



HAL
open science

Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus* associés aux pneumonies communautaires sévères : focus sur l'hémolysine-gamma

Mariane Pivard

► To cite this version:

Mariane Pivard. Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus* associés aux pneumonies communautaires sévères : focus sur l'hémolysine-gamma. Microbiologie et Parasitologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2022. Français. NNT : 2022LYO10077 . tel-04105065

HAL Id: tel-04105065

<https://theses.hal.science/tel-04105065>

Submitted on 24 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.



**THESE de DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

Ecole Doctorale N° 341

Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation (E2M2)

Discipline : Microbiologie

Soutenue publiquement le 25/10/2022, par :

Mariane Pivard

**Les facteurs de virulence de
Staphylococcus aureus associés aux
pneumonies communautaires sévères :
focus sur l'hémolysine-gamma**

Devant le jury composé de :

Caldelari Isabelle,
Condon Ciaran,
Gilbert Christophe,
Moreau Karen,
Moreillon Philippe,
Soutourina Olga,
Vandenesch François,

MCU, Université de Strasbourg
DR, Sorbonne Université Paris
MCU, Université Lyon 1
PU, Université Lyon 1
PU ém.-PH, Université de Lausanne
PU, Université Paris Saclay
PU-PH, Université Lyon 1

Examinatrice
Rapporteur
Examinateur
Examinatrice
Rapporteur et président
Rapporteuse
Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier **Mme Soutourina**, **M. Moreillon** et **M. Condon** pour avoir accepté d'évaluer ce manuscrit, ainsi que **Mme Caldelari** et **M. Gilbert** pour leur participation à mon jury de thèse.

Monsieur, même après 4 ans à vos côtés, je reste avec cette formulation pour conclure ce long chemin parcouru, elle qui vous a fait sourire ou surpris tant de fois. Un simple merci ne saurait suffire pour exprimer toute la gratitude que j'ai pour vous et tout ce que vous m'avez enseigné. Tout au long de ma thèse vous m'avez fait confiance et donné une grande autonomie pour la réaliser, sans pour autant jamais me laisser seule quand nécessaire. Tant d'un point de vue scientifique qu'humain, merci infiniment d'avoir été un si bon directeur de thèse.

Karen, merci beaucoup d'avoir été toujours présente et de m'avoir prêté une oreille attentive au cours de ces dernières années. Tu as toujours été de très bon conseil, scientifiquement mais également humainement (et même à quelques occasions administrativement). Tu as très largement contribué à l'encadrement de ma thèse, et cette aide m'aura été très précieuse.

Laura, en plus d'avoir été une collègue tu es devenue une amie avec qui j'ai pu partager tant de bons moments (et de verres) mais également certains de mes échecs et doutes. Ma thèse n'aurait clairement pas été une aussi belle aventure si tu n'avais pas été là.

Ced, grand maître incontesté des colonies PCR, ça a été un vrai plaisir de travailler avec toi et de discuter devant nos PSM. Tes conseils, nos discussions et l'horoscope de Rachel ont grandement participés à me motiver à venir si tôt au labo.

Katia, te faire peur durant toutes ces années aura été une de mes plus grandes satisfactions ! Ta bonne humeur, ton rire, tes farces, les repas le midi, mais également ton aide au quotidien pour préparer mes manip vont beaucoup me manquer.

Sylvère, merci beaucoup pour ta patience à m'apporter les réponses à toutes mes questions. Tu auras presque réussi à me faire aimer R après toutes ses années.

Flo, merci pour ton aide sur les différents projets au cours de ces dernières années. Mes futures pauses café seront bien différentes sans ton humour et ton rire.

Je tiens également à remercier mes trois stagiaires qui m'ont aidée sur le terrible sujet qu'est la régulation d'*hlgCB*. **Xanthe** tu as été ma première stagiaire, et je n'aurais pu espérer mieux ! Merci **Darlène** pour ta persévérance pour ce sujet si compliqué ainsi que la biomole. Et enfin **Chloé**, grande héritière des Northern, je suis très contente d'avoir travaillé avec toi, et que tu fasses partie de l'équipe maintenant (il faut croire que je ne t'ai pas dégoutée de la recherche pendant tes 6 mois de stage ;)).

Un grand merci également à toutes les personnes avec qui j'ai pu travailler au 6^{ème} durant ces quatre années : **Jess, Polo, Floriane, Pauline, Alexia, Aurélia, Louise, Didier, Aubin, Mathias**, et tant d'autres. Mention spéciale pour **Maëlle** et **Sibyle** avec qui partager mon bureau et quelques verres et restau auront été un vrai plaisir. Et mention très spéciale pour mon **petit caillou**. Tu es l'une des plus belles rencontres que j'ai pu faire dans ce labo !

Mais l'**équipe Staph** ne se limite pas au 6^{ème}, et je tiens à remercier toute l'**équipe du 5^{ème}** pour les repas partagés et les conversations au détour d'un couloir. Toutes les personnes qui aux réunions BP2i m'ont aidée (et supportée) pour mes nombreuses présentations. Je tiens également à remercier **Patricia, Yvonne** et **Jean-Philippe** pour leurs aides précieuses tout au long de cette thèse.

Je tiens à remercier également les personnes du CIRI qui m'ont aidée durant cette thèse, notamment **Laurent Chavatte** et **Caroline Vindry** qui m'ont initiée aux Northern, et **M. Cosset** pour son soutien.

Un immense merci à **Pascale Romby** et toute son équipe de m'avoir accueillie à Strasbourg et d'avoir tant participé aux réflexions autour de mon sujet. **Isabelle**, merci pour tout, pour ton aide, ta participation à ce sujet, tes conseils, ton accueil chez toi, ta bonne humeur et tous nos échanges.

