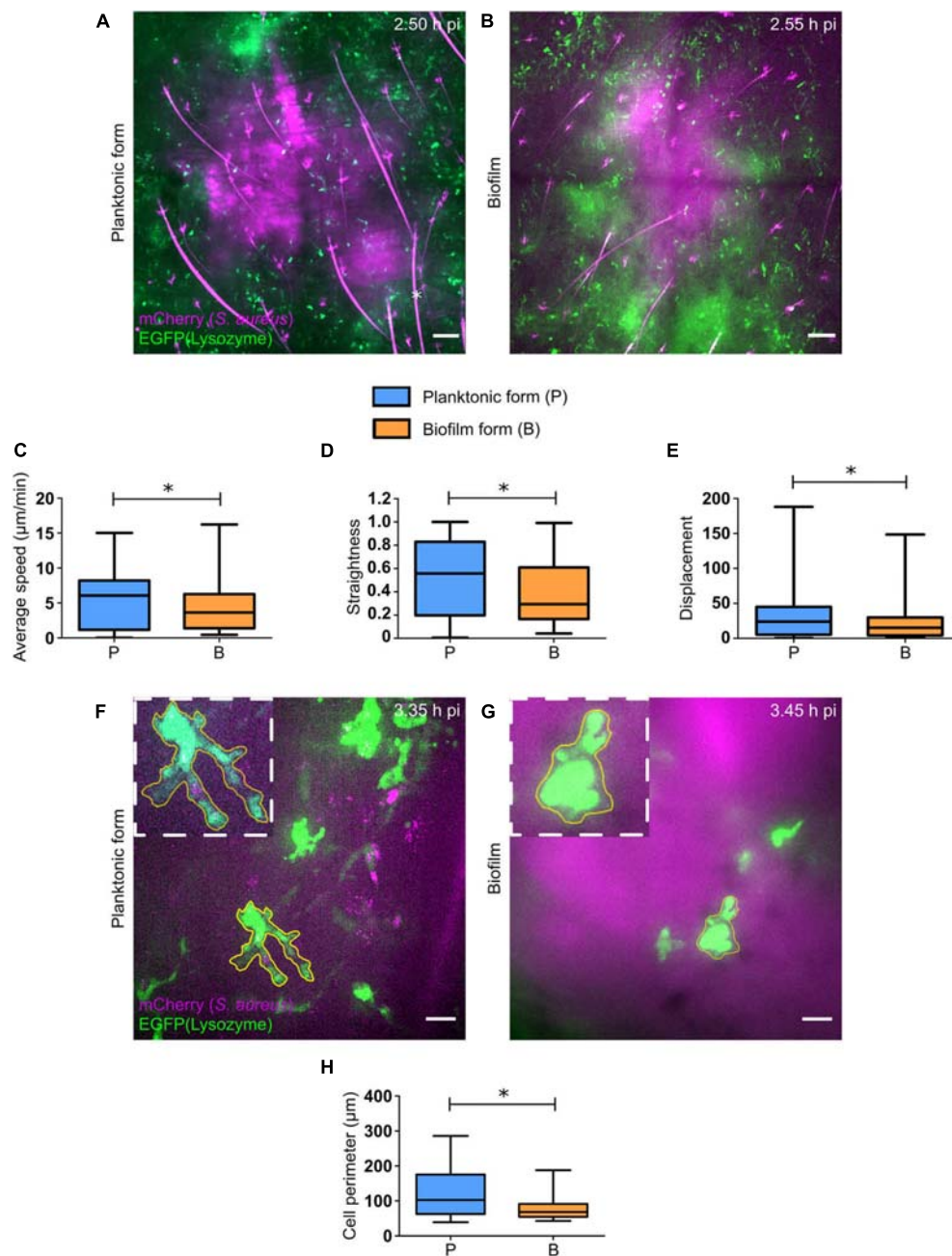
### Differential Kinetics of Polymorphonuclear Neutrophil Recruitment After the Micro-Injection of Either the Planktonic or Biofilm Form of *Staphylococcus aureus*

To further understand the early inflammatory responses to the biofilm inocula, imaging data were complemented by flow cytometry analysis of the phenotype of recruited inflammatory cells in the cutaneous ear tissue and the dLNs. Here, ear pinna tissue of WT C57BL/6J mice were inoculated with either PBS or  $5 \times 10^6$  CFUs of GFP fluorescent *S. aureus* planktonic or biofilm bacteria. After 2, 24, and 48 h, organs were harvested, digested to obtain a single cell suspension, labeled for specific membrane markers of innate inflammatory cells, and then analyzed by flow cytometry. Myeloid populations (CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) were identified among live single cells and further subdivided into PMNs (Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>) and MO/M $\Phi$  (Ly6G<sup>-</sup>Ly6C<sup>hi</sup>) (Figure 4A and Supplementary Figure 5).

Total cell counts prior to labeling showed a significant recruitment of cells to the cutaneous ear tissue as soon as 2 h pi in infected mice, as compared to control mice, which continued until 48 h pi (Supplementary Figure 6A). However, absolute values of myeloid cells in the ear pinna tissue of infected mice were only significantly increased after 24 and 48 h, as compared to control mice (Figure 4B). These data correlate with the previous measures of overall tissue inflammation in LysM-EGFP transgenic mice (Figure 1G). Interestingly, a decrease in the number of myeloid cells recruited in the ear tissue was observed 48 h following biofilm inoculation, as compared to the planktonic condition.

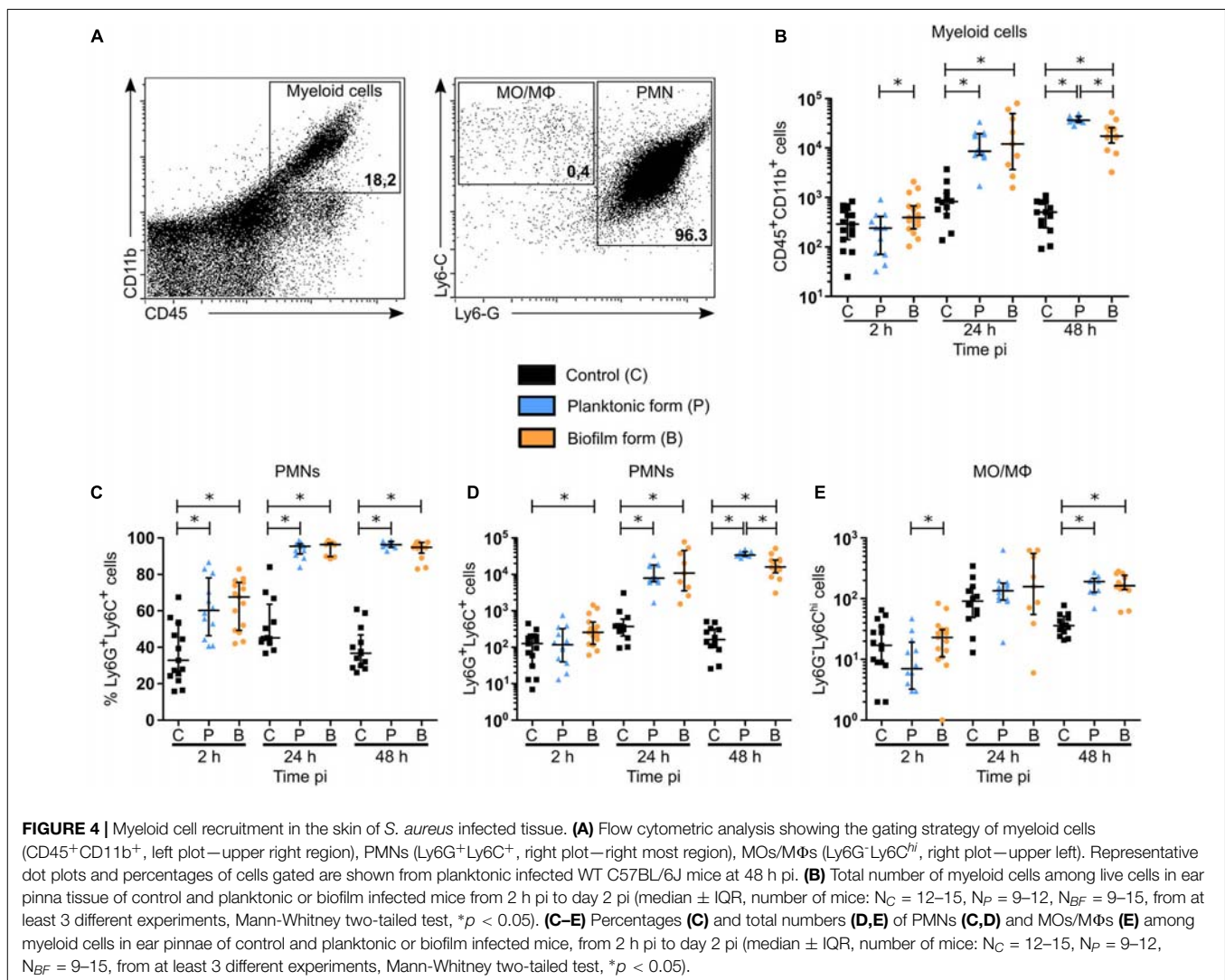
When looking further at the phenotype of recruited myeloid cells, a significantly higher percentage of PMNs was present in infected cutaneous ear tissue compared to controls, from 2 to 48 h pi (Figure 4C). However, PMN cell numbers revealed that this increase was significant only after 24 h in the planktonic group of mice, and from 2 h pi in biofilm infected mice (Figure 4D). Indeed, biofilms recruited more PMNs than controls at 2 h pi, with only a trend to increase when compared to mice infected with planktonic bacteria ( $p = 0.0673$ ). Similar to their parent population (CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> cells), biofilms recruited a significantly lower number of PMNs at 48 h pi, as compared to planktonic inoculated sites.





**FIGURE 3 |** Early dynamics of recruited EGFP + cells in the skin of *S. aureus* infected tissue. **(A,B)** Live confocal imaging, using X10 objectives, in the ear pinna tissue of LysM-EGFP transgenic mice following micro-injection of mCherry-SH1000 planktonic **(A)** or biofilm **(B)** bacteria. Average projections of green (EGFP + innate immune cells) and magenta (mCherry-SH1000) fluorescence, acquired at 2.50 h pi **(A)** and 2.55 h pi **(B)**, show immune cells recruited toward the injection site. Asterisk: autofluorescent hair (also in magenta). Scale bar: 100 μm. One representative experiment is shown for each group of mice from at least 9 independent experiments. **(C–E)** Quantification of EGFP + innate immune cell average speed **(C)**, straightness **(D)**, and displacement **(E)**, from X20 time-lapse acquisitions of infected mice (median ± minimum and maximum values, number of cells:  $N_P = 209$ ,  $N_{BF} = 126$ , from at least 3 different experiments, Mann-Whitney two-tailed test,  $*p < 0.05$ ). **(F,G)** Live confocal imaging, using X40 objectives, in the ear pinna tissue of LysM-EGFP transgenic mice following micro-injection of mCherry-SH1000 planktonic **(F)** or biofilm **(G)** bacteria. Maximum projections of green (EGFP + innate immune cells) and magenta (mCherry bacteria) fluorescence, acquired at 3.35 h pi **(F)** and 3.45 h pi **(G)**, show immune cells interacting with bacteria. The yellow line indicates the ROI where cell perimeter was measured. Scale bar: 15 μm. One representative experiment is shown for each group of mice from at least 9 independent experiments. **(H)** Measure of EGFP + innate immune cell perimeter, from maximum projection time-lapse acquisitions of infected mice (median ± minimum and maximum values, number of cells:  $N_P = 19$ ,  $N_{BF} = 25$ , from 4 different experiments, Mann-Whitney one-tailed test,  $*p < 0.05$ ).





Altogether, **Figures 4C,D** illustrate that the majority of myeloid cells, and thus EGFP + phagocytes recruited to the cutaneous ear tissue after biofilm injection were PMNs. Their recruitment kinetics were different at 2 and 48 h pi, when compared to planktonic bacteria.

For MO/MΦ, a significant recruitment was detected in ear pinna tissue for both bacterial forms only after 48 h, as compared to control mice, but in a much lower proportion compared to PMNs (**Figure 4E**).

In dLNs, total cell counts were significantly increased only after 48 h with planktonic bacteria, as compared to controls, while only a trend to increase was detected in the biofilm group of mice ( $p = 0.069$ ) (**Supplementary Figure 6B**). As shown previously in the cutaneous ear tissue, a significant increase in the percentage of PMNs was observed at 2 and 24 h pi in biofilm infected mice, as compared to control mice (**Figure 5A**). Additionally, a decrease in the percentage of these cells among their parent population was observed after 48 h, as compared to the planktonic condition. Thus, recruitment kinetics of PMNs in the dLN were similar to those in the cutaneous ear tissue (**Figure 5B**).

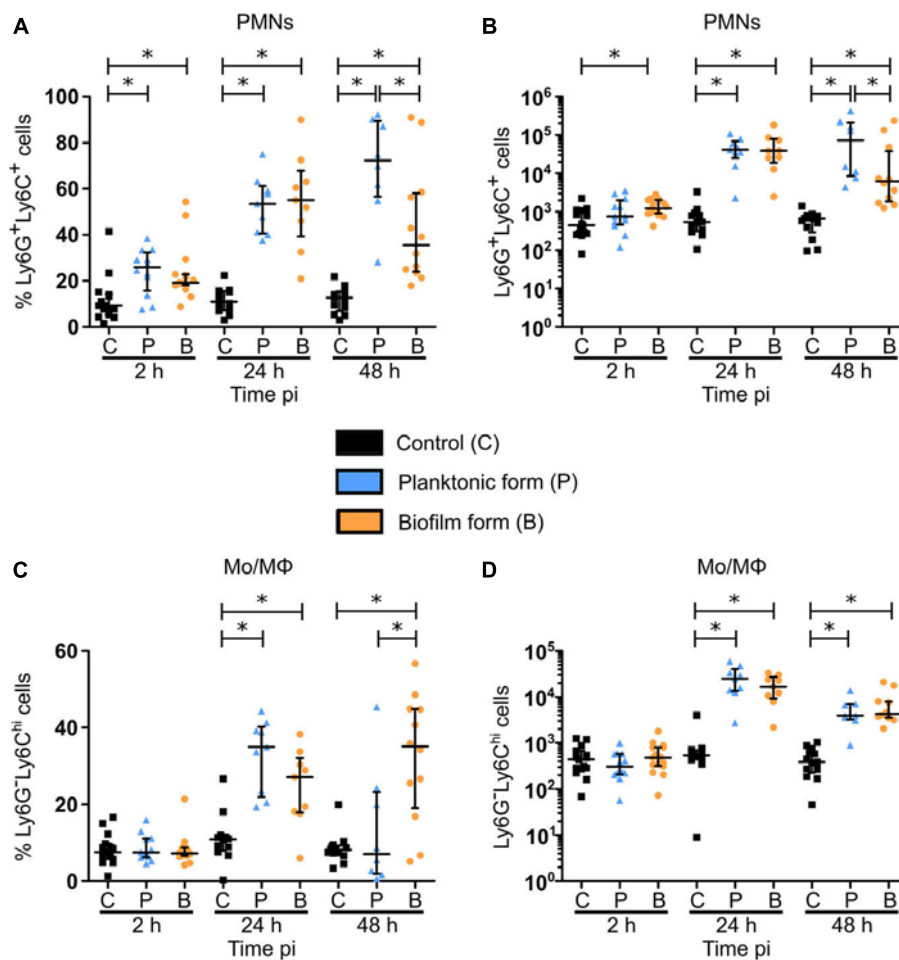
Interestingly, bacteria inoculation induced a significant increase in both percentage and MO/MΦ cell numbers in the dLN at 24 and 48 h pi, a result which was not observed in the cutaneous ear tissue (**Figures 4E, 5B,C**). In contrast to PMNs, the percentage of MO/MΦ in the dLN was higher after 48 h following biofilm inoculation, as compared to the planktonic condition (**Figures 5A,C**).

Taken globally, these results show that PMNs comprise the majority of cells recruited during the early stages of anti-biofilm inflammatory responses. However, their recruitment seemed to be specifically impacted by biofilms.

### **Staphylococcus aureus Biofilm Bacteria Inoculated Into the Mouse Ear Pinna Mostly Interact With Polymorphonuclear Neutrophils**

Imaging data presented in **Figure 3** illustrate qualitative differences in the interaction between EGFP + innate immune cells and either planktonic or biofilm bacteria at cutaneous





**FIGURE 5** | Myeloid cell recruitment in the auricular draining lymph nodes of *S. aureus* infected mice. (A–D) Percentages (A,C) and total numbers (B,D) of PMNs (A,B) and MOs/MΦs (C,D) among myeloid cells in dLNs of control and planktonic or biofilm infected mice, from 2 h pi to day 2 pi (median ± IQR, number of mice:  $N_C = 12-15$ ,  $N_P = 8-12$ ,  $N_{BF} = 9-15$ , from at least 3 different experiments, Mann-Whitney two-tailed test, \* $p < 0.05$ ).

injection sites. Thus, in complementary experiments, bacterial association with recruited inflammatory cells, and more specifically PMNs, was quantified in the cutaneous ear tissue by flow cytometry. To do this, ear pinnae of WT C57BL/6J mice were inoculated with either PBS or  $5 \times 10^6$  CFUs of planktonic or biofilm GFP-SH1000, and the proportion of recruited inflammatory cells associated to bacteria was quantified at 2, 24, and 48 h pi (Figure 6A). To verify the specificity of bacterial association, we measured the median fluorescence intensity (MFI) of the GFP signal in PMN and MO/MΦ subpopulations and compared them to the MFIs of controls (Supplementary Figures 6C,D). Supplementary Figures 6E,F show that although GFP autofluorescent cells were detected in ear tissues of control mice, a significant GFP specific signal was associated to recruited phagocytes in the ear tissues of infected mice (Supplementary Figures 6C–F).

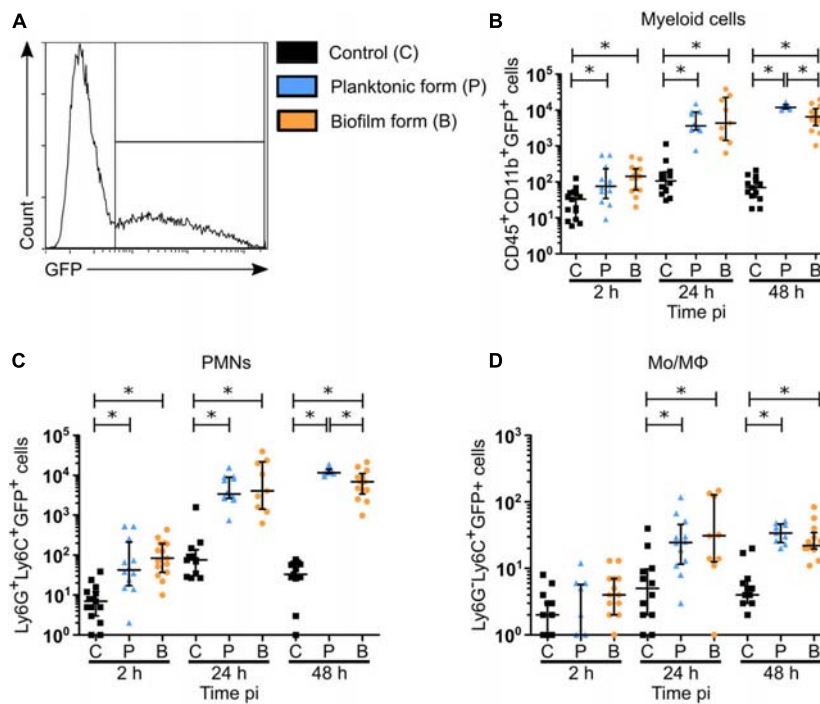
Bacterial association was observed in myeloid cell populations (CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) as early as 2 h pi (Figure 6B), which corroborates observations made by intravital imaging (Figure 3).

The proportion of bacteria associated cells increased significantly for both bacterial forms at 24 and 48 h pi, as compared to PBS inoculated control mice. Interestingly, a decrease in biofilm association was observed at 48 h pi, as compared to planktonic bacteria. Recruited PMNs followed the same kinetics of bacterial association as myeloid cells (Figure 6C and Supplementary Figure 6E), with the same significant decrease observed after 48 h for the biofilm inoculum. These data were coherent with the decrease of myeloid cells and PMN numbers observed at this time point (Figures 4B,D). Bacteria associated to MOs/MΦs were detected in a significantly increased proportion at 24 and 48 h pi (Figure 6D and Supplementary Figure 6F), but in a much smaller proportion, as compared to PMNs. Furthermore, the percentage of PMNs associated to bacteria was continuously higher than those observed in MO/MΦ at all three time points analyzed.

Taken together, these data suggest that PMNs represent key cells in the interactions with biofilm bacteria at the cutaneous injection site.







**FIGURE 6 |** Biofilm bacteria associated myeloid cells in the skin of *S. aureus* infected mice. **(A)** Flow cytometric analysis showing the gating strategy to analyze GFP-SH1000 associated cells among myeloid cells (CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>), PMNs (Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>), and MOs/MΦs (Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>int</sup>GFP<sup>+</sup>). Representative histogram is shown from planktonic infected WT C57BL/6J mice at 48 h pi. **(B–D)** Total number of bacteria associated myeloid cells **(B)**, PMNs **(C)**, and MOs/MΦs **(D)** in ear pinna tissue of control and planktonic or biofilm infected mice, from 2 h pi to day 2 pi (median ± IQR, number of mice: N<sub>C</sub> = 12–15, N<sub>P</sub> = 9–12, N<sub>BF</sub> = 9–15, from at least 3 different experiments, Mann-Whitney two-tailed test, \**p* < 0.05).

## Differential Functional Properties of Recruited Polymorphonuclear Neutrophil in the Mouse Ear Pinna After the Micro-Injection of Either the Planktonic or Biofilm Form of *Staphylococcus aureus*

Figures 4–6 illustrated that PMNs consist of the majority of inflammatory cells recruited to both the cutaneous ear tissue and the dLN, and are greatly associated to biofilms at the cutaneous injection site. In complementary experiments, their functional properties were studied in the ear pinna tissue of WT C57BL/6J mice, after inoculation of either PBS or *S. aureus* planktonic or biofilm bacteria.

In the first set of experiments, activation of myeloid cells and PMNs was assessed at 2, 24, and 48 h pi, based on their expression of the activation marker integrin receptor CD11b (Figures 7A,B). For both populations studied, an increased expression of CD11b was observed at 24 and 48 h pi, as compared to control mice, with a significant increase following biofilm inoculation at 48 h pi, as compared to the planktonic group. Interestingly, an initial significant increase in CD11b expression was shown 2 h pi in PMN populations only after planktonic bacteria inoculation.

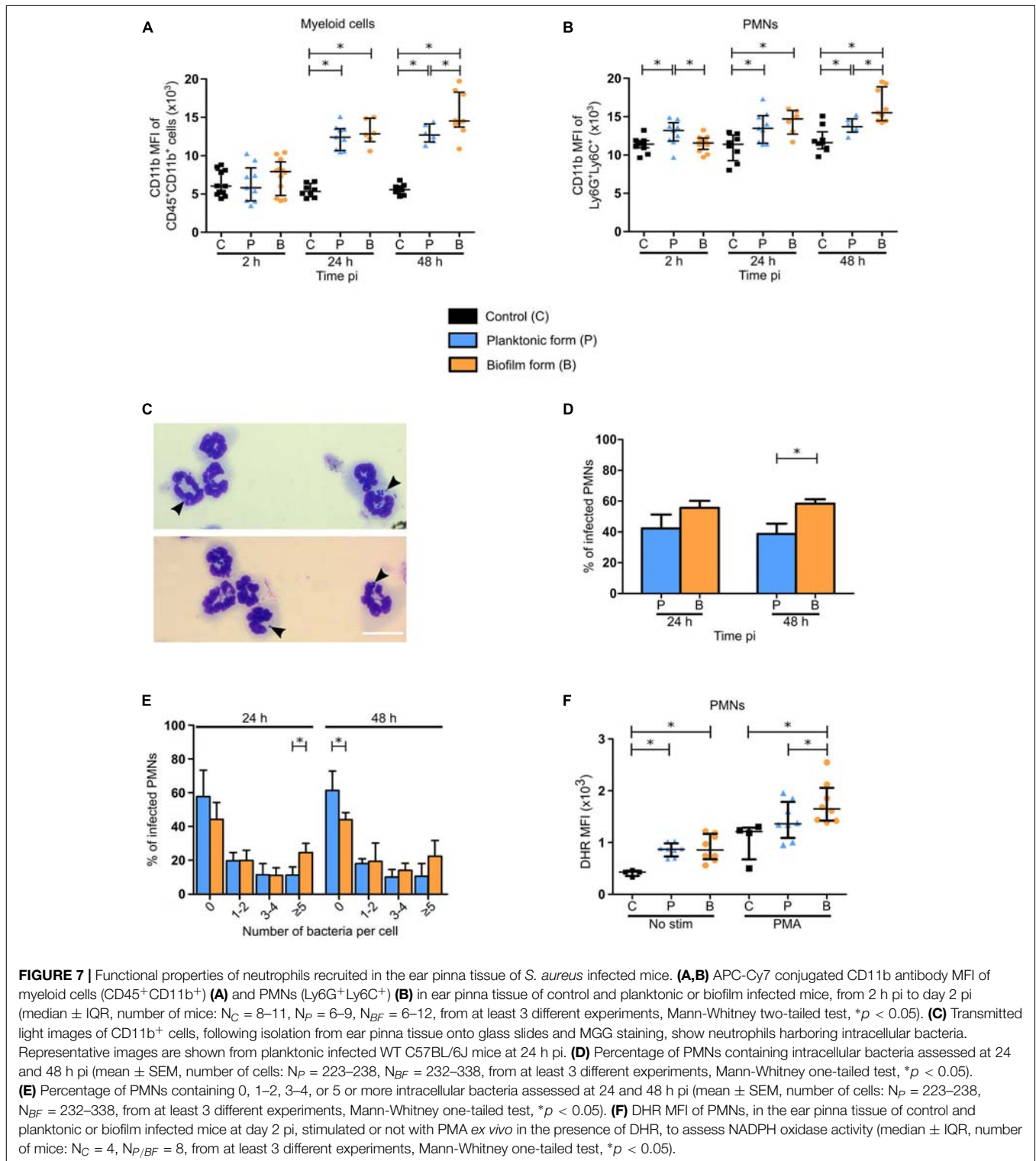
In a second set of experiments, phagocytic activity of PMNs and MO/MΦ was analyzed 24 and 48 h pi. Intracellular bacteria were counted inside CD11b<sup>+</sup> cells

purified from cutaneous infected tissues and subsequently stained using the May Grünwald-Giemsa (MGG) staining (Figure 7C and Supplementary Figures 7A,B). This analysis revealed that the proportion of PMNs harboring intracellular bacteria was significantly increased at 48 h pi when biofilms were inoculated, as compared to planktonic bacteria (Figure 7D). Further analyses showed that the proportion of PMNs harboring 5 or more intracellular bacteria was significantly increased in biofilm infected mice compared to the planktonic condition after 24 h. This seemed to continue at 48 h pi where a trend to increase was observed in the same group of cells. Conversely, the proportion of PMNs not harboring any intracellular bacteria was significantly increased 48 h pi after planktonic bacteria inoculation (Figure 7E), illustrating differential phagocytosis capacities of PMNs in response to the planktonic or biofilm inocula.

For MO/MΦ, the proportion of intracellular bacteria was comparable for both bacterial forms at both 24 and 48 h pi (Supplementary Figure 7C). However, as seen previously for PMNs, the proportion of these cells harboring 5 or more intracellular bacteria was also significantly increased after 24 h for biofilm inocula (Supplementary Figure 7D).

The viability of intracellular bacteria counted on MGG stained slides was also verified (Supplementary Figure 7E). To do this, CD11b<sup>+</sup> cells were purified from ear skin tissue of infected





mice and treated with gentamycin. Cells were then lysed, and bacteria were enumerated following plating on agar plates. Results indicate the presence of viable intracellular planktonic and biofilm bacteria inside these cells (mainly PMNs and MOs/MΦs) at 24 and 48 h pi, in similar proportions.

**Figures 4C,D** illustrate that PMN recruitment was significantly decreased in response to biofilms after 48 h, as compared to planktonic inocula. However, the increased expression of the CD11b surface marker and of phagocytosis capacity of PMNs observed at this time-point supposed that



they were more activated in this context. To test this hypothesis, flow cytometry analysis was performed to assess DHR oxidation by Reactive Oxygen Species (ROS), reflective of NADPH oxidase activity generated in recruited PMNs in response to PMA (Figure 7F). When not in the presence of this soluble agent, DHR MFI was comparable between the two bacterial forms, despite being significantly increased compared to controls. PMA-stimulated PMNs from infected ear pinnae also presented a higher DHR MFI than controls, with an increased production of ROS after biofilm inoculation, as compared to planktonic bacteria.

Taken together, these results illustrated differential functional properties in recruited PMNs at 48 h pi following biofilm inoculation.

## DISCUSSION

PMNs and M $\Phi$  have been largely described as key effector cells in the inflammatory responses during *S. aureus* infections (de Vor et al., 2020; Pidwill et al., 2021). Certain *in vivo* models have also shown that biofilms induce anti-inflammatory responses as early as day 3 or day 5 pi (Heim et al., 2015, 2018). As the infection outcome is conditioned in the first few days following host-bacteria contact, we sought out to highlight the very early impacts of *S. aureus* biofilms on the main cellular components of innate immune responses, meaning phagocytes. To do this, we compared inflammatory responses elicited by either planktonic or biofilm bacteria at different levels of the organism, in a mouse ear pinna model of infection. In this report, we demonstrated globally similar responses at the tissue and cytokine level, but found different cellular responses, including cell behavior, recruitment, and certain functional properties.

At the tissue level, we first observed a globally similar evolution of bacterial load between the two forms of *S. aureus*, contradicting a previous study that compared the fate of non-biofilm and biofilm inocula in mice. Thurlow and collaborators showed a better bacterial clearance of non-biofilm bacteria in skin abscess as early as day 3 compared to catheter grown biofilms implanted sub-cutaneously (Thurlow et al., 2011). They assigned this to the presence of the catheter, which could impede access of leukocytes toward the site of infection. In contrast, in the ear pinna model used in this work, biofilm inocula were accessible to host innate immune cells as no abiotic support was used. One possible reason for the comparable bacterial load observed in the ear pinna tissue could be the *in vivo* transition of planktonic bacteria to the biofilm lifestyle, representing a possible limit of the model. Several days are nevertheless probably necessary for this transition, even if the precise timing of this event to occur *in vivo* is currently unknown. In the clinical setting, *S. aureus* is prevalent in early prosthetic infections, which become manifest within 1 month following surgery (Arciola et al., 2018). To identify a possible planktonic to biofilm transition in the ear pinna, biofilm matrix components could be labeled *in vivo* by using specific fluorescent probes several days pi (Sauvat et al., 2020). Genes upregulated during biofilm formation could also

be identified by transcriptomic analysis from planktonic-infected ear tissues, as previously carried out *in vitro* by Resch et al. (2005).

An observable inflammatory response was characterized by the apparition of redness and tissue swelling of the ear pinna tissue of infected mice, which was coherent with the presence of a high dose of bacteria in the first few days of infection. These results were further corroborated by the semi-quantitative measure of EGFP + phagocyte recruitment in the ear pinna tissue, and observations of bacterial injection sites showing a considerable recruitment of leukocytes for both bacterial forms. *S. aureus* is known to produce toxins and enzymes, such as leukocidins and coagulase, that are able to induce cell death by apoptosis, necroptosis, and also pyroptosis (Soe et al., 2021). This was coherent with ear pinna tissue necrosis observed as early as day 3. However, the exact proportion of each cell death pathway is yet to be studied.

We further determined the chemokine and cytokine profile in both cutaneous ear tissue and dLNs after *S. aureus* infection. In the ear tissue, we found large proportions of the PMN chemoattractant CXCL1 which has been shown previously to be notably secreted by keratinocytes in response to *S. aureus* (Olaru and Jensen, 2010). This would partially explain the significant increase in EGFP + immune cells observed at 24 h pi. High amounts of CXCL9/MIG, a Th1 cell-recruiting chemokine, were also found in infected mice. Globally, we found a robust pro-inflammatory cytokine response comparable between bacterial forms in both infected tissues, due to the presence of IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$ . In line with these data, the presence of IL-17 may indicate that infected mice also mount a Th17 response, which is coherent with a previous study implicating IL-17 in establishing an effective antimicrobial response by  $\gamma\delta$  T cells (Cho et al., 2010). At early time points, IL-17 could also be produced by innate lymphoid cells in the skin and the dLNs (Cua and Tato, 2010). The absence of IFN $\gamma$  production in infected mice could be explained by the early time points and/or by the presence of IL-10 in the infectious milieu, as the two are negatively correlated (Saraiva and O'Garra, 2010). Biofilms have indeed been shown to skew host immune responses toward an anti-inflammatory phenotype, in part *via* IL-10 secretion by M2 polarized M $\Phi$ s and recruited MDSCs (Thurlow et al., 2011; Heim et al., 2018). In this study, the presence of IL-10 was comparable in both planktonic and biofilm infected ear tissues. In a previous study (Heim et al., 2020), *S. aureus* bacteria derived lactate was shown to inhibit HDAC11 in M $\Phi$ s and MDSCs, which led to an increase in histone 3 acetylation at the IL-10 promoter, thus enhancing its expression. This discovery was, however, demonstrated in a biofilm prosthetic joint infection model, without comparison with planktonic bacteria. This anti-inflammatory response may be dependent on bacterial concentration, as IL-10 was not significantly increased in auricular dLNs of infected mice. Depending on the strain used, the inocula doses and the target tissues analyzed, some discrepancies may be observed between the inflammatory and anti-inflammatory chemokines and cytokines measured in different *in vivo* models. In all cases, host immune responses to *S. aureus* biofilm infection may be modulated by quorum sensing



or metabolically dampened bacteria induced by host immune responses (Yamada and Kielian, 2018).

The use of intravital confocal imaging to further decorticate very early inflammatory responses allowed us to highlight differences in cellular behavior. First, we validated the previously observed “biofilm” phenotype that leukocytes present at the injection site, with cells arrested at the periphery of the biofilm and modified motility parameters of recruited cells (Abdul Hamid et al., 2020; Sauvat et al., 2020). This means that the protective barrier role that biofilms exert are common between these two *S. aureus* strains, and probably among all biofilm-producing strains. The two strains used in our previous works were both MSSAs, but a “biofilm” phenotype has also been described for the MRSA strain USA300 (Thurlow et al., 2011; Gries et al., 2020b). The use of biofilms grown over longer periods (3 or 4 days) in the latter experiments compared to those used in this report further suggest a common immune evasion mechanism conserved throughout biofilm maturation. Furthermore, the fate of phagocytes capable of penetrating *S. aureus* biofilms have been explored *in vitro*. For example, Bhattacharya et al. (2020) showed that biofilms provoked NET formation in penetrating PMNs *via* the activity of Pantone-Valentine Leukocidins and  $\gamma$ -hemolysin AB. Otherwise, Thurlow et al. (2011) showed that M $\Phi$ s closer to the base of biofilms were not viable, while those on the surface were intact. In the ear pinna model, the “biofilm” phenotype also extended to a difference in migration properties, namely average speed, displacement, and trajectory straightness between the two bacterial forms. Indeed, EGFP + phagocytes possessed decreased values for all three motility parameters stated previously in the presence of biofilms, meaning that cells moved at a slower rate, were more restrained and were not recruited directly toward biofilms. This could be partly explained by the inability of phagocytes to bind to bacterial components embedded in the extracellular matrix or by the expression of chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus* (CHIPS) (de Vor et al., 2020). Observing bacteria-cell interactions using higher magnification objectives allowed us to show for the first time *in vivo* that phagocytes interacting with biofilms were less capable of emitting pseudopods (illustrated by the decrease in cell perimeter) in the first hours after bacteria inoculation. Previously, Jesaitis et al. (2003) have shown a comparable phenomenon *in vitro* with PMNs and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. In these experiments, PMNs were immobilized on the surface of biofilms, while conserving a rounded morphology, a characteristic of unstimulated phagocytes. Unfortunately, the dynamics of EGFP<sup>+</sup> cells could not be further analyzed by intravital imaging due to ear tissue swelling and necrosis starting at 24 h pi. In line with these results, we found that the expression of the activation marker CD11b in PMNs (Kinhult et al., 2003) of biofilm-infected mice was similar to that of controls at 2 h pi, while it was upregulated in cells in the presence of planktonic bacteria.

Complementing these findings with FACS analysis allowed us to quantify the proportion of phagocytic cells recruited to both ear and dLN tissue over the first few days, and also to

evaluate phagocytosis efficacy of recruited cells. Our results show that the majority of EGFP + cells that were observed in the cutaneous injection sites as early as 2 h pi were PMNs. After 24 h and onward, PMNs comprised the main bulk of the myeloid cell response, suggesting an important role played by these cells in the *S. aureus* early immune responses. Interestingly, at 2 h pi, increased PMN numbers were only observed in response to biofilms alluding to biofilm specific properties that favor PMN recruitment. In the Gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa*, the quorum sensing molecule N-acylhomoserine lactone acted as a strong PMN chemoattractant (Holm and Vikström, 2014). Recruitment continued at 24 and 48 h pi, coherent with the high levels of CXCL1 found in ear skin tissue at these time points.

In the dLN, kinetics of PMN recruitment were mostly similar to those observed in the ear tissue, except for a significant difference between both infected conditions in PMN percentage after 48 h. The recruitment of PMNs over the course of time was coherent with the large quantity of CXCL1 found in the skin and the dLN. As almost the same number of cells could be observed in both tissues despite the gap in CXCL1 concentration observed in the dLN, this suggests the implication of other homing mechanisms toward dLN. Moreover, the decrease in PMN numbers in the dLN of biofilm infected mice at 48 h pi, as compared to the planktonic condition, seemed more pronounced than in the ear tissue.

MO/M $\Phi$  arrived at the injection site after PMNs, but only after 48 h, and always in a smaller proportion compared to PMNs. Indeed, an initial increase in MO/M $\Phi$  numbers in biofilm mice compared to planktonic mice was observed at 2 h pi, but the two were however comparable to controls. Moreover, MO/M $\Phi$  were also recruited in control mice between 2 and 24 h pi, which could be reflective of their non-specific recruitment after skin trauma due to intradermal injection of PBS.

The numbers of recruited MO/M $\Phi$  were almost comparable to those of PMNs in the dLN, which coincides with the large quantity of CXCL9 predominant at 24 h pi. This chemokine has been previously shown to induce M $\Phi$  migration and activation in a apical periodontitis mouse model (Hasegawa et al., 2021). Resch et al. (2005) described the upregulation of polysaccharide intercellular adhesins, staphylococcal secretory antigen and staphyloxanthin during biofilm formation, as compared to planktonic growth. The recruited MOs/M $\Phi$ s are antigen presenting cells that will migrate to the cutaneous dLN. Their mobilization from the skin and probably also from the blood circulation is clearly detected in the auricular dLN from 24 h pi. They will present antigens to naïve T cells, therefore playing a key role in inducing specific adaptive immune responses to biofilms. These responses need to be further explored.

In further experiments, the functional properties of PMNs recruited at the cutaneous injection sites were analyzed, as they were the major player in inflammatory responses mounted against *S. aureus* in this model.

CD11b is a  $\beta$ 2 integrin that is found on the cell surface and also PMN granules. Following activation, intracellular pools of CD11b are translocated to the cell surface where they form heterodimers with CD18 capable of interacting with fibrinogen and inactivated





complement component 3 (iC3b) (Solovjov et al., 2005). The latter is implicated in opsonization, thus increasing phagocytosis effectiveness in PMNs with higher levels of CD11b. PMNs in contact with biofilms did not overexpress the CD11b surface marker at the beginning of the infection period. This could be due to the physical barrier represented by biofilms which could limit PMN access to bacteria. However, higher levels of CD11b were detected 48 h pi despite the PMNs decreased numbers observed at this later time point. This difference between the two inocula after 48 h could be due to the presence of matrix components in the biofilm inoculum, representing a multiplicity of additional antigens that are absent in the planktonic inoculum. Furthermore, a proportion of biofilm bacteria could be lysed after phagocytosis and matrix components could be released at the cutaneous injection sites. Namely, Phenol Soluble Modulins are biofilm matrix proteins well known as immunomodulators (Richardson et al., 2018). They also have been shown to fix to PMN formyl peptide receptors inducing their recruitment. The activation of this PMN receptor has been shown to induce chemotaxis, ROS production, degranulation, cytokine expression, and phagocytosis (Cheung et al., 2014; Dorward et al., 2015).

Analysis of bacterial association to immune cells showed that PMNs were the predominant immune cell interacting with inoculated *S. aureus* throughout the first few days of infection. Inversely, MO/M $\Phi$  were less likely to interact with bacteria, as they were detected in lesser proportions (number and percentage) compared to PMNs at each time-point. In just 2 h, PMNs present at the injection site were able to interact with planktonic and biofilm bacteria, corroborating intravital imaging observations. In response to large aggregates of bacteria and phagocytosis failure, PMNs release NETs composed of chromatin and antimicrobial peptides which subsequently trap and degrade bacteria (Branzk et al., 2014). Furthermore, this process causes cell membrane rupture and thus cell death although certain studies have shown that some PMNs conserve membrane integrity after NET release (non-lytic NETosis) and continue to phagocytose bacteria (Bhattacharya et al., 2020). The proportion of cells undergoing this type of NETosis in the ear pinna model is yet to be examined.

Phagocytic capacity of recruited PMNs was further studied. Phagocytosis of biofilm bacteria was increased at 48 h pi, as compared to planktonic bacteria, while it was comparable for both bacterial forms 24 h pi. In line with these results, a higher proportion of PMNs containing bacterial aggregates of 5 or more at 24 h pi was also observed in MO/M $\Phi$ . This could be explained by the spatial distribution of bacteria that are more compact in biofilms, allowing greater entry into cells during phagocytosis. Planktonic and biofilm bacteria that were observed intracellularly (in PMNs and MO/M $\Phi$ ) were shown to be viable, and at comparable levels between the two forms. This proves the *in vivo* ability of *S. aureus* to maintain intracellularly inside phagocytes. Indeed, to combat degradation, *S. aureus* produce a variety of enzymes ranging from extracellular adherence protein that inhibit PMN serine protease (Stapels et al., 2014) to catalase and superoxide dismutase that prevent the oxidation effects of ROS (Painter et al., 2015). However, the exact

*in vivo* contribution of persisting bacteria or of new phagocytosed bacteria to the proportion of detected intracellular bacteria in the ear tissue is not known.

A previous study suggested that PMN accumulation in *S. aureus* infected skin tissue was attributed to blood stream recruitment of mature PMNs, prolonged survival of recruited PMNs and local proliferation/maturation of c-kit<sup>+</sup> progenitor cells into mature PMNs (Kim et al., 2011). These progenitor cells were also capable of differentiating into MDSCs. The latter were initially described as having an important role in cancer where they promote an immunosuppressive microenvironment *via* the secretion of IL-10 and TGF $\beta$  or high levels of ROS, which have been associated with T-cell deactivation. They also have been identified in *S. aureus* biofilm prosthetic joint infections where they contribute toward anti-inflammatory responses (Heim et al., 2014). In the described mouse models, MDSCs were identified based on the co-expression of surface markers CD11b, Ly6G, and Ly6C. The selection of our PMN population was based on the same markers. In this report, even if PMN numbers were decreased after 48 h of biofilm infection as compared to the planktonic condition, these cells globally expressed higher levels of CD11b, had an increased production of ROS, and an increased phagocytic capacity. These results illustrate a potential PMN “over-activated” status in response to biofilms after 48 h. Further experiments are required to identify the specific phenotype of the different PMN subsets induced by *S. aureus* biofilms at this time point and their possible MDSC nature.

Taken globally, at early time points (2 h), we observed an initial increase in PMN numbers associated with CD11b expression levels comparable to controls, and a decreased capacity to penetrate biofilms and to emit pseudopods. At later time points (48 h), we observed a decrease in PMN numbers with a potential “over-activated” status associated with increased CD11b expression levels, ROS production and phagocytic capacity. In these conditions, we could have expected a higher and lower biofilm bacterial load after 2 and 48 h, respectively. Surprisingly, no differences in CFU numbers were observed with the planktonic condition in all experiments performed, suggesting a more complex mechanism of bacterial survival at play involving other immune or non-immune cell populations. Namely, Natural Killer cells that are recruited to *S. aureus* skin infections have been reported to secrete IL-17, subsequently activating keratinocytes to produce pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules that mediate neutrophil recruitment (Krishna and Miller, 2012). In any case, this comparative study where immune responses and bacterial loads were followed over time has never been carried out, and thus gives new insights into the understanding of innate immune responses directed toward *S. aureus* biofilms.

In conclusion, the ear pinna model allowed us to obtain a global picture of the early dynamics of immune responses against both forms of *S. aureus* at different levels of the organism. By performing a direct comparison of innate immune responses between planktonic and biofilm bacteria in the cutaneous tissue and dLN, we provide evidence that biofilms elicit specific immune signatures regarding PMN kinetics of recruitment and functional properties at very early time points.



## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation (Auvergne C2E2A, Clermont-Ferrand, France) Agreement number: 1,725.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

AA, AC, AD, JJ, FL, and PG conceived and designed the experiments. AA analyzed the data. AA, AC, AD, and PG performed experiments. AA, AC, AD, JJ, and PG participated in the provision of materials for experiments. PG supervised, managed, and coordinated responsibility for the research activity. AA and PG verified the overall replication and reproducibility of results, visualized, and wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

PG obtained funding for this work by the Auvergne-Rhône-Alpes (AURA) region (Pack Ambition Recherche 2017-IMMUNOFILM-Staph project). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Ivo Boneca (Bacteria-Cell Interactions Unit, Pasteur Institute, Paris, France) for the LysM-EGFP transgenic mouse line, Caroline Vachias and Pierre Pouchin (Clermont Imagerie Confocal: CLIC, GRéD, Clermont Auvergne University) for their help with setting up confocal microscopy acquisition parameters and subsequent image analysis and processing, Christelle Blavignac (Centre d'Imagerie Cellulaire Santé: CICS, Clermont Auvergne University) for helping us with flow cytometry parameters and data analysis, Tessa Amblard and Julie Durif for cytokine assays, Abdullah Azaz, Laurence Olivier-Nakusi and Sarah Chateaufneuf for their preliminary results and setting up the mouse ear pinna model, as well as Elisabeth Billard for manuscript revision and helpful discussions, and Abdelkrim Alloui for ensuring mouse care and housing.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.728429/full#supplementary-material>

**Supplementary Figure 1** | Representative images illustrating the different levels of scoring used to assess ear pinna tissue inflammation. Images of C57BL/6J mice ear pinnae showing erythema (black empty arrowheads) at different time points following infection by *S. aureus*.

**Supplementary Figure 2** | Mosaic acquisition of LysM-EGFP transgenic mice ear pinna tissue. Reconstituted confocal images of LysM-EGFP transgenic mice ear pinna tissue following micro-injection of PBS (A) or mCherry-SH1000 planktonic bacteria (B). Images correspond to the maximal projection intensities of the EGFP signal, and the yellow line indicates the ROI where the "Sum of EGFP fluorescence intensities" was measured. Scale bar: 2 mm. One representative experiment is shown for each group of mice from at least 3 independent experiments.

**Supplementary Figure 3** | Cytokine production in the ear pinna tissue and dLNs of control and planktonic or biofilm infected mice. (A–H) Cytokine levels, expressed in pg/mg of total protein, were analyzed by Bioplex in the supernatants of ear pinna tissue (A, C, E, G) and dLN (B, D, F, H) homogenates at 24 and 72 h pi (median ± IQR, number of mice:  $N_C = 5$ ,  $N_{P/BF} = 6$ , from at least 3 different experiments, Mann-Whitney two-tailed test, \* $p < 0.05$ ).

**Supplementary Figure 4** | Representative images of EGFP + immune cell recruitment to either *S. aureus* planktonic or biofilm bacteria. (A–D) Live confocal imaging, using X10 objectives, in the ear pinna tissue of LysM-EGFP transgenic mice following micro-injection of mCherry-SH1000 planktonic (A, B) or biofilm (C, D) bacteria. Representative average projections of green (EGFP + innate immune cells) and magenta (bacteria) fluorescence, acquired at 2.10 h pi (A), 3.30 h pi (B), 2.10 h pi (C), and 3.30 h pi (D), show immune cells recruited toward the injection site. Asterisk: autofluorescent hair (also in magenta). Scale bar: 100  $\mu$ m. (E–H) Live confocal imaging, using X40 objectives, in the ear pinna tissue of LysM-EGFP transgenic mice following micro-injection of mCherry-SH1000 planktonic (E, F) or biofilm (G, H) bacteria. Maximum projections of green (innate immune cells) and magenta (bacteria) fluorescence, acquired at 4.20 h pi (E), 3.25 h pi (F), 3.25 h pi (G), and 2.30 h pi (H) show immune cells in the injection area. The yellow line indicates the ROI where cell perimeter was measured. Asterisk: autofluorescent hair (also in magenta). Scale bar: 15  $\mu$ m. One representative experiment is shown for each group of mice from at least 9 independent experiments.

**Supplementary Figure 5** | Flow cytometry gating strategy for myeloid cells populations isolated from the ear tissue and dLN. Representative dot plots showing the gating strategy to analyze myeloid cell populations in the skin and dLN following inoculation. Representative dot plots and percentages of cells gated are shown from planktonic infected WT C57BL/6J mice at 24 h pi.

**Supplementary Figure 6** | Immune cell counts and percentage of bacteria associated immune cells. (A, B) Total number of live cells recruited to ear pinna tissue (A) and dLNs (B) of control and planktonic or biofilm infected mice from 2 h pi to day 2 pi (median ± IQR, number of mice:  $N_C = 12-15$ ,  $N_P = 9-12$ ,  $N_{BF} = 9-15$ , from at least 3 different experiments, Mann-Whitney two-tailed test, \* $p < 0.05$ ). (C, D) GFP median fluorescence intensity of PMNs (C) and MOs/M $\Phi$ s (D) associated to GFP-SH1000 in the ear pinna tissues of control and planktonic or biofilm infected mice from 2 to 48 h pi (median ± IQR, number of mice:  $N_C = 12-15$ ,  $N_P = 9-12$ ,  $N_{BF} = 9-15$ , from at least 3 different experiments, Mann-Whitney one-tailed test, \* $p < 0.05$ ). (E, F) Percentage of bacteria associated PMNs (E) and MOs/M $\Phi$ s (F) in ear pinna tissue of control and planktonic or biofilm infected mice from 2 h pi to day 2 pi (median ± IQR, number of mice:  $N_C = 12-15$ ,  $N_P = 9-12$ ,  $N_{BF} = 9-15$ , from at least 3 different experiments, Mann-Whitney two-tailed test, \* $p < 0.05$ ).

**Supplementary Figure 7** | Phagocytosis of *S. aureus* planktonic or biofilm bacteria by CD11b<sup>+</sup> myeloid cells in the ear pinna tissue. (A, B) Transmitted light images of CD11b<sup>+</sup> cells, following isolation from ear pinna tissue onto glass slides and MGG staining, show PMNs (A, B) and MOs/M $\Phi$ s (B) harboring intracellular bacteria (black arrowheads). Representative images are shown from planktonic infected WT C57BL/6J mice at 24 h pi (A) and 48 h pi (B). (C) Percentage of MOs/M $\Phi$ s containing intracellular bacteria assessed at 24 and 48 h pi (mean ± SEM, number of cells:  $N_P = 223-238$ ,  $N_{BF} = 232-338$ , from at least 3 different experiments, Mann-Whitney one-tailed test, \* $p < 0.05$ ). (D) Percentage of MOs/M $\Phi$ s containing 0, 1–2, 3–4, or 5 or more intracellular bacteria assessed at 24 and 48 h pi (mean ± SEM, number of cells:  $N_P = 223-238$ ,  $N_{BF} = 232-338$ , from at least 3 different experiments, Mann-Whitney one-tailed test, \* $p < 0.05$ ).



**(E)** Quantification of intracellular bacteria, expressed in CFUs/10<sup>6</sup> cells, in CD11b + cells isolated from ear pinna tissue of planktonic or biofilm infected mice, at 24 and 48 h pi (median ± IQR, number of mice: N<sub>P</sub> = 5, N<sub>BF</sub> = 3–4, from at least 3 different experiments, Mann-Whitney one-tailed test, \**p* < 0.05).

**Supplementary Movie 1** | EGFP + innate immune cells are recruited toward a planktonic injection site. *In vivo* confocal time-lapse imaging of immune cell migration in LysM-EGFP transgenic mice ear tissue injected with planktonic

bacteria from 2.50 to 3.10 hpi. Average projections of time-lapse images. Z-stacks collected 72.98 s apart. Scale bar: 100 μm.

**Supplementary Movie 2** | EGFP + innate immune cells are recruited toward a biofilm injection site. *In vivo* confocal time-lapse imaging of immune cell migration in LysM-EGFP transgenic mice ear tissue injected with planktonic bacteria from 2.55 to 3.25 hpi. Average projections of time-lapse images. Z-stacks collected 106.55 s apart. Scale bar: 100 μm.

## REFERENCES

- Abdul Hamid, A. I., Nakusi, L., Givskov, M., Chang, Y.-T., Marquès, C., and Gueirard, P. (2020). A mouse ear skin model to study the dynamics of innate immune responses against *Staphylococcus aureus* biofilms. *BMC Microbiol.* 20:22. doi: 10.1186/s12866-019-1635-z
- Arciola, C. R., Campoccia, D., and Montanaro, L. (2018). Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 397–409. doi: 10.1038/s41579-018-0019-y
- Bhattacharya, M., Berends, E. T. M., Zheng, X., Hill, P. J., Chan, R., Torres, V. J., et al. (2020). Leukocidins and the nuclease nuc prevent neutrophil-mediated killing of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect. Immun.* 88, e00372–20. doi: 10.1128/IAI.00372-20
- Bjarnsholt, T. (2013). The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Suppl.* 121, 1–51. doi: 10.1111/apm.12099
- Borbón, T. Y., Scorza, B. M., Clay, G. M., de Queiroz, F. L. N., Sariol, A. J., Bowen, J. L., et al. (2019). Coinfection with *Leishmania major* and *Staphylococcus aureus* enhances the pathologic responses to both microbes through a pathway involving IL-17A. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13:e0007247. doi: 10.1371/journal.pntd.0007247
- Branzk, N., Lubojemska, A., Hardison, S. E., Wang, Q., Gutierrez, M. G., Brown, G. D., et al. (2014). Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat. Immunol.* 15, 1017–1025. doi: 10.1038/ni.2987
- Capucetti, A., Albano, F., and Bonecchi, R. (2020). Multiple roles for chemokines in neutrophil biology. *Front. Immunol.* 11:1259. doi: 10.3389/fimmu.2020.01259
- Charpentier, E., Anton, A. I., Barry, P., Alfonso, B., Fang, Y., and Novick, R. P. (2004). Novel cassette-based shuttle vector system for gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6076–6085. doi: 10.1128/AEM.70.10.6076-6085.2004
- Cheung, G. Y. C., Joo, H.-S., Chatterjee, S. S., and Otto, M. (2014). Phenol-soluble modulins – critical determinants of staphylococcal virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 698–719. doi: 10.1111/1574-6976.12057
- Cho, J. S., Pietras, E. M., Garcia, N. C., Ramos, R. I., Farzam, D. M., Monroe, H. R., et al. (2010). IL-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice. *J. Clin. Invest.* 120, 1762–1773. doi: 10.1172/JCI40891
- Costerton, J. W. (2001). Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *Trends Microbiol.* 9, 50–52. doi: 10.1016/S0966-842X(00)01918-1
- Cua, D. J., and Tato, C. M. (2010). Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 479–489. doi: 10.1038/nri2800
- de Vor, L., Rooijakkers, S. H. M., and van Strijp, J. A. G. (2020). Staphylococci evade the innate immune response by disarming neutrophils and forming biofilms. *FEBS Lett.* 594, 2556–2569. doi: 10.1002/1873-3468.13767
- Dorward, D. A., Lucas, C. D., Chapman, G. B., Haslett, C., Dhaliwal, K., and Rossi, A. G. (2015). The role of formylated peptides and formyl peptide receptor 1 in governing neutrophil function during acute inflammation. *Am. J. Pathol.* 185, 1172–1184. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.01.020
- Forestier, C., Billard, E., Milon, G., and Gueirard, P. (2017). Unveiling and characterizing early bilateral interactions between biofilm and the mouse innate immune system. *Front. Microbiol.* 8:2309. doi: 10.3389/fmicb.2017.02309
- Gries, C. M., Biddle, T., Bose, J. L., Kielian, T., and Lo, D. D. (2020a). *Staphylococcus aureus* fibronectin binding protein A mediates biofilm development and infection. *Infect. Immun.* 88, e00859-19. doi: 10.1128/IAI.00859-19
- Gries, C. M., Rivas, Z., Chen, J., and Lo, D. D. (2020b). Intravital multiphoton examination of implant-associated *Staphylococcus aureus* biofilm infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10:574092. doi: 10.3389/fcimb.2020.574092
- Hanke, M. L., Heim, C. E., Angle, A., Sanderson, S. D., and Kielian, T. (2013). Targeting macrophage activation for the prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm infections. *J. Immunol.* 190, 2159–2168. doi: 10.4049/jimmunol.1202348
- Hasegawa, T., Venkata Suresh, V., Yahata, Y., Nakano, M., Suzuki, S., Suzuki, S., et al. (2021). Inhibition of the CXCL9-CXCR3 axis suppresses the progression of experimental apical periodontitis by blocking macrophage migration and activation. *Sci. Rep.* 11:2613. doi: 10.1038/s41598-021-82167-7
- Heim, C. E., Bosch, M. E., Yamada, K. J., Aldrich, A. L., Chaudhari, S. S., Klinkebiel, D., et al. (2020). Lactate production by *Staphylococcus aureus* biofilm inhibits HDAC11 to reprogram the host immune response during persistent infection. *Nat. Microbiol.* 5, 1271–1284. doi: 10.1038/s41564-020-0756-3
- Heim, C. E., Vidlak, D., and Kielian, T. (2015). Interleukin-10 production by myeloid-derived suppressor cells contributes to bacterial persistence during *Staphylococcus aureus* orthopedic biofilm infection. *J. Leukoc. Biol.* 98, 1003–1013. doi: 10.1189/jlb.4VMA0315-125RR
- Heim, C. E., Vidlak, D., Scherr, T. D., Kozel, J. A., Holzappel, M., Muirhead, D. E., et al. (2014). Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) contribute to *S. aureus* orthopedic biofilm infection. *J. Immunol.* 192, 3778–3792. doi: 10.4049/jimmunol.1303408
- Heim, C. E., West, S. C., Ali, H., and Kielian, T. (2018). Heterogeneity of Ly6G+ Ly6C+ Myeloid-Derived suppressor cell infiltrates during *Staphylococcus aureus* biofilm infection. *Infect. Immun.* 86, e00684-18. doi: 10.1128/IAI.00684-18
- Herbert, S., Ziebandt, A.-K., Ohlsen, K., Schäfer, T., Hecker, M., Albrecht, D., et al. (2010). Repair of global regulators in *Staphylococcus aureus* 8325 and comparative analysis with other clinical isolates. *Infect. Immun.* 78, 2877–2889. doi: 10.1128/IAI.00088-10
- Holm, A., and Vikström, E. (2014). Quorum sensing communication between bacteria and human cells: signals, targets, and functions. *Front. Plant Sci.* 5:309. doi: 10.3389/fpls.2014.00309
- Horn, C. M., and Kielian, T. (2020). Crosstalk between *Staphylococcus aureus* and innate immunity: focus on immunometabolism. *Front. Immunol.* 11:621750. doi: 10.3389/fimmu.2020.621750
- Jesaitis, A. J., Franklin, M. J., Berglund, D., Sasaki, M., Lord, C. I., Bleazard, J. B., et al. (2003). Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization of neutrophil and biofilm interactions. *J. Immunol.* 171, 4329–4339. doi: 10.4049/jimmunol.171.8.4329
- Kim, M.-H., Granick, J. L., Kwok, C., Walker, N. J., Borjesson, D. L., Curry, F.-R. E., et al. (2011). Neutrophil survival and c-kit+ progenitor proliferation in *Staphylococcus aureus*-infected skin wounds promote resolution. *Blood* 117, 3343–3352. doi: 10.1182/blood-2010-07-296970
- Kinhult, J., Egesten, A., Benson, M., Uddman, R., and Cardell, L. O. (2003). Increased expression of surface activation markers on neutrophils following migration into the nasal lumen. *Clin. Exp. Allergy* 33, 1141–1146. doi: 10.1046/j.1365-2222.2003.01682.x
- Krishna, S., and Miller, L. S. (2012). Innate and adaptive immune responses against *Staphylococcus aureus* skin infections. *Semin. Immunopathol.* 34, 261–280. doi: 10.1007/s00281-011-0292-6
- Mac-Daniel, L., Buckwalter, M. R., Gueirard, P., and Ménard, R. (2016). Myeloid cell isolation from mouse skin and draining lymph node following intradermal immunization with live attenuated plasmodium sporozoites. *J. Vis. Exp.* 2016:53796. doi: 10.3791/53796
- Moormeier, D. E., and Bayles, K. W. (2017). *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Mol. Microbiol.* 104, 365–376. doi: 10.1111/mmi.13634



- O'Neill, A. J. (2010). *Staphylococcus aureus* SH1000 and 8325-4: comparative genome sequences of key laboratory strains in staphylococcal research. *Let. Appl. Microbiol.* 51, 358–361. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02885.x
- Olaru, F., and Jensen, L. E. (2010). *Staphylococcus aureus* stimulates neutrophil targeting chemokine expression in keratinocytes through an autocrine IL-1 $\alpha$  signaling loop. *J. Invest. Dermatol.* 130, 1866–1876. doi: 10.1038/jid.2010.37
- Painter, K. L., Strange, E., Parkhill, J., Bamford, K. B., Armstrong-James, D., and Edwards, A. M. (2015). *Staphylococcus aureus* adapts to oxidative stress by producing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-resistant small-colony variants via the SOS response. *Infect. Immun.* 83, 1830–1844. doi: 10.1128/IAI.03016-14
- Pidwill, G. R., Gibson, J. F., Cole, J., Renshaw, S. A., and Foster, S. J. (2021). The role of macrophages in *Staphylococcus aureus* infection. *Front. Immunol.* 11:620339. doi: 10.3389/fimmu.2020.620339
- Resch, A., Rosenstein, R., Nerz, C., and Götz, F. (2005). Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2663–2676. doi: 10.1128/AEM.71.5.2663-2676.2005
- Ricciardi, B. F., Muthukrishnan, G., Masters, E., Ninomiya, M., Lee, C. C., and Schwarz, E. M. (2018). *Staphylococcus aureus* evasion of host immunity in the setting of prosthetic joint infection: biofilm and beyond. *Curr. Rev. Musculoskelet. Med.* 11, 389–400. doi: 10.1007/s12178-018-9501-4
- Richardson, J. R., Armbruster, N. S., Günter, M., Henes, J., and Autenrieth, S. E. (2018). *Staphylococcus aureus* PSM peptides modulate human monocyte-derived dendritic cells to prime regulatory T cells. *Front. Immunol.* 9:2603. doi: 10.3389/fimmu.2018.02603
- Saraiva, M., and O'Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 170–181. doi: 10.1038/nri2711
- Sauvat, L., Hamid, A. I. A., Blavignac, C., Josse, J., Lesens, O., and Gueirard, P. (2020). Biofilm-coated microbeads and the mouse ear skin: an innovative model for analysing anti-biofilm immune response in vivo. *PLoS One* 15:e0243500. doi: 10.1371/journal.pone.0243500
- Schenk, S., and Laddaga, R. A. (1992). Improved method for electroporation of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 73, 133–138. doi: 10.1016/0378-1097(92)90596-g
- Soe, Y. M., Bedoui, S., Stinear, T. P., and Hachani, A. (2021). Intracellular *Staphylococcus aureus* and host cell death pathways. *Cell. Microbiol.* 23:e13317. doi: 10.1111/cmi.13317
- Solovjov, D. A., Pluskota, E., and Plow, E. F. (2005). Distinct roles for the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits in the functions of integrin  $\alpha$ M $\beta$ 2\*. *J. Biol. Chem.* 280, 1336–1345. doi: 10.1074/jbc.M406968200
- Stapels, D. A. C., Ramyar, K. X., Bischoff, M., von Kückritz-Blickwede, M., Milder, F. J., Ruyken, M., et al. (2014). *Staphylococcus aureus* secretes a unique class of neutrophil serine protease inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 13187–13192. doi: 10.1073/pnas.1407616111
- Tasse, J., Cara, A., Saglio, M., Villet, R., and Laurent, F. (2018). A steam-based method to investigate biofilm. *Sci. Rep.* 8:13040. doi: 10.1038/s41598-018-31437-y
- Thurlow, L. R., Hanke, M. L., Fritz, T., Angle, A., Aldrich, A., Williams, S. H., et al. (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation in vivo. *J. Immunol.* 186, 6585–6596. doi: 10.4049/jimmunol.1002794
- Turner, N. A., Sharma-Kuinkel, B. K., Maskarinec, S. A., Eichenberger, E. M., Shah, P. P., Carugati, M., et al. (2019). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 203–218. doi: 10.1038/s41579-018-0147-4
- Yamada, K. J., and Kielian, T. (2018). Biofilm-Leukocyte cross-talk: impact on immune polarization and immunometabolism. *J. Innate Immun.* 11, 280–288. doi: 10.1159/000492680

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

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Abdul Hamid, Cara, Diot, Laurent, Josse and Gueirard. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.





## V. Revue bibliographique : analyse *in vivo* des interactions entre les cellules dendritiques de la peau et *Staphylococcus aureus*

*Travail soumis pour publication : Towards a better understanding of Staphylococcus aureus skin infections - The interactions with dendritic cells*

Bien que les DC ne soient pas considérées comme les effecteurs principaux de la réponse immunitaire innée dirigée contre *S. aureus*, elles y participent et jouent un rôle clé dans la transition entre cette réponse et la réponse immunitaire adaptative. Par ailleurs, la peau renferme plusieurs sous-populations de DC résidentes ou recrutées lors de l'infection, avec notamment les LC, les dDC, les pDC et les DC inflammatoires qui participent toutes à la présentation antigénique et donc à l'activation lymphocytaire de façon plus ou moins importante. La prévalence des infections récurrentes à *S. aureus* suggère que la réponse adaptative de l'hôte n'est pas complètement efficace dans l'élimination de la bactérie, ou que la mise en place de cette réponse adaptative est modulée par *S. aureus* elle-même (Karauzum and Datta, 2017; Darisipudi et al., 2018).

Une revue de la littérature traitant des différentes populations de DC présentes dans la peau, des interactions entre ces populations cellulaires et *S. aureus*, ainsi que des mécanismes d'échappement utilisés par la bactérie en présence de celles-ci a été réalisée. Les différents modèles d'étude analysant ces interactions *in vivo*, dans la peau, ont été recensés. Les principales conclusions issues des expériences réalisées aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* ont révélé un manque de données expérimentales sur les interactions entre les DC et le biofilm de *S. aureus*. Ce domaine est en effet encore très peu exploré à ce jour, et les mécanismes par lesquels le biofilm de *S. aureus* peut moduler la mise en place de la réponse immunitaire adaptative sont encore peu documentés.



1 **Full title : Towards a better understanding of *Staphylococcus aureus* skin**  
2 **infections- The interactions with Dendritic cells**

3

4

5 **Running title : Role of Dendritic cells during *Staphylococcus aureus* skin**  
6 **infections**

7

8

9 Aizat Iman Abdul Hamid<sup>1</sup>, Elisabeth Billard<sup>2</sup>, Pascale Gueirard<sup>1\*</sup>

10 <sup>1</sup>Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, CNRS UMR 6023, Université  
11 Clermont-Auvergne, Clermont-Ferrand, France

12 <sup>2</sup>Laboratoire Microbes Intestin Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte, Inserm U1071, INRA  
13 USC 2018, Université Clermont-Auvergne, Clermont-Ferrand, France

14

15 \*Correspondence:

16 Pascale Gueirard

17 pascale.gueirard@uca.fr

18 Telephone number: + (33) 4.73.40.74.35 or + (33) 4.73.17.79.25

19



20 **Abstract**

21 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is the leading cause of skin and soft tissue infections in  
22 humans. Additionally, local infections further lead to dissemination and colonization of  
23 secondary infections sites including the lungs, heart valves and even medical prostheses. It is  
24 well known that this bacterial species is capable of altering host immune responses and that  
25 long-term protection against *S. aureus* is not completely effective. Antigen presenting cells  
26 represent key players in the implementation of these responses. Among these, dendritic cells  
27 (DCs) represent a wide variety of cell subsets that are heterogeneously distributed throughout  
28 the skin. As sentinels of the epithelial barrier, they are often the first cells in contact with  
29 pathogens and play a crucial role in the activation of specific T cell responses. In its planktonic  
30 form, the interactions between *S. aureus* and various DC cell subsets have been extensively  
31 studied in *in vitro* and *ex vivo* models. However, the tendency of bacteria to transition towards  
32 the biofilm lifestyle in the host suggest a necessity to study these interactions under *in vivo*  
33 conditions. Of note, mouse skin infection models provide a cheap and easy support to study  
34 the longitudinal responses of DCs through the use of fluorescence and intravital imaging. The  
35 development of models capable of comparing *S. aureus* planktonic and biofilm *in vivo* DC  
36 responses could prove essential in explaining the chronic nature of biofilms or the absence of  
37 an effective protective response. In this review, we highlight the different DC subsets found in  
38 the skin and their roles during *S. aureus* skin infections. We also address how this bacterium  
39 is capable of subverting these functions and review the known literature of existing mouse  
40 skin infection models that have and could potentially aid in the study of *S. aureus* planktonic  
41 or biofilm immune responses.