Je remercie également **Jérôme Lemoine** et toutes les personnes de son équipe avec qui j'ai pu collaborer, en particulier **Nicolas** et **Iulia**.

Et enfin, merci à **Delphine Croisier** et **Nelson Anzala**, et à **Virginie Brun** et son équipe, pour leur participation à mes travaux de thèse et nos échanges.

Mais ma thèse c'est aussi toutes les personnes en dehors du labo qui m'ont soutenue, depuis le début ou qui sont arrivées en cours de route.

À **mes parents**, merci du fond du cœur d'avoir tout fait pour que je puisse réussir mes études dans les meilleures conditions possibles, et d'avoir toujours cru en moi malgré mes doutes. À **ma sœur** d'être toujours là pour moi. Et à toute **ma famille** qui suit mes péripéties depuis le début ♥

Merci à **tous mes amis** qui m'entourent et qui m'ont permis tantôt d'oublier la thèse quand j'en avais besoin, tantôt de me rebooster quand il fallait s'y remettre. Sans vous je ne serais jamais allée aussi loin. Mention spéciale pour toi **Ben**, qui a été courageux d'avoir vécu ça avec moi depuis la L2 et pendant plusieurs années.

Et qu'aurait été ma thèse si je n'avais pas fait de sport, et surtout du volley ? Merci à **Richard** et à toutes les **volleyeuses** et tous les **volleyeurs** de l'ENS pour cette échappatoire défoulante et les belles rencontres. Et je n'oublie pas ceux rencontrés à Blandan ;))

Pour terminer, merci à toi **Froufrou** pour ton soutien et ton optimisme contagieux !

À tous ceux que j'ai pu oublier, pardonnez-moi et merci !!

Résumé

Staphylococcus aureus est une bactérie responsable de nombreuses infections, dont les pneumonies, le plus souvent d'acquisition nosocomiale mais aussi communautaire. Ces dernières sont rares mais souvent graves, avec un fort taux de mortalité. La Leucocidine de Panton-Valentin (PVL) est une toxine de *S. aureus* connue pour participer à sa virulence dans ce contexte de pneumonie et, bien qu'ayant un rôle majeur dans la sévérité des pneumonies communautaires (PC), la PVL n'est pas présente dans l'ensemble des souches responsables de PC. Ceci implique que d'autres facteurs de virulence contribuent à la sévérité.

Un premier objectif de mes travaux a été de rechercher les différents facteurs de virulence impliqués de manière dose-dépendante dans les PC sévères grâce à une approche de protéomique ciblée explorant 136 isolats cliniques. Cette étude a permis de démontrer que la PVL est le principal facteur de la virulence de *S. aureus*, corrélé de manière dose-dépendante avec le décès. Néanmoins, en plus de la PVL, d'autres facteurs participent à la sévérité des infections, notamment l'hémolysine- γ CB (HlgCB) qui fonctionne et cible les mêmes cellules que la PVL.

Le second objectif de ces travaux a donc été d'étudier le rôle d'HlgCB dans les pneumonies et d'étudier les mécanismes de régulation de son expression dans des souches cliniques. Nos résultats ont pu montrer que cette toxine participe à la virulence de *S. aureus*. De plus, l'étude de sa production dans de multiples souches cliniques, via différentes approches de biologie moléculaire, a montré l'existence de deux profils distincts en plus d'une forte variabilité d'expression inter-souche. Ceci s'explique par des différences d'activité promotrice, de stabilité des ARN et de traductibilité, dues à la présence de *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), notamment dans la région 5'-*UnTranslated Region* (5'-UTR).

Enfin, malgré une organisation en opéron d'HlgCB, plusieurs transcrits plus courts, certains correspondant à *hlgB* seul et d'autres à un transcrit plus court qu'*hlgB*, nommé *short hlgB* (*shlgB*), ont été découverts. Leurs rôles et mécanismes de production ont été investigués, mais restent encore à approfondir.

Ces travaux ont donc permis de confirmer le rôle de la PVL dans la virulence de *S. aureus* dans un contexte de pneumonie, mais également celui d'HlgCB, cette dernière étant très finement régulée.

Abstract

Staphylococcus aureus is a bacterium responsible for many infections, including pneumonia, most often acquired nosocomial but also community acquired. The latter are rare but often serious, with a high mortality rate. Several virulence factors of *S. aureus* are known to contribute to its virulence, notably the Panton-Valentin Leucocidin (PVL). Although PVL plays a major role in the severity of community-acquired pneumonia (CAP), it is not present in all *S. aureus* strains causing pneumonia, implying that other virulence factors contribute to severity. A first objective of my work was to investigate the different virulence factors involved in a dose-dependent manner in severe CAP using a targeted proteomics approach on 136 clinical isolates. This study demonstrated that PVL is the main virulence factor of *S. aureus*, correlated in a dose-dependent manner with death. However, in addition to PVL, other factors are involved in the severity of infections, notably the γ -hemolysin CB (HlgCB), which similarly works and targets the same cells as PVL.

The second objective of this work was therefore to study the role of HlgCB in pneumonia and to study the mechanisms regulating its expression in clinical strains. Our results showed that this toxin participates in the virulence of *S. aureus*, particularly in PVL-negative strains. Moreover, the study of its production in different clinical strains, using different molecular biology approaches, showed the existence of two distinct profiles in addition to a high variability of inter-strain expression. These differences can be explained by differences in promoter activity, RNA stability and translatability, due to sequence differences, and in particular the presence of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the 5'- Untranslated Region (5'-UTR).