42 **Keywords :** dendritic cells, *Staphylococcus aureus*, skin, immunity, biofilm, *in vivo* models

43



## 44 Introduction

45 In healthy individuals, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) can be found commensally in  
46 sebaceous sites in the skin microbiome [1]. Dysbiosis in the skin flora, abnormal skin barrier  
47 functions and immune abnormalities, such as in patients suffering from immunodeficiency or  
48 immunosuppressive treatments, predispose to the development of staphylococcal skin  
49 infections [2–4]. Indeed, these cocci are often isolated from patients suffering from chronic  
50 inflammatory skin diseases such as atopic dermatitis (AD) and recurring furunculosis, diseases  
51 that can be further exacerbated by the presence of *S. aureus* biofilms [3,4]. However, little is  
52 known about how this bacterial lifestyle interacts with the immune system in favor of  
53 chronicity [1,5].

54 The skin represents a specialized niche of immunity, as keratinocytes and Langerhans  
55 cells (LC) also participate in immune responses by the recognition of pathogen associated  
56 molecular patterns (PAMP), the antigen presentation and the secretion of antimicrobial  
57 peptides and cytokines [3,4]. The latter participate in the recruitment of professional  
58 phagocytes such as monocytes (MO), macrophages (MΦ) and polymorphonuclear neutrophils  
59 (PMN). These effector cells are implicated in the clearance of bacterial infections *via*  
60 phagocytosis and the formation of neutrophil or macrophage extracellular traps [6–8]. In  
61 addition, dendritic cells (DC) play the role of antigen presenting cells (APC) where they induce  
62 adaptive immune responses, that can be recalled in subsequent infections [9].

63 The adaptive cellular responses to *S. aureus* skin infections have mainly implicated T  
64 helper (Th)17 cells. *Via* the secretion of interleukin (IL)-17A and IL-17F, these cells enhance  
65 the barrier function and antimicrobial properties of epithelial cells, while also increasing  
66 recruitment of PMNs [9]. In a murine immunization model, Th1/Th17 populations were  
67 upregulated in skin lesions of immunized mice, accompanied by an increase in PMN  
68 recruitment, resulting in a decrease of skin lesion area and bacterial burden in comparison to  
69 naïve mice [10]. Supporting this concept, IL-17A from  $\gamma\delta$  T cells has also been described in the  
70 control of *S. aureus* cutaneous infections [11,12]. Similarly, in patients with Hyper IgE  
71 Syndrome or HIV, characterized by impaired Th17 formation, an increased susceptibility to *S.*  
72 *aureus* skin infections is observed. However, the beneficial actions of these cells are not  
73 observed in the case of AD patients colonized by AD specific *S. aureus* strains where a Th2  
74 immune environment is induced in lesional skin [3]. Outside of AD, a protective role of Th2  
75 responses have been demonstrated in animal models [9,13].

76 Clearly, the mechanisms regulating T cell activation in the context of *S. aureus* skin  
77 infections remains unclear. Further, the presence of biofilms adds a second level of complexity  
78 to the subject. Although the impact of *S. aureus* biofilms in relation to skin infections is not  
79 well documented, the chronic nature of both entities suggests an impaired adaptive immune  
80 response incapable of mediating bacterial clearance. At the center of T cell coordination, DCs  
81 play a critical role as APCs that could potentially contribute to these ineffective responses.





82 In this review, we discuss the different DC populations in the skin and their responses  
83 towards *S. aureus* in a cutaneous setting. We address the mechanisms employed by *S. aureus*  
84 to counter DC functions and lastly, we review the known literature on the specific interactions  
85 between biofilms and DCs in the skin.

## 86 **Dendritic cells subsets in the skin**

87 Skin is composed of two anatomical distinct layers: the epidermis and the dermis. The  
88 outer epidermis is a highly stratified-epithelium mainly composed of keratinocytes, and  
89 separated from the underlying dermis by the basement membrane. The dermis is made of  
90 various stromal cells that include fibroblasts, and houses blood and lymph vessels, sweat  
91 glands and hair follicles. Skin DCs are divided into LCs in the epidermis, and dermal DCs (dDCs)  
92 in the dermis that are closely related to conventional or classical DCs (cDCs) subsets present  
93 in lymphoid tissues. They represent heterogeneous populations of highly specialized  
94 phagocytic cells. As professional APCs, their main function is to transport cutaneous antigens  
95 to skin draining lymph nodes (dLN) and to present them to naïve CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells to  
96 initiate adaptive immune responses. They also interact with skin resident and infiltrated cells  
97 at steady state or under inflammation to modulate both innate and adaptive immune  
98 responses.

## 99 **Dendritic cells at steady state**

100 At steady state, the only resident APCs in the epidermis are LCs, which represent 3-5%  
101 of epidermal cells, with approximately 700 LCs/mm<sup>2</sup> [14]. They are related to MΦs and have  
102 unique properties. Indeed, they self-renew in the epidermis and originate, in mouse, from yolk  
103 sac- or fetal liver-derived hematopoietic precursors rather than bone marrow Hematopoietic  
104 Stem Cells [15]. Compared with dermal cDCs, LCs express lower major histocompatibility  
105 complex class II (MHC-II) levels, intermediate CD11c levels and very high levels of the C-type  
106 lectin Langerin (CD207) [16,17]. In humans, LCs are further subdivided into LC1 and LC2  
107 subsets that differ in abundance and also transcription profile [18]. As sentinel cells, they  
108 continuously sense the external environment and maintain tolerance to skin commensals by  
109 establishing connections with the surrounding epithelium *via* protruding dendrites [19,20].  
110 When skin inflammation occurs, they take up antigen and transport it to the dLN to initiate T  
111 cell responses. Their migratory capacity to lymph nodes T cell zone is similar to that of cDCs  
112 [20,21].

113 Dermal DCs originate from blood-borne precursors known as pre-cDCs. In the skin, 3  
114 distinct subsets of migratory dDCs are found: XCR1<sup>+</sup> dDCs (or cDC1), CD11b<sup>+</sup> dDCs (or cDC2)  
115 and double negative dDCs (For reviews see Malissen, 2014; Kashem, 2017; Collin, 2018).  
116 CD11b<sup>-</sup> XCR1<sup>+</sup> dDCs represent a minor population of DCs in human and mice that express high  
117 levels of CD207. They include CD103<sup>+</sup> and CD103<sup>-</sup> cells. They are able to quickly migrate to the  
118 deep T cell area of the LN. CD11b<sup>+</sup> dDCs are the most abundant sub-population of DCs in the  
119 dermis at steady state. They express the CD11b and CD1c markers respectively in mice and in



120 humans, and other numerous markers both in human and mice as CX3CR1<sup>+</sup>, SIRP  $\alpha$ <sup>+</sup>, CCR2<sup>+</sup>  
121 and CD11c<sup>+</sup>. Classically, the presence of CD14 is used to distinguish monocytes and  
122 macrophages from cDCs, although a novel CD1c<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> DC subset that remain phenotypically  
123 distinct from monocytes, has been identified in the human dermis [22]. After migration, dDCs  
124 are directed into the peripheral paracortex of the LN. Double negative dDCs represent a small  
125 population of dDCs exclusively present in the mouse dermis. Their phenotype is XCR1<sup>-</sup> CD207<sup>-</sup>  
126 CD11b<sup>lo</sup> [15,21,23].

127 Finally, LY6C<sup>hi</sup> monocytes migrate from the blood circulation in a CC-chemokine  
128 receptor 2 (CCR2)-dependent manner to generate dermal monocyte-derived DCs (mo-DCs)  
129 that are detected in the skin at steady state. Their transcriptional program is similar to that of  
130 CD11b<sup>+</sup> dDCs, but their capacity to migrate and activate CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes is lower.

### 131 **Dendritic cells during inflammation**

132 Inflammatory DCs appear transiently when inflammation occurs. Contrary to LCs and  
133 dDCs which are present at steady state and enriched in inflammatory conditions,  
134 inflammatory DCs disappear when skin returns to a steady state, once infection is cured. They  
135 represent a highly heterogeneous populations of MHC-II<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> cells, with no unique surface  
136 markers. Their origin is currently not well established, with a predominant hypothesis as MO-  
137 derived cells (For reviews see Kashem, 2017; Collin, 2018) [15,21]. During skin inflammation,  
138 they are recruited in a CCR2-dependent manner, and play a major role at the site of  
139 inflammation [24].

140 Plasmacytoid DCs (pDCs) are interferon alpha (IFN $\alpha$ )-producing population of cells,  
141 with a similar origin as cDCs. They are detected in the blood circulation and in lymphoid tissues  
142 at steady state [15]. In humans, pDCs located in tonsillar crypts and oro-nasopharyngeal  
143 epithelium can be exposed to extracellular bacteria such as *S. aureus* [25]. During  
144 inflammation, they are also present in the skin, playing distinct roles in inflammatory skin  
145 diseases [15,26]. In mice, they express membrane markers shared with members of the B cell  
146 family, including B220 and Ly6C. In humans, pDCs are CD11c<sup>lo</sup>, CD11b<sup>-</sup>, MHC-II<sup>low</sup>, CD123/IL-  
147 3R<sup>+</sup>, CD303 (BDCA-2)<sup>+</sup> and CD304 (BDCA-4)<sup>+</sup> [7,15]. When activated, they secrete high  
148 concentrations of IFN $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) and IL-6 and upregulate the CD86  
149 membrane marker [25,27]. Additionally, Chen et al. (2020) have identified a transient pDC-like  
150 subset, that infiltrate human skin wounds, expressing CD11c<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD123<sup>+</sup> and CD1a<sup>+</sup>  
151 [28].

### 152 **DC activation after *S. aureus* recognition in the skin**

153 In the skin, cutaneous DCs can recognize *S. aureus* antigens through their toll like  
154 receptors (TLR). The most documented pattern recognition receptor (PRR) in this regard is  
155 TLR2, found on the plasma membrane, which can sense a diverse range of PAMPs, namely  
156 bacterial peptidoglycan (PGN), acetylated lipoproteins and lipoteichoic acid, the latter  
157 involving heterodimerization with TLR6 along with CD36 [29,30]. CD207 and macrophage



158 galactose-type lectin (CD301) expressed in LCs and dDCs respectively have also been shown  
159 to interact with specific carbohydrate motifs located on *S. aureus* wall teichoic acids (WTA)  
160 [31,32]. The intracellular TLRs 8 and 9 recognize ssDNA and dsDNA respectively, but have not  
161 been described in human LCs [33].

162 The binding of PRRs to their PAMPs leads to the internalization of bacteria by  
163 phagocytosis, inducing DC maturation, characterized by the expression of MHC and  
164 costimulatory molecules, and their migration towards skin dLNs, where they present antigens  
165 to naïve T cells. The latter has also been shown to occur directly in the skin, following infection,  
166 where DC-T cell clusters were observed at the perivascular area in the dermis of various animal  
167 models [15,34]. Recently, the expression of activity-regulated cytoskeleton associated  
168 protein/activity-regulated gene 3.1 (Arc/Arg3.1) in a proportion of mice DCs and LCs was  
169 shown to enhance migratory capacity and CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell activation in dLNs [35]. The  
170 differentiation of naïve T cells into the different effector T cell populations is influenced by the  
171 secretion of cytokines in addition to T cell receptor and co-stimulatory molecules activation.  
172 Indeed, activation of a particular PRR influences the downstream secretion of cytokines and  
173 chemokines, thus influencing the fate of the inflammatory environment [30]. Mouse LCs  
174 expressing human langerin secreted CXCL1 (KC), IL-6 and IL-17 in response to WTA β-GlcNAc  
175 while PGN, an agonist of TLR2, induced the secretion of IL-6, IL-10 and IL-8 but not IL-12 or IL-  
176 1β in LCs isolated from human skin [32,33]. Thus, LCs have been implicated in the  
177 differentiation of Th17 cells and also the accumulation of IL-17 producing γδ T cells in the skin  
178 [36,37]. In contrast, cDC1s have been shown to drive Th1 polarization *via* the cytokine IL-12  
179 [15,34]. Activated EpCAM<sup>+</sup>CD59<sup>+</sup>Ly-6D<sup>+</sup> cDC1s also mediated PMN recruitment through the  
180 secretion of vascular endothelial growth factor α following intradermal challenge with *S.*  
181 *aureus* [38].

## 182 **How *Staphylococcus aureus* planktonic bacteria manipulate the Dendritic cells**

183 *S. aureus* has developed numerous strategies to avoid host immune attacks and  
184 modulate the establishment of adaptive immune responses (For a review, see Darisipudi et al,  
185 2018 ; Wu et al, 2014) [7,25]. First, the bacteria produce numerous bicomponent pore-forming  
186 leukocidins as LukAB and LukED that target the CD11b and CCR5 receptors respectively, and  
187 lyse PMNs, MOs and MΦs, but also DCs, even after efficient phagocytosis [39–43].

188 Inside phagocytes, the bacteria are also able to survive and multiply. Several virulence  
189 factors are involved, as phenol-soluble modulins α (PSM α) peptides to counteract  
190 phagolysosomal acidification, the O-Acetyltransferase (OatA) to resist to lysozyme  
191 degradation and the Catalase (KatA), the Alkyl Hydroperoxide Reductase (AhpC) and the  
192 Staphylococcal Peroxidase Inhibitor (SPIN) to resist oxidative stress [44–47]. Even if DCs lack  
193 myeloperoxidase, the target of the SPIN protein, their functional capacity to prime T cells in  
194 the lymphoid tissues is impaired by the PMN-derived protein [7]. PSM peptides have  
195 additional effects on DC activity, as PSM3 produced by community-associated methicillin-



196 resistant *S. aureus* have the capacity to induce tolerogenic DCs upon TLR2 ligand stimulation  
197 of regulatory T cells *via* the activation of the p38-CREB pathway [48,49].

198 The bacteria cell wall is another key component of DC attenuated functional  
199 properties. In the skin, WTA producing *S. aureus* strains induce LC activation and maturation  
200 [50]. The lipoteichoic acid thereafter downregulates DC activation and antigen presenting  
201 activity *via* a TLR2 dependent signal pathway [51].

202 Another immune evasion strategy developed by *S. aureus* bacteria is DC modulation of  
203 cytokine production, by secreting several virulence factors as Esx factors, PSMs or alpha-toxin.  
204 *In vitro*, the two Esx proteins, EsxA and EsxB secreted by the type VII-like secretion system,  
205 reduce the production of Th1/Th17 pro-inflammatory cytokines by infected DCs [52]. PSMs  
206 are other key modulators of DC cytokines production [48,49,53]. In particular, they inhibit the  
207 production of IL-32, IL-6 and IL-8 by epithelial cells, and IL-32 is involved in DC maturation [53].  
208 In AD, toxins as the alpha-toxin first contribute to the induction of a Th1 like cytokine response  
209 [54]. Bacteria further skew the immune response toward Th2, with LCs producing high  
210 amounts of IL-2 and lower amounts of IFN $\gamma$ , therefore contributing to bacterial persistence in  
211 the skin, and to chronicization of the inflammatory skin disorder [3,55,56].

212 Finally, *S. aureus* induces an overstimulation of the host immune system by producing  
213 numerous pyrogenic superantigens [57]. They do not affect any parameters of DC function  
214 but lead to an overstimulation of T cell lymphocytes [58].

#### 215 **Dendritic cells and *Staphylococcus aureus* chronic skin infections – in vivo infection models**

216 A contributing factor to the pathogenicity of *S. aureus* is its capacity to transition  
217 towards the biofilm lifestyle. The latter are mono- or poly-species species microbial aggregates  
218 embedded in an extracellular matrix that can be found attached to a variety of surfaces,  
219 conferring protection to environmental dangers [59]. In humans, *S. aureus* can attach to either  
220 host proteins such as collagen and fibronectin or to inert surfaces namely, implanted medical  
221 devices in order to form biofilms [60]. In non-inflammatory conditions, *S. aureus* of the human  
222 microbiota have been shown to form biofilms [5]. In pathological conditions, *S. aureus* have  
223 been linked to the severity of certain inflammatory skin diseases namely AD [1]. Moreover, *S.*  
224 *aureus* clinical isolates from AD patients have been shown to be strong producers of biofilms  
225 [61,62]. The capacity of biofilms to survive the treatment of antimicrobials such as antibiotics  
226 and host anti-microbial peptides, while also resisting host immune attacks makes them strong  
227 contributors to the chronic nature of skin diseases [63,64]. Thus, the study of the *in vivo*  
228 interactions between *S. aureus* biofilms and specific actors of the adaptive immune system is  
229 essential in the understanding of *S. aureus* chronic infections. Review of the current literature  
230 has shown a lack of *in vivo* information on how DCs respond to biofilms and how this differs  
231 to planktonic bacteria [7,65].

232 Animal models, namely rodents, provide the complex interactions between host cells  
233 that are absent in *in vitro* conditions, while allowing the study of a variety of infections in





234 different contexts, such as those present at the different depths of the skin, in wounds and  
235 also in the presence of implanted material [65–67]. Epicutaneous colonization models have  
236 demonstrated a beneficial effect of the oral administration of *Lactococcus lactis* on the  
237 maturation of pDCs in the skin dLN [68]. The langerin receptor can be used in inducible  
238 ablation models when expressed with the diphtheria toxin receptor (Langerin-diphtheria toxin  
239 receptor knock-in mice) to study the functional roles of LCs and cDC1s during inflammation  
240 [38]. To selectively deplete a subset of DCs, transcription factors specific to certain subsets  
241 can also be targeted, such as *Batf3* in the case of cDC1s [38]. The development of humanized  
242 rodent models has led to the use of xenografts containing tissue resident LCs and T cells, while  
243 the use of transgenic mice constitutively expressing human langerin on LCs have shown an  
244 increase in inflammatory markers following the recognition of WTA [32,69]. Models where  
245 bacteria are introduced into the subcutaneous level of skin tissue have been essential in  
246 studying the effectors of innate immune memory. Indeed, after an initial subcutaneous  
247 inoculation of *S. aureus* in the flanks of mice, an increase in Langerin<sup>+</sup> DC infiltration was  
248 observed in the abscess of mice during a subsequent infection compared to mice that never  
249 received the initial dose of bacteria [70,71]. Seeing as *S. aureus* preferentially transition  
250 towards the multicellular lifestyle when under harmful conditions in the host, it is likely that  
251 bacteria in colonized tissue contain a mixture of planktonic or biofilm bacteria or an  
252 intermediate between the two phenotypes. However, this parameter is rarely verified in *in*  
253 *vivo* models and thus, the specificity of the observed responses to either lifestyle is not clear.

254 *In vivo* biofilm infection models involve more invasive colonization of the skin tissue at  
255 the intradermal or the subcutaneous level of the skin. Biofilms are introduced either directly  
256 by inoculation into tissues [72–74] or by inserting abiotic supports, such as tissue cages,  
257 catheters or medical sutures, through incisions or pre-formed air pouches [75–77]. Abiotic  
258 supports are either sterile upon insertion and subsequently inoculated with bacteria to allow  
259 biofilm formation or are already pre-colonized by biofilms [78–80]. The common entry of *S.*  
260 *aureus* through wounds can be mimicked by mouse wound infection models which involve  
261 disruption of the skin barrier through skin incisions, external wounds or by scalding followed  
262 by bacterial inoculation [81–84]. However, the use of less invasive techniques has facilitated  
263 the monitoring of the evolution of infections; for example, using bioluminescent *S. aureus*  
264 strains to follow the bacterial charge at the infection site over time and to study their  
265 dispersion towards secondary sites in the same animal [77,81,82,85–87]. Intravital imaging of  
266 transgenic reporter mice, such as the LysM-EGFP or CX3CR1-EGFP mouse lines, allows insight  
267 into the interactions of immune cell populations, namely PMNs, MOs and DCs, with *in vivo*  
268 biofilms [74,88,89]. To visualize cDC populations specifically, CD11c-YFP reporter mice have  
269 been used in both bacterial and non-infectious models [90–92]. The application of  
270 multiphoton imaging in *in vivo* models has also improved our understanding of the  
271 interactions between DCs and T cells in the lymph node and could prove useful in highlighting  
272 differential adaptive immune responses between planktonic and biofilm *S. aureus* [93–96].

273



274 **Conclusion**

275 The use of mouse models to study the immune responses towards *S. aureus* skin infections  
276 remain advantageous as they are cheap, easy to set up and permit the use of non-invasive  
277 analysis techniques such as bioluminescence measures, lesion size evaluation and intravital  
278 imaging. These analyses are not always possible in other animal models or in other tissues and  
279 permits the continued observation of host-pathogen interactions in the same animal over  
280 time. Furthermore, the availability of a variety of transgenic mouse lines has made the study  
281 of specific conditions more accessible, such as obtaining DC specific KO of MyD88 expression  
282 in mice. The inherent differences between mice and human physiology however make it  
283 difficult to translate findings between species. Thus, it is important to identify the specificity  
284 of the observed *in vivo* responses by correlating data to the bacterial form being analyzed. The  
285 development of models that can compare immune responses between either planktonic or  
286 biofilm *S. aureus* in similar conditions is therefore essential to further advance our  
287 understanding of chronic infections in humans.

288



289 **Conflicts of Interest**

290 The authors declare no conflict of interest.

291 **Funding Statement**

292 This work was supported by funds from the Auvergne-Rhône-Alpes (AURA) region (Pack  
293 Ambition Recherche 2017-IMMUNOFILM-Staph project) obtained by Pascale Gueirard.

294 **Acknowledgments**

295 We wish to thank Jérôme Josse (Centre International de Recherche en Infectiologie, Université  
296 Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France) for the helpful insight and discussions.

297



298 **References**

- 299 1. Di Domenico EG, Cavallo I, Capitanio B, Ascenzioni F, Pimpinelli F, Morrone A, et al.  
300 Staphylococcus aureus and the Cutaneous Microbiota Biofilms in the Pathogenesis of Atopic  
301 Dermatitis. *Microorganisms*. 2019 Aug 29;7(9):301.
- 302 2. Ricciardi BF, Muthukrishnan G, Masters E, Ninomiya M, Lee CC, Schwarz EM. Staphylococcus  
303 aureus Evasion of Host Immunity in the Setting of Prosthetic Joint Infection: Biofilm and Beyond.  
304 *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine*. 2018 Sep;11(3):389–400.
- 305 3. Iwamoto K, Moriwaki M, Miyake R, Hide M. Staphylococcus aureus in atopic dermatitis: Strain-  
306 specific cell wall proteins and skin immunity. *Allergology International*. 2019 Jul 1;68(3):309–15.
- 307 4. Nowicka D, Grywalska E. Staphylococcus aureus and Host Immunity in Recurrent Furunculosis.  
308 *DRM*. 2019;235(4):295–305.
- 309 5. Brandwein M, Steinberg D, Meshner S. Microbial biofilms and the human skin microbiome. *npj*  
310 *Biofilms Microbiomes*. 2016 Nov 23;2(1):1–6.
- 311 6. Vor L de, Rooijackers SHM, Strijp JAG van. Staphylococci evade the innate immune response by  
312 disarming neutrophils and forming biofilms. *FEBS Letters*. 2020;594(16):2556–69.
- 313 7. Darisipudi MN, Nordengrün M, Bröker BM, Péton V. Messing with the Sentinels—The Interaction  
314 of Staphylococcus aureus with Dendritic Cells. *Microorganisms*. 2018 Aug 15;6(3):87.
- 315 8. Pidwill GR, Gibson JF, Cole J, Renshaw SA, Foster SJ. The Role of Macrophages in Staphylococcus  
316 aureus Infection. *Front Immunol*. 2021 Jan 19;11:620339.
- 317 9. Karauzum H, Datta SK. Adaptive immunity against Staphylococcus aureus. *Curr Top Microbiol*  
318 *Immunol*. 2017;409:419–39.
- 319 10. Peng Z, Cao D-Y, Wu H-Y, Saito S. Immunization with a Bacterial Lipoprotein Establishes an  
320 Immuno-Protective Response with Upregulation of Effector CD4+ T Cells and Neutrophils Against  
321 Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infection. *Pathogens*. 2020 Feb 20;9(2):138.
- 322 11. Cho JS, Pietras EM, Garcia NC, Ramos RI, Farzam DM, Monroe HR, et al. IL-17 is essential for host  
323 defense against cutaneous Staphylococcus aureus infection in mice. *J Clin Invest*. 2010 May  
324 3;120(5):1762–73.
- 325 12. Dillen CA, Pinsker BL, Marusina AI, Merleev AA, Farber ON, Liu H, et al. Clonally expanded  $\gamma\delta$  T  
326 cells protect against Staphylococcus aureus skin reinfection. *J Clin Invest*. 2018 Mar  
327 1;128(3):1026–42.
- 328 13. González JF, Hahn MM, Gunn JS. Chronic biofilm-based infections: skewing of the immune  
329 response. *Pathog Dis*. 2018 Mar 28;76(3):fty023.
- 330 14. Merad M, Ginhoux F, Collin M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other  
331 langerin-expressing dendritic cells. *Nat Rev Immunol*. 2008 Dec;8(12):935–47.
- 332 15. Kashem SW, Haniffa M, Kaplan DH. Antigen-Presenting Cells in the Skin. *Annual Review of*  
333 *Immunology*. 2017;35(1):469–99.





- 334 16. Nestle FO, Turka LA, Nickoloff BJ. Characterization of dermal dendritic cells in psoriasis.  
335 Autostimulation of T lymphocytes and induction of Th1 type cytokines. *J Clin Invest.* 1994 Jul  
336 1;94(1):202–9.
- 337 17. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function  
338 of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annu Rev*  
339 *Immunol.* 2013;31:10.1146/annurev-immunol-020711–74950.
- 340 18. Liu X, Zhu R, Luo Y, Wang S, Zhao Y, Qiu Z, et al. Distinct human Langerhans cell subsets  
341 orchestrate reciprocal functions and require different developmental regulation. *Immunity.* 2021  
342 Oct 12;54(10):2305-2320.e11.
- 343 19. Nishibu A, Ward BR, Jester JV, Ploegh HL, Boes M, Takashima A. Behavioral Responses of  
344 Epidermal Langerhans Cells In Situ to Local Pathological Stimuli. *Journal of Investigative*  
345 *Dermatology.* 2006 Apr 1;126(4):787–96.
- 346 20. Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Sasaki H, Amagai M. External antigen uptake by Langerhans cells  
347 with reorganization of epidermal tight junction barriers. *J Exp Med.* 2009 Dec 21;206(13):2937–  
348 46.
- 349 21. Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology.* 2018 May;154(1):3–  
350 20.
- 351 22. Cytlak U, Resteu A, Pagan S, Green K, Milne P, Maisuria S, et al. Differential IRF8 Transcription  
352 Factor Requirement Defines Two Pathways of Dendritic Cell Development in Humans. *Immunity.*  
353 2020 Aug 18;53(2):353-370.e8.
- 354 23. Malissen B, Tamoutounour S, Henri S. The origins and functions of dendritic cells and  
355 macrophages in the skin. *Nat Rev Immunol.* 2014 Jun;14(6):417–28.
- 356 24. Guilliams M, van de Laar L. A Hitchhiker’s Guide to Myeloid Cell Subsets: Practical  
357 Implementation of a Novel Mononuclear Phagocyte Classification System. *Front Immunol.* 2015  
358 Aug 11;6:406.
- 359 25. Wu X, Xu F. Dendritic cells during *Staphylococcus aureus* infection: subsets and roles. *J Transl*  
360 *Med.* 2014 Dec 18;12:358.
- 361 26. Wollenberg A, Günther S, Moderer M, Wetzel S, Wagner M, Towarowski A, et al. Plasmacytoid  
362 Dendritic Cells: A New Cutaneous Dendritic Cell Subset with Distinct Role in Inflammatory Skin  
363 Diseases. *J Invest Dermatol.* 2002 Nov 1;119(5):1096–102.
- 364 27. Michea P, Vargas P, Donnadieu M-H, Roseblatt M, Bono MR, Duménil G, et al. Epithelial control  
365 of the human pDC response to extracellular bacteria. *Eur J Immunol.* 2013 May;43(5):1264–73.
- 366 28. Chen Y-L, Gomes T, Hardman CS, Vieira Braga FA, Gutowska-Owsiak D, Salimi M, et al. Re-  
367 evaluation of human BDCA-2+ DC during acute sterile skin inflammation. *J Exp Med.* 2019 Dec  
368 17;217(3):jem.20190811.
- 369 29. Triantafilou M, Gamper FGJ, Haston RM, Mouratis MA, Morath S, Hartung T, et al. Membrane  
370 Sorting of Toll-like Receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 Heterodimers at the Cell Surface Determines  
371 Heterotypic Associations with CD36 and Intracellular Targeting \*. *Journal of Biological Chemistry.*  
372 2006 Oct 13;281(41):31002–11.



- 373 30. Miller LS. Toll-like receptors in skin. *Adv Dermatol.* 2008;24:71–87.
- 374 31. Mnich ME, van Dalen R, Gerlach D, Hendriks A, Xia G, Peschel A, et al. The C-type lectin receptor  
375 MGL senses N-acetylgalactosamine on the unique *Staphylococcus aureus* ST395 wall teichoic  
376 acid. *Cell Microbiol.* 2019 Oct;21(10):e13072.
- 377 32. van Dalen R, De La Cruz Diaz JS, Rumpret M, Fuchsberger FF, van Teijlingen NH, Hanske J, et al.  
378 Langerhans Cells Sense *Staphylococcus aureus* Wall Teichoic Acid through Langerin To Induce  
379 Inflammatory Responses. *mBio.* 2019 May 14;10(3):e00330-19.
- 380 33. Flacher V, Bouschbacher M, Verronè E, Massacrier C, Sisirak V, Berthier-Vergnes O, et al.  
381 Human Langerhans Cells Express a Specific TLR Profile and Differentially Respond to Viruses and  
382 Gram-Positive Bacteria. *The Journal of Immunology.* 2006 Dec 1;177(11):7959–67.
- 383 34. Honda T, Egawa G, Kabashima K. Antigen presentation and adaptive immune responses in skin.  
384 *International Immunology.* 2019 Jul 13;31(7):423–9.
- 385 35. Tintelnot J, Ufer F, Engler JB, Winkler H, Lücke K, Mittrücker H-W, et al. Arc/Arg3.1 defines  
386 dendritic cells and Langerhans cells with superior migratory ability independent of phenotype  
387 and ontogeny in mice. *European Journal of Immunology.* 2019;49(5):724–36.
- 388 36. Mathers AR, Janelsins BM, Rubin JP, Tkacheva OA, Shufesky WJ, Watkins SC, et al. Differential  
389 capability of human cutaneous dendritic cell subsets to initiate Th17 responses. *J Immunol.* 2009  
390 Jan 15;182(2):921–33.
- 391 37. Kobayashi T, Glatz M, Horiuchi K, Kawasaki H, Akiyama H, Kaplan DH, et al. Dysbiosis and  
392 *Staphylococcus aureus* Colonization Drives Inflammation in Atopic Dermatitis. *Immunity.* 2015  
393 Apr 21;42(4):756–66.
- 394 38. Janela B, Patel AA, Lau MC, Goh CC, Msallam R, Kong WT, et al. A Subset of Type I Conventional  
395 Dendritic Cells Controls Cutaneous Bacterial Infections through VEGF $\alpha$ -Mediated Recruitment of  
396 Neutrophils. *Immunity.* 2019 Apr;50(4):1069-1083.e8.
- 397 39. Dalla Serra M, Coraiola M, Viero G, Comai M, Potrich C, Ferreras M, et al. *Staphylococcus aureus*  
398 Bicomponent  $\gamma$ -Hemolysins, HlgA, HlgB, and HlgC, Can Form Mixed Pores Containing All  
399 Components. *J Chem Inf Model.* 2005 Nov;45(6):1539–45.
- 400 40. Meyer F, Girardot R, Piémont Y, Prévost G, Colin DA. Analysis of the Specificity of Pantone-  
401 Valentine Leucocidin and Gamma-Hemolysin F Component Binding. *Infect Immun.* 2009  
402 Jan;77(1):266–73.
- 403 41. DuMont AL, Yoong P, Liu X, Day CJ, Chumbler NM, James DBA, et al. Identification of a Crucial  
404 Residue Required for *Staphylococcus aureus* LukAB Cytotoxicity and Receptor Recognition. *Infect*  
405 *Immun.* 2014 Mar;82(3):1268–76.
- 406 42. Spaan AN, van Strijp JAG, Torres VJ. Leukocidins: *Staphylococcal* bi-component pore-forming  
407 toxins find their receptors. *Nat Rev Microbiol.* 2017 Jul;15(7):435–47.
- 408 43. Berends ETM, Zheng X, Zwack EE, Ménager MM, Cammer M, Shopsin B, et al. *Staphylococcus*  
409 *aureus* Impairs the Function of and Kills Human Dendritic Cells via the LukAB Toxin. *mBio.* 2019  
410 Jan 2;10(1):e01918-18.



- 411 44. Bera A, Herbert S, Jakob A, Vollmer W, Götz F. Why are pathogenic staphylococci so lysozyme  
412 resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme  
413 resistance of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*. 2005;55(3):778–87.
- 414 45. Cosgrove K, Coutts G, Jonsson I-M, Tarkowski A, Kokai-Kun JF, Mond JJ, et al. Catalase (KatA) and  
415 Alkyl Hydroperoxide Reductase (AhpC) Have Compensatory Roles in Peroxide Stress Resistance  
416 and Are Required for Survival, Persistence, and Nasal Colonization in *Staphylococcus aureus*. *J*  
417 *Bacteriol*. 2007 Feb;189(3):1025–35.
- 418 46. Grosz M, Kolter J, Paprotka K, Winkler A-C, Schäfer D, Chatterjee SS, et al. Cytoplasmic replication  
419 of *Staphylococcus aureus* upon phagosomal escape triggered by phenol-soluble modulins  $\alpha$ . *Cell*  
420 *Microbiol*. 2014 Apr;16(4):451–65.
- 421 47. de Jong NWM, Ramyar KX, Guerra FE, Nijland R, Fevre C, Voyich JM, et al. Immune evasion by a  
422 staphylococcal inhibitor of myeloperoxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Aug  
423 29;114(35):9439–44.
- 424 48. Armbruster NS, Richardson JR, Schreiner J, Klenk J, Günter M, Autenrieth SE. *Staphylococcus*  
425 *aureus* PSM peptides induce tolerogenic dendritic cells upon treatment with ligands of  
426 extracellular and intracellular TLRs. *Int J Med Microbiol*. 2016 Dec;306(8):666–74.
- 427 49. Richardson JR, Armbruster NS, Günter M, Henes J, Autenrieth SE. *Staphylococcus aureus* PSM  
428 Peptides Modulate Human Monocyte-Derived Dendritic Cells to Prime Regulatory T Cells. *Front*  
429 *Immunol*. 2018 Nov 13;9:2603.
- 430 50. Hendriks A, van Dalen R, Ali S, Gerlach D, van der Marel GA, Fuchsberger FF, et al. Impact of  
431 Glycan Linkage to *Staphylococcus aureus* Wall Teichoic Acid on Langerin Recognition and  
432 Langerhans Cell Activation. *ACS Infect Dis*. 2021 Mar 12;7(3):624–35.
- 433 51. Saito S, Okuno A, Cao D-Y, Peng Z, Wu H-Y, Lin S-H. Bacterial Lipoteichoic Acid Attenuates Toll-  
434 Like Receptor Dependent Dendritic Cells Activation and Inflammatory Response. *Pathogens*.  
435 2020 Oct 8;9(10):825.
- 436 52. Cruciani M, Etna MP, Camilli R, Giacomini E, Percario ZA, Severa M, et al. *Staphylococcus aureus*  
437 Esx Factors Control Human Dendritic Cell Functions Conditioning Th1/Th17 Response. *Front Cell*  
438 *Infect Microbiol*. 2017 Jul 21;7:330.
- 439 53. Deplanche M, Alekseeva L, Semenovskaya K, Fu C-L, Dessauge F, Finot L, et al. *Staphylococcus*  
440 *aureus* Phenol-Soluble Modulins Impair Interleukin Expression in Bovine Mammary Epithelial  
441 Cells. *Infect Immun*. 2016 May 24;84(6):1682–92.
- 442 54. Breuer K, Wittmann M, Kempe K, Kapp A, Mai U, Dittrich-Breiholz O, et al. Alpha-toxin is  
443 produced by skin colonizing *Staphylococcus aureus* and induces a T helper type 1 response in  
444 atopic dermatitis. *Clinical & Experimental Allergy*. 2005;35(8):1088–95.
- 445 55. Iwamoto K, Moriwaki M, Niitsu Y, Saino M, Takahagi S, Hisatsune J, et al. *Staphylococcus aureus*  
446 from atopic dermatitis skin alters cytokine production triggered by monocyte-derived  
447 Langerhans cell. *Journal of Dermatological Science*. 2017 Dec 1;88(3):271–9.
- 448 56. Iwamoto K, Nümm TJ, Koch S, Herrmann N, Leib N, Bieber T. Langerhans and inflammatory  
449 dendritic epidermal cells in atopic dermatitis are tolerized toward TLR2 activation. *Allergy*.  
450 2018;73(11):2205–13.



- 451 57. Koymans KJ, Goldmann O, Karlsson CAQ, Sital W, Thänert R, Bisschop A, et al. The TLR2  
452 Antagonist Staphylococcal Superantigen-Like Protein 3 Acts as a Virulence Factor to Promote  
453 Bacterial Pathogenicity in vivo. *J Innate Immun.* 2017;9(6):561–73.
- 454 58. Al-Shangiti AM, Nair SP, Chain BM. The interaction between staphylococcal superantigen-like  
455 proteins and human dendritic cells. *Clin Exp Immunol.* 2005 Jun;140(3):461–9.
- 456 59. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent  
457 infections. *Science.* 1999 May 21;284(5418):1318–22.
- 458 60. Paharik AE, Horswill AR. The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response.  
459 *Microbiology Spectrum.* 2016 Mar 18;4(2):4.2.06.
- 460 61. Smith K, Perez A, Ramage G, Lappin D, Gemmell CG, Lang S. Biofilm formation by Scottish clinical  
461 isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol.* 2008 Aug;57(Pt 8):1018–23.
- 462 62. Allen HB, Vaze ND, Choi C, Hailu T, Tulbert BH, Cusack CA, et al. The Presence and Impact of  
463 Biofilm-Producing Staphylococci in Atopic Dermatitis. *JAMA Dermatology.* 2014 Mar  
464 1;150(3):260–5.
- 465 63. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet.* 2001 Jul  
466 14;358(9276):135–8.
- 467 64. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms.  
468 *Clin Microbiol Rev.* 2002 Apr;15(2):167–93.
- 469 65. Forestier C, Billard E, Milon G, Gueirard P. Unveiling and Characterizing Early Bilateral Interactions  
470 between Biofilm and the Mouse Innate Immune System. *Front Microbiol.* 2017 Nov 21;8:2309.
- 471 66. Youn C, Archer NK, Miller LS. Research Techniques Made Simple: Mouse Bacterial Skin Infection  
472 Models for Immunity Research. *J Invest Dermatol.* 2020 Aug;140(8):1488-1497.e1.
- 473 67. Klopfenstein N, Cassat JE, Monteith A, Miller A, Drury S, Skaar E, et al. Murine Models for  
474 Staphylococcal Infection. *Current Protocols.* 2021;1(3):e52.
- 475 68. Tsuji R, Fujii T, Nakamura Y, Yazawa K, Kanauchi O. *Staphylococcus aureus* Epicutaneous Infection  
476 Is Suppressed by *Lactococcus lactis* Strain Plasma via Interleukin 17A Elicitation. *J Infect Dis.* 2019  
477 Jul 31;220(5):892–901.
- 478 69. Schulz A, Jiang L, Vor L de, Ehrström M, Wermeling F, Eidsmo L, et al. Neutrophil Recruitment to  
479 Noninvasive MRSA at the Stratum Corneum of Human Skin Mediates Transient Colonization. *Cell*  
480 *Reports.* 2019 Oct 29;29(5):1074-1081.e5.
- 481 70. Chan LC, Rossetti M, Miller LS, Filler SG, Johnson CW, Lee HK, et al. Protective immunity in  
482 recurrent *Staphylococcus aureus* infection reflects localized immune signatures and  
483 macrophage-conferred memory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 20;115(47):E11111–9.
- 484 71. Chan LC, Chaili S, Filler SG, Miller LS, Solis NV, Wang H, et al. Innate Immune Memory Contributes  
485 to Host Defense against Recurrent Skin and Skin Structure Infections Caused by Methicillin-  
486 Resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 2017 Jan 26;85(2):e00876-16.
- 487 72. Yee R, Yuan Y, Shi W, Brayton C, Tarff A, Feng J, et al. Infection with Persister Forms of  
488 *Staphylococcus aureus* Causes a Persistent Skin Infection with More Severe Lesions in Mice:



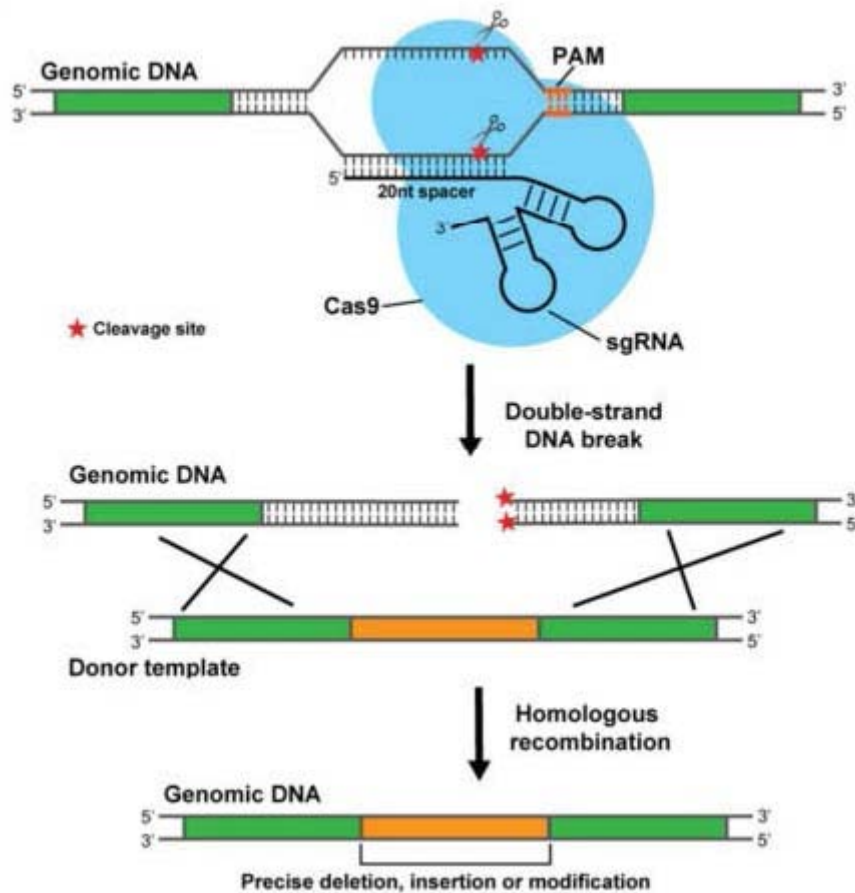


- 489 Failure to Clear the Infection by the Current Standard of Care Treatment. *Discovery Medicine*.  
490 2019 Jul 26;28(151):7–16.
- 491 73. Abdul Hamid AI, Nakusi L, Givskov M, Chang Y-T, Marquès C, Gueirard P. A mouse ear skin model  
492 to study the dynamics of innate immune responses against *Staphylococcus aureus* biofilms. *BMC*  
493 *Microbiol*. 2020 Jan 29;20(1):22.
- 494 74. Sauvat L, Hamid AIA, Blavignac C, Josse J, Lesens O, Gueirard P. Biofilm-coated microbeads and  
495 the mouse ear skin: An innovative model for analysing anti-biofilm immune response in vivo.  
496 *PLOS ONE*. 2020 Dec 4;15(12):e0243500.
- 497 75. Woischnig A-K, Gonçalves LM, Ferreira M, Kuehl R, Kikhney J, Moter A, et al. Acrylic microparticles  
498 increase daptomycin intracellular and in vivo anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus*.  
499 *Int J Pharm*. 2018 Oct 25;550(1–2):372–9.
- 500 76. Markel DC, Bergum C, Wu B, Bou-Akl T, Ren W. Does Suture Type Influence Bacterial Retention  
501 and Biofilm Formation After Irrigation in a Mouse Model? *Clin Orthop Relat Res*. 2019  
502 Jan;477(1):116–26.
- 503 77. Le H, Arnoult C, Dé E, Schapman D, Galas L, Le Cerf D, et al. Antibody-Conjugated Nanocarriers  
504 for Targeted Antibiotic Delivery: Application in the Treatment of Bacterial Biofilms.  
505 *Biomacromolecules*. 2021 Apr 12;22(4):1639–53.
- 506 78. Yamada KJ, Heim CE, Aldrich AL, Gries CM, Staudacher AG, Kielian T. Arginase-1 Expression in  
507 Myeloid Cells Regulates *Staphylococcus aureus* Planktonic but Not Biofilm Infection. *Infect*  
508 *Immun*. 2018 Jun 21;86(7):e00206-18.
- 509 79. He L, Le KY, Khan BA, Nguyen TH, Hunt RL, Bae JS, et al. Resistance to leukocytes ties benefits of  
510 quorum-sensing dysfunctionality to biofilm infection. *Nat Microbiol*. 2019 Jul;4(7):1114–9.
- 511 80. Narayana JL, Mishra B, Lushnikova T, Golla RM, Wang G. Modulation of antimicrobial potency of  
512 human cathelicidin peptides against the ESKAPE pathogens and in vivo efficacy in a murine  
513 catheter-associated biofilm model. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2019 Sep 1;1861(9):1592–  
514 602.
- 515 81. Anderson LS, Reynolds MB, Rivara KR, Miller LS, Simon SI. A Mouse Model to Assess Innate  
516 Immune Response to *Staphylococcus aureus* Infection. *J Vis Exp*. 2019 Feb  
517 28;(144):10.3791/59015.
- 518 82. Hoffmann JP, Friedman JK, Wang Y, McLachlan JB, Sammarco MC, Morici LA, et al. In situ  
519 Treatment With Novel Microbiocide Inhibits Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in a  
520 Murine Wound Infection Model. *Front Microbiol*. 2020 Jan 23;10:3106.
- 521 83. Li J, Zhong W, Zhang K, Wang D, Hu J, Chan-Park MB. Biguanide-Derived Polymeric Nanoparticles  
522 Kill MRSA Biofilm and Suppress Infection In Vivo. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020 May  
523 13;12(19):21231–41.
- 524 84. Wang B, Yao Y, Wei P, Song C, Wan S, Yang S, et al. Housefly Phormicin inhibits *Staphylococcus*  
525 *aureus* and MRSA by disrupting biofilm formation and altering gene expression in vitro and in  
526 vivo. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021 Jan 15;167:1424–34.



- 527 85. Archer NK, Wang Y, Ortines RV, Liu H, Nolan SJ, Liu Q, et al. Preclinical Models and Methodologies  
528 for Monitoring *Staphylococcus aureus* Infections Using Noninvasive Optical Imaging. *Methods*  
529 *Mol Biol.* 2020;2069:197–228.
- 530 86. Quan K, Jiang G, Liu J, Zhang Z, Ren Y, Busscher HJ, et al. Influence of interaction between surface-  
531 modified magnetic nanoparticles with infectious biofilm components in artificial channel digging  
532 and biofilm eradication by antibiotics in vitro and in vivo. *Nanoscale.* 2021 Mar 4;13(8):4644–53.
- 533 87. Redman WK, Welch GS, Rumbaugh KP. Assessing Biofilm Dispersal in Murine Wounds. *J Vis Exp.*  
534 2021 Aug 7;(174).
- 535 88. Gries CM, Rivas Z, Chen J, Lo DD. Intravital Multiphoton Examination of Implant-Associated  
536 *Staphylococcus aureus* Biofilm Infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020 Oct 15;10:574092.
- 537 89. Abdul Hamid AI, Cara A, Diot A, Laurent F, Josse J, Gueirard P. Differential Early in vivo Dynamics  
538 and Functionality of Recruited Polymorphonuclear Neutrophils After Infection by Planktonic or  
539 Biofilm *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology.* 2021;12:2471.
- 540 90. Abtin A, Jain R, Mitchell AJ, Roediger B, Brzoska AJ, Tikoo S, et al. Perivascular macrophages  
541 mediate neutrophil recruitment during bacterial skin infection. *Nat Immunol.* 2014 Jan;15(1):45–  
542 53.
- 543 91. Ortiz G, Chao C, Jamali A, Seyed-Razavi Y, Kenyon B, Harris DL, et al. Effect of Dry Eye Disease on  
544 the Kinetics of Lacrimal Gland Dendritic Cells as Visualized by Intravital Multi-Photon Microscopy.  
545 *Front Immunol.* 2020 Aug 12;11:1713.
- 546 92. Jamali A, Seyed-Razavi Y, Chao C, Ortiz G, Kenyon B, Blanco T, et al. Intravital Multiphoton  
547 Microscopy of the Ocular Surface: Alterations in Conventional Dendritic Cell Morphology and  
548 Kinetics in Dry Eye Disease. *Front Immunol.* 2020 May 7;11:742.
- 549 93. Kitano M, Yamazaki C, Takumi A, Ikeno T, Hemmi H, Takahashi N, et al. Imaging of the cross-  
550 presenting dendritic cell subsets in the skin-draining lymph node. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016  
551 Jan 26;113(4):1044–9.
- 552 94. Okada T, Takahashi S, Ishida A, Ishigame H. In vivo multiphoton imaging of immune cell dynamics.  
553 *Pflugers Arch.* 2016;468(11):1793–801.
- 554 95. van Panhuys N. Studying Dendritic Cell-T Cell Interactions Under In Vivo Conditions. *Methods Mol*  
555 *Biol.* 2017;1584:569–83.
- 556 96. Akkaya B, Kamenyeva O, Kabat J, Kissinger R. Visualizing the Dynamics of T Cell-Dendritic Cell  
557 Interactions in Intact Lymph Nodes by Multiphoton Confocal Microscopy. *Methods Mol Biol.*  
558 2021;2304:243–63.

559



**Figure 26 : Le mécanisme de l'édition du génome médiée par CRISPR/Cas9 chez les bactéries (Chen et al., 2017).** Dans ce système, la nucléase Cas9 (bleue) forme un complexe avec un ARN guide (sgRNA). Le complexe est guidé vers un locus génomique précis par une séquence de 20 nucléotides modifiables appartenant au sgRNA. Après la liaison, la Cas9 clive le locus cible, générant une cassure d'ADN double brin dans le génome. Pour survivre, les cellules bactériennes doivent subir un processus de réparation par la recombinaison homologue avec l'utilisation d'ADN donneurs. Seules les bactéries dont les génomes sont réparés peuvent survivre après l'action de la nucléase. Ces éléments (Cas9, sgRNA et l'ADN donneur) sont codés sur un plasmide sensible à la température qui peut par conséquent être éliminé suite à la recombinaison homologue.

## VI. Analyse *in vitro* des interactions entre les cellules dendritiques et *Staphylococcus aureus* sous forme planctonique ou biofilm

### 1. Introduction

Afin d'améliorer nos connaissances sur les interactions entre les DC et le biofilm de *S. aureus*, nous avons mis en place un protocole utilisant des BMDC. L'objectif de notre étude a été de comparer l'internalisation de *S. aureus* sous forme planctonique ou biofilm par les BMDC, ainsi que le profil de cytokines synthétisées par les BMDC infectées. En parallèle, nous avons commencé la caractérisation d'un mutant de *S. aureus* SH1000 délété pour le système *agr*. L'objectif ici est de comparer les réponses des BMDC à un biofilm du mutant *agr* à celles obtenues avec la souche sauvage SH1000.

### 2. Matériels et méthodes

#### 2.1 Souches bactériennes et conditions de culture

La souche mutante de *S. aureus* SH1000 délétée pour le système de régulation *agr* ( $\Delta agr$ ) a été construite comme décrit précédemment (Figure 26) (Chen et al., 2017), à partir de la souche laboratoire SH1000. Les deux souches sont stockées à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  et sont mises en culture à partir d'un aliquot de bactéries congelées dans 5 mL de milieu de culture trypticase soja (TS). Les cultures sont placées à  $37^{\circ}\text{C}$  sous agitation pendant la nuit (culture « overnight »).

#### 2.2 Réalisation des courbes de croissance

A partir des cultures « overnight », les souches WT et  $\Delta agr$  ont étéensemencées à une densité optique égale à 0,01 à 600nm ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ), dans un volume final de 25 mL de milieu de culture TS, et incubées à  $37^{\circ}\text{C}$ , sous agitation à 130rpm. La  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  a été mesuré pendant 7h toutes les 30 min, après un premier temps d'incubation d'une heure. Le taux de croissance ( $\mu$ ) a été calculé à partir de la phase exponentielle des courbes obtenues.

#### 2.3 Détermination du titre bactérien

Afin de préparer une suspension bactérienne ayant la concentration souhaitée, le titre en Unités Formant Colonies (UFC)/mL/ $\text{DO}_{600\text{nm}}$  des deux souches a été établie. Pour cela, la  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  des cultures « overnight » a été lue, puis des dilutions en série ont été effectuées et étalées sur milieu gélosé de Bouillon Lysogénie (LB). Après une incubation pendant la nuit à  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , le nombre d'UFC a été compté puis le rapport entre la concentration bactérienne (UFC/mL) et la  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  a été établie (UFC/mL/ $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ).



## 2.4 Evaluation de la biomasse bactérienne par cristal violet

La  $DO_{600nm}$  des cultures « overnight » des souches WT et  $\Delta$ agr a été déterminée puis ajustée à  $1 \pm 0,05$ . Ces suspensions ont ensuite été diluées au centième avant d'être distribuées en triplicat dans une plaque de culture cellulaire 24 puits à fond plat (1 mL/puits). La plaque a été incubée en chambre humide à 37 °C, sans agitation pendant 24h. Une fois la période d'incubation terminée, le surnageant a été éliminé par retournement et 3 lavages en tampon phosphate salin (PBS) ont été effectués. Un mL d'une solution filtrée (0,45  $\mu$ m) de cristal violet 0,1 % a été rajouté dans chaque puits pendant 10min à température ambiante. Le cristal violet a été éliminé par retournement et de nouveau, trois lavages ont été réalisés. Après élimination de l'excès d'eau et séchage pendant 1 h, 1 mL d'acide acétique 33 % a été rajouté dans chaque puits pour solubiliser le biofilm. La DO de chaque puits a été mesurée à 620nm, après 10 min d'incubation à température ambiante et homogénéisation à la pipette.

## 2.5 Maturation des BMDC

Les BMDC ont été isolées en mettant en culture des précurseurs de la moelle osseuse de fémurs et de tibias de souris, comme décrit précédemment (Lutz et al., 1999). Elles ont été obtenues après 10 jours de différenciation en boîtes de pétri. Brièvement, les fémurs et les tibias d'une souris C75BL/6 ont été prélevés puis nettoyés. La moelle osseuse a ensuite été récupérée puis filtrée sur un tamis cellulaire 100  $\mu$ m. Suite à une centrifugation à 400 x g pendant 5 min à température ambiante, les globules rouges ont été lysés puis de nouveau centrifugés pendant 5 min à 400 x g à température ambiante. Enfin, les cellules ont été reprises dans du RPMI 1640 supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), et un mélange de pénicilline et de streptomycine (milieu complet), puis comptées et la concentration a été ajustée à  $4 \times 10^5$  cellules/mL. Cinq mL de cette préparation a été ajouté par boîte de pétri. En parallèle, le surnageant des cellules J558, contenant du GM-CSF, a été dilué à 40% dans du milieu complet. Cinq mL de cette préparation a été ajouté dans chaque boîte de pétri contenant des cellules (20 % final), puis les boîtes ont été incubées à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> pendant 10 jours. L'apport de nouveau milieu de culture contenant du GM-CSF a été réalisée tous les 3 jours. Un jour avant leur récolte, le pourcentage de différenciation des BMDC a été vérifié par cytométrie en flux, après marquage des cellules par un anticorps spécifique du marqueur de surface CD11c (REA754, Miltenyi Biotec).





## 2.6 Infections des BMDC par *S. aureus* sous forme planctonique ou de biofilm

### 2.6.1 Préparation de l'inoculum planctonique

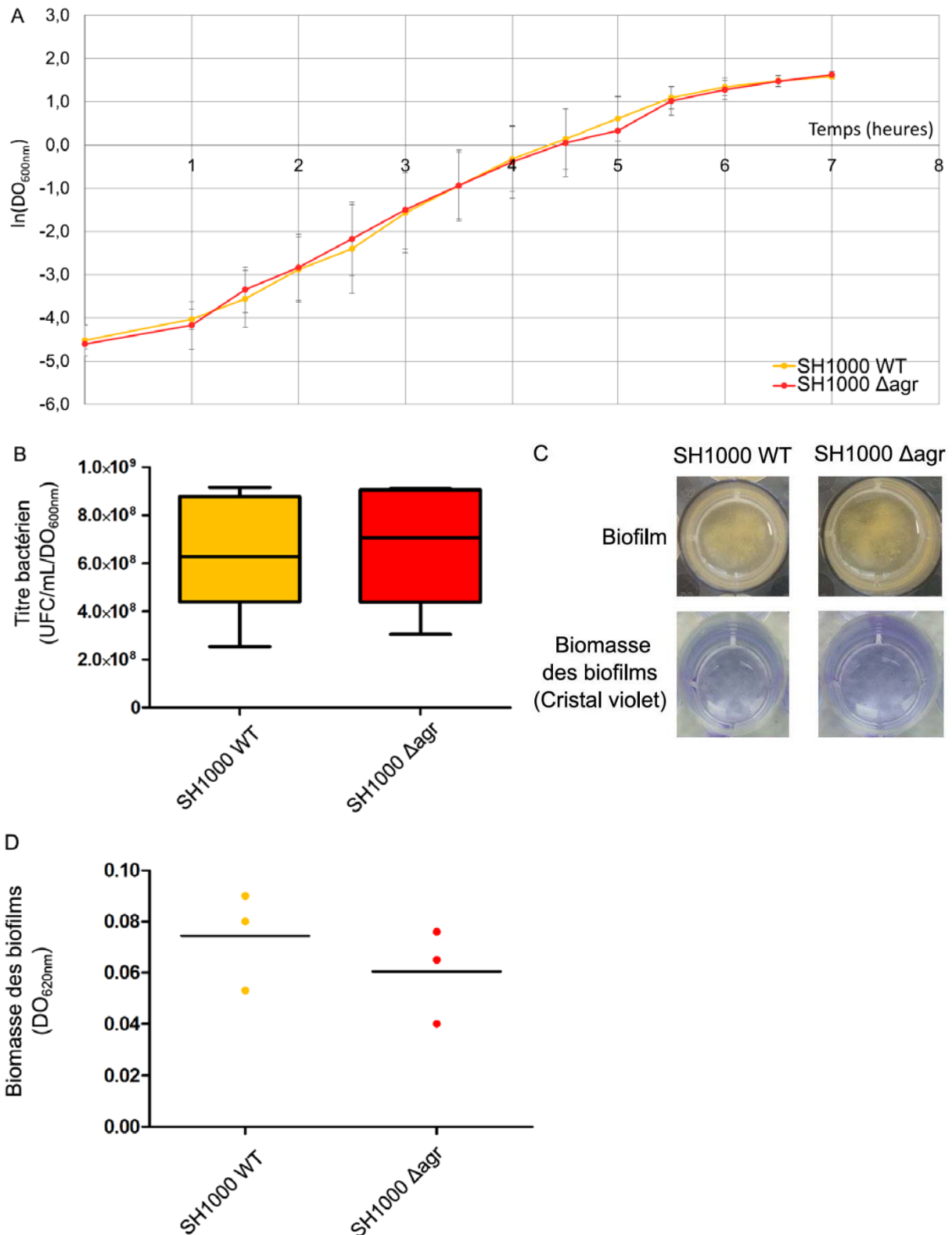
La souche sauvage *S. aureus* SH1000 a été utilisée pour l'ensemble des expérimentations réalisées *in vitro*. Après obtention d'une culture « overnight », la concentration bactérienne a été déduite par mesure de la  $DO_{600nm}$  rapportée au titre bactérien préalablement établi à  $3,62 \times 10^8$  UFC/mL/UDO. Le volume de culture « overnight » nécessaire pour obtenir  $10^9$  UFC a été prélevé, puis centrifugé pendant 8 min à  $6000 \times g$  à température ambiante. Ensuite, le culot a été resuspendu dans 20 mL de milieu RPMI 1640 10% de SVF, soit  $5 \times 10^7$  UFC/mL correspondant à la condition MOI5 (rapport cellule : bactérie égal à 1:5). Pour obtenir une MOI égale à 1, soit  $10^7$  UFC/mL, la solution préparée de MOI égale à 5 a été diluée 5 fois. La concentration bactérienne de ces suspensions a été ensuite vérifiée comme décrit précédemment.

### 2.6.2 Préparation de l'inoculum « biofilm »

La  $DO_{600nm}$  de la culture « overnight » a été lue puis ajustée à  $DO_{600nm} = 1 \pm 0,05$ . Ces suspensions ont été diluées au centième avant d'être distribuées en plaque de culture cellulaire 24 puits à fond plat (1 mL/puits), puis placées à  $37^\circ C$  sans agitation pendant 24 h. Une fois la période d'incubation terminée, la plaque a subi un rinçage à la vapeur pendant 40 min (Tasse et al., 2018). Par la suite, les biofilms adhérents au fond des puits ont été récupérés par grattage à l'aide d'une pipette, après ajout de 200  $\mu L$  de RPMI 1640 10% SVF. Des mises au point antérieures réalisées au laboratoire ont permis d'ajuster la concentration de cette suspension bactérienne à  $10^9$  UFC/mL. La préparation des deux suspensions bactériennes de MOI 5 et 1 a été réalisée par dilution de cette suspension. Avant de procéder au dénombrement, l'inoculum a été mélangé au vortex pendant 30 s, placé dans un bain à ultrasons pendant 10min, et mélangé au vortex de nouveau pendant 30 s. La concentration bactérienne a ensuite été déterminée comme décrit précédemment.

### 2.6.3 Mise en contact des bactéries avec les BMDC

Après 10 jours de différenciation, les BMDC sont récoltées et distribuées dans une flasque de culture cellulaire. Suite à une centrifugation de 8min à  $300 \times g$  à température ambiante, les cellules sont resuspendues à une concentration de  $1 \times 10^7$  cellules/mL dans du RPMI 1640 10% SVF. Dans un tube eppendorf, 500  $\mu L$  de cultures de bactéries planctoniques ou en biofilm sont mélangées avec 500  $\mu L$  de suspension cellulaire (MOI5 ou 1). Dans les tubes contrôle, du LPS purifié d'*Escherichia coli* (10 ng/mL final) ou du RPMI 1640-10% SVF est rajouté. Les tubes sont ensuite incubés pendant 1 h à  $37^\circ C$ , 5 %  $CO_2$ , et homogénéisés toutes les 15 min. Après



**Figure 27 : Caractérisation du mutant  $\Delta agr$  de *S. aureus* SH1000.** (A) Comparaison de la croissance de la souche WT et du mutant  $\Delta agr$ . La  $DO_{600nm}$  de la culture bactérienne planctonique est mesurée en fonction du temps durant une période de 7 h (moyenne  $\pm$  écart-type,  $n = 3$ ). (B) Détermination du titre bactérien (UFC/mL/ $DO_{600nm}$ ) de la souche WT et  $\Delta agr$ . La concentration bactérienne d'une culture « overnight » est déterminée et reportée à la  $DO_{600nm}$  préalablement mesurée (médiane  $\pm$  IQR,  $n = 7$ ). (C) Observation macroscopique des biofilms des souches WT et  $\Delta agr$  après 24 h d'incubation à 37 °C en milieu TS et après coloration au cristal violet. (D) Evaluation de la biomasse des biofilms de la souche WT et  $\Delta agr$ . La  $DO_{620nm}$  des biofilms de 24 h est mesurée après coloration au cristal violet (médiane,  $n = 3$ ).

le temps de contact, l'adhésion et l'invasion bactérienne sont analysés, ainsi que la production de cytokines dans les surnageants de culture des cellules.

#### 2.6.4 Invasion de *S. aureus* dans les BMDC

Les cellules infectées sont lavées 2 fois dans 1 mL de PBS, et centrifugées pendant 8 min à 300 x g à température ambiante. Après le dernier lavage, les cellules sont reprises dans 1 mL de RPMI 1640 10 % SVF contenant 100µg/mL ou 50µg/mL de gentamicine, puis déposées en plaques 24 puits et incubées à 37 °C, CO<sub>2</sub> 5 %. Après 1 h de traitement à la gentamicine 100 µg/mL, les cellules sont transférées dans un tube eppendorf, puis 2 lavages sont réalisés. Les cellules sont ensuite lysées et les lysats étalés sur milieu gélosé. Les bactéries sont dénombrées comme précédemment. Le même traitement est réalisé pour des cellules infectées et lavées, puis incubées pendant 24 h avec la gentamicine 50µg/mL. Après lyse des cellules, les bactéries intracellulaires sont dénombrées comme décrit précédemment.

#### 2.6.5 Production des cytokines par les BMDC infectées par *S. aureus*

D'autres puits de culture contenant des cellules infectées et lavées reprises dans du RPMI 1640 10% SVF avec 50 µg/mL de gentamicine ont été préparés en parallèle. Après 24 h, les cellules ont été homogénéisées et placées dans un tube eppendorf pour être ensuite centrifugées à 4 °C pendant 10 min à 10000 rpm. Le surnageant de culture a été aliquoté dans des tubes contenant des inhibiteurs de protéases et stocké à -80 °C.

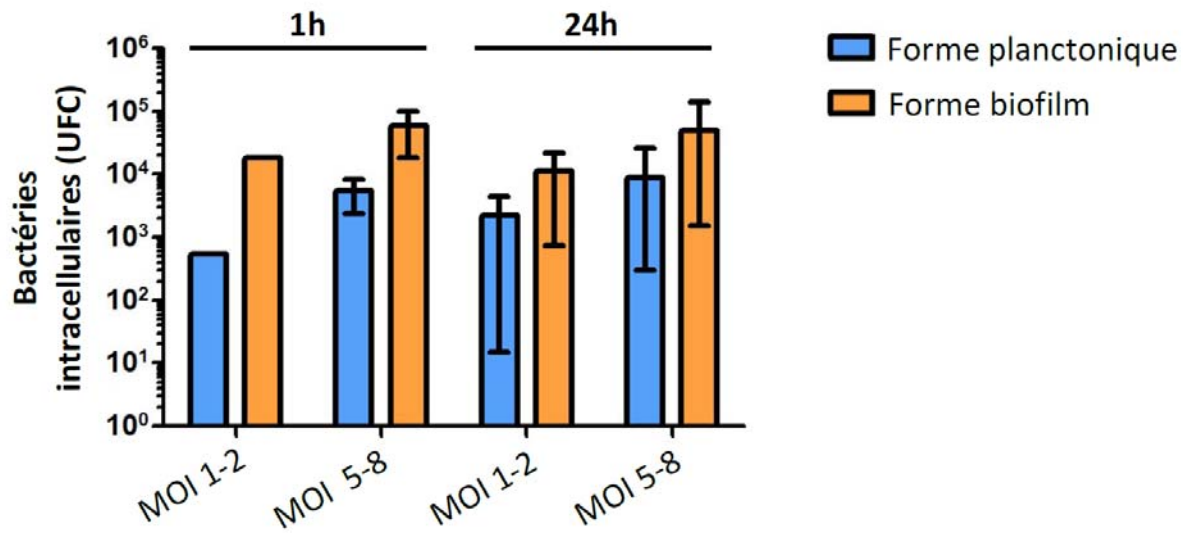
### 2.7 Détermination de la concentration en cytokines par ELISA

La concentration en IL-6, IL-12, IL-10, TNF $\alpha$  et TGF $\beta$  a été déterminée par technique ELISA dans les surnageants de culture des cellules infectées, en suivant les recommandations des kits DuoSet ELISA (R&D Systems).

## 3. Résultats

### 3.1 Caractérisation du mutant $\Delta$ agr de *Staphylococcus aureus* SH1000

Les courbes de croissance de la souche WT et du mutant  $\Delta$ agr (Figure 27A) montrent que l'augmentation de la DO en fonction du temps est similaire pour les deux souches, et qu'elles atteignent la phase stationnaire après 6 h de culture. Ainsi, la délétion du système *agr* n'impacte pas la croissance de *S. aureus*. Le taux de croissance  $\mu$ , correspondant à la pente de la courbe durant la phase exponentielle, est également comparable pour les deux souches :  $\mu$  (SH1000 WT) = 1,27 et  $\mu$  (SH1000  $\Delta$ agr) = 1,11. Afin de pouvoir utiliser la souche mutante pour les expériences d'infection, nous avons ensuite déterminé son titre bactérien exprimé en



**Figure 28 : Evaluation de la capacité des BMDC à internaliser la souche WT de *S. aureus* SH1000 sous sa forme planctonique ou biofilm.** Nombre d'UFC intracellulaires après 1h de contact et un traitement par la gentamicine à 100 µg/mL ou 50 µg/mL, durant 1 ou 24 h respectivement, à MOI 1-2 ou 5- 8 (n = 2-3 pour chaque condition, avec un nombre de réplicats techniques = 1-3 pour chaque expérience).