Finally, despite an operon-like organization of HlgCB, several shorter transcripts, some corresponding to *hlgB* alone, and others to a transcript shorter than *hlgB*, named *short hlgB* (*shlgB*), have been discovered. Their roles and mechanisms of production have been investigated but remain to be further studied.

Laboratoire de Rattachement

Ce doctorat a été préparé au sein du laboratoire :

**INSERM U1111 – Centre International de Recherche en Infectiologie,
Équipe Pathogénie des staphylocoques.**

Adresse postale du laboratoire :

CIRI-INSERM U1111
Faculté de Médecine Lyon-Est,
7 rue Guillaume Paradin
69008 LYON CEDEX 8 – France

Financements :

Ce doctorat a été financé par le **ministère des Études Supérieures et de la Recherche** ainsi que le **RHU IdBIORIV**, fondé sous le Programme Investissements d'Avenir (accord ANR-18-RHUS-0013).



Abréviations :

AA	Acide aminé	RACE-5'	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
ADAM10	<i>Disintegrin and Metalloproteinase domain-containing protein 10</i>	RBS	Site de fixation du ribosome
ADN	Acide désoxyribonucléique	rot	<i>repressor of toxin</i>
agr	<i>accessory gene regulator</i>	RPMI	Milieu Roswell Park Memorial Institute
AIP	<i>auto-inducer protein</i>	RT	Retrotranscription
ARN	Acide ribonucléique	SA-CAP	<i>S. aureus community-acquired pneumonia</i>
BHI	Brain Heart Infusion	SAGs	Superantigènes
CAP	Community-acquired pneumonia	Sak	Staphylokinase
CC	Complexe clonal	SarA	<i>Staphylococcal accessory regulator A</i>
CCY	<i>Casein Hydrolysate Yeast Extract</i>	SARM	<i>S. aureus</i> résistant à la méticilline
CHIPS	<i>Chemotaxis Inhibitory Protein of Staphylococcus aureus</i>	S. aureus	<i>Staphylococcus aureus</i>
CLASH	<i>Cross-linking ligation and sequencing of hybrids</i>	SCIN	<i>Staphylococcal Complement Inhibitor</i>
Hlg	Hémolysine- γ	SEs	Entérotoxines
HlgAB	Hémolysine- γ AB	SE-Is	Entérotoxines-like
HlgCB	Hémolysine- γ CB	SHAPE	<i>Selective 2'-hydroxylacylation analyzed by primer extension</i>
kDa	Kilo Dalton	shlgB	<i>short hlgB</i>
LC	Chromatographie liquide	SOC	<i>Super Optimal Broth with Catabolite repression</i>
LukAB	Leucocidine AB	SM	Spectrométrie de masse
LukDE	Leucocidine DE	SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
MSCRAMMS	<i>Microbial Surface Components Reconizing Adhesive Matrix Molecules</i>	SRM	<i>Selected Reaction Monitoring</i>
NET	<i>Neutrophil Extracellular Trap</i>	ST	Séquence type
Nuc	Nucléase	TAP	<i>Tobacco Acid-Pyrophosphatase</i>
PC	Pneumonie communautaire	TCR	<i>T-Cell Receptor</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>	TCS	Systèmes à deux composants
PCS	Pneumonie communautaire sévère	TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
PFT	<i>Pore-forming toxin</i>	TSS-EMOTE	<i>Transcription Start Specific Exact Mapping Of Transcriptome Ends</i>
PSM	<i>Phenol-Soluble Modulins</i>	TSST-1	Toxine du syndrome du choc toxique staphylococcique
PVL	Panton-Valentine Leucocidine	WT	<i>Wild type</i>
qPCR	PCR quantitative	5'-UTR	<i>5'-Untranslated region</i>

Table des matières

Résumé	6
Introduction	16
État de l'art.....	19
I. <i>Staphylococcus aureus</i>	19
1. Historique	19
1. Taxonomie	20
2. Portage et pathogénie	20
i) Portage	20
ii) Pathogénie	21
2. Facteurs de virulence	21
1. Protéines de surfaces.....	22
2. Protéines d'évasion immunitaire.....	23
3. Enzymes et cofacteurs sécrétés.....	23
4. Toxines sécrétées.....	25
i) Superantigènes (SAgs).....	25
ii) Les PSMs et la δ -toxine.....	25
iii) Hémolysine- α	26
iv) <i>Pore-forming toxins</i> à deux composants	27
a) Prévalences.....	27
b) Mécanismes.....	28
c) Récepteurs.....	29
d) Pathogénies associées	30
5. Principaux mécanismes de régulation des facteurs de virulences	31
i) Le système <i>agr</i>	31
ii) Les systèmes à deux composants.....	32
iii) Les ARN régulateurs	33
iv) Facteurs de transcription	33
v) Facteur σ	34
II. L'Hémolysine-γ.....	35
1. Organisation génomique.....	35
2. Séquences protéiques et structures	35
1. Séquence protéique et homologie	35