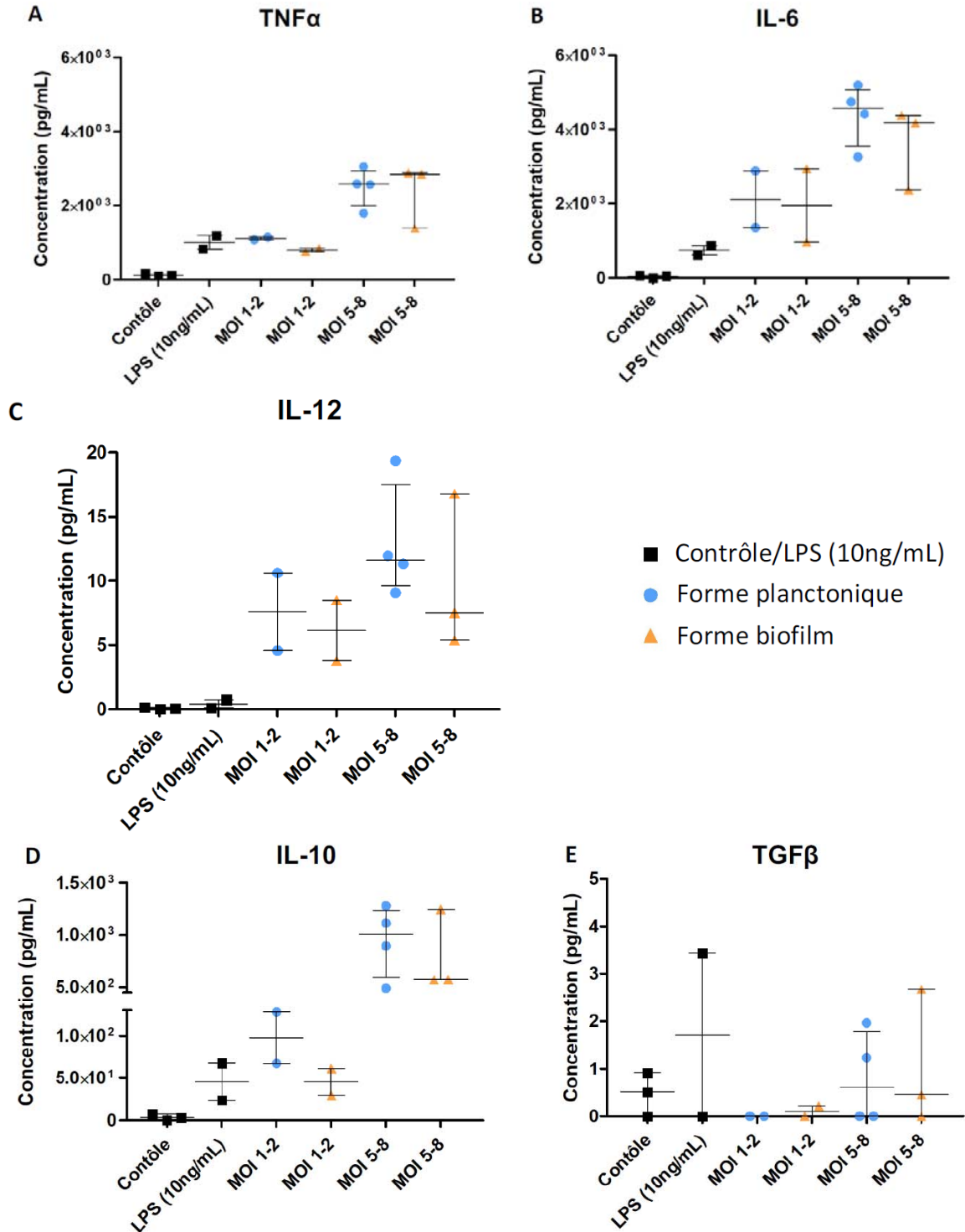
UFC/mL/DO (Figure 27B). La souche  $\Delta agr$  présente un titre égal à  $7,11 \times 10^8 \pm 2,36 \times 10^8$  UFC/mL/DO, alors que celui de la souche sauvage est égal à  $6,32 \times 10^8 \pm 2,59 \times 10^8$  UFC/mL/DO. Des expériences supplémentaires de préparation d'inoculum à sont cependant nécessaires pour vérifier les résultats obtenus. A l'échelle macroscopique, la souche  $\Delta agr$  est également capable de produire du biofilm (Figure 27C). Ce dernier est observable dans les puits, et présente un aspect morphologique comparable à celui de la souche sauvage. Enfin, nous avons quantifié la biomasse des biofilms produits après 24 h de culture en utilisant une coloration au cristal violet (Figure 27D). En cohérence avec les résultats précédents, le biofilm de la souche mutante possède une biomasse comparable à celle de la souche WT. Ainsi, la délétion du système *agr* ne semble pas impacter la croissance de la souche SH1000 sous forme planctonique ou biofilm.

### 3.2 Comparaison de la capacité d'internalisation des cellules dendritiques de *Staphylococcus aureus* SH1000 sous forme planctonique ou biofilm

Nous avons ensuite comparé la capacité des BMDC à phagocyter les deux formes bactériennes de *Staphylococcus aureus* SH1000 (Figure 28). Du fait d'une variation dans la préparation des inocula entre chaque expérience, nous considérons deux conditions expérimentales : MOI comprise entre 1 et 2, ou MOI comprise entre 5 et 8. Une variation dans le nombre de BMDC obtenues après 10 jours de différenciation a également induit une variation dans le nombre de réplicats pouvant être réalisés pour chaque expérience. Après 1 h de traitement à la gentamicine, nous constatons la présence de bactéries intracellulaires dans chaque condition testée, avec une tendance à une augmentation dans la condition MOI 5-8 par rapport à la condition MOI 1-2 pour les deux formes bactériennes. Cette augmentation est également observée avec la forme biofilm, en comparaison avec la forme planctonique aux deux MOI testées. Après 24 h, la quantité de bactéries intracellulaires semble être comparable avec celle du temps 1 h pour les deux formes bactériennes, mais une hétérogénéité plus importante est observée entre les expériences.

### 3.3 Comparaison de la réponse cytokinique des cellules dendritiques après l'infection par la forme planctonique ou biofilm de *Staphylococcus aureus* SH1000

En parallèle, nous avons étudié la réponse cytokinique des BMDC à la présence de *S. aureus* SH1000 WT sous sa forme planctonique ou biofilm. Des cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-6 et IL-12) et anti-inflammatoires (IL-10), ainsi que le TGF $\beta$  ont été dosés dans les surnageants de culture des cellules infectées (Figure 29). En plus de la condition contrôle



**Figure 29 : Dosage des cytokines produites par les BMDC après contact avec la souche WT de *S. aureus* SH1000 sous sa forme planctonique ou biofilm.** Suite au contact des BMDC avec la forme planctonique ou biofilm de la souche WT de *S. aureus* SH1000 et un traitement par la gentamycine (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) pendant 24 h, la production des cytokines (A) TNF $\alpha$ , (B) IL-6, (C) IL-12, (D) TGF $\beta$  et (E) IL-10 par est évaluée par la technique ELISA (médiane  $\pm$  IQR, n = 2-3).

exempte de bactéries, cette réponse a également été comparée à celle induite par le LPS bactérien d'*E. coli* à la concentration de 10 ng/mL. Le LPS induit la production des deux cytokines TNF $\alpha$  et IL-6 (Figure 29A et B). En réponse aux bactéries, un profil de réponse cytokinique pro-inflammatoire similaire est observé pour les deux formes bactériennes. Une augmentation de la concentration en cytokines est observée dans les puits infectés par rapport aux puits contrôle, avec une augmentation plus importante observée dans la condition MOI 5-8. En particulier, les bactéries induisent une production d'IL-6 plus importante que celle du TNF $\alpha$ . Ce dernier est produit en quantité comparable suite à la stimulation des BMDC par le LPS ou l'infection par *S. aureus* à MOI 1-2.

La cytokine anti-inflammatoire IL-10 est également produite par les BMDC en réponse à l'infection, mais en quantité moins importante en comparaison des concentrations de TNF $\alpha$  et d'IL-6 (Figure 29D). En présence de bactéries planctoniques ou de biofilm dans la condition MOI 1-2, nous constatons une faible production d'IL-10, comparable à la condition LPS. A cette MOI, une tendance à une diminution est observée lorsque les cellules sont infectées par la forme biofilm, en comparaison avec la forme planctonique. Plus d'expériences sont nécessaires pour évaluer la significativité de ces résultats. De même que pour les cytokines pro-inflammatoires, une augmentation de MOI induit une plus forte synthèse d'IL-10 en comparaison avec la MOI 1-2.

L'IL-12 et le TGF $\beta$  sont très peu présents dans nos échantillons (Figure 29C et E). En effet, nous observons une légère augmentation de la concentration en IL-12 dans les puits infectés par rapport aux puits contrôle, alors que le TGF $\beta$  est détecté en quantité comparable dans ces deux conditions. Cependant, les valeurs de DO lues pour chaque échantillon dans chaque condition sont inférieures au premier point de la gamme défini par les kits ELISA pour ces deux cytokines. Nous ne pouvons pas donc pas émettre de conclusion sur les différences observées pour ces deux cytokines.





## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---

---

L'objectif de notre travail a été de comparer la réponse immunitaire innée précoce induite par la forme planctonique ou biofilm de *S. aureus* dans un modèle *in vivo* d'infection cutanée. En comparant ces réponses, nous avons voulu identifier un profil de réponse inflammatoire qui serait spécifique de la forme communautaire de *S. aureus*. Ce profil particulier nous permettrait alors de mieux comprendre les mécanismes d'immuno-échappement mis en place par la bactérie pour persister chez l'hôte et être à l'origine d'infections chroniques chez l'Homme. Plusieurs résultats importants émergent de ce travail : (i) en étudiant la dynamique de la réponse inflammatoire dirigée contre *S. aureus* dans le modèle du pavillon de l'oreille de la souris, un profil de réponse spécifique à la forme biofilm est mis en évidence (ii) la réponse inflammatoire induite par la forme biofilm est majoritairement médiée par des PNN qui présentent des cinétiques de recrutement et des propriétés fonctionnelles distinctes au cours de l'infection , (iii) une potentielle différence dans la capacité des DC à internaliser les deux formes bactériennes est observée.

### I. Etude de la réponse inflammatoire anti-biofilm par imagerie intravitale dans le modèle d'infection du pavillon de l'oreille de la souris

La première partie de notre travail a consisté à utiliser le modèle du pavillon de l'oreille de la souris pour mettre au point un protocole d'analyse par imagerie intravitale de la dynamique de la réponse inflammatoire dirigée contre le biofilm de *S. aureus*. Ce modèle a été largement utilisé dans d'autres modèles infectieux, notamment lors des infections par *Yersinia pestis*, *Streptococcus pyogenes*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania major* et *Plasmodium berghei* (Chtanova et al., 2008; Peters et al., 2008; Mac-Daniel et al., 2014; Marino-Marmolejo et al., 2016; Gonzalez, 2019). La réponse immunitaire innée induite par *S. aureus* a été étudiée chez les souris transgéniques LysM-EGFP qui possèdent des cellules phagocytaires fluorescentes (PNN, MO/MΦ). Les souris ont été infectées par la forme planctonique ou biofilm de deux souches distinctes de *S. aureus* : la souche clinique LYO-S2 et la souche de laboratoire SH1000. La souche parentale NCTC8325 à l'origine de la souche SH1000 a été isolée en 1960 à partir d'un patient atteint de sepsis (Sassi et al., 2014). Un inoculum calibré de biofilm a été inoculé par voie intradermique, soit directement dans le tissu de l'oreille, soit sous forme adhérente à



la surface de microbilles. En ayant recours à des microbilles de silice, l'objectif a été de mimer les infections sur matériel biomédical chez l'Homme. Le recours à l'imagerie intravitale par microscopie confocale nous a permis de suivre en temps réel le recrutement cellulaire en analysant le signal fluorescent émis par les cellules EGFP<sup>+</sup> recrutées au niveau de l'oreille en fonction du temps, et de quantifier ce recrutement dans le tissu cutané entier. Nous avons constaté, en présence ou non de microbilles, un afflux massif de cellules inflammatoires ainsi qu'une augmentation du signal EGFP entre le temps précoce (4–7 h post-infection) et le temps tardif (après 24 h) chez les souris infectées par les deux formes bactériennes, par rapport aux souris contrôle. Dans un modèle d'infection de plaie de souris par la forme planctonique bioluminescente de la souche *S. aureus* SH1000, la coloration histologique de la peau infectée par l'hématoxyline et l'éosine, associée à un marquage par un anticorps anti-Gr-1 (double marquage Ly6C et Ly6G chez les PNN et les MO/MΦ) a révélé la présence d'abcès inflammatoires contenant des cellules Gr-1 positives. Chez les souris transgéniques LysM-EGFP infectées, un pic de fluorescence a été observé 24h après l'infection, et correspond au pic de recrutement des PNN et des MO/MΦ à ce temps de cinétique (Cho et al., 2011). Dans le modèle d'infection du pavillon de l'oreille, ce pic de recrutement serait également à 24 h pour la forme planctonique, selon des données partielles non publiées obtenues avec la souche LYO-S2 aux temps 24 et 48h post-infection. Pour la forme biofilm, les premières données sont variables, sans différence significative obtenue entre les temps 24h et 48h, et nécessitent la réalisation d'expériences complémentaires.

En utilisant le modèle du pavillon de l'oreille, nous avons pu observer pour la première fois la dynamique de la réponse inflammatoire anti-biofilm au site d'injection cutané. Après quelques heures d'infection, les phagocytes sont majoritairement présents en périphérie de la zone d'inoculation, en raison de leur difficulté à infiltrer le biofilm. Un petit nombre de cellules réussissent néanmoins à l'infiltrer, et quelques zones d'interactions bactéries-cellules sont détectées. Ce phénomène n'est pas observé avec la forme planctonique. Ainsi, ce modèle nous a permis de mettre en évidence une des premières différences dans la réponse inflammatoire induite par les deux formes bactériennes, avec l'illustration de la fonction de barrière physique jouée par le biofilm, comme décrite initialement par Costerton (Costerton et al., 1999). Cet effet barrière a déjà été illustré dans un modèle murin d'infection par un biofilm implanté sur cathéter sous-cutané. Dans ce modèle, le marquage des MΦ par immunofluorescence a montré que la majorité des cellules restaient éloignées du site d'infection, avec seulement quelques MΦ recrutés à la surface du biofilm (Thurlow et al., 2011). Cette effet barrière est dépendant de la



densité du biofilm. En effet, les biofilms de *S. aureus* USA300 LAC  $\Delta$ agr marqués par l'iodure de propidium et le SYTO9 sont organisés en couches compactes de cellules vivantes, avec peu d'ADNe. A l'inverse, les biofilms des souches parentales se présentent sous la forme de micro-colonies dispersées, intégrées dans de l'ADNe. A la différence de la souche parentale, les biofilms du mutant  $\Delta$ agr sont difficilement infiltrés par les PNN ; les bactéries du biofilm résistent ainsi à la lyse par les PNN (He et al., 2019).

Dans des systèmes dynamiques de fluide *in vitro* (système de flow cell) étudiant les biofilms, cet effet barrière semble être minimisé. En effet, les cellules mononuclées isolées du sang périphérique de donneurs (MO et lymphocytes) sont capables de pénétrer à l'intérieur d'un biofilm de 7 jours de la souche clinique *S. aureus* Seattle 1945 (biofilm considéré comme mature). Dans cette étude, la capacité de pénétration des leucocytes s'explique par la présence de forces de cisaillement exercées sur les biofilms. En effet, ce phénomène n'est pas observé chez un biofilm de 2 jours de la même souche bactérienne cultivée en mode statique. Néanmoins, la pénétration des leucocytes à l'intérieur du biofilm n'est pas suffisante pour induire la phagocytose des bactéries du biofilm car aucune bactérie intracellulaire n'est détectée (Leid et al., 2002). En condition dynamique, les forces de cisaillement s'exercent seulement lorsqu'une force tangentielle agit sur la surface du biofilm, et pourraient alors mener à la modification des fonctions des leucocytes ou de l'architecture du biofilm. Dans notre modèle d'étude, les forces de cisaillement ne s'appliquent pas, ou du moins, sont probablement minimales en comparaison des conditions expérimentales dynamiques décrites ci-dessus (système de flow cell). En effet, pour la majorité des expériences de caractérisation de la réponse inflammatoire réalisées, le biofilm a été inoculé directement dans le derme du tissu cutané de l'oreille, sans support abiotique qui aurait pu générer des mouvements fluidiques plus importants. Dans ce contexte, notre modèle d'inoculation se rapprocherait d'un modèle statique, et l'inhibition de la pénétration des phagocytes au sein du biofilm inoculé dans le tissu cutané de l'oreille peut s'observer.

Par la suite, le modèle mis au point nous a permis d'analyser les propriétés de déplacement des cellules recrutées sur le site d'infection. Nous avons retenu deux paramètres d'analyse qui semblaient être les plus adaptés pour illustrer l'effet barrière du biofilm observé précédemment : la vitesse moyenne de déplacement et la linéarité de la trajectoire des cellules. Une diminution de la vitesse de déplacement signifie un mouvement ralenti des cellules présentes dans la zone d'injection, alors qu'une linéarité de trajectoire proche de zéro indique que les cellules possèdent un mouvement confiné ou restreint. Lorsque les cellules sont



analysées dans leur ensemble (cellules à proximité ou présentes dans la zone d'inoculation), une diminution de la vitesse et de la linéarité de trajectoire des phagocytes recrutés par la forme biofilm est observée au temps précoce, en comparaison des souris contrôles inoculées avec du PBS. Après 24 h, cette diminution est maintenue pour le paramètre de la vitesse, mais la linéarité des cellules est augmentée en comparaison des souris contrôles. Ainsi, en présence du biofilm, les paramètres de déplacement des cellules recrutées sont modifiés ; celles-ci diminuent leur vitesse et modifient leur trajectoire pour pouvoir interagir avec les bactéries du biofilm. Ces modifications sont également observées avec la forme planctonique pour les deux paramètres étudiés au temps précoce, mais les effets sont plus marqués avec la forme biofilm. Par la suite, nous avons étudié séparément le comportement des cellules à proximité du site d'injection et de celles se trouvant directement en contact avec les bactéries de l'inoculum (forme planctonique ou biofilm). Cette analyse nous a permis d'étudier plus en détail les paramètres de déplacement des cellules inflammatoires recrutées. Les deux paramètres sont diminués pour les cellules présentes dans la zone d'injection des biofilms aux deux temps analysés, en comparaison avec les cellules présentes à proximité. En comparaison avec la forme planctonique, la vitesse de ces deux populations de cellules est diminuée de façon plus importante au temps précoce et au temps tardif en présence du biofilm, suggérant un mécanisme de modulation dépendant de la présence des biofilms, et aussi un effet à distance sur ce paramètre. Plusieurs explications sont possibles pour expliquer cet effet plus marqué avec la forme biofilm. Le déplacement des phagocytes peut être empêché par la présence dense des bactéries englobées dans la MEC. Certains composants immunomodulateurs du biofilm tels que les PSM présents dans la MEC et avec lesquels les cellules interagissent (effet par contact direct), ou des molécules sécrétées par le biofilm comme le CHIPS ou le SCIN (effet à distance) pourraient aussi agir sur les paramètres de déplacement des cellules recrutées par le biofilm.

Une étude comparable a été réalisée dans le modèle du pavillon de l'oreille de souris transgéniques PGRP-S-DsRed possédant exclusivement des PNN fluorescents. Un inoculum de  $10^3$  UFC de *S. aureus* LAC 13C fluorescentes a été inoculé dans le derme après incision du pavillon de l'oreille. Un implant de silicone a ensuite été déposé au niveau de l'incision avant sa fermeture, pour mimer une infection à biofilm sur matériel médical invasif. L'analyse de la vitesse de déplacement, de la distance en ligne droite entre la première position de la cellule et la dernière (« *displacement* ») et de la linéarité de la trajectoire des cellules a été réalisée trois jours post-opératoire, en utilisant une approche de microscopie multi-photonique par imagerie intravitale. En utilisant ce modèle, une augmentation des trois paramètres mesurés a été





observée chez les souris infectées, en comparaison avec les souris contrôle (absence de bactéries mais présence de l'implant de silicone) (Gries et al., 2020). Dans cette étude, les propriétés de déplacement des PNN uniquement à proximité de l'inoculum, mais pas en contact direct avec les bactéries du biofilm, ont été étudiées. Il est donc difficile de comparer les résultats décrits avec ceux obtenus dans notre modèle d'étude. Aussi, une souche bactérienne différente a été utilisée, et des doses d'inoculum différentes ont été inoculées. Néanmoins, l'augmentation de la linéarité de la trajectoire des cellules observées au temps 24 h dans notre analyse est cohérent avec les résultats présentés dans cette étude. A l'inverse, la diminution de la vitesse des cellules recrutées observée dans notre modèle d'infection cutanée est contradictoire avec les résultats de cette étude et nécessiterait des expériences complémentaires. En particulier, l'identification d'effecteurs spécifiques exprimés par les biofilms des deux souches utilisées dans ces deux études, et agissant à distance, pourrait aussi contribuer à expliquer les différences observées.

L'observation de la dynamique des cellules inflammatoires sur le microscope confocal spinning disk peut se faire dans une limite de profondeur tissulaire égale à environ 150  $\mu\text{m}$ . Le recours à la microscopie multi-photonique présente certains avantages capables de pallier à cette limite technique. Contrairement à la microscopie confocale et à la microscopie par épifluorescence où la longueur d'onde d'excitation est plus courte que la longueur d'onde d'émission, cette technique se base sur le principe de l'absorption simultanée de deux ou plusieurs photons de grande longueur d'onde, produisant un seul photon d'émission de courte longueur d'onde. L'utilisation de lumières de longueur d'onde plus longues permet une plus grande pénétration des tissus (jusqu'à 1 mm), sans les effets dommageables des sources lumineuses de la microscopie confocale ou par épifluorescence (Denk et al., 1990). En plus du modèle *in vivo* d'infection par *S. aureus* développé par Gries et al. et décrit ci-dessus, la microscopie multi-photonique est largement utilisée pour étudier les interactions entre l'hôte et les micro-organismes dans d'autres modèles d'études *in vivo*. Par exemple, Abtin et al. ont utilisé l'imagerie intravitale multi-photonique pour mettre en évidence la lyse des M $\Phi$  périvasculaires par la toxine Hla de la forme planctonique de la souche *S. aureus* 8325-4 dans le pavillon de l'oreille de souris (Abtin et al., 2014). Dans un modèle d'infection du pavillon de l'oreille de la souris par *Leishmania major*, la dynamique de déplacement des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques de l'antigène LACK a été analysée une et deux semaines post-infection (Filipe-Santos et al., 2009).

En identifiant différents aspects de la dynamique de la réponse inflammatoire spécifiques à la forme biofilm de *S. aureus*, cette première partie de notre travail nous a permis de valider



un modèle original d'infection du tissu cutané de l'oreille nous permettant d'étudier la réponse immunitaire anti-biofilm. En utilisant l'imagerie intravitale par microscopie confocale, nous avons pu identifier les premières signatures d'un phénotype « biofilm » de réponse immunitaire innée.

## II. Caractérisation de la réponse inflammatoire précoce dirigée contre la forme biofilm de *Staphylococcus aureus* chez la souris

La mise en place d'une réponse inflammatoire dès l'entrée d'un agent pathogène représente la première réponse de défense mise en place chez l'hôte pour pouvoir éliminer ce micro-organisme. Notre étude s'est poursuivie par la caractérisation de la réponse inflammatoire précoce induite par le biofilm de *S. aureus* à l'échelle tissulaire, cellulaire et moléculaire.

Lors de la mise en place de notre modèle d'étude utilisant le pavillon de l'oreille de la souris, nous avons voulu établir une corrélation entre le recrutement des cellules inflammatoires et l'évolution de la charge bactérienne dans le tissu cutané. Nous avons observé par imagerie intravitale un signal de fluorescence bactérienne qui semblait être moins intense avec la forme planctonique qu'avec la forme biofilm après 24 h d'infection. Cela nous laisse penser que les cellules phagocytaires exercent plus difficilement leur fonction de phagocytose en présence du biofilm et par conséquent de lyse bactérienne. La quantification de ce signal n'a pas pu être réalisée *in vivo*, à la différence du signal EGFP (cellules phagocytaires), en raison de la présence d'un fort signal d'autofluorescence émis par les poils à la surface du tissu cutané de l'oreille de la souris. Nous avons aussi été limités par l'apparition de zones de nécrose au site d'injection après 48h d'infection à la dose d'inoculum utilisée ( $1 \times 10^7$  UFC pour la LYO-S2 et  $5 \times 10^6$  pour la SH1000). D'autres travaux ont eu recours à des souches bioluminescentes de *S. aureus* et à des systèmes d'imagerie optique *in vivo* pour suivre l'évolution d'une infection cutanée. Par exemple, un modèle de plaie de dos chez la souris LysM-EGFP a été utilisé pour inoculer une souche bioluminescente de *S. aureus* SH1000 afin de quantifier et de suivre de manière non-invasive et en parallèle le recrutement des phagocytes au site d'infection et l'évolution de la charge bactérienne pendant une période de 14 jours chez un même animal (Anderson et al., 2019). Le caractère non-invasif de ce système d'analyse est ainsi adapté à l'étude des infections chroniques; ces infections nécessitent en effet des analyses sur des périodes de temps prolongées, comme c'est le cas chez l'Homme lors des infections nosocomiales à *S. aureus* sur matériel biomédical implanté. Chauhan et al. ont proposé un modèle d'infection sur cathéter



chez le rat permettant un suivi de la colonisation des cathéters par les biofilms de différentes espèces bactériennes, dont *S. aureus*. L'utilisation de souches bioluminescentes a permis un suivi non-invasif de l'infection durant de longues périodes (détection d'un signal bioluminescent jusqu'à 60 jours après l'infection), ainsi que la mesure de l'efficacité de traitements d'antibiotiques (Chauhan et al., 2012, 2016).

Dans notre modèle d'infection du pavillon de l'oreille, nous avons comparé l'évolution de la charge bactérienne dans le tissu cutané après inoculation des deux formes bactériennes, en utilisant une approche classique de quantification des UFC sur milieu gélosé après broyage des tissus infectés. Nous avons observé une évolution similaire de la charge bactérienne entre les deux formes bactériennes en fonction du temps, notamment aux temps précoces, ce qui est contradictoire avec le phénomène de phagocytose « frustrée » décrit pour les biofilms. L'absence de différence pourrait s'expliquer par une potentielle transition *in vivo* des bactéries planctoniques vers le mode de vie biofilm dans le tissu du pavillon de l'oreille. En effet, à l'échelle d'une bactérie unique, *S. aureus* peut détecter son environnement « contraint » après avoir été capturée dans un espace confiné comme le cytoplasme de la cellule ou le phagosome. A l'intérieur de ces compartiments, le peptide signal AIP produit par *S. aureus* ne peut pas diffuser et s'accumulerait rapidement dans cet espace limité. Cet événement déclencherait une auto-induction du système *agr* de la bactérie, à l'origine du déclenchement de certains mécanismes de virulence et de l'activation de certaines voies métaboliques favorables au maintien de la survie bactérienne (Carnes et al., 2010; Du et al., 2021). Ainsi, le système *agr* permet non seulement de détecter la densité bactérienne à l'échelle d'une population, mais est aussi un système senseur du confinement de la bactérie (*diffusion sensing*). Bien que l'expression des effecteurs du système *agr* par *S. aureus* ait été démontrée dans l'espace intracellulaire des cellules épithéliales et endothéliales (Shompole et al., 2003; Grønnemose et al., 2021), le confinement des bactéries au site d'injection, notamment à l'intérieur des cellules phagocytaires, ou dans un contexte de formation d'abcès cutanés pourrait favoriser la formation du biofilm. Des analyses supplémentaires seront nécessaires pour déterminer le phénotype (planctonique ou biofilm) des bactéries présentes dans le tissu cutané en fonction du temps, comme par exemple le marquage des composants du biofilm *in vivo* en utilisant des sondes fluorescentes spécifiques des composants de la MEC, ou encore la mise en évidence de l'augmentation de l'expression de gènes spécifiques de la forme biofilm par analyse transcriptomique (Resch et al., 2005; Sauvat et al., 2020). Des essais préliminaires ont été réalisés *in vivo* en marquant les fibres amyloïdes de la MEC dans le tissu cutané à l'aide de la



sonde fluorescente CDy11 (Kim et al., 2016). Aux temps 2 h et 48 h après l'inoculation de la souche *S. aureus* SH1000 GFP<sup>+</sup> sous forme planctonique ou biofilm en présence de la sonde, un plus fort signal de colocalisation partielle est observé avec la forme biofilm en comparaison avec la forme planctonique. Des expériences supplémentaires devront être réalisées pour compléter ces premiers résultats.

A l'échelle tissulaire, nous avons analysé la production de différentes cytokines et chimiokines dans le tissu cutané de l'oreille après inoculation des deux formes bactériennes. En particulier, la chimiokine CXCL1 a été détectée en quantité importante jusqu'à 72 h post-infection. Cette chimiokine impliquée dans le recrutement des PNN au site d'infection microbienne est sécrétée par plusieurs populations cellulaires résidentes de la peau tels que les kératinocytes, les LC et le MΦ (Olaru and Jensen, 2010; Abtin et al., 2014; van Dalen et al., 2019). A l'inverse, la concentration d'IL-17 est faible dans le tissu cutané. Or, la synthèse d'IL-17 par différentes cellules de la peau comme les DETC (chez la souris), les cellules Th17 (T  $\gamma\delta$  et T CD4+) et les cellules NK est normalement à l'origine de la production de CXCL1 (Liu et al., 2018). Ce résultat signifie qu'il existe un autre activateur potentiel de la production de la chimiokine CXCL1 comme l'IL-1 $\beta$ . Dans un modèle d'infection péritonéale par les streptocoques du groupe B, des souris déficientes en IL-1 $\beta$  présentent un défaut de production en CXCL1 et en CXCL2 associé à une diminution du recrutement des PNN dans la cavité péritonéale (Biondo et al., 2014). La concentration importante d'IL-1 $\beta$  dans le tissu cutané contribuerait ainsi à la synthèse de CXCL1 par les cellules de la peau. La présence d'IL-10, couplée à l'absence d'IFN $\gamma$  dans le tissu cutané, serait en faveur d'une polarisation des MΦ vers le phénotype M2, conduisant ainsi à une réponse anti-inflammatoire et pro-fibrotique en faveur de la persistance bactérienne et de la transition planctonique-biofilm. Dans notre modèle d'étude, nous n'avons cependant pas observé de différences de concentrations en IL-10 pour les deux formes bactériennes. Dans le modèle d'infection à biofilm de *S. aureus* sur implant articulaire développé par Kielian et collaborateurs, les MDSC recrutés au niveau du tissu infecté sont capables de produire de l'IL-10 et sont détectés dès le troisième jour post-infection. L'IL-12 a été décrite comme capable de favoriser le recrutement des MDSC dans les modèles d'infection à biofilm de *S. aureus* décrits précédemment (Heim et al., 2015b) résultats contradictoires ont été décrits *in vitro* avec *S. epidermidis*. En effet, l'incubation de MΦ humains dérivés de MO avec la forme planctonique ou biofilm de *S. epidermidis* a permis de mettre en évidence une diminution de la production de l'IL-12p40, de l'IL-12p70, du TNF $\alpha$  et de l'IFN- $\gamma$  par les MΦ infectés par la forme biofilm en comparaison à la forme planctonique





(Spiliopoulou et al., 2012). Ainsi d'autres cytokines pourront être dosées dans les broyats tissulaires des tissus d'oreille infectées par les deux formes bactériennes, et en particulier IL-12.

Le recours à l'imagerie intravitale par microscopie confocale pour observer la dynamique de la réponse inflammatoire nous a permis de valider le phénotype « biofilm » précédemment observé avec la souche *S. aureus* LYO-S2. Ce phénotype est caractérisé par une accumulation de phagocytes EGFP<sup>+</sup> à la périphérie du site d'injection, une pénétration limitée de ces cellules au sein du biofilm, et une modulation des paramètres de déplacement des cellules recrutées. L'observation des interactions bactéries-cellules à l'aide d'objectifs à plus fort grossissement nous a permis de mettre en évidence un autre aspect de la modulation de la réponse inflammatoire par la forme biofilm. La diminution du périmètre des phagocytes recrutés au site d'injection observée *in vivo* montre que ces cellules ont une capacité à émettre des pseudopodes altérée en présence du biofilm dans les premières heures suivant l'inoculation des bactéries. Ce mécanisme d'« immuno-échappement » semble être commun aux biofilms car les mêmes observations ont été réalisées *in vitro* chez des PNN mis en présence de biofilms de *P. aeruginosa* PAO1 (Jesaitis et al., 2003). Dans cette étude et dans la nôtre, la présence de PNN ayant une morphologie arrondie lorsqu'ils sont immobilisés à la surface du biofilm est caractéristique d'un état « non stimulé ». Parmi les facteurs de virulence sécrétés par *S. aureus*, la leukotoxine LukAB est capable d'interagir avec le récepteur CD11b, un des récepteurs membranaires responsable de l'activation des PNN et des MO/MΦ (Latger-Cannard et al., 2004). Bhattacharya et al. ont démontré *in vitro* une diminution du biovolume et du nombre d'UFC chez le biofilm de la souche *S. aureus* USA300 LAC délétée pour LukAB mise en contact avec des PNN humains, en comparaison avec la souche parentale (Bhattacharya et al., 2020). La liaison de LukAB au récepteur CD11b pourrait donc être à l'origine de l'état « inactivé » des PNN observé dans le modèle du pavillon de l'oreille, et serait en faveur d'un état de « résistance » des biofilms à la phagocytose.

Le phénotypage des cellules recrutées au site d'injection cutané nous a permis de mettre en évidence que le PNN est la cellule majoritairement recrutée au cours de la réponse inflammatoire induite par le biofilm de *S. aureus* au temps précoce. Nos résultats montrent que la majorité des cellules EGFP<sup>+</sup> détectées au niveau des sites d'injection cutanés dès 2 h post-infection sont des PNN. Aux temps 24 h et 48 h, les PNN représentent presque la totalité des cellules myéloïdes CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> présentes dans le tissu de l'oreille. En nombre de cellules, les PNN sont recrutés de manière significative par la forme biofilm dès 2 h post-infection, en



comparaison avec les souris contrôles (PBS), alors qu'un recrutement significatif des PNN est observé avec la forme planctonique seulement à partir de 24 h post-infection. De plus, nous avons constaté que le nombre de PNN recrutés est moins important au temps 48 h chez les souris inoculées avec la forme biofilm en comparaison avec la forme planctonique, mettant ainsi en évidence une cinétique de recrutement des PNN spécifique à la forme biofilm. Cette observation n'est pas vraie pour les MO/MΦ. En effet, malgré un nombre initial de MO/MΦ significativement plus important chez les souris infectées par la forme biofilm par rapport aux souris infectées avec la forme planctonique au temps 2 h post-infection, le nombre de cellules recrutées chez les souris infectées reste comparable à celui des souris contrôles. Une augmentation du nombre de MO/MΦ est observée seulement après 48 h d'infection par les deux formes bactériennes en comparaison des souris contrôles, sans différence significative entre la forme planctonique ou biofilm.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette cinétique de recrutement des phagocytes spécifique à la forme biofilm. La présence des PSM, composants majeurs de la MEC, pourrait être à l'origine de ce recrutement précoce des PNN par le biofilm. A la concentration nano-molaire, ces derniers peuvent en effet jouer le rôle de chimiokines en interagissant avec le récepteur FPR2 présent à la surface des PNN (Clarke, 2010). Cet effet chimiotactique des PSM a été décrit dans un modèle *in vitro* utilisant des PNN humains déposés dans le compartiment supérieur d'un transwell équipé d'un filtre polycarbonate de 3 µm de diamètre. La migration des cellules vers le compartiment inférieur a été observée seulement en présence des PSM déposés dans ce deuxième compartiment (Kretschmer et al., 2010). Chez la souris, l'interaction des PSM avec des récepteurs FPR-like induit également un effet chimiotactique. Dans cette même étude, l'injection de PSMα2 dans une poche d'air formée au niveau de la peau du dos de la souris induit un recrutement significatif de PNN par rapport aux souris contrôle. L'injection au préalable de l'antagoniste du récepteur Fpr-rs2, un paralogue du récepteur FPR2 humain, inhibe le recrutement des PNN observé dans la poche d'air (Kretschmer et al., 2010).