2.	Structure secondaire et tertiaire	36
3.	Régulation de l'expression de l'hémolysine gamma	37
1.	Régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles	38
	i) <i>Agr</i> et <i>rot</i>	38
	ii) <i>SaeRS</i>	38
	iii) <i>SarA</i>	39
	iv) Autres régulateurs	39
2.	Régulations post-traductionnelles	40
4.	Pathologies associées	40
III.	Pneumonie à <i>S. aureus</i>	40
1.	Pneumonies d'acquisition nosocomiale	41
2.	Pneumonies communautaires	41
	1. Prévalence	41
	2. Symptômes	42
	3. Facteurs de virulence de <i>S. aureus</i> associés :	42
IV.	Spectrométrie de masse : protéomique ciblée	60
1.	Technique et design expérimental	60
	1. Généralités techniques	60
	2. Design des peptides	61
2.	Quantification absolue	62
3.	Quantification relative	62
V.	Objectifs de thèse	63
Axe 1 : Les facteurs de virulence impliqués dans les pneumonies communautaires sévères : approche par protéomique ciblée		65
I.	Introduction	65
II.	Article scientifique :	68
III.	Résultats complémentaires et perspectives	96
Axe 2 : L'hémolysine-γ CB : facteur de virulence de <i>S. aureus</i> impliqué dans les pneumonies, dont l'expression est finement dépendante de la séquence génomique		101
I.	Introduction	101
II.	Article scientifique :	104
III.	Résultats complémentaires et perspectives	135
	1. Autres facteurs impliqués dans la virulence des souches USA300, ST80 et PEN	135
	2. Régulation de l'expression d'<i>hlgCB</i>	137
	3. <i>hlgB</i> ARNm : production et rôle	139

Axe 3 : <i>hlgCB</i>, bien plus qu'un opéron : découverte de <i>short hlgB (shlgB)</i> et <i>shlgB2</i>	141
I. Introduction.....	141
II. Matériels et Méthodes	141
1. Souches bactériennes, conditions de culture et plasmides	141
2. Extraction d'ARN et Northern blot	142
3. <i>5'- Rapid Amplification of cDNA Ends (5'- RACE)</i>	143
4. Test de régions promotrices : fusions transcriptionnelles	146
5. Surexpression de <i>shlgB</i> et <i>shlgB2</i>	146
6. Extraction d'ARN et analyse RT-qPCR.....	146
7. Protéomique.....	147
III. Résultats.....	148
1. Confirmation de l'existence du transcrit et de son extrémité 5'	148
2. Origines des transcrits : ARN <i>de novo</i> ou maturés ?	150
3. Fonction de ces transcrits et leur impact dans la virulence de <i>S. aureus</i>	151
1. <i>shlgB</i> et <i>shlgB2</i> up-régulent l'ARNIII et ses cibles.....	151
2. L'impact de la surexpression de <i>shlgB</i> et <i>shlgB2</i> est retrouvée au niveau protéomique	154
3. <i>shlgB</i> et <i>shlgB2</i> sont-ils des ARNm ?	155
IV. Discussion et perspectives	157
Conclusion générale.....	160
Références.....	162

Listes des Figures et des Tableaux :

Figures :

État de l'art :

- P 18 **Figure 1** Apparition des résistances aux antibiotiques majeures chez *S. aureus*
- P 20 **Figure 2** Principales zones de portage de *S. aureus* dans la population
- P 21 **Figure 3** Représentation schématique des protéines appartenant au groupe des MSCRAMMs
- P 25 **Figure 4** Formation et structure du pore formé par la protéine Hla
- P 26 **Figure 5** Organisation génomique des leucocidines à deux composants
- P 27 **Figure 6** Formation d'un pore par les leucocidines
- P 31 **Figure 7** Le système *agr*
- P 33 **Figure 8** Mécanismes de régulation des facteurs de virulence de *S. aureus*
- P 35 **Figure 9** Homologie de séquence entre HlgA, HlgC et HlgB
- P 36 **Figure 10** Structures secondaires, tertiaires et du pore de l'hémolysine- γ
- P 37 **Figure 11** Régulateurs transcriptionnels d'*hlgACB*
- P 60 **Figure 12** Représentation schématique de l'analyse par spectrométrie de masse ciblée

Axe 1 : Les facteurs de virulence impliqués dans les pneumonies communautaires sévères : approche par protéomique ciblée

- P 99 **Figure 13** Impact du milieu et du temps de culture sur le virulome

Axe 2 : L'hémolysine- γ CB : facteur de virulence de *S. aureus* impliqué dans les pneumonies, dont l'expression est finement dépendante de la séquence génomique

- P 134 **Figure 14** Quantification absolue de la PVL, d'Hla et d'HlgCB dans les souches USA300, ST80 et PEN
- P 136 **Figure 15** Impact des toxines PVL, Hla et HlgCB dans les pneumonies chez le lapin
- P 139 **Figure 16** L'exposition de *S. aureus* au sang induit une forte surexpression d'*hlgA*

Axe 3 : *hlgCB*, bien plus qu'un opéron : découverte de *short hlgB (shlgB)* et *shlgB2*

- P 141 **Figure 17** Sondes utilisées pour les analyses par Northern Blot
- P 143 **Figure 18** Principales étapes de la RACE 5'
- P 145 **Figure 19** Schéma des potentielles régions promotrices testées
- P 147 **Figure 20** Détection de *shlgB* par Northern Blot

- P 148** **Figure 21** Résultat des expériences de RACE-5'
- P 149** **Figure 22** Absence d'activité promotrice en amont de *shlgB* et *shlgB2*
- P 151** **Figure 23** Surexpression des ARN *shlgB* et *shlgB2* dans les souches USA300 et ST80
- P 152** **Figure 24** Impacts de la surexpression de *shlgB* et *shlgB2* sur la virulence de *S. aureus* au niveau transcriptionnel
- P 153** **Figure 25** Impacts de la surexpression de *shlgB* et *shlgB2* sur la virulence de *S. aureus* au niveau protéique
- P 155-156** **Figure 26** Prédictions de ORF et cadre de lecture pour *shlgB* et *shlgB2*

Conclusion générale

- P 160** **Figure 27** Complexité de l'opéron *hlgCB* et des mécanismes sous-jacents

Tableaux :