La diminution du recrutement des PNN observée après 48 h pourrait être expliquée par deux mécanismes potentiels. Premièrement, une partie des PNN recrutés pourrait être lysée par les leukotoxines sécrétées par la bactérie et par des PSM du biofilm. En effet, à plus forte concentration (micro-molaire), les PSM exercent une activité lytique sur les PNN humains, de façon indépendante des récepteurs FPR (Wang et al., 2007). L'accumulation des PSM dans l'environnement inflammatoire au cours de l'infection pourrait donc être à l'origine de cet effet



toxique pour les PNN. Les leukotoxines sont également capables d'induire la mort cellulaire par « *NETosis* » des PNN. Bhattacharya et al. ont décrit *in vitro* la mort cellulaire de PNN humains après leur mise en contact avec un surnageant de culture d'un biofilm de 24 h de *S. aureus* USA300 LAC, avec des dommages membranaires et une libération d'ADN, deux caractéristiques évocatrices de « *NETosis* ». Ce mécanisme de mort cellulaire n'a pas été observé avec le surnageant de culture de la bactérie sous sa forme planctonique. Il dépend de l'expression de la PVL et de l'Hlg par le biofilm. L'induction de « *NETosis* » par ces leukotoxines a ensuite été validé après marquage des protéines histones H3 citrullinées, de la MPO et de l'élastase, trois composants libérés lors de la « *NETosis* ». Deuxièmement, la diminution du recrutement des PNN observée avec la forme biofilm au temps 48h pourrait être reliée à la présence de MDSC qui inhiberaient précocement la réponse inflammatoire.

Comme décrit précédemment, les MDSC représentent une population hétérogène de MO ( $CD11b^+ Ly6G^{neg} Ly6C^{high}$ ) et de granulocytes ( $CD11b^+ Ly6G^+ Ly6C^+$ ) immatures qui sont de puissants inhibiteurs de l'activation des lymphocytes T. Ces cellules ont été initialement décrites en cancérologie comme favorisant un microenvironnement « immunosuppresseur » par la production de l'Arg-1, de l'iNOS et de ROS. En effet, le catabolisme de la L-arginine en L-ornithine par l'Arg-1 épuise cet acide aminé non essentiel du microenvironnement tumoral. Il a été démontré que l'absence de L-arginine conduit à l'inhibition de la prolifération des lymphocytes (Rodriguez et al., 2002; Rodríguez and Ochoa, 2008). La production de NO et des ROS par l'iNOS et la NADPH oxidase modulent également les propriétés des lymphocytes T par divers mécanismes impliquant l'inhibition de l'expression du CMHII et l'induction de l'apoptose des lymphocytes T (Rivoltini et al., 2002; Harari and Liao, 2004). Dans le contexte des infections à biofilm sur prothèse articulaire, l'expression de l'Arg-1, de l'iNOS et de l'IL-10 par des MDSC purifiées a été détectée au niveau du tissu infecté entourant la prothèse, 14 jours après l'infection. De plus, l'incubation de ces cellules avec des lymphocytes T  $CD4^+$  inhibe la prolifération lymphocytaire (Heim et al., 2014). Dans ce même modèle, l'IL-12 a été décrite comme la cytokine essentielle au recrutement des MDSC de phénotype  $CD11b^+ Ly6G^+ Ly6C^+$  (G-MDSC) au niveau du tissu entourant la prothèse 7 jours post-infection. L'inhibition du recrutement de cette sous-population granulocytaire chez des souris IL-12 KO a conduit à une augmentation du recrutement de MO au site d'infection, et à une amélioration de la clairance bactérienne dans les tissus entourant la prothèse (Heim et al., 2015b). En utilisant le même modèle d'infection, cette équipe a démontré le recrutement des G-MDSC au niveau du tissu infecté dès 3 jours post-infection, et a mieux caractérisé le phénotype de ces cellules sur la base



de l'expression marqueur membranaire CD11b. En effet, les G-MDSC se différencient des PNN « classiques » par une forte expression de CD11b membranaire. Le phénotype de ces cellules devient donc CD11b<sup>hi</sup>Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> (Heim et al., 2018). Dans notre étude, la diminution du recrutement des PNN observée 48 h après l'inoculation de la forme biofilm est associée à une augmentation de l'expression du marqueur membranaire CD11b, un marqueur d'activation des PNN. Ce résultat serait en faveur d'un recrutement potentiel de G-MDSC au niveau du tissu cutané de l'oreille dès les temps précoces d'infection. L'étude des propriétés fonctionnelles des PNN recrutés par la forme biofilm après 48 h a également révélé une augmentation de la production des ROS par ces cellules, ainsi qu'une augmentation de la capacité phagocytaire des PNN. Ces deux dernières propriétés n'ont pas encore été décrites chez les G-MDSC en réponse au biofilm de *S. aureus*. Par ailleurs, l'absence de différence dans la production de l'IL-10 entre les deux formes bactériennes n'est pas en faveur de l'hypothèse de la présence des G-MDSC dans le tissu cutané de l'oreille au temps 48h post-infection, spécifiquement après inoculation de la forme biofilm. D'autres analyses seront donc nécessaires pour aboutir à un phénotypage complet des sous-populations de PNN recrutées, comme par exemple le dosage de l'activité de l'iNOS et de l'Arg-1, ainsi que le dosage de l'IL-12 dans le tissu cutané de l'oreille. Ces analyses supplémentaires nous permettront d'identifier les différentes sous-populations de PNN recrutées spécifiquement après inoculation du biofilm, ainsi que leurs rôles respectifs.

De façon globale, l'analyse des propriétés fonctionnelles des PNN recrutés dans notre modèle d'étude a permis de mettre en évidence deux états d'activation distincts après inoculation de la forme biofilm. Au temps précoce (dès 2 h post-infection), les PNN recrutés sur le site d'inoculation sont décrits comme étant « inactivés » et se caractérisent par :

- l'absence d'augmentation de l'expression du marqueur membranaire CD11b en comparaison avec les PNN des souris contrôle
- le maintien d'une morphologie ronde et d'un périmètre diminué après contact avec le biofilm, en association avec une diminution de leur vitesse et de la linéarité de leur trajectoire
- l'augmentation de leur nombre en comparaison avec les souris contrôle

A l'inverse, les PNN recrutés par la forme biofilm après 48 h sont décrits comme étant « suractivés » et se caractérisent par :

- l'augmentation de l'expression du marqueur membranaire CD11b en comparaison avec les PNN des souris contrôle et des souris inoculées par la forme planctonique





- la production augmentée des ROS associée à une augmentation de la capacité de phagocytose
- la diminution de leur nombre en comparaison avec les souris inoculées avec la forme planctonique

Ces différences observées précocement au cours de la mise en place de la réponse immunitaire innée dirigée contre la forme biofilm de *S. aureus* pourront avoir un impact sur la la réponse immunitaire adaptative qui en découlera. En particulier, il a été décrit *in vitro* que la co-culture de PNN activés par la N-f-Met-Leu-Phe, une molécule entraînant la dégranulation et la production de ROS chez ces cellules, et de lymphocytes humains induit un état d'hypo-réactivité chez ces derniers, caractérisé par une diminution de la capacité à proliférer proportionnelle à la quantité de ROS produits par les PNN. De plus, cet état hypo-réactif est associé à une diminution de l'expression de la chaîne CD3 $\zeta$  du TCR et à une diminution de l'afflux de Ca<sup>2+</sup> suite à son activation. Cette effet a été inhibé par l'utilisation d'inhibiteurs de ROS comme la catalase, démontrant l'effet modulateur de ces molécules oxydatives sur certaines fonctions des lymphocytes (Cemerski et al., 2002). Un effet potentiel de l'état « suractivé » des PNN observé dans notre étude pourrait donc être une modulation de la mise en place de la réponse adaptative *via* une inhibition de l'activation des lymphocytes T dans les tissus lymphoïdes. Cette hypothèse serait en accord avec la fonction inhibitrice des G-MDSC sur les lymphocytes T décrite précédemment.

### III. Etude des interactions entre le biofilm de *Staphylococcus aureus* et les cellules dendritiques pour la mise en place de la réponse adaptative

La nature de la réponse immunitaire adaptative induite par la forme biofilm va conditionner le devenir de l'infection, avec soit l'élimination de la bactérie ou soit sa persistance chez l'hôte. Dans un modèle *in vivo* d'infection de souris C57BL/6 par la souche clinique de *S. aureus* MRSA-M2 isolée d'ostéomyélite, l'insertion d'un implant pré-colonisé par la bactérie conduit à une infection chronique caractérisée par la formation d'un biofilm persistant jusqu'à 49 jours post-infection dans le tissu osseux. L'induction de réponses de type Th1/Th17 jusqu'à 28 jours post-infection a été décrite, en association avec une inhibition de la réponse Th2/T reg durant cette période (Prabhakara et al., 2011a). A l'inverse, l'utilisation de ce même modèle chez des souris BALB/c a conduit à des résultats différents. En effet, une majorité des souris BALB/c ont spontanément éliminé la bactérie, sans traitement supplémentaire. Chez ces souris,



un taux plus élevé de cytokines de type Th2 (IL-4 et IL-10) a été détecté dans le tissu osseux, en comparaison avec les souris C57BL/6, avec l'absence d'infiltration de l'implant par les PNN au temps 7 jours post-infection. Par ailleurs, cette étude a démontré la présence en plus grand nombre de lymphocytes T rég dans le dLN des souris BALB/c, en comparaison avec les souris C57BL/6 au même jour d'infection. L'inhibition de la réponse Th1 par un anticorps anti-IL-12 a conduit à une diminution du pourcentage de souris infectées après 28 jours, en comparaison avec les souris non traitées (Prabhakara et al., 2011b). Ces études illustrent un effet délétère de la réponse Th1/Th17 dans les infections chroniques à *S. aureus*, et à l'inverse, un effet protecteur de la réponse Th2/T reg contre les biofilms de *S. aureus*. Ces résultats contradictoires en fonction du fonds génétique des souris utilisées pourraient être reliés à une réponse lymphocytaire T qualitativement et quantitativement différente au site d'infection, comme proposé par Kielian et collaborateurs (Heim et al., 2015b). Globalement, il ressort que les biofilms peuvent potentiellement moduler la mise en place de la réponse adaptative *in vivo*. Ce domaine étant encore peu exploré, nous avons décidé de poursuivre notre étude par une analyse *in vitro* des interactions entre les cellules dendritiques et *S. aureus* sous sa forme planctonique ou biofilm. En effet, et comme décrit précédemment, ces cellules sont des cellules clés de l'immunité innée qui jouent un rôle essentiel dans l'initiation de la réponse immunitaire adaptative.

Nos premiers résultats montrent une tendance à l'augmentation de l'internalisation de la souche *S. aureus* SH1000 sous forme biofilm par les BMDC après 1 h de contact, en comparaison avec la forme planctonique, ainsi qu'une survie intracellulaire qui tend à augmenter après 24 h avec la forme biofilm. Ces résultats sont en désaccord avec la notion de résistance des biofilms à la phagocytose par les cellules phagocytaires professionnelles. Cependant, cette tendance a été retrouvée dans d'autres études réalisées *in vitro*. En particulier, Daw et al. ont décrit une augmentation du pourcentage de DC JAWS II infectées par la forme biofilm de *E. faecalis* FA2-2 (pESPF). Après 45 min de contact avec les deux formes bactériennes, un nombre plus important de bactéries intracellulaires a été visualisé par microscopie après infection par la forme biofilm, en comparaison avec la forme planctonique (Daw et al., 2012). Ces résultats peuvent être expliqués par le caractère dense en bactéries des biofilms, permettant aux DC d'internaliser des agrégats bactériens contrairement aux bactéries isolées de la forme planctonique.

Nos analyses ont également démontré la production par les BMDC de quantités comparables de TNF $\alpha$ , d'IL-6 et d'IL-10 suite au contact avec les deux formes bactériennes.



Une tendance à une diminution de la production d'IL-10 a été observée suite à l'infection par la forme biofilm, en comparaison avec la forme planctonique. Ces résultats peuvent en partie être corrélés avec les observations décrites *in vivo* par Prabhakara et al., expériences dans lesquelles la mise en place d'une réponse précoce de type Th1 induit des dommages tissulaires qui vont favoriser la transition vers la forme biofilm et la chronicisation de l'infection (Prabhakara et al., 2011b, 2011a). L'absence d'IL-12 dans le surnageant de culture des BMDC n'est cependant pas en faveur de cette hypothèse. Une réponse de type Th1/Th17 est par contre observée dans les dLN des souris infectées dans notre étude réalisée *in vivo*, avec la présence de l'IL-17 et de l'IFN $\gamma$ . Cette discordance entre nos résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* pourrait s'expliquer par la présence d'autres types cellulaires dans le dLN des souris, comme les MO/M $\Phi$ , qui sont également capables de migrer vers les dLN, lieu où ils produisent des cytokines pro-inflammatoires et réalisent leur fonction de CPA en activant les lymphocytes T naïfs.

Même si les différences de profils cytokiniques observées *in vitro* avec les deux formes bactériennes semblent minimales, les bactéries du biofilm pourraient moduler la maturation des BMDC ainsi que leurs propriétés fonctionnelles. Dans une étude comparant la maturation des DC JAWS II après contact avec des bactéries planctoniques ou des biofilms désagrégés d'*E. faecalis* FA2-2 (pESPF), aucune différence significative n'a été observée dans l'expression des marqueurs membranaires d'activation CD40, CD80 et CD86. Aucune donnée n'existe sur la maturation des BMDC en réponse à la forme biofilm de *S. aureus*. Des expériences complémentaires devront ainsi être réalisées pour analyser par cytométrie en flux l'expression des marqueurs CD40, CD86, CD80 et du marqueur de maturation CMHII.

Des expériences de présentation antigénique par les BMDC activées par la forme planctonique ou biofilm de *S. aureus* pourront également être réalisées pour étudier leurs propriétés de CPA et leurs capacités à activer des lymphocytes T naïfs *in vitro*. Ainsi, une modulation de la prolifération et de la production cytokinique par les lymphocytes T activés pourrait être mise en évidence en fonction de la forme bactérienne testée. Le recours à la microscopie multi-photonique a permis de visualiser les interactions dynamiques entre DC et lymphocytes T *in vivo*. Ces modèles ont permis de caractériser la présentation antigénique d'un point de vue spatio-temporelle (Hugues et al., 2004; Celli et al., 2007; Morin-Zorman et al., 2019). Par exemple, l'observation dans le ganglion des souris des interactions entre des DC GFP<sup>+</sup> présentant le peptide Dby et des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> marqués par le Seminaphtharhodafluor (SNARF) a permis de mettre en évidence des interactions stables d'au



moins 6 h entre ces deux types cellulaires, conduisant par la suite à l'activation des lymphocytes T (Celli et al., 2007). A l'inverse, l'induction d'un état de tolérance chez la souris a été corrélée à une absence d'interaction de longue durée, caractérisé par un déplacement permanent des lymphocytes T dans le ganglion (Hugues et al., 2004). Ces modèles seraient utiles pour étudier la mise en place de la réponse immunitaire adaptative dirigée contre le biofilm de *S. aureus*, et pourraient alors contribuer à l'identification de nouveaux mécanismes d'« immuno-échappement » induits par cette forme bactérienne, comme par exemple une modification de la dynamique des interactions entre les lymphocytes T et les DC dans le ganglion.





## CONCLUSION

---

---

Ce travail nous a permis d'approfondir nos connaissances sur la réponse inflammatoire précoce induite par la forme biofilm de *S. aureus* dans un contexte d'infection cutanée. Nos résultats montrent que la réponse inflammatoire anti-biofilm est un processus dynamique et complexe qui fait intervenir plusieurs types cellulaires du système immunitaire inné de l'hôte. Dans les premières heures suivant l'infection, nos résultats décrivent un recrutement important de PNN sur le site de l'infection, avec une élimination partielle de l'inoculum (phagocytose inefficace). Au temps 24 h post-infection, ces PNN représentent la majorité des cellules recrutées par la forme biofilm. Après 48 h, le recrutement des PNN diminue, mais ces cellules présentent un état fonctionnel qualifié de « suractivé », conduisant à une meilleure capacité de phagocytose et à une augmentation de la production de ROS. De manière intéressante, la diminution du recrutement des PNN à 48 h post-infection coïncide avec un recrutement significatif des MO/M $\Phi$  dans le tissu cutané. L'analyse du phénotype et des propriétés fonctionnelles de ces cellules serait donc une piste intéressante dans la suite de la caractérisation de la réponse inflammatoire anti-biofilm.

Une meilleure connaissance de ces premières étapes de la réponse immunitaire innée nous permettra de contribuer à la mise au point de stratégies thérapeutiques alternatives à l'antibiothérapie pour lutter contre les infections par le biofilm de *S. aureus*, comme les thérapies immunomodulatrices. L'administration de M $\Phi$  polarisés vers un phénotype pro-inflammatoire (après un pré-traitement par l'IFN- $\gamma$  et du PGN de *S. aureus*) dans un modèle d'infection cutanée a par exemple été proposé comme stratégie thérapeutique adjuvante à l'antibiothérapie contre les infections à biofilm de *S. aureus* (Hanke et al., 2013). Plus récemment, l'utilisation de nanoparticules pour favoriser l'expression de gènes pro-inflammatoires des MO a également été décrite *in vivo* (Yamada et al., 2020). L'efficacité de ces différentes thérapies contre les infections à biofilm a été démontrée dans des modèles *in vivo* d'infection sur support abiotique, et peuvent être adaptées à différents sites d'infections tissulaires chez la souris. L'objectif *in fine* sera d'adapter ces différentes stratégies thérapeutiques au traitement des infections à biofilm chez l'Homme.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

---

### A

Abtin, A., Jain, R., Mitchell, A. J., Roediger, B., Brzoska, A. J., Tikoo, S., et al. (2014). Perivascular macrophages mediate neutrophil recruitment during bacterial skin infection. *Nat Immunol* 15, 45–53. doi:10.1038/ni.2769.

Adhikari, R. P., and Novick, R. P. (2008). Regulatory organization of the staphylococcal sae locus. *Microbiology (Reading)* 154, 949–959. doi:10.1099/mic.0.2007/012245-0.

Akdeniz, M., Gabriel, S., Lichterfeld-Kottner, A., Blume-Peytavi, U., and Kottner, J. (2018). Transepidermal water loss in healthy adults: a systematic review and meta-analysis update. *Br J Dermatol* 179, 1049–1055. doi:10.1111/bjd.17025.

Alva-Murillo, N., López-Meza, J. E., and Ochoa-Zarzosa, A. (2014). Nonprofessional Phagocytic Cell Receptors Involved in Staphylococcus aureus Internalization. *Biomed Res Int* 2014, 538546. doi:10.1155/2014/538546.

Anderson, L. S., Reynolds, M. B., Rivara, K. R., Miller, L. S., and Simon, S. I. (2019). A Mouse Model to Assess Innate Immune Response to Staphylococcus aureus Infection. *J Vis Exp*, 10.3791/59015. doi:10.3791/59015.

Archer, N. K., Mazaitis, M. J., Costerton, J. W., Leid, J. G., Powers, M. E., and Shirtliff, M. E. (2011). Staphylococcus aureus biofilms. *Virulence* 2, 445–459. doi:10.4161/viru.2.5.17724.

Arciola, C. R., Campoccia, D., and Montanaro, L. (2018). Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nature Reviews Microbiology* 16, 397–409. doi:10.1038/s41579-018-0019-y.

Arda, O., Göksügür, N., and Tüzün, Y. (2014). Basic histological structure and functions of facial skin. *Clinics in Dermatology* 32, 3–13. doi:10.1016/j.clindermatol.2013.05.021.

Areschoug, T., and Gordon, S. (2009). Scavenger receptors: role in innate immunity and microbial pathogenesis. *Cell Microbiol* 11, 1160–1169. doi:10.1111/j.1462-5822.2009.01326.x.

Asai, A., Tsuda, Y., Kobayashi, M., Hanafusa, T., Herndon, D. N., and Suzuki, F. (2010). Pathogenic Role of Macrophages in Intradermal Infection of Methicillin-Resistant



*Staphylococcus aureus* in Thermally Injured Mice. *Infect Immun* 78, 4311–4319. doi:10.1128/IAI.00642-10.

## B

---

Bąbolewska, E., Witczak, P., Pietrzak, A., and Brzezińska-Błaszczyk, E. (2012). Different potency of bacterial antigens TLR2 and TLR4 ligands in stimulating mature mast cells to cysteinyl leukotriene synthesis. *Microbiol Immunol* 56, 183–190. doi:10.1111/j.1348-0421.2012.00426.x.

Bangert, S., Levy, M., and Hebert, A. A. (2012). Bacterial resistance and impetigo treatment trends: a review. *Pediatr Dermatol* 29, 243–248. doi:10.1111/j.1525-1470.2011.01700.x.

Bateman, A., Holden, M. T. G., and Yeats, C. (2005). The G5 domain: a potential N-acetylglucosamine recognition domain involved in biofilm formation. *Bioinformatics* 21, 1301–1303. doi:10.1093/bioinformatics/bti206.

Bautista-Hernández, L. A., Gómez-Olivares, J. L., Buentello-Volante, B., and Bautista-de Lucio, V. M. (2017). Fibroblasts: The Unknown Sentinels Eliciting Immune Responses Against Microorganisms. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 7, 151–157. doi:10.1556/1886.2017.00009.

Beck, K., Ohno, H., and Satoh-Takayama, N. (2020). Innate Lymphoid Cells: Important Regulators of Host–Bacteria Interaction for Border Defense. *Microorganisms* 8, 1342. doi:10.3390/microorganisms8091342.

Beekhuizen, H., and van de Gevel, J. S. (2007). Gamma Interferon Confers Resistance to Infection with *Staphylococcus aureus* in Human Vascular Endothelial Cells by Cooperative Proinflammatory and Enhanced Intrinsic Antibacterial Activities. *Infect Immun* 75, 5615–5626. doi:10.1128/IAI.00530-07.

Beenken, K. E., Dunman, P. M., McAleese, F., Macapagal, D., Murphy, E., Projan, S. J., et al. (2004). Global Gene Expression in *Staphylococcus aureus* Biofilms. *J Bacteriol* 186, 4665–4684. doi:10.1128/JB.186.14.4665-4684.2004.

Benito, Y., Kolb, F. A., Romby, P., Lina, G., Etienne, J., and Vandenesch, F. (2000). Probing the structure of RNAlII, the *Staphylococcus aureus* agr regulatory RNA, and identification of the RNA domain involved in repression of protein A expression. *RNA* 6, 668–679.



- Berends, E. T. M., Horswill, A. R., Haste, N. M., Monestier, M., Nizet, V., and von Köckritz-Blickwede, M. (2010). Nuclease Expression by *Staphylococcus aureus* Facilitates Escape from Neutrophil Extracellular Traps. *J Innate Immun* 2, 576–586. doi:10.1159/000319909.
- Bergsbaken, T., Fink, S. L., and Cookson, B. T. (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol* 7, 99–109. doi:10.1038/nrmicro2070.
- Bestebroer, J., Aerts, P. C., Rooijackers, S. H. M., Pandey, M. K., Köhl, J., van Strijp, J. A. G., et al. (2010). Functional basis for complement evasion by staphylococcal superantigen-like 7. *Cell Microbiol* 12, 1506–1516. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01486.x.
- Bestebroer, J., Poppelier, M. J. J. G., Ulfman, L. H., Lenting, P. J., Denis, C. V., van Kessel, K. P. M., et al. (2007). Staphylococcal superantigen-like 5 binds PSGL-1 and inhibits P-selectin-mediated neutrophil rolling. *Blood* 109, 2936–2943. doi:10.1182/blood-2006-06-015461.
- Bestebroer, J., van Kessel, K. P. M., Azouagh, H., Walenkamp, A. M., Boer, I. G. J., Romijn, R. A., et al. (2009). Staphylococcal SSL5 inhibits leukocyte activation by chemokines and anaphylatoxins. *Blood* 113, 328–337. doi:10.1182/blood-2008-04-153882.
- Beveridge, T. J., Makin, S. A., Kadurugamuwa, J. L., and Li, Z. (1997). Interactions between biofilms and the environment. *FEMS Microbiology Reviews* 20, 291–303. doi:10.1111/j.1574-6976.1997.tb00315.x.
- Bhattacharya, M., Berends, E. T. M., Zheng, X., Hill, P. J., Chan, R., Torres, V. J., et al. (2020). Leukocidins and the Nuclease Nuc Prevent Neutrophil-Mediated Killing of *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Infect Immun* 88. doi:10.1128/IAI.00372-20.
- Biondo, C., Mancuso, G., Midiri, A., Signorino, G., Domina, M., Lanza Cariccio, V., et al. (2014). The Interleukin-1 $\beta$ /CXCL1/2/Neutrophil Axis Mediates Host Protection against Group B Streptococcal Infection. *Infect Immun* 82, 4508–4517. doi:10.1128/IAI.02104-14.
- Biswas, R., Voggu, L., Simon, U. K., Hentschel, P., Thumm, G., and Götz, F. (2006). Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. *FEMS Microbiol Lett* 259, 260–268. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00281.x.
- Bitschar, K., Wolz, C., Krismer, B., Peschel, A., and Schitteck, B. (2017). Keratinocytes as sensors and central players in the immune defense against *Staphylococcus aureus* in the skin. *Journal of Dermatological Science* 87, 215–220. doi:10.1016/j.jdermsci.2017.06.003.





Bolle, E. C. L., Verderosa, A. D., Dhoub, R., Parker, T. J., Fraser, J. F., Dargaville, T. R., et al. (2020). An in vitro Reconstructed Human Skin Equivalent Model to Study the Role of Skin Integration Around Percutaneous Devices Against Bacterial Infection. *Front Microbiol* 11, 670. doi:10.3389/fmicb.2020.00670.

Boucher, H. W., and Corey, G. R. (2008). Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases* 46, S344–S349. doi:10.1086/533590.

Bouchery, T., and Harris, N. (2019). Neutrophil–macrophage cooperation and its impact on tissue repair. *Immunology & Cell Biology* 97, 289–298. doi:10.1111/imcb.12241.

Bouchiat, C., Curtis, S., Spiliopoulou, I., Bes, M., Cocuzza, C., Codita, I., et al. (2017). MRSA infections among patients in the emergency department: a European multicentre study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72, 372–375. doi:10.1093/jac/dkw431.

Brady, R. A., Leid, J. G., Kofonow, J., Costerton, J. W., and Shirtliff, M. E. (2007). Immunoglobulins to surface-associated biofilm immunogens provide a novel means of visualization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 73, 6612–6619. doi:10.1128/AEM.00855-07.

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., et al. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532–1535. doi:10.1126/science.1092385.

Bukowski, M., Wladyka, B., and Dubin, G. (2010). Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins (Basel)* 2, 1148–1165. doi:10.3390/toxins2051148.

## C

---

Cadieux, B., Vijayakumaran, V., Bernards, M. A., McGavin, M. J., and Heinrichs, D. E. (2014). Role of Lipase from Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain USA300 in Hydrolyzing Triglycerides into Growth-Inhibitory Free Fatty Acids. *Journal of Bacteriology* 196, 4044–4056. doi:10.1128/JB.02044-14.

Carnes, E. C., Lopez, D. M., Donegan, N. P., Cheung, A., Gresham, H., Timmins, G. S., et al. (2010). Confinement-induced quorum sensing of individual *Staphylococcus aureus* bacteria. *Nat Chem Biol* 6, 41–45. doi:10.1038/nchembio.264.



- Cassini, A., Högberg, L. D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G. S., et al. (2019). Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet Infectious Diseases* 19, 56–66. doi:10.1016/S1473-3099(18)30605-4.
- Celli, S., Lemaître, F., and Bousso, P. (2007). Real-Time Manipulation of T Cell-Dendritic Cell Interactions In Vivo Reveals the Importance of Prolonged Contacts for CD4+ T Cell Activation. *Immunity* 27, 625–634. doi:10.1016/j.immuni.2007.08.018.
- Cemerski, S., Cantagrel, A., Meerwijk, J. P. M. van, and Romagnoli, P. (2002). Reactive Oxygen Species Differentially Affect T Cell Receptor-signaling Pathways\*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 19585–19593. doi:10.1074/jbc.M111451200.
- Chan, L. C., Chaili, S., Filler, S. G., Miller, L. S., Solis, N. V., Wang, H., et al. (2017). Innate Immune Memory Contributes to Host Defense against Recurrent Skin and Skin Structure Infections Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 85. doi:10.1128/IAI.00876-16.
- Chan, L. C., Rossetti, M., Miller, L. S., Filler, S. G., Johnson, C. W., Lee, H. K., et al. (2018). Protective immunity in recurrent *Staphylococcus aureus* infection reflects localized immune signatures and macrophage-conferred memory. *PNAS* 115, E11111–E11119. doi:10.1073/pnas.1808353115.
- Chauhan, A., Ghigo, J.-M., and Beloin, C. (2016). Study of in vivo catheter biofilm infections using pediatric central venous catheter implanted in rat. *Nat Protoc* 11, 525–541. doi:10.1038/nprot.2016.033.
- Chauhan, A., Lebeaux, D., Decante, B., Kriegel, I., Escande, M.-C., Ghigo, J.-M., et al. (2012). A Rat Model of Central Venous Catheter to Study Establishment of Long-Term Bacterial Biofilm and Related Acute and Chronic Infections. *PLoS One* 7, e37281. doi:10.1371/journal.pone.0037281.
- Chavakis, T., Hussain, M., Kanse, S. M., Peters, G., Bretzel, R. G., Flock, J.-I., et al. (2002). *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat Med* 8, 687–693. doi:10.1038/nm728.



- Chen, W., Zhang, Y., Yeo, W.-S., Bae, T., and Ji, Q. (2017). Rapid and Efficient Genome Editing in *Staphylococcus aureus* by Using an Engineered CRISPR/Cas9 System. *J. Am. Chem. Soc.* 139, 3790–3795. doi:10.1021/jacs.6b13317.
- Chen, X., and Alonzo, F. (2019). Bacterial lipolysis of immune-activating ligands promotes evasion of innate defenses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 3764–3773. doi:10.1073/pnas.1817248116.
- Cheng, A. G., McAdow, M., Kim, H. K., Bae, T., Missiakas, D. M., and Schneewind, O. (2010). Contribution of Coagulases towards *Staphylococcus aureus* Disease and Protective Immunity. *PLoS Pathogens* 6, e1001036. doi:10.1371/journal.ppat.1001036.
- Chiriaco, M., Salfa, I., Di Matteo, G., Rossi, P., and Finocchi, A. (2016). Chronic granulomatous disease: Clinical, molecular, and therapeutic aspects. *Pediatr Allergy Immunol* 27, 242–253. doi:10.1111/pai.12527.
- Cho, J. S., Guo, Y., Ramos, R. I., Hebroni, F., Plaisier, S. B., Xuan, C., et al. (2012). Neutrophil-derived IL-1 $\beta$  Is Sufficient for Abscess Formation in Immunity against *Staphylococcus aureus* in Mice. *PLoS Pathog* 8, e1003047. doi:10.1371/journal.ppat.1003047.
- Cho, J. S., Pietras, E. M., Garcia, N. C., Ramos, R. I., Farzam, D. M., Monroe, H. R., et al. (2010). IL-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice. *J Clin Invest* 120, 1762–1773. doi:10.1172/JCI40891.
- Cho, J. S., Zussman, J., Donegan, N. P., Irene Ramos, R., Garcia, N. C., Uslan, D. Z., et al. (2011). Noninvasive In Vivo Imaging to Evaluate Immune Responses and Antimicrobial Therapy against *Staphylococcus aureus* and USA300 MRSA Skin Infections. *J Invest Dermatol* 131, 907–915. doi:10.1038/jid.2010.417.
- Chtanova, T., Schaeffer, M., Han, S.-J., van Dooren, G. G., Nollmann, M., Herzmark, P., et al. (2008). Dynamics of neutrophil migration in lymph nodes during infection. *Immunity* 29, 487–496. doi:10.1016/j.immuni.2008.07.012.
- Clarke, S. R. (2010). Phenol-Soluble Modulins of *Staphylococcus aureus* Lure Neutrophils into Battle. *Cell Host & Microbe* 7, 423–424. doi:10.1016/j.chom.2010.05.015.
- Collin, M., and Bigley, V. (2018). Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology* 154, 3–20. doi:10.1111/imm.12888.



Corbin, B. D., Seeley, E. H., Raab, A., Feldmann, J., Miller, M. R., Torres, V. J., et al. (2008). Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science* 319, 962–965. doi:10.1126/science.1152449.

Corrigan, R. M., Abbott, J. C., Burhenne, H., Kaefer, V., and Gründling, A. (2011). c-di-AMP is a new second messenger in *Staphylococcus aureus* with a role in controlling cell size and envelope stress. *PLoS Pathog* 7, e1002217. doi:10.1371/journal.ppat.1002217.

Costerton, J. W., Stewart, P. S., and Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>

Costerton, W., Veeh, R., Shirtliff, M., Pasmore, M., Post, C., and Ehrlich, G. (2003). The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* 112, 1466–1477. doi:10.1172/JCI200320365.

Cramton, S. E., Gerke, C., Schnell, N. F., Nichols, W. W., and Götz, F. (1999). The Intercellular Adhesion (ica) Locus Is Present in *Staphylococcus aureus* and Is Required for Biofilm Formation. *Infect Immun* 67, 5427–5433.

Craven, R. R., Gao, X., Allen, I. C., Gris, D., Bubeck-Wardenburg, J., McElvania-Tekippe, E., et al. (2009). *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin activates the NLRP3-inflammasome in human and mouse monocytic cells. *PLoS One* 4, e7446. doi:10.1371/journal.pone.0007446.

## D

---

Darisipudi, M. N., Nordengrün, M., Bröker, B. M., and Péton, V. (2018). Messing with the Sentinels—The Interaction of *Staphylococcus aureus* with Dendritic Cells. *Microorganisms* 6. doi:10.3390/microorganisms6030087.

Das, A., Sinha, M., Datta, S., Abas, M., Chaffee, S., Sen, C. K., et al. (2015). Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration. *Am J Pathol* 185, 2596–2606. doi:10.1016/j.ajpath.2015.06.001.

David, M. Z., and Daum, R. S. (2010). Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic. *Clin Microbiol Rev* 23, 616–687. doi:10.1128/CMR.00081-09.