État de l'art :

P 27 **Tableau 1** Origines et prévalences des gènes codant pour les leucocidines

P 28 **Tableau 2** Récepteurs et cellules cibles des leucocidines

Axe 1 : Les facteurs de virulence impliqués dans les pneumonies communautaires sévères : approche par protéomique ciblée

P 96 **Tableau 3** Protéines recherchées initialement en protéomique

P 97 **Tableau 4** Protéines du virulome de *S. aureus* recherchées dans la méthode actuelle

Axe 2 : L'hémolysine- γ CB : facteur de virulence de *S. aureus* impliqué dans les pneumonies, dont l'expression est finement dépendante de la séquence génomique

P 135 **Tableau 5** Mutants testés dans le model lapin de pneumonie

Axe 3 : *hlgCB*, bien plus qu'un opéron : découverte de *short hlgB (shlgB)* et *shlgB2*

P 141 **Tableau 6** Plasmides utilisés dans cette étude

P 141 **Tableau 7** Sondes utilisées dans cette étude

P 142 **Tableau 8** Oligonucléotides utilisés dans cette étude

P 144 **Tableau 9** Mixes PCR réalisés pour les PCR nichées de la RACE-5'

P 144 **Tableau 10** Programme PCR réalisé pour les PCR nichées de la RACE-5'

Introduction

Staphylococcus aureus est une bactérie Gram positive, commensale de l'Homme, mais qui est également responsable de nombreuses infections pouvant être superficielles et peu dangereuses à sévères et potentiellement mortelles telles que les endocardites ou les pneumonies [1]. Dans le cas des pneumonies, *S. aureus* est en Europe l'un des principaux agents infectieux responsables des pneumonies nosocomiales [2]. Il représente également environ 2% des pneumonies-communautaires (PC) [3-4], où son taux de mortalité atteint jusqu'à 35% [5], faisant de *S. aureus* un enjeu majeur de la santé publique, comme décrit en partie III de la bibliographie de ce manuscrit.

Le succès infectieux de *S. aureus* résulte en grande partie dans sa capacité à produire de nombreux facteurs de virulence, selon les conditions environnementales dans lesquelles il se trouve. Parmi le large panel de facteurs de virulence qu'il possède, les toxines constituent un groupe essentiel, comme illustré en première partie bibliographique de ce manuscrit.

Contrairement aux endocardites et bactériémies, où aucun facteur de virulence spécifique n'a pu être mis en cause, plusieurs adhésines et toxines ont pu être identifiées dans le développement et/ou la sévérité des pneumonies à *S. aureus*, comme décrit dans ma revue bibliographique : « *Staphylococcus aureus Arsenal To Conquer the Lower Respiratory Tract* » [6]. Parmi les toxines, on retrouve les « *pore-forming toxins (PFT)* » dont fait partie la Leucocidine de Pantone-Valentine (PVL). La PVL est une toxine à deux-composants formant des pores à la surface des neutrophiles, monocytes et des macrophages en ciblant leurs récepteurs C5aR1 et R2, C5L2 et CD45 [7-8]. Cette toxine est codée par deux gènes, *lukS-PV* et *lukF-PV* qui sont rarement présents dans les isolats de *S. aureus* (< 3%), mais qui atteignent une prévalence d'environ 50% dans des souches isolées de patients atteints de PC sévère [5,9]. De nombreuses publications ont fait état de l'importance de la PVL dans la sévérité des pneumonies à *S. aureus* [9-13].

Cependant, la PVL ne peut à elle seule expliquer toute la virulence des souches de *S. aureus* dans le cas des pneumonies, n'étant présente que dans une partie des isolats cliniques. Une autre PFT pourrait-être impliquée dans la virulence de *S. aureus* : l'hémolysine- γ CB (HlgCB). Cette toxine, codée au sein du locus de l'hémolysine- γ composé d'*hlgA* suivi de l'opéron *hlgCB*, est présente dans environ 99% des souches de *S. aureus* [15] et cible les mêmes récepteurs

que la PVL, à savoir C5aR1 et R2, à la surface des leucocytes [16]. Des résultats préliminaires, obtenus sur l'étude de 80 souches cliniques issues de patients ayant eu une PC sévère, avaient montré un lien entre la sévérité et les quantités d'HlgC produites par ces souches, et plus particulièrement parmi les souches PVL négatives. Ces observations ont soulevé deux questions auxquelles nous avons voulu répondre avec mes travaux de thèse. Tout d'abord, est-il possible de trouver ou de confirmer des facteurs de virulence impliqués dans la virulence de *S. aureus* dans le contexte de PC de manière dose-dépendante ? Même si de nombreux facteurs sont codés sur des éléments accessoires du génome, plusieurs d'entre eux (i.e. l'hémolysine- α (Hla), Hld, les *Phenol-Soluble Modulins* (PSMs), HlgCB...) font partie du génome-cœur de la bactérie, et sont donc présentes dans quasiment toutes les souches de *S. aureus*. Leurs rôles et impacts dépendraient moins de leurs présence/absence que de leur niveau de production dans ces souches. Cette hypothèse a été testée avec le développement d'une nouvelle approche de spectrométrie de masse ciblée permettant d'obtenir des données semi-quantitatives pour 44 facteurs de virulence de *S. aureus*. Cette technique appliquée à 136 souches issues d'une cohorte de patients atteints de PC sévère est l'objet de l'Axe 1 de ce manuscrit. La seconde hypothèse porte sur le rôle de l'hémolysine- γ CB dans ce contexte infectieux. Cette question a été adressée en utilisant une souche PVL négative fortement productrice d'HlgCB, et isolée d'un patient décédé des suites de sa pneumonie, ainsi que de son mutant non producteur d'HlgC, dans un modèle expérimental de pneumonie chez le lapin. Leurs virulences ont été comparées entre elles, mais également à d'autres souches de *S. aureus pvl* positives, connues pour être très virulentes dans ce modèle de pneumonie. En plus de tester le rôle de l'hémolysine- γ CB dans la virulence de *S. aureus*, nous avons cherché à déterminer les différents mécanismes de régulation impliqués dans la variabilité d'expression et de production de la toxine entre souches cliniques et les différences de production entre HlgC et HlgB. L'ensemble des travaux qui ont permis de répondre à ces deux questions, sont décrits dans l'Axe 2 de ce manuscrit.

Enfin, l'étude des mécanismes de régulation de l'hémolysine- γ CB a mis en évidence l'existence de plusieurs transcrits d'*hlgB* seul sans *hlgC*, avec un 5'-UTR plus ou moins long, et également de deux transcrits plus courts nommés *short hlgB* (*shlgB*) et *short hlgB2* (*shlgB2*). L'étude de ces transcrits et de leurs rôles dans la virulence de *S. aureus* sont discutés en dernière partie, dans l'Axe 3.

Ces travaux ont permis d'avoir une vue d'ensemble des facteurs de virulence de *S. aureus* impliqués dans sa virulence dans un contexte de PC sévère avec le développement d'une nouvelle approche de spectrométrie de masse à haut débit, mais aussi du rôle spécifique de l'hémolysine- γ CB. Ils ont mis en évidence également la complexité de la régulation de l'opéron *hlgCB*, faisant intervenir différents niveaux de régulation (transcriptionnel, post-transcriptionnel et traductionnel). Enfin, ces travaux de recherche ont permis la découverte de nouveaux transcrits au sein de l'opéron, qui peuvent servir à la production de toxine (*hlgB*) ou servir d'ARN régulateur (*shlgB* et *shlgB2*).

État de l'art

I. Staphylococcus aureus

1. Historique

Staphylococcus aureus est une bactérie Gram-positive, observée pour la première fois en 1878 au microscope par Louis Pasteur et son équipe à partir de prélèvements de pus de furoncles et d'ostéomyélites, qu'ils décrivent alors comme des « amas de grains ». Les premières cultures *in vitro* sont réalisées en 1881, avec la création du genre *Staphylococcus* [17] suivi de celle de l'espèce *aureus* quelques années plus tard après l'observation de sa couleur jaune quand il est sous forme de colonies [18]. Rapidement *S. aureus* est identifié comme étant un agent pathogène responsable de nombreuses infections. La découverte de la pénicilline et son utilisation à des fins thérapeutiques en 1941 vont permettre de combattre ces infections. Cependant, son utilisation massive va faire émerger des résistances (Figure 1) [19,20]. Après la découverte dans les années 60 de la méticilline, le même phénomène va avoir lieu, conduisant à une nouvelle caractérisation des souches de *S. aureus* selon qu'elles sont sensibles ou résistantes à la méticilline (SARM pour *S. aureus* Résistant à la Méticilline) (Figure 1) [21,22]. Les SARM sont alors devenus l'une des principales causes d'infections nosocomiales. De plus, depuis le début des années 2000 de nouvelles résistances contre

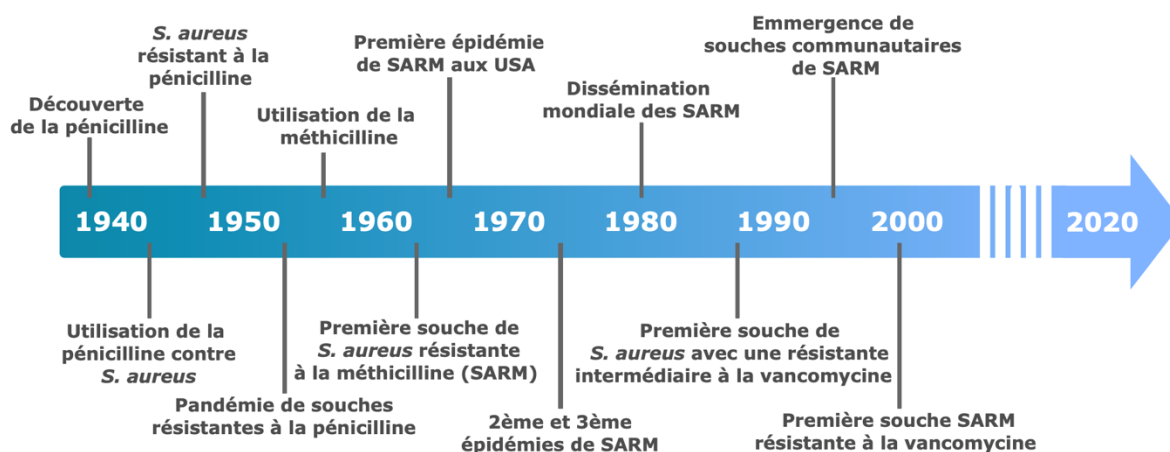


Figure 1 : Apparition des résistances aux antibiotiques majeures chez *S. aureus*

Frise chronologique représentant les principales émergences de résistances aux antibiotiques acquises par *S. aureus* au cours du temps.

d'autres antibiotiques, tel que la vancomycine, ont permis l'émergence de souches dites multi-résistantes, qui sont actuellement un enjeu de santé publique majeur dans le monde (Figure 1) [23,24].