- Daw, K., Baghdayan, A. S., Awasthi, S., and Shankar, N. (2012). Biofilm and planktonic *Enterococcus faecalis* elicit different responses from host phagocytes in vitro. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65, 270–282. doi:10.1111/j.1574-695X.2012.00944.x.
- Deckers, J., Hammad, H., and Hoste, E. (2018). Langerhans Cells: Sensing the Environment in Health and Disease. *Front Immunol* 9, 93. doi:10.3389/fimmu.2018.00093.
- Delauné, A., Dubrac, S., Blanchet, C., Poupel, O., Mäder, U., Hiron, A., et al. (2012). The WalkR System Controls Major Staphylococcal Virulence Genes and Is Involved in Triggering the Host Inflammatory Response. *Infection and Immunity* 80, 3438–3453. doi:10.1128/IAI.00195-12.
- Delekta, P. C., Shook, J. C., Lydic, T. A., Mulks, M. H., and Hammer, N. D. (2018). *Staphylococcus aureus* Utilizes Host-Derived Lipoprotein Particles as Sources of Fatty Acids. *J Bacteriol* 200, e00728-17. doi:10.1128/JB.00728-17.
- Demos, M., McLeod, M. P., and Nouri, K. (2012). Recurrent furunculosis: a review of the literature. *Br J Dermatol* 167, 725–732. doi:10.1111/j.1365-2133.2012.11151.x.
- Denk, W., Strickler, J. H., and Webb, W. W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248, 73–76. doi:10.1126/science.2321027.
- Dillen, C. A., Pinsker, B. L., Marusina, A. I., Merleev, A. A., Farber, O. N., Liu, H., et al. (2018). Clonally expanded  $\gamma\delta$  T cells protect against *Staphylococcus aureus* skin reinfection. *J Clin Invest* 128, 1026–1042. doi:10.1172/JCI96481.
- Donlan, R. M., and Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15, 167–193. doi:10.1128/CMR.15.2.167-193.2002.
- Dorward, D. A., Lucas, C. D., Chapman, G. B., Haslett, C., Dhaliwal, K., and Rossi, A. G. (2015). The Role of Formylated Peptides and Formyl Peptide Receptor 1 in Governing Neutrophil Function during Acute Inflammation. *Am J Pathol* 185, 1172–1184. doi:10.1016/j.ajpath.2015.01.020.
- Du, H., Xu, W., Zhang, Z., and Han, X. (2021). Bacterial Behavior in Confined Spaces. *Front Cell Dev Biol* 9, 629820. doi:10.3389/fcell.2021.629820.
- Dunkelberger, J. R., and Song, W.-C. (2010). Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res* 20, 34–50. doi:10.1038/cr.2009.139.



## E

---

Edwards, S. C., Sutton, C. E., Ladell, K., Grant, E. J., McLaren, J. E., Roche, F., et al. (2020). A population of proinflammatory T cells coexpresses  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cell receptors in mice and humans. *J Exp Med* 217, e20190834. doi:10.1084/jem.20190834.

Esposito, S., Noviello, S., and Leone, S. (2016). Epidemiology and microbiology of skin and soft tissue infections. *Current Opinion in Infectious Diseases* 29, 109–115. doi:10.1097/QCO.0000000000000239.

Ezekwe, E. A. D., Weng, C., and Duncan, J. A. (2016). ADAM10 Cell Surface Expression but Not Activity Is Critical for Staphylococcus aureus  $\alpha$ -Hemolysin-Mediated Activation of the NLRP3 Inflammasome in Human Monocytes. *Toxins (Basel)* 8, 95. doi:10.3390/toxins8040095.

## F

---

Fang, Y., Gong, S.-J., Xu, Y.-H., Hambly, B. D., and Bao, S. (2007). Impaired cutaneous wound healing in granulocyte/macrophage colony-stimulating factor knockout mice. *Br J Dermatol* 157, 458–465. doi:10.1111/j.1365-2133.2007.07979.x.

Filipe-Santos, O., Pescher, P., Breart, B., Lippuner, C., Aebischer, T., Glaichenhaus, N., et al. (2009). A Dynamic Map of Antigen Recognition by CD4 T Cells at the Site of Leishmania major Infection. *Cell Host & Microbe* 6, 23–33. doi:10.1016/j.chom.2009.04.014.

Fitzpatrick, F., Humphreys, H., and O’Gara, J. P. (2005). Evidence for icaA/BC-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical isolates. *J Clin Microbiol* 43, 1973–1976. doi:10.1128/JCM.43.4.1973-1976.2005.

Flacher, V., Bouschbacher, M., Verronèse, E., Massacrier, C., Sisirak, V., Berthier-Vergnes, O., et al. (2006). Human Langerhans Cells Express a Specific TLR Profile and Differentially Respond to Viruses and Gram-Positive Bacteria. *The Journal of Immunology* 177, 7959–7967. doi:10.4049/jimmunol.177.11.7959.

Forestier, C., Billard, E., Milon, G., and Gueirard, P. (2017). Unveiling and Characterizing Early Bilateral Interactions between Biofilm and the Mouse Innate Immune System. *Front Microbiol* 8. doi:10.3389/fmicb.2017.02309.



Foster, T. J. (2020). Surface Proteins of *Staphylococcus epidermidis*. *Frontiers in Microbiology* 11, 1829. doi:10.3389/fmicb.2020.01829.

Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K., and Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 49–62. doi:10.1038/nrmicro3161.

Fournier, B., Klier, A., and Rapoport, G. (2001). The two-component system ArlS-ArlR is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 41, 247–261. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02515.x.

Francois, P., Tu Quoc, P. H., Bisognano, C., Kelley, W. L., Lew, D. P., Schrenzel, J., et al. (2003). Lack of biofilm contribution to bacterial colonisation in an experimental model of foreign body infection by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 35, 135–140. doi:10.1016/S0928-8244(02)00463-7.

## G

---

Geiger, T., Francois, P., Liebeke, M., Fraunholz, M., Goerke, C., Krismer, B., et al. (2012). The Stringent Response of *Staphylococcus aureus* and Its Impact on Survival after Phagocytosis through the Induction of Intracellular PSMs Expression. *PLoS Pathog* 8, e1003016. doi:10.1371/journal.ppat.1003016.

Geiger, T., Goerke, C., Mainiero, M., Kraus, D., and Wolz, C. (2008). The Virulence Regulator Sae of *Staphylococcus aureus*: Promoter Activities and Response to Phagocytosis-Related Signals. *J. Bacteriol.* 190, 3419–3428. doi:10.1128/JB.01927-07.

Genestier, A.-L., Michallet, M.-C., Prévost, G., Bellot, G., Chalabreysse, L., Peyrol, S., et al. (2005). *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J Clin Invest* 115, 3117–3127. doi:10.1172/JCI22684.

Giese, B., Glowinski, F., Paprotka, K., Dittmann, S., Steiner, T., Sinha, B., et al. (2011). Expression of  $\delta$ -toxin by *Staphylococcus aureus* mediates escape from phago-endosomes of human epithelial and endothelial cells in the presence of  $\beta$ -toxin. *Cellular Microbiology* 13, 316–329. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01538.x.



- Giudice, P. (2020). Skin Infections Caused by *Staphylococcus aureus*. *Acta Derm Venerol* 100, adv00110-215. doi:10.2340/00015555-3466.
- Gnanamani, A., Hariharan, P., and Paul-Satyaseela, M. (2017). *Staphylococcus aureus: Overview of Bacteriology, Clinical Diseases, Epidemiology, Antibiotic Resistance and Therapeutic Approach*. IntechOpen doi:10.5772/67338.
- Gonzalez, R. J. (2019). “An Intradermal Model for *Yersinia pestis* Inoculation,” in *Pathogenic Yersinia: Methods and Protocols* Methods in Molecular Biology., eds. V. Vadyvaloo and M. B. Lawrenz (New York, NY: Springer), 3–15. doi:10.1007/978-1-4939-9541-7\_1.
- Greenlee-Wacker, M. C., Rigby, K. M., Kobayashi, S. D., Porter, A. R., DeLeo, F. R., and Nauseef, W. M. (2014). Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by human neutrophils prevents macrophage efferocytosis and induces programmed necrosis. *J Immunol* 192, 4709–4717. doi:10.4049/jimmunol.1302692.
- Gries, C. M., and Kielian, T. (2017). Staphylococcal Biofilms and Immune Polarization during Prosthetic Joint Infection. *J Am Acad Orthop Surg* 25, S20–S24. doi:10.5435/JAAOS-D-16-00636.
- Gries, C. M., Rivas, Z., Chen, J., and Lo, D. D. (2020). Intravital Multiphoton Examination of Implant-Associated *Staphylococcus aureus* Biofilm Infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10. doi:10.3389/fcimb.2020.574092.
- Grønnemose, R. B., Garde, C., Wassmann, C. S., Klitgaard, J. K., Nielsen, R., Mandrup, S., et al. (2021). Bacteria-host transcriptional response during endothelial invasion by *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep* 11, 6037. doi:10.1038/s41598-021-84050-x.
- Gross, M., Cramton, S. E., Götz, F., and Peschel, A. (2001). Key Role of Teichoic Acid Net Charge in *Staphylococcus aureus* Colonization of Artificial Surfaces. *Infect Immun* 69, 3423–3426. doi:10.1128/IAI.69.5.3423-3426.2001.
- Grosz, M., Kolter, J., Paprotka, K., Winkler, A.-C., Schäfer, D., Chatterjee, S. S., et al. (2014). Cytoplasmic replication of *Staphylococcus aureus* upon phagosomal escape triggered by phenol-soluble modulins  $\alpha$ . *Cell Microbiol* 16, 451–465. doi:10.1111/cmi.12233.
- Gupta, R. K., Luong, T. T., and Lee, C. Y. (2015). RNAIII of the *Staphylococcus aureus* agr system activates global regulator MgrA by stabilizing mRNA. *PNAS* 112, 14036–14041. doi:10.1073/pnas.1509251112.





# H

---

Haag, A. F., Fitzgerald, J. R., and Penadés, J. R. (2019). Staphylococcus aureus in Animals. *Microbiology Spectrum* 7, 7.3.11. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0060-2019.

Hair, P. S., Ward, M. D., Semmes, O. J., Foster, T. J., and Cunnion, K. M. (2008). Staphylococcus aureus clumping factor A binds to complement regulator factor I and increases factor I cleavage of C3b. *J. Infect. Dis.* 198, 125–133. doi:10.1086/588825.

Haller, D., Serrant, P., Granato, D., Schiffrin, E. J., and Blum, S. (2002). Activation of Human NK Cells by Staphylococci and Lactobacilli Requires Cell Contact-Dependent Costimulation by Autologous Monocytes. *Clin Diagn Lab Immunol* 9, 649–657. doi:10.1128/CDLI.9.3.649-657.2002.

Hall-Stoodley, L., and Stoodley, P. (2009). Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* 11, 1034–1043. doi:10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x.

Hanke, M. L., Heim, C. E., Angle, A., Sanderson, S. D., and Kielian, T. (2013). Targeting macrophage activation for the prevention and treatment of Staphylococcus aureus biofilm infections. *J. Immunol.* 190, 2159–2168. doi:10.4049/jimmunol.1202348.

Hanke, M. L., and Kielian, T. (2012). Deciphering mechanisms of staphylococcal biofilm evasion of host immunity. *Front Cell Infect Microbiol* 2. doi:10.3389/fcimb.2012.00062.

Harari, O., and Liao, J. K. (2004). Inhibition of MHC II Gene Transcription by Nitric Oxide and Antioxidants. *Curr Pharm Des* 10, 893–898.

Hardman, C. S., Chen, Y.-L., Salimi, M., Nahler, J., Corridoni, D., Jagielowicz, M., et al. (2021). IL-6 effector function of group 2 innate lymphoid cells (ILC2) is NOD2 dependent. *Sci Immunol* 6, eabe5084. doi:10.1126/sciimmunol.abe5084.

Haupt, K., Reuter, M., van den Elsen, J., Burman, J., Hälbich, S., Richter, J., et al. (2008). The Staphylococcus aureus protein Sbi acts as a complement inhibitor and forms a tripartite complex with host complement Factor H and C3b. *PLoS Pathog* 4, e1000250. doi:10.1371/journal.ppat.1000250.

He, L., Le, K. Y., Khan, B. A., Nguyen, T. H., Hunt, R. L., Bae, J. S., et al. (2019). Resistance to leukocytes ties benefits of quorum-sensing dysfunctionality to biofilm infection. *Nat Microbiol* 4, 1114–1119. doi:10.1038/s41564-019-0413-x.



- Heim, C. E., Bosch, M. E., Yamada, K. J., Aldrich, A. L., Chaudhari, S. S., Klinkebiel, D., et al. (2020). Lactate production by *Staphylococcus aureus* biofilm inhibits HDAC11 to reprogram the host immune response during persistent infection. *Nat Microbiol* 5, 1271–1284. doi:10.1038/s41564-020-0756-3.
- Heim, C. E., Vidlak, D., and Kielian, T. (2015a). Interleukin-10 production by myeloid-derived suppressor cells contributes to bacterial persistence during *Staphylococcus aureus* orthopedic biofilm infection. *J Leukoc Biol* 98, 1003–1013. doi:10.1189/jlb.4VMA0315-125RR.
- Heim, C. E., Vidlak, D., Scherr, T. D., Hartman, C. W., Garvin, K. L., and Kielian, T. (2015b). IL-12 promotes myeloid-derived suppressor cell recruitment and bacterial persistence during *Staphylococcus aureus* orthopedic implant infection. *J Immunol* 194, 3861–3872. doi:10.4049/jimmunol.1402689.
- Heim, C. E., Vidlak, D., Scherr, T. D., Kozel, J. A., Holzapfel, M., Muirhead, D. E., et al. (2014). Myeloid-derived suppressor cells contribute to *Staphylococcus aureus* orthopedic biofilm infection. *J. Immunol.* 192, 3778–3792. doi:10.4049/jimmunol.1303408.
- Heim, C. E., West, S. C., Ali, H., and Kielian, T. (2018). Heterogeneity of Ly6G<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> Myeloid-Derived Suppressor Cell Infiltrates during *Staphylococcus aureus* Biofilm Infection. *Infection and Immunity* 86. doi:10.1128/IAI.00684-18.
- Hobley, L., Harkins, C., MacPhee, C. E., and Stanley-Wall, N. R. (2015). Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiol Rev* 39, 649–669. doi:10.1093/femsre/fuv015.
- Hoffmann, J. P., Friedman, J. K., Wang, Y., McLachlan, J. B., Sammarco, M. C., Morici, L. A., et al. (2020). In situ Treatment With Novel Microbiocide Inhibits Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in a Murine Wound Infection Model. *Front Microbiol* 10, 3106. doi:10.3389/fmicb.2019.03106.
- Høiby, N., Krogh Johansen, H., Moser, C., Song, Z., Ciofu, O., and Kharazmi, A. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. *Microbes and Infection* 3, 23–35. doi:10.1016/S1286-4579(00)01349-6.
- Honda, T., Egawa, G., and Kabashima, K. (2019). Antigen presentation and adaptive immune responses in skin. *International Immunology* 31, 423–429. doi:10.1093/intimm/dxz005.



Horn, J., Stelzner, K., Rudel, T., and Fraunholz, M. (2018). Inside job: Staphylococcus aureus host-pathogen interactions. *International Journal of Medical Microbiology* 308, 607–624. doi:10.1016/j.ijmm.2017.11.009.

Houston, P., Rowe, S. E., Pozzi, C., Waters, E. M., and O’Gara, J. P. (2011). Essential Role for the Major Autolysin in the Fibronectin-Binding Protein-Mediated Staphylococcus aureus Biofilm Phenotype. *Infect Immun* 79, 1153–1165. doi:10.1128/IAI.00364-10.

Hruz, P., Zinkernagel, A. S., Jenikova, G., Botwin, G. J., Hugot, J.-P., Karin, M., et al. (2009). NOD2 contributes to cutaneous defense against Staphylococcus aureus through alpha-toxin-dependent innate immune activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12873–12878. doi:10.1073/pnas.0904958106.

Hugues, S., Fetler, L., Bonifaz, L., Helft, J., Amblard, F., and Amigorena, S. (2004). Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity. *Nat Immunol* 5, 1235–1242. doi:10.1038/ni1134.

Imajo, N., Kurihara, D., Fukuishi, N., Inukai, A., Matsushita, S., Noda, S., et al. (2009). Lipoteichoic acid improves the capability of mast cells in the host defense system against bacteria. *Inflamm Res* 58, 797–807. doi:10.1007/s00011-009-0050-6.

## I

---

Iwamoto, K., Moriwaki, M., Miyake, R., and Hide, M. (2019). Staphylococcus aureus in atopic dermatitis: Strain-specific cell wall proteins and skin immunity. *Allergology International* 68, 309–315. doi:10.1016/j.alit.2019.02.006.

## J

---

Janela, B., Patel, A. A., Lau, M. C., Goh, C. C., Msallam, R., Kong, W. T., et al. (2019). A Subset of Type I Conventional Dendritic Cells Controls Cutaneous Bacterial Infections through VEGF $\alpha$ -Mediated Recruitment of Neutrophils. *Immunity* 50, 1069-1083.e8. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.001.

Jean-Marie, G. de travail P. D. de G., coordonateur, infectiologue, Philippe, P. P. B., Travail, P. D. G. D., dermatologue, et al. (2004). Prescription des antibiotiques par voie locale dans les infections cutanées bactériennes primitives et secondaires. *Médecine thérapeutique* 10, 365–368.



Jenul, C., and Horswill, A. R. (2018). Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. *Microbiol Spectr* 6, 10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018.

Jesaitis, A. J., Franklin, M. J., Berglund, D., Sasaki, M., Lord, C. I., Bleazard, J. B., et al. (2003). Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization of neutrophil and biofilm interactions. *J. Immunol.* 171, 4329–4339.

Jong, N. W. M. de, Kessel, K. P. M. van, and Striip, J. A. G. van (2019). Immune Evasion by *Staphylococcus aureus*. *Microbiology Spectrum* 7. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0061-2019.

Jongerius, I., Köhl, J., Pandey, M. K., Ruyken, M., van Kessel, K. P. M., van Striip, J. A. G., et al. (2007). Staphylococcal complement evasion by various convertase-blocking molecules. *J Exp Med* 204, 2461–2471. doi:10.1084/jem.20070818.

## K

---

Kang, M., Ko, Y.-P., Liang, X., Ross, C. L., Liu, Q., Murray, B. E., et al. (2013). Collagen-binding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule (MSCRAMM) of Gram-positive bacteria inhibit complement activation via the classical pathway. *J. Biol. Chem.* 288, 20520–20531. doi:10.1074/jbc.M113.454462.

Karauzum, H., and Datta, S. K. (2017). Adaptive immunity against *Staphylococcus aureus*. *Curr Top Microbiol Immunol* 409, 419–439. doi:10.1007/82\_2016\_1.

Kashem, S. W., Haniffa, M., and Kaplan, D. H. (2017). Antigen-Presenting Cells in the Skin. *Annual Review of Immunology* 35, 469–499. doi:10.1146/annurev-immunol-051116-052215.

Kaya, E., Batoni, G., Di Luca, M., Apolloni, E., Mazzoni, A., Maisetta, G., et al. (2021). Planktonic and Biofilm-Associated *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* Elicit Differential Human Peripheral Blood Cell Responses. *Microorganisms* 9, 1846. doi:10.3390/microorganisms9091846.

Kennedy, C. A., and O’Gara, J. P. (2004). Contribution of culture media and chemical properties of polystyrene tissue culture plates to biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 53, 1171–1173. doi:10.1099/jmm.0.45764-0.





- Kim, B. S. (2015). Innate Lymphoid Cells in the Skin. *Journal of Investigative Dermatology* 135, 673–678. doi:10.1038/jid.2014.401.
- Kim, J.-Y., Sahu, S., Yau, Y.-H., Wang, X., Shochat, S. G., Nielsen, P. H., et al. (2016). Detection of Pathogenic Biofilms with Bacterial Amyloid Targeting Fluorescent Probe, CDy11. *J. Am. Chem. Soc.* 138, 402–407. doi:10.1021/jacs.5b11357.
- Kirker, K. R., James, G. A., Fleckman, P., Olerud, J. E., and Stewart, P. S. (2012). Differential Effects of Planktonic and Biofilm MRSA on Human Fibroblasts. *Wound Repair Regen* 20, 253–261. doi:10.1111/j.1524-475X.2012.00769.x.
- Klein, E. Y., Mojica, N., Jiang, W., Cosgrove, S. E., Septimus, E., Morgan, D. J., et al. (2017). Trends in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Hospitalizations in the United States, 2010-2014. *Clinical Infectious Diseases* 65, 1921–1923. doi:10.1093/cid/cix640.
- Kobayashi, S. D., Braughton, K. R., Palazzolo-Ballance, A. M., Kennedy, A. D., Sampaio, E., Kristosturyan, E., et al. (2010). Rapid neutrophil destruction following phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *J Innate Immun* 2, 560–575. doi:10.1159/000317134.
- Kobayashi, T., Ricardo-Gonzalez, R. R., and Moro, K. (2020). Skin-Resident Innate Lymphoid Cells – Cutaneous Innate Guardians and Regulators. *Trends in Immunology* 41, 100–112. doi:10.1016/j.it.2019.12.004.
- Kolar, S. L., Antonio Ibarra, J., Rivera, F. E., Mootz, J. M., Davenport, J. E., Stevens, S. M., et al. (2013). Extracellular proteases are key mediators of *Staphylococcus aureus* virulence via the global modulation of virulence-determinant stability. *Microbiologyopen* 2, 18–34. doi:10.1002/mbo3.55.
- Koziel, J., Kmiecik, K., Chmiest, D., Maresz, K., Mizgalska, D., Maciag-Gudowska, A., et al. (2013). The role of Mcl-1 in *S. aureus*-induced cytoprotection of infected macrophages. *Mediators Inflamm* 2013, 427021. doi:10.1155/2013/427021.
- Koziel, J., Maciag-Gudowska, A., Mikołajczyk, T., Bzowska, M., Sturdevant, D., Whitney, A., et al. (2009). Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by Macrophages Exerts Cytoprotective Effects Manifested by the Upregulation of Antiapoptotic Factors. *PloS one*. doi:10.1371/journal.pone.0005210.



Kretschmer, D., Gleske, A.-K., Rautenberg, M., Wang, R., Köberle, M., Bohn, E., et al. (2010). Human Formyl Peptide Receptor 2 (FPR2/ALX) Senses Highly Pathogenic *Staphylococcus aureus*. *Cell Host Microbe* 7, 463–473. doi:10.1016/j.chom.2010.05.012.

Krysko, O., Holtappels, G., Zhang, N., Kubica, M., Deswarte, K., Derycke, L., et al. (2011). Alternatively activated macrophages and impaired phagocytosis of *S. aureus* in chronic rhinosinusitis. *Allergy* 66, 396–403. doi:10.1111/j.1398-9995.2010.02498.x.

Kubica, M., Guzik, K., Koziel, J., Zarebski, M., Richter, W., Gajkowska, B., et al. (2008). A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS One* 3, e1409. doi:10.1371/journal.pone.0001409.

Kumar, N. G., Jr, D. C., Wijesinghe, D. S., and Jefferson, K. K. (2021). *Staphylococcus aureus* Lipase 3 (SAL3) is a surface-associated lipase that hydrolyzes short chain fatty acids. *PLOS ONE* 16, e0258106. doi:10.1371/journal.pone.0258106.

Kwiatkowski, P., Wojciuk, B., Wojciechowska-Koszko, I., Łopusiewicz, Ł., Grygorcewicz, B., Pruss, A., et al. (2020). Innate Immune Response against *Staphylococcus aureus* Preincubated with Subinhibitory Concentration of trans-Anethole. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 4178. doi:10.3390/ijms21114178.

## L

---

Laarman, A. J., Mijnheer, G., Mootz, J. M., van Rooijen, W. J. M., Ruyken, M., Malone, C. L., et al. (2012). *Staphylococcus aureus* Staphopain A inhibits CXCR2-dependent neutrophil activation and chemotaxis. *EMBO J* 31, 3607–3619. doi:10.1038/emboj.2012.212.

Lasa, I., and Penadés, J. R. (2006). Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. *Research in Microbiology* 157, 99–107. doi:10.1016/j.resmic.2005.11.003.

Latger-Cannard, V., Besson, I., Doco-Lecompte, T., and Lecompte, T. (2004). A standardized procedure for quantitation of CD11b on polymorphonuclear neutrophil by flow cytometry: potential application in infectious diseases. *Clinical & Laboratory Haematology* 26, 177–186. doi:10.1111/j.1365-2257.2004.00599.x.



- Le, H., Arnoult, C., Dé, E., Schapman, D., Galas, L., Le Cerf, D., et al. (2021). Antibody-Conjugated Nanocarriers for Targeted Antibiotic Delivery: Application in the Treatment of Bacterial Biofilms. *Biomacromolecules* 22, 1639–1653. doi:10.1021/acs.biomac.1c00082.
- Lebre, M. C., Antons, J. C., Kalinski, P., Schuitemaker, J. H. N., van Capel, T. M. M., Kapsenberg, M. L., et al. (2003). Double-stranded RNA-exposed human keratinocytes promote Th1 responses by inducing a Type-1 polarized phenotype in dendritic cells: role of keratinocyte-derived tumor necrosis factor alpha, type I interferons, and interleukin-18. *J Invest Dermatol* 120, 990–997. doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12245.x.
- Leid, J. G., Shirliff, M. E., Costerton, J. W., and Stoodley, P. (2002). Human Leukocytes Adhere to, Penetrate, and Respond to Staphylococcus aureus Biofilms. *Infect Immun* 70, 6339–6345. doi:10.1128/IAI.70.11.6339-6345.2002.
- León, B., López-Bravo, M., and Ardavín, C. (2007). Monocyte-Derived Dendritic Cells Formed at the Infection Site Control the Induction of Protective T Helper 1 Responses against Leishmania. *Immunity* 26, 519–531. doi:10.1016/j.immuni.2007.01.017.
- Lewis, K. (2005). Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Mosc)* 70, 267–274. doi:10.1007/s10541-005-0111-6.
- Lewis, K. (2010). Persister cells. *Annu Rev Microbiol* 64, 357–372. doi:10.1146/annurev.micro.112408.134306.
- Li, J., Zhong, W., Zhang, K., Wang, D., Hu, J., and Chan-Park, M. B. (2020). Biguanide-Derived Polymeric Nanoparticles Kill MRSA Biofilm and Suppress Infection In Vivo. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 12, 21231–21241. doi:10.1021/acsami.9b17747.
- Lister, J. L., and Horswill, A. R. (2014). Staphylococcus aureus biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Front Cell Infect Microbiol* 4. doi:10.3389/fcimb.2014.00178.
- Liu, H., Archer, N. K., Dillen, C. A., Wang, Y., Ashbaugh, A. G., Ortines, R. V., et al. (2017). Staphylococcus aureus Epicutaneous Exposure Drives Skin Inflammation via IL-36-Mediated T Cell Responses. *Cell Host & Microbe* 22, 653-666.e5. doi:10.1016/j.chom.2017.10.006.
- Liu, Q., Mazhar, M., and Miller, L. S. (2018). Immune and Inflammatory Responses to Staphylococcus aureus Skin Infections. *Curr Dermatol Rep* 7, 338–349. doi:10.1007/s13671-018-0235-8.



Löffler, B., Tuscherr, L., Niemann, S., and Peters, G. (2014). Staphylococcus aureus persistence in non-professional phagocytes. *Int J Med Microbiol* 304, 170–176. doi:10.1016/j.ijmm.2013.11.011.

Lowy, F. D. (1998). Staphylococcus aureus infections. *N Engl J Med* 339, 520–532. doi:10.1056/NEJM199808203390806.

Lutz, M. B., Kukutsch, N., Ogilvie, A. L. J., Rößner, S., Koch, F., Romani, N., et al. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of Immunological Methods* 223, 77–92. doi:10.1016/S0022-1759(98)00204-X.

## M

---

Mac-Daniel, L., Buckwalter, M. R., Berthet, M., Virk, Y., Yui, K., Albert, M. L., et al. (2014). Local Immune Response to Injection of Plasmodium Sporozoites into the Skin. *The Journal of Immunology* 193, 1246–1257. doi:10.4049/jimmunol.1302669.

MacLeod, A. S., Hemmers, S., Garijo, O., Chabod, M., Mowen, K., Witherden, D. A., et al. (2013). Dendritic epidermal T cells regulate skin antimicrobial barrier function. *J Clin Invest* 123, 4364–4374. doi:10.1172/JCI70064.

Makhlin, J., Kofman, T., Borovok, I., Kohler, C., Engelmann, S., Cohen, G., et al. (2007). Staphylococcus aureus ArcR Controls Expression of the Arginine Deiminase Operon. *J Bacteriol* 189, 5976–5986. doi:10.1128/JB.00592-07.

Marchitto, M. C., Dillen, C. A., Liu, H., Miller, R. J., Archer, N. K., Ortines, R. V., et al. (2019). Clonal V $\gamma$ 6+V $\delta$ 4+ T cells promote IL-17-mediated immunity against Staphylococcus aureus skin infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 10917–10926. doi:10.1073/pnas.1818256116.

Maretzky, T., Scholz, F., Köten, B., Proksch, E., Saftig, P., and Reiss, K. (2008). ADAM10-Mediated E-Cadherin Release Is Regulated by Proinflammatory Cytokines and Modulates Keratinocyte Cohesion in Eczematous Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology* 128, 1737–1746. doi:10.1038/sj.jid.5701242.

Marino-Marmolejo, E. N., Flores-Hernández, F. Y., Flores-Valdez, M. A., García-Morales, L. F., González-Villegas, A. C., and Bravo-Madrigal, J. (2016). A quantitative model for dermal





infection and oedema in BALB/c mice pinna. *BMC Microbiol* 16, 290. doi:10.1186/s12866-016-0907-0.

Markel, D. C., Bergum, C., Wu, B., Bou-Akl, T., and Ren, W. (2019). Does Suture Type Influence Bacterial Retention and Biofilm Formation After Irrigation in a Mouse Model? *Clin Orthop Relat Res* 477, 116–126. doi:10.1097/CORR.0000000000000391.

Mashruwala, A. A., and Boyd, J. M. (2017). The Staphylococcus aureus SrrAB Regulatory System Modulates Hydrogen Peroxide Resistance Factors, Which Imparts Protection to Aconitase during Aerobic Growth. *PLoS One* 12, e0170283. doi:10.1371/journal.pone.0170283.

Mashruwala, A. A., Guchte, A. van de, and Boyd, J. M. (2017). Impaired respiration elicits SrrAB-dependent programmed cell lysis and biofilm formation in Staphylococcus aureus. *Elife* 6, e23845. doi:10.7554/eLife.23845.

Mathers, A. R., Janelins, B. M., Rubin, J. P., Tkacheva, O. A., Shufesky, W. J., Watkins, S. C., et al. (2009). Differential capability of human cutaneous dendritic cell subsets to initiate Th17 responses. *J Immunol* 182, 921–933. doi:10.4049/jimmunol.182.2.921.

Mauri, C., and Bosma, A. (2012). Immune Regulatory Function of B Cells. *Annual Review of Immunology* 30, 221–241. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074934.

McLoughlin, R. M., Solinga, R. M., Rich, J., Zaleski, K. J., Cocchiaro, J. L., Risley, A., et al. (2006). CD4+ T cells and CXC chemokines modulate the pathogenesis of Staphylococcus aureus wound infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10408–10413. doi:10.1073/pnas.0508961103.

McSharry, B. P., and Gardiner, C. M. (2010). “The Role of NK Cells in Bacterial Infections,” in *Natural Killer Cells: At the Forefront of Modern Immunology*, ed. J. Zimmer (Berlin, Heidelberg: Springer), 153–175. doi:10.1007/978-3-642-02309-5\_7.

Melehani, J. H., and Duncan, J. A. (2016). Inflammasome activation can mediate tissue-specific pathogenesis or protection in S. aureus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 397, 257–282. doi:10.1007/978-3-319-41171-2\_13.

Merino, N., Toledo-Arana, A., Vergara-Irigaray, M., Valle, J., Solano, C., Calvo, E., et al. (2009). Protein A-mediated multicellular behavior in Staphylococcus aureus. *J. Bacteriol.* 191, 832–843. doi:10.1128/JB.01222-08.



- Mestre, M. B., Fader, C. M., Sola, C., and Colombo, M. I. (2010).  $\alpha$ -hemolysin is required for the activation of the autophagic pathway in *Staphylococcus aureus* infected cells. *Autophagy* 6, 110–125. doi:10.4161/auto.6.1.10698.
- Michea, P., Vargas, P., Donnadieu, M.-H., Roseblatt, M., Bono, M. R., Duménil, G., et al. (2013). Epithelial control of the human pDC response to extracellular bacteria. *Eur J Immunol* 43, 1264–1273. doi:10.1002/eji.201242990.
- Miller, L. S., and Cho, J. S. (2011). Immunity against *Staphylococcus aureus* cutaneous infections. *Nat Rev Immunol* 11, 505–518. doi:10.1038/nri3010.
- Miller, L. S., O’Connell, R. M., Gutierrez, M. A., Pietras, E. M., Shahangian, A., Gross, C. E., et al. (2006). MyD88 mediates neutrophil recruitment initiated by IL-1R but not TLR2 activation in immunity against *Staphylococcus aureus*. *Immunity* 24, 79–91. doi:10.1016/j.immuni.2005.11.011.
- Miller, L. S., Pietras, E. M., Uricchio, L. H., Hirano, K., Rao, S., Lin, H., et al. (2007). Inflammasome-Mediated Production of IL-1 $\beta$  Is Required for Neutrophil Recruitment against *Staphylococcus aureus* In Vivo. *The Journal of Immunology* 179, 6933–6942. doi:10.4049/jimmunol.179.10.6933.
- Miller, R. J., Crosby, H. A., Schilcher, K., Wang, Y., Ortines, R. V., Mazhar, M., et al. (2019). Development of a *Staphylococcus aureus* reporter strain with click beetle red luciferase for enhanced in vivo imaging of experimental bacteremia and mixed infections. *Sci Rep* 9, 16663. doi:10.1038/s41598-019-52982-0.
- Mirza, R., DiPietro, L. A., and Koh, T. J. (2009). Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. *Am J Pathol* 175, 2454–2462. doi:10.2353/ajpath.2009.090248.
- Mölkänen, T., Tyynelä, J., Helin, J., Kalkkinen, N., and Kuusela, P. (2002). Enhanced activation of bound plasminogen on *Staphylococcus aureus* by staphylokinase. *FEBS Letters* 517, 72–78. doi:10.1016/S0014-5793(02)02580-2.
- Monie, T. P. (2017a). “Section 1 - A Snapshot of the Innate Immune System,” in *The Innate Immune System*, ed. T. P. Monie (Academic Press), 1–40. doi:10.1016/B978-0-12-804464-3.00001-6.



Monie, T. P. (2017b). “Section 3 - Effector Mechanisms and Cellular Outputs,” in *The Innate Immune System*, ed. T. P. Monie (Academic Press), 83–119. doi:10.1016/B978-0-12-804464-3.00003-X.

Montgomery, C. P., Daniels, M., Zhao, F., Alegre, M.-L., Chong, A. S., and Daum, R. S. (2014). Protective Immunity against Recurrent *Staphylococcus aureus* Skin Infection Requires Antibody and Interleukin-17A. *Infection and Immunity* 82, 2125–2134. doi:10.1128/IAI.01491-14.

Moormeier, D. E., and Bayles, K. W. (2017). *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Mol. Microbiol.* 104, 365–376. doi:10.1111/mmi.13634.

Moormeier, D. E., Bose, J. L., Horswill, A. R., and Bayles, K. W. (2014). Temporal and stochastic control of *Staphylococcus aureus* biofilm development. *mBio* 5, e01341-01314. doi:10.1128/mBio.01341-14.

Morin-Zorman, S., Wysocki, C., Zhu, J., Li, H., Zorman, S., Matte-Martone, C., et al. (2019). In vivo dynamics of T cells and their interactions with dendritic cells in mouse cutaneous graft-versus-host disease. *Blood Adv* 3, 2082–2092. doi:10.1182/bloodadvances.2019000227.

Motani, K., Kushiya, H., Imamura, R., Kinoshita, T., Nishiuchi, T., and Suda, T. (2011). Caspase-1 Protein Induces Apoptosis-associated Speck-like Protein Containing a Caspase Recruitment Domain (ASC)-mediated Necrosis Independently of Its Catalytic Activity. *J Biol Chem* 286, 33963–33972. doi:10.1074/jbc.M111.286823.

Mulcahy, M. E., O’Brien, E. C., O’Keeffe, K. M., Voza, E. G., Leddy, N., and McLoughlin, R. M. (2020). Manipulation of Autophagy and Apoptosis Facilitates Intracellular Survival of *Staphylococcus aureus* in Human Neutrophils. *Front Immunol* 11, 565545. doi:10.3389/fimmu.2020.565545.

## N

---

Nakagawa, S., Matsumoto, M., Katayama, Y., Oguma, R., Wakabayashi, S., Nygaard, T., et al. (2017). *Staphylococcus aureus* virulent PSM $\alpha$  peptides induce keratinocyte alarmin release to orchestrate IL-17-dependent skin inflammation. *Cell Host Microbe* 22, 667-677.e5. doi:10.1016/j.chom.2017.10.008.



Neumann, Y., Bruns, S. A., Rohde, M., Prajsnar, T. K., Foster, Simon. J., and Schmitz, I. (2016). Intracellular *Staphylococcus aureus* eludes selective autophagy by activating a host cell kinase. *Autophagy* 12, 2069–2084. doi:10.1080/15548627.2016.1226732.

Nguyen, A. V., and Soulika, A. M. (2019). The Dynamics of the Skin's Immune System. *Int J Mol Sci* 20, 1811. doi:10.3390/ijms20081811.

Nguyen, H. T. T., Nguyen, T. H., and Otto, M. (2020). The staphylococcal exopolysaccharide PIA – Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. *Comput Struct Biotechnol J* 18, 3324–3334. doi:10.1016/j.csbj.2020.10.027.

Niebuhr, M., Baumert, K., and Werfel, T. (2010). TLR-2-mediated cytokine and chemokine secretion in human keratinocytes. *Experimental Dermatology* 19, 873–877. doi:10.1111/j.1600-0625.2010.01140.x.

## O

---

O'Brien, R. L., and Born, W. K. (2015). Dermal  $\gamma\delta$  T Cells – What Have We Learned? *Cell Immunol* 296, 62–69. doi:10.1016/j.cellimm.2015.01.011.

Olaru, F., and Jensen, L. E. (2010). *Staphylococcus aureus* stimulates neutrophil targeting chemokine expression in keratinocytes through an autocrine IL-1 $\alpha$  signaling loop. *J Invest Dermatol* 130, 1866–1876. doi:10.1038/jid.2010.37.

OLENDER, A., BOGUT, A., MAGRYŚ, A., and TABARKIEWICZ, J. (2019). Cytokine Levels in the In Vitro Response of T Cells to Planktonic and Biofilm *Corynebacterium amycolatum*. *Pol J Microbiol* 68, 457–464. doi:10.33073/pjm-2019-045.

Oliveira, D., Borges, A., and Simões, M. (2018). *Staphylococcus aureus* Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. *Toxins (Basel)* 10, 252. doi:10.3390/toxins10060252.

Oppermann, M. (2004). Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. *Cellular Signalling* 16, 1201–1210. doi:10.1016/j.cellsig.2004.04.007.

O'Riordan, K., and Lee, J. C. (2004). *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. *Clin Microbiol Rev* 17, 218–234. doi:10.1128/CMR.17.1.218-234.2004.





Osipovitch, D. C., Therrien, S., and Griswold, K. E. (2015). Discovery of novel *S. aureus* autolysins and molecular engineering to enhance bacteriolytic activity. *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 6315–6326. doi:10.1007/s00253-015-6443-2.

Otter, J. A., and French, G. L. (2010). Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Lancet Infect Dis* 10, 227–239. doi:10.1016/S1473-3099(10)70053-0.

Otto, M. (2014). *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr Opin Microbiol* 0, 32–37. doi:10.1016/j.mib.2013.11.004.

## P

---

P R, V., and M, J. (2013). A Comparative Analysis of Community Acquired and Hospital Acquired Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus*. *J Clin Diagn Res* 7, 1339–1342. doi:10.7860/JCDR/2013/5302.3139.

Parcina, M., Wendt, C., Goetz, F., Zawatzky, R., Zähringer, U., Heeg, K., et al. (2008). *Staphylococcus aureus*-induced plasmacytoid dendritic cell activation is based on an IgG-mediated memory response. *J Immunol* 181, 3823–3833. doi:10.4049/jimmunol.181.6.3823.

Peng, K.-T., Hsieh, C.-C., Huang, T.-Y., Chen, P.-C., Shih, H.-N., Lee, M. S., et al. (2017). *Staphylococcus aureus* biofilm elicits the expansion, activation and polarization of myeloid-derived suppressor cells in vivo and in vitro. *PLoS One* 12, e0183271. doi:10.1371/journal.pone.0183271.

Peng, Z., Cao, D.-Y., Wu, H.-Y., and Saito, S. (2020). Immunization with a Bacterial Lipoprotein Establishes an Immuno-Protective Response with Upregulation of Effector CD4+ T Cells and Neutrophils Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Pathogens* 9, 138. doi:10.3390/pathogens9020138.

Periasamy, S., Joo, H.-S., Duong, A. C., Bach, T.-H. L., Tan, V. Y., Chatterjee, S. S., et al. (2012). How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 1281–1286. doi:10.1073/pnas.1115006109.

Peschel, A., and Otto, M. (2013). Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nat Rev Microbiol* 11, 667–673. doi:10.1038/nrmicro3110.



- Peters, N. C., Egen, J. G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., et al. (2008). In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 321, 970–974. doi:10.1126/science.1159194.
- Pidwill, G. R., Gibson, J. F., Cole, J., Renshaw, S. A., and Foster, S. J. (2021). The Role of Macrophages in *Staphylococcus aureus* Infection. *Front Immunol* 11, 620339. doi:10.3389/fimmu.2020.620339.
- Pietka, W., Khnykin, D., Bertelsen, V., Lossius, A. H., Stav-Noraas, T. E., Hol Fosse, J., et al. (2019). Hypo-osmotic Stress Drives IL-33 Production in Human Keratinocytes-An Epidermal Homeostatic Response. *J Invest Dermatol* 139, 81–90. doi:10.1016/j.jid.2018.07.023.
- Pietrocola, G., Arciola, C. R., Rindi, S., Di Poto, A., Missineo, A., Montanaro, L., et al. (2011). Toll-like receptors (TLRs) in innate immune defense against *Staphylococcus aureus*. *Int J Artif Organs* 34, 799–810. doi:10.5301/ijao.5000030.
- Podolnikova, N. P., Podolnikov, A. V., Haas, T. A., Lishko, V. K., and Ugarova, T. P. (2015). Ligand Recognition Specificity of Leukocyte Integrin  $\alpha M\beta 2$  (Mac-1, CD11b/CD18) and Its Functional Consequences. *Biochemistry* 54, 1408–1420. doi:10.1021/bi5013782.
- Polak, M. E., Thirdborough, S. M., Ung, C. Y., Elliott, T., Healy, E., Freeman, T. C., et al. (2014). Distinct Molecular Signature of Human Skin Langerhans Cells Denotes Critical Differences in Cutaneous Dendritic Cell Immune Regulation. *J Invest Dermatol* 134, 695–703. doi:10.1038/jid.2013.375.
- Poulakou, G., Lagou, S., and Tsiodras, S. (2019). What's new in the epidemiology of skin and soft tissue infections in 2018? *Curr Opin Infect Dis* 32, 77–86. doi:10.1097/QCO.0000000000000527.
- Prabhakara, R., Foreman, O., De Pascalis, R., Lee, G. M., Plaut, R. D., Kim, S. Y., et al. (2013). Epicutaneous Model of Community-Acquired *Staphylococcus aureus* Skin Infections. *Infect Immun* 81, 1306–1315. doi:10.1128/IAI.01304-12.
- Prabhakara, R., Harro, J. M., Leid, J. G., Harris, M., and Shirtliff, M. E. (2011a). Murine Immune Response to a Chronic *Staphylococcus aureus* Biofilm Infection. *Infect Immun* 79, 1789–1796. doi:10.1128/IAI.01386-10.
- Prabhakara, R., Harro, J. M., Leid, J. G., Keegan, A. D., Prior, M. L., and Shirtliff, M. E. (2011b). Suppression of the Inflammatory Immune Response Prevents the Development of



Chronic Biofilm Infection Due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ▽. *Infect Immun* 79, 5010–5018. doi:10.1128/IAI.05571-11.

Prens, E. P., Kant, M., van Dijk, G., van der Wel, L. I., Mourits, S., and van der Fits, L. (2008). IFN- $\alpha$  enhances poly-IC responses in human keratinocytes by inducing expression of cytosolic innate RNA receptors: relevance for psoriasis. *J Invest Dermatol* 128, 932–938. doi:10.1038/sj.jid.5701087.

## Q

---

Quaresma, J. A. S. (2019). Organization of the Skin Immune System and Compartmentalized Immune Responses in Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev* 32, e00034-18. doi:10.1128/CMR.00034-18.

## R

---

Raff, A. B., and Kroshinsky, D. (2016). Cellulitis: A Review. *JAMA* 316, 325–337. doi:10.1001/jama.2016.8825.

Rani, S. A., Pitts, B., Beyenal, H., Veluchamy, R. A., Lewandowski, Z., Davison, W. M., et al. (2007). Spatial Patterns of DNA Replication, Protein Synthesis, and Oxygen Concentration within Bacterial Biofilms Reveal Diverse Physiological States. *J Bacteriol* 189, 4223–4233. doi:10.1128/JB.00107-07.

Resch, A., Rosenstein, R., Nerz, C., and Götz, F. (2005). Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2663–2676. doi:10.1128/AEM.71.5.2663-2676.2005.

Richardson, A. R., Libby, S. J., and Fang, F. C. (2008). A nitric oxide-inducible lactate dehydrogenase enables *Staphylococcus aureus* to resist innate immunity. *Science* 319, 1672–1676. doi:10.1126/science.1155207.

Rivoltini, L., Carrabba, M., Huber, V., Castelli, C., Novellino, L., Dalerba, P., et al. (2002). Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte–tumor cell interaction. *Immunological Reviews* 188, 97–113. doi:10.1034/j.1600-065X.2002.18809.x.



Roche, F. M., Massey, R., Peacock, S. J., Day, N. P. J., Visai, L., Speziale, P., et al. (2003). Characterization of novel LPXTG-containing proteins of *Staphylococcus aureus* identified from genome sequences. *Microbiology (Reading)* 149, 643–654. doi:10.1099/mic.0.25996-0.

Rodríguez, P. C., and Ochoa, A. C. (2008). Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol Rev* 222, 180–191. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00608.x.

Rodriguez, P. C., Zea, A. H., Culotta, K. S., Zabaleta, J., Ochoa, J. B., and Ochoa, A. C. (2002). Regulation of T Cell Receptor CD3 $\zeta$  Chain Expression by l-Arginine \*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 21123–21129. doi:10.1074/jbc.M110675200.

Rooijackers, S. H. M., Ruyken, M., Roos, A., Daha, M. R., Presanis, J. S., Sim, R. B., et al. (2005a). Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nat Immunol* 6, 920–927. doi:10.1038/ni1235.

Rooijackers, S. H. M., Ruyken, M., Van Roon, J., Van Kessel, K. P. M., Van Strijp, J. A. G., and Van Wamel, W. J. B. (2006). Early expression of SCIN and CHIPS drives instant immune evasion by *Staphylococcus aureus*. *Cellular Microbiology* 8, 1282–1293. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00709.x.

Rooijackers, S. H. M., van Wamel, W. J. B., Ruyken, M., van Kessel, K. P. M., and van Strijp, J. a. G. (2005b). Anti-opsonic properties of staphylokinase. *Microbes Infect* 7, 476–484. doi:10.1016/j.micinf.2004.12.014.

## S

---

Saïd-Salim, B., Dunman, P. M., McAleese, F. M., Macapagal, D., Murphy, E., McNamara, P. J., et al. (2003). Global Regulation of *Staphylococcus aureus* Genes by Rot. *J Bacteriol* 185, 610–619. doi:10.1128/JB.185.2.610-619.2003.

Salzer, A., Keinhörster, D., Kästle, C., Kästle, B., and Wolz, C. (2020). Small Alarmone Synthetases RelP and RelQ of *Staphylococcus aureus* Are Involved in Biofilm Formation and Maintenance Under Cell Wall Stress Conditions. *Frontiers in Microbiology* 11, 2286. doi:10.3389/fmicb.2020.575882.





- Sargison, F., Goncheva, M. I., Alves, J., Pickering, A., and Fitzgerald, J. R. (2021). Staphylococcus aureus secreted lipases do not inhibit innate immune killing mechanisms. *Wellcome Open Res* 5, 286. doi:10.12688/wellcomeopenres.16194.2.
- Sassi, M., Felden, B., and Augagneur, Y. (2014). Draft Genome Sequence of Staphylococcus aureus subsp. aureus Strain HG003, an NCTC8325 Derivative. *Genome Announc* 2, e00855-14. doi:10.1128/genomeA.00855-14.
- Sauvat, L., Hamid, A. I. A., Blavignac, C., Josse, J., Lesens, O., and Gueirard, P. (2020). Biofilm-coated microbeads and the mouse ear skin: An innovative model for analysing anti-biofilm immune response in vivo. *PLOS ONE* 15, e0243500. doi:10.1371/journal.pone.0243500.
- Schulz, A., Jiang, L., Vor, L. de, Ehrström, M., Wermeling, F., Eidsmo, L., et al. (2019). Neutrophil Recruitment to Noninvasive MRSA at the Stratum Corneum of Human Skin Mediates Transient Colonization. *Cell Reports* 29, 1074-1081.e5. doi:10.1016/j.celrep.2019.09.055.
- Schwartz, K., and Boles, B. R. (2013). Microbial Amyloids—functions and interactions within the host. *Curr Opin Microbiol* 16, 93–99. doi:10.1016/j.mib.2012.12.001.
- Schwartz, K., Ganesan, M., Payne, D. E., Solomon, M. J., and Boles, B. R. (2016). Extracellular DNA facilitates the formation of functional amyloids in Staphylococcus aureus biofilms. *Mol Microbiol* 99, 123–134. doi:10.1111/mmi.13219.
- Secor, P. R., James, G. A., Fleckman, P., Olerud, J. E., McInnerney, K., and Stewart, P. S. (2011). Staphylococcus aureus Biofilm and Planktonic cultures differentially impact gene expression, mapk phosphorylation, and cytokine production in human keratinocytes. *BMC Microbiol* 11, 143. doi:10.1186/1471-2180-11-143.
- Seebach, E., and Kubatzky, K. F. (2019). Chronic Implant-Related Bone Infections—Can Immune Modulation be a Therapeutic Strategy? *Frontiers in Immunology* 10, 1724. doi:10.3389/fimmu.2019.01724.
- Seilie, E. S., and Wardenburg, J. B. (2017). Staphylococcus aureus pore-forming toxins: the interface of pathogen and host complexity. *Semin Cell Dev Biol* 72, 101–116. doi:10.1016/j.semdb.2017.04.003.



- Serbina, N. V., Salazar-Mather, T. P., Biron, C. A., Kuziel, W. A., and Pamer, E. G. (2003). TNF/iNOS-Producing Dendritic Cells Mediate Innate Immune Defense against Bacterial Infection. *Immunity* 19, 59–70. doi:10.1016/S1074-7613(03)00171-7.
- Sharp, J. A., Echague, C. G., Hair, P. S., Ward, M. D., Nyalwidhe, J. O., Geoghegan, J. A., et al. (2012). Staphylococcus aureus surface protein SdrE binds complement regulator factor H as an immune evasion tactic. *PLoS ONE* 7, e38407. doi:10.1371/journal.pone.0038407.
- Shompole, S., Henon, K. T., Liou, L. E., Dziwanowska, K., Bohach, G. A., and Bayles, K. W. (2003). Biphasic intracellular expression of Staphylococcus aureus virulence factors and evidence for Agr-mediated diffusion sensing. *Molecular Microbiology* 49, 919–927. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03618.x.
- Shook, B., Xiao, E., Kumamoto, Y., Iwasaki, A., and Horsley, V. (2016). CD301b+ Macrophages Are Essential for Effective Skin Wound Healing. *J Invest Dermatol* 136, 1885–1891. doi:10.1016/j.jid.2016.05.107.
- Singh, R., Ray, P., Das, A., and Sharma, M. (2010). Penetration of antibiotics through Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65, 1955–1958. doi:10.1093/jac/dkq257.
- Soong, G., Chun, J., Parker, D., and Prince, A. (2012). Staphylococcus aureus Activation of Caspase 1/Calpain Signaling Mediates Invasion Through Human Keratinocytes. *J Infect Dis* 205, 1571–1579. doi:10.1093/infdis/jis244.
- Spaan, A. N., Reyes-Robles, T., Badiou, C., Cochet, S., Boguslawski, K. M., Yoong, P., et al. (2015). Staphylococcus aureus targets the Duffy antigen receptor for chemokines (DARC) to lyse erythrocytes. *Cell Host Microbe* 18, 363–370. doi:10.1016/j.chom.2015.08.001.
- Spaan, A. N., Surewaard, B. G. J., Nijland, R., and Striip, J. A. G. van (2013). Neutrophils Versus Staphylococcus aureus: A Biological Tug of War. *Annual Review of Microbiology* 67, 629–650. doi:10.1146/annurev-micro-092412-155746.
- Spaan, A. N., van Striip, J. A. G., and Torres, V. J. (2017). Leukocidins: Staphylococcal bi-component pore-forming toxins find their receptors. *Nat Rev Microbiol* 15, 435–447. doi:10.1038/nrmicro.2017.27.
- Spiliopoulou, A. I., Kolonitsiou, F., Krevvata, M. I., Leontsinidis, M., Wilkinson, T. S., Mack, D., et al. (2012). Bacterial adhesion, intracellular survival and cytokine induction upon



stimulation of mononuclear cells with planktonic or biofilm phase *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett* 330, 56–65. doi:10.1111/j.1574-6968.2012.02533.x.

Strobel, M., Pfortner, H., Tuchscher, L., Völker, U., Schmidt, F., Kramko, N., et al. (2016). 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* 22, 799–809. doi:10.1016/j.cmi.2016.06.020.

Sultan, A. R., Hoppenbrouwers, T., Lemmens-den Toom, N. A., Snijders, S. V., van Neck, J. W., Verbon, A., et al. (2019). During the Early Stages of *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation, Induced Neutrophil Extracellular Traps Are Degraded by Autologous Thermonuclease. *Infect Immun* 87. doi:10.1128/IAI.00605-19.

Sultan, A. R., Swierstra, J. W., Lemmens-den Toom, N. A., Snijders, S. V., Hansenová Maňásková, S., Verbon, A., et al. (2018). Production of Staphylococcal Complement Inhibitor (SCIN) and Other Immune Modulators during the Early Stages of *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation in a Mammalian Cell Culture Medium. *Infect Immun* 86, e00352-18. doi:10.1128/IAI.00352-18.

Supajatura, V., Ushio, H., Nakao, A., Akira, S., Okumura, K., Ra, C., et al. (2002). Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J Clin Invest* 109, 1351–1359. doi:10.1172/JCI14704.

Surewaard, B. G. J., Deniset, J. F., Zemp, F. J., Amrein, M., Otto, M., Conly, J., et al. (2016). Identification and treatment of the *Staphylococcus aureus* reservoir in vivo. *J Exp Med* 213, 1141–1151. doi:10.1084/jem.20160334.

## T

---

Takashima, A., Matsue, H., Bergstresser, P. R., and Ariizumi, K. (1995). Interleukin-7-dependent interaction of dendritic epidermal T cells with keratinocytes. *J Invest Dermatol* 105, 50S-53S. doi:10.1111/1523-1747.ep12315288.

Talan, D. A., Krishnadasan, A., Gorwitz, R. J., Fosheim, G. E., Limbago, B., Albrecht, V., et al. (2011). Comparison of *Staphylococcus aureus* from skin and soft-tissue infections in US emergency department patients, 2004 and 2008. *Clin Infect Dis* 53, 144–149. doi:10.1093/cid/cir308.



- Tang, S.-C., Liao, P.-Y., Hung, S.-J., Ge, J.-S., Chen, S.-M., Lai, J.-C., et al. (2017). Topical application of glycolic acid suppresses the UVB induced IL-6, IL-8, MCP-1 and COX-2 inflammation by modulating NF- $\kappa$ B signaling pathway in keratinocytes and mice skin. *J Dermatol Sci* 86, 238–248. doi:10.1016/j.jdermsci.2017.03.004.
- Tasse, J., Cara, A., Saglio, M., Villet, R., and Laurent, F. (2018). A steam-based method to investigate biofilm. *Sci Rep* 8, 13040. doi:10.1038/s41598-018-31437-y.
- Theilgaard-Mönch, K., Knudsen, S., Follin, P., and Borregaard, N. (2004). The transcriptional activation program of human neutrophils in skin lesions supports their important role in wound healing. *J Immunol* 172, 7684–7693. doi:10.4049/jimmunol.172.12.7684.
- Thomer, L., Schneewind, O., and Missiakas, D. (2016). Pathogenesis of Staphylococcus aureus Bloodstream Infections. *Annu Rev Pathol* 11, 343–364. doi:10.1146/annurev-pathol-012615-044351.
- Thurlow, L. R., Hanke, M. L., Fritz, T., Angle, A., Aldrich, A., Williams, S. H., et al. (2011). Staphylococcus aureus biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation in vivo. *J. Immunol.* 186, 6585–6596. doi:10.4049/jimmunol.1002794.
- Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., and Fowler, V. G. (2015). Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clin Microbiol Rev* 28, 603–661. doi:10.1128/CMR.00134-14.
- Tordesillas, L., Lozano-Ojalvo, D., Dunkin, D., Mondoulet, L., Agudo, J., Merad, M., et al. (2018). PDL2+ CD11b+ dermal dendritic cells capture topical antigen through hair follicles to prime LAP+ Tregs. *Nat Commun* 9, 5238. doi:10.1038/s41467-018-07716-7.
- Trotonda, M. P., Manna, A. C., Cheung, A. L., Lasa, I., and Penadés, J. R. (2005). SarA Positively Controls Bap-Dependent Biofilm Formation in Staphylococcus aureus. *J Bacteriol* 187, 5790–5798. doi:10.1128/JB.187.16.5790-5798.2005.
- Tsepkolenko, A., Tsepkolenko, V., Dash, S., Mishra, A., Bader, A., Melerzanov, A., et al. (2019). The regenerative potential of skin and the immune system. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 12, 519–532. doi:10.2147/CCID.S196364.
- Tuscherr, L., Bischoff, M., Lattar, S. M., Noto Llana, M., Pfortner, H., Niemann, S., et al. (2015). Sigma Factor SigB Is Crucial to Mediate Staphylococcus aureus Adaptation during Chronic Infections. *PLoS Pathog* 11, e1004870. doi:10.1371/journal.ppat.1004870.





## U

---

Uy Gonzales, K. A., and Fuchs, E. (2017). Skin and Its Regenerative Powers: An Alliance between Stem Cells and Their Niche. *Dev Cell* 43, 387–401. doi:10.1016/j.devcel.2017.10.001.

## V

---

Valle-Noguera, A., Ochoa-Ramos, A., Gomez-Sánchez, M. J., and Cruz-Adalia, A. (2021). Type 3 Innate Lymphoid Cells as Regulators of the Host-Pathogen Interaction. *Frontiers in Immunology* 12, 4021. doi:10.3389/fimmu.2021.748851.

van Dalen, R., De La Cruz Diaz, J. S., Rumpret, M., Fuchsberger, F. F., van Teijlingen, N. H., Hanske, J., et al. (2019). Langerhans Cells Sense Staphylococcus aureus Wall Teichoic Acid through Langerin To Induce Inflammatory Responses. *mBio* 10, e00330-19. doi:10.1128/mBio.00330-19.

Van Ziffle, J. A., and Lowell, C. A. (2009). Neutrophil-specific deletion of Syk kinase results in reduced host defense to bacterial infection. *Blood* 114, 4871–4882. doi:10.1182/blood-2009-05-220806.

Vanassche, T., Peetermans, M., Van Aelst, L. N. L., Peetermans, W. E., Verhaegen, J., Missiakas, D. M., et al. (2013). The role of staphylothrombin-mediated fibrin deposition in catheter-related Staphylococcus aureus infections. *J Infect Dis* 208, 92–100. doi:10.1093/infdis/jit130.

Ventola C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*, 40(4), 277–283.

Vitko, N. P., Spahich, N. A., and Richardson, A. R. (2015). Glycolytic dependency of high-level nitric oxide resistance and virulence in Staphylococcus aureus. *mBio* 6, e00045-15. doi:10.1128/mBio.00045-15.

Vollmer, W., Blanot, D., and De Pedro, M. A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews* 32, 149–167. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x.

Vor, L. de, Rooijackers, S. H. M., and Strijp, J. A. G. van (2020). Staphylococci evade the innate immune response by disarming neutrophils and forming biofilms. *FEBS Letters* 594, 2556–2569. doi:https://doi.org/10.1002/1873-3468.13767.



Vozza, E. G., Mulcahy, M. E., and McLoughlin, R. M. (2021). Making the Most of the Host; Targeting the Autophagy Pathway Facilitates *Staphylococcus aureus* Intracellular Survival in Neutrophils. *Front Immunol* 12, 667387. doi:10.3389/fimmu.2021.667387.

## W

Wang, B., Yao, Y., Wei, P., Song, C., Wan, S., Yang, S., et al. (2021). Housefly Phormicin inhibits *Staphylococcus aureus* and MRSA by disrupting biofilm formation and altering gene expression in vitro and in vivo. *International Journal of Biological Macromolecules* 167, 1424–1434. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.11.096.

Wang, R., Braughton, K. R., Kretschmer, D., Bach, T.-H. L., Queck, S. Y., Li, M., et al. (2007). Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat Med* 13, 1510–1514. doi:10.1038/nm1656.

Wang, Y., Szretter, K. J., Vermi, W., Gilfillan, S., Rossini, C., Cella, M., et al. (2012). IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat Immunol* 13, 753–760. doi:10.1038/ni.2360.

Weinrick, B., Dunman, P. M., McAleese, F., Murphy, E., Projan, S. J., Fang, Y., et al. (2004). Effect of mild acid on gene expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 186, 8407–8423. doi:10.1128/JB.186.24.8407-8423.2004.

Williams, M. R., Costa, S. K., Zaramela, L. S., Khalil, S., Todd, D. A., Winter, H. L., et al. (2019). Quorum sensing between bacterial species on the skin protects against epidermal injury in atopic dermatitis. *Sci Transl Med* 11, eaat8329. doi:10.1126/scitranslmed.aat8329.

Woehl, J. L., Stapels, D. A. C., Garcia, B. L., Ramyar, K. X., Keightley, A., Ruyken, M., et al. (2014). The Extracellular Adherence Protein from *Staphylococcus aureus* Inhibits the Classical and Lectin Pathways of Complement by Blocking Formation of the C3 Pro-Convertase. *J Immunol* 193, 6161–6171. doi:10.4049/jimmunol.1401600.

Wu, S., Lin, K., Liu, Y., Zhang, H., and Lei, L. (2020). Two-component signaling pathways modulate drug resistance of *Staphylococcus aureus* (Review). *Biomedical Reports* 13, 1–1. doi:10.3892/br.2020.1312.

Wu, X., and Xu, F. (2014). Dendritic cells during *Staphylococcus aureus* infection: subsets and roles. *J Transl Med* 12. doi:10.1186/s12967-014-0358-z.



## X

---

Xue, L., Chen, Y. Y., Yan, Z., Lu, W., Wan, D., and Zhu, H. (2019). Staphyloxanthin: a potential target for antivirulence therapy. *Infect Drug Resist* 12, 2151–2160. doi:10.2147/IDR.S193649.

Xue, L., Salimi, M., Panse, I., Mjösberg, J. M., McKenzie, A. N. J., Spits, H., et al. (2014). Prostaglandin D2 activates group 2 innate lymphoid cells through chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells. *J Allergy Clin Immunol* 133, 1184–1194. doi:10.1016/j.jaci.2013.10.056.

## Y

---

Yamada, K. J., Heim, C. E., Xi, X., Attri, K. S., Wang, D., Zhang, W., et al. (2020). Monocyte metabolic reprogramming promotes pro-inflammatory activity and Staphylococcus aureus biofilm clearance. *PLOS Pathogens* 16, e1008354. doi:10.1371/journal.ppat.1008354.

Yee, R., Yuan, Y., Shi, W., Brayton, C., Tarff, A., Feng, J., et al. (2019). Infection with Persister Forms of Staphylococcus aureus Causes a Persistent Skin Infection with More Severe Lesions in Mice: Failure to Clear the Infection by the Current Standard of Care Treatment. *Discovery Medicine* 28, 7–16.

Yipp, B. G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C. N., Scott, B. N. V., Zbytnuik, L. D., et al. (2012). Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med* 18, 1386–1393. doi:10.1038/nm.2847.

Yoong, P., and Torres, V. J. (2013). The effects of Staphylococcus aureus leukotoxins on the host: cell lysis and beyond. *Curr Opin Microbiol* 16, 63–69. doi:10.1016/j.mib.2013.01.012.

Youn, C., Archer, N. K., and Miller, L. S. (2020). Research Techniques Made Simple: Mouse Bacterial Skin Infection Models for Immunity Research. *J Invest Dermatol* 140, 1488-1497.e1. doi:10.1016/j.jid.2020.04.012.

## Z

---

Zeden, M. S., Schuster, C. F., Bowman, L., Zhong, Q., Williams, H. D., and Gründling, A. (2018). Cyclic di-adenosine monophosphate (c-di-AMP) is required for osmotic regulation in



Staphylococcus aureus but dispensable for viability in anaerobic conditions. *J Biol Chem* 293, 3180–3200. doi:10.1074/jbc.M117.818716.

Zhou, C., Bhinderwala, F., Lehman, M. K., Thomas, V. C., Chaudhari, S. S., Yamada, K. J., et al. (2019). Urease is an essential component of the acid response network of Staphylococcus aureus and is required for a persistent murine kidney infection. *PLoS Pathog* 15, e1007538. doi:10.1371/journal.ppat.1007538.

Zhou, C., and Fey, P. D. (2020). The Acid Response Network of Staphylococcus aureus. *Curr Opin Microbiol* 55, 67–73. doi:10.1016/j.mib.2020.03.006.

Zielinska, A. K., Beenken, K. E., Mrak, L. N., Spencer, H. J., Post, G. R., Skinner, R. A., et al. (2012). sarA-mediated repression of protease production plays a key role in the pathogenesis of Staphylococcus aureus USA300 isolates. *Mol Microbiol* 86, 1183–1196. doi:10.1111/mmi.12048.





# BIBLIOGRAPHIE PERSONNELLE

---

---

## ARTICLES SCIENTIFIQUES

**Abdul Hamid AI**, Cara A, Diot A, Laurent F, Josse J, Gueirard P. Differential early *in vivo* dynamics and functionality of recruited polymorphonuclear neutrophils after infection by planktonic or biofilm *Staphylococcus aureus*. Front Microbiol. 2021;12:728429.

Sauvat L, **Abdul Hamid AI**, Blavignac C, Josse J, Lesens O, Gueirard P. Biofilm-coated microbeads and the mouse ear skin: An innovative model for analysing anti-biofilm immune response *in vivo*. PLoS One. 2020;15(12):e0243500.

**Abdul Hamid AI**, Nakusi L, Givskov M, Chang YT, Marquès C, Gueirard P. A mouse ear skin model to study the dynamics of innate immune responses against *Staphylococcus aureus* biofilms. BMC Microbiol. 2020;20(1):22.

## PUBLICATIONS D'ACTES DE CONGRÈS

Feki I, **Abdul Hamid AI**, Dubuffet A, Delbac F, Gueirard P. A mouse ear skin model to study the dynamics of innate immune responses against *Encephalitozoon cuniculi*. Microsporidia Fest, Virtual conference, 2021.

**Abdul Hamid AI**, Cara A, Diot A, Josse J, Billard E, Laurent F, Gueirard P. The mouse ear skin model reveals specific innate immune signatures into study of the dynamics of innate immune responses against *Staphylococcus aureus* biofilms. 30<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Paris, 2020.

Sauvat L, **Abdul Hamid AI**, Blavignac C, Josse J, Lesens O, Gueirard P. An innovative model to analyze anti-biofilm immune response *in vivo*. 30<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Paris, 2020.

## COMMUNICATIONS ORALES

**Abdul Hamid AI**, Cara A, Diot A, Laurent F, Josse J, Gueirard P. Etude chez la souris de la dynamique de la réponse immunitaire innée dirigée contre le biofilm de *Staphylococcus aureus*. 6<sup>ème</sup> Rencontre des microscopistes clermontois (sur invitation), Clermont-Ferrand, 2021.

**Abdul Hamid AI**, Cara A, Diot A, Laurent F, Josse J, Gueirard P. Differential *in vivo* inflammatory responses after *Staphylococcus aureus* biofilm infection. **Abdul Hamid AI**, Cara



A, Diot A, Laurent F, Josse J, Gueirard P. Young Researchers in Biology of Auvergne-Rhône-Alpes Region Congress, Clermont-Ferrand, 2021.

**(Résumé sélectionné pour une communication orale)**

**Abdul Hamid AI**, Cara A, Diot A, Laurent F, Josse J, Gueirard P. Differential *in vivo* inflammatory responses after *Staphylococcus aureus* biofilm infection. 24<sup>th</sup> SVSAE Doctoral School, 9<sup>ème</sup> Journée des Doctorants du LMGE, Clermont-Ferrand, 2019.

**Abdul Hamid AI**, Cara A, Diot A, Josse J, Billard E, Laurent F, Gueirard P. The mouse ear skin model reveals specific innate immune signatures into study of the dynamics of innate immune responses against *Staphylococcus aureus* biofilms. 30<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Paris, 2020.

**(Résumé sélectionné pour une communication orale)**

**Abdul Hamid AI**, Nakusi L, Givskov M, Chang YT, Marquès C, Gueirard P. The mouse ear skin model to study the dynamics of innate immune responses against planktonic or sessile *Staphylococcus aureus*. Journée de Rencontre des Microbiologistes du pôle Clermontois 2019 & 7<sup>ème</sup> Journée des Doctorants du LMGE, Clermont-Ferrand, 2019.

**COMMUNICATIONS PAR AFFICHE**

**Abdul Hamid AI**, Cara A, Diot A, Laurent F, Josse J, Gueirard P. Differential early *in vivo* dynamics and functionality of recruited polymorphonuclear neutrophils after infection by planktonic or biofilm *Staphylococcus aureus*. 53<sup>rd</sup> Annual Meeting of the French Society for Immunology, Paris, 2021.

**Abdul Hamid AI**, Nakusi L, Givskov M, Chang YT, Marquès C, Gueirard P. A mouse ear skin model to study the dynamics of innate immune responses against *Staphylococcus aureus* biofilms. 52<sup>nd</sup> Annual Meeting of the French Society for Immunology, Nantes, 2019.

**Abdul Hamid AI**, Nakusi L, Josse J, Diot A, Cara A, Billard E, Laurent F, Gueirard P. A new *in vivo* model to analyze the dynamics of innate immune responses against *Staphylococcus aureus* biofilms. 18th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections, Copenhagen, 2018.