1. Taxonomie

S. aureus appartient au phylum des Firmicutes qui regroupe les bactéries à Gram-positif. Il est ensuite rattaché à la classe des *Bacilli* et de l'ordre des *Bacillales* et à la famille des *Staphylococcaceae*. Le genre des *Staphylococcus* contient plus d'une cinquantaine d'espèces et de sous-espèces à ce jour, dont l'espèce *aureus* [25].

Parmi les caractéristiques qui permettent de définir l'espèce *aureus*, on retrouve : bactéries en forme de coque regroupées en amas, avec une activité coagulase positive mais oxydase négative, qui sont fermentatives du glucose, avec une activité DNase thermorésistante ainsi que la production de certains facteurs de virulence [26].

Au sein des souches de *S. aureus* il est possible de les regrouper selon leur degré de parenté, évalué grâce à l'analyse génétique de certains gènes appartenant au génome-cœur de la bactérie. Un premier niveau de regroupement est le type *agr* (*Accessory Gene Regulator*) dont il existe 4 types qui dépendent des variants alléliques des gènes qui composent le système *agr* servant à la régulation de nombreux facteurs de virulence selon la densité bactérienne (*quorum sensing*) [27]. Un second niveau classification est le complexe clonal (CC) et/ou séquence type (ST) des souches qui reposent sur plus de 180 gènes et 300 allèles, dont les gènes du système *agr*, de facteurs de virulence, de protéines d'adhésion présentes à la surface de la bactérie, de la capsule et de résistance aux antibiotiques [28].

2. Portage et pathogénie

i) Portage

Environ 30% de la population est porteuse saine de *S. aureus* [29], soit de façon permanente (environ 15% de la population), soit de façon transitoire (50% de la population) [30]. *S. aureus* est en effet une bactérie commensale de l'Homme que l'on retrouve majoritairement au

niveau de la peau et des muqueuses (nasale, pharyngée et gastro-intestinale). Il peut également coloniser de manière moins fréquente la flore vaginale ou les aisselles (Figure 2).

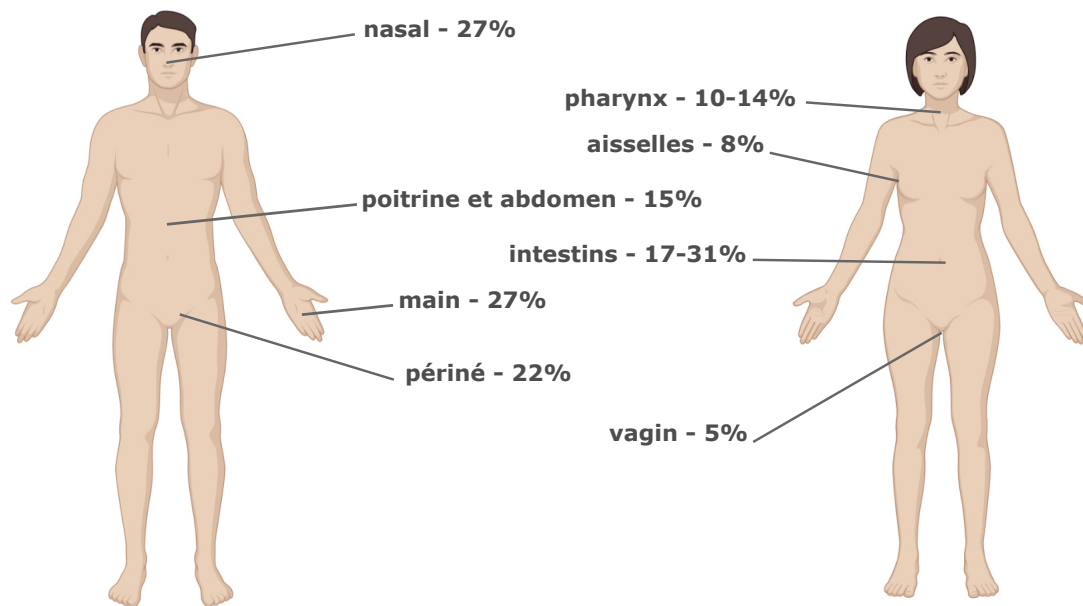


Figure 2 : Principales zones de portage de *S. aureus* dans la population

Les zones principales où *S. aureus* est présent sont indiquées, ainsi que le pourcentage de la population le portant de manière transitoire ou permanente dans ces zones. Figure inspirée de la publication de Wertheim et *al.*, 2005 et Sollid et *al.*, 2013.

ii) Pathogénie

S. aureus est un pathogène opportuniste, qui peut causer un large spectre d'infections, de différents types (nosocomiales et communautaires), pouvant être sévères et qui, avec les multiples résistances aux antibiotiques développées au cours du temps, est actuellement un problème de santé publique majeur. En plus de pouvoir causer des maladies toxiques, uniquement due à la production de toxine, comme les toxi-infections alimentaires, le syndrome d'exfoliation généralisé ou le syndrome de choc toxique staphylococcique, *S. aureus* est responsable de nombreuses infections suppuratives de la peau (folliculites, furoncles, anthrax, orgelets, panaris, impétigo, abcès...), mais également d'infections plus graves, voir potentiellement mortelles, comme les bactériémies et les pneumonies [31].

2. Facteurs de virulence

Parmi les différents moyens qui permettent à *S. aureus* un succès infectieux, la production de facteurs de virulence joue un rôle crucial. Ces facteurs de virulence sont nombreux et sont

exprimés de manière très spécifique selon la temporalité de l'infection, le lieu de celle-ci et la réponse immunitaire de l'hôte.

1. Protéines de surfaces

Les protéines de surfaces sont les premiers facteurs de virulence produits, généralement en début de croissance, et sont déterminants pour la colonisation et l'adhésion [32]. Il existe différents groupes de protéines de surface, mais le principal, regroupant plus d'une vingtaine de protéines, est le groupe des MSCRAMMs (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*) (Figure 3) [33]. Ces protéines sont localisées à la surface de la bactérie, ancrées dans la paroi de celle-ci grâce à un motif de reconnaissance pour la Sortase en C-ter, cette enzyme couplant la protéine au peptidoglycane (Figure 3) [34]. Les

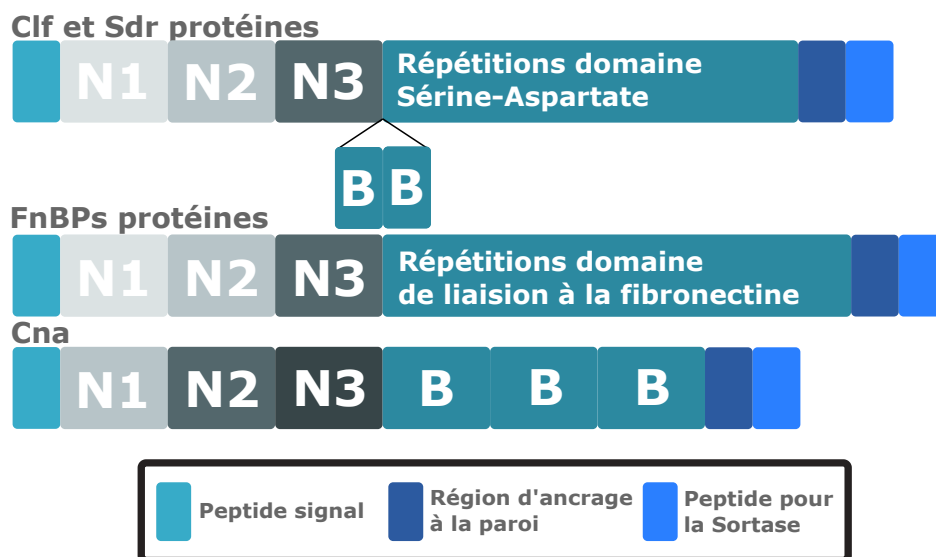


Figure 3 : Représentation schématique des protéines appartenant au groupe des MSCRAMMs

Les MSCRAMMs sont des protéines d'adhésion ancrées dans la paroi cellulaire de *S. aureus*. Elles possèdent toutes en N-ter les domaines N1, N2 et N3, qui sont des domaines repliés avec des structures proches de celle des IgG, ainsi qu'un peptide signal. Elles ont également toutes une région d'ancrage à la paroi et un peptide d'adressage à la paroi via la sortase en C-ter. Elles possèdent toutes des régions répétées qui participent à leur fonction d'adhésion. Les MSCRAMMs regroupent 3 groupes différents. Le premier groupe comprend les « *cumpling* » facteurs (**Clf**) et les facteurs avec des répétitions de type sérine-aspartate (**Sdr**). Les protéines Sdr ont contrairement aux Clf des régions répétées supplémentaires, représentées ici avec les domaines « B ». Le second groupe est celui des protéines se liant aux fibronectines, les « *fibronectin binding proteins* » (**FnBPA** and **FnBPB**), qui sont structurellement et fonctionnellement similaires au groupe des Clf-Sdr. Le dernier groupe comprend la protéine d'adhésion au collagène : « *collagen adhesin* » (**Cna**) qui possède également des régions répétées, nommées ici « B ». Figure inspirée de la publication de Foster et *al.*, 2014.

MSCRAMMs permettent à *S. aureus* de s'accrocher à la matrice extracellulaire de l'hôte en ciblant les molécules de celle-ci, tels que le collagène, les fibrinogènes et les fibronectines [33,34]. En plus de jouer un rôle clé dans l'adhésion, certaines de ces protéines possèdent d'autres fonctions qui vont impacter les défenses de l'hôte. La protéine ClfA, qui permet d'interagir avec les fibrinogènes, sert également à l'évasion immunitaire de *S. aureus* en participant à la dégradation de C3b du complément, réduisant ainsi l'efficacité de phagocytose de l'hôte [35,36]. Un autre exemple sont les adhésines FnbpA et B, qui en plus de leur interaction avec les fibrinogènes, permettent l'internalisation de *S. aureus* dans certains types cellulaires non spécialisés dans la phagocytose et participent à la formation du biofilm [37–39].

2. Protéines d'évasion immunitaire

Certains facteurs de virulence sont spécialisés dans l'évasion/échappement du système immunitaire. C'est notamment le cas de deux protéines encodées dans le même îlot d'évasion de l'immunité innée (appelé *Immune Evasion Cluster*) provenant de bactériophages : SCIN, pour *Staphylococcal Complement INhibitor* et CHIPS, pour *Chemotaxis Inhibitory Protein of Staphylococcus aureus*. Bien que codés dans des bactériophages, ce cluster est retrouvé dans presque 90% des souches cliniques de *S. aureus* [40]. SCIN, comme son nom l'indique, est un inhibiteur du complément. Elle empêche le clivage de la protéine C3 en C3b, évitant ainsi une phagocytose efficace de *S. aureus* par les neutrophiles [41]. CHIPS, de son côté, affecte le recrutement des cellules immunitaires, et plus particulièrement des neutrophiles, en interagissant avec les récepteurs permettant le chimiotaxisme des neutrophiles sur le lieu de l'infection, ce qui impacte également leur bonne activation [42]. Ces deux protéines sont produites assez précocement, étant retrouvées dans les premières étapes du biofilm [43].

3. Enzymes et cofacteurs sécrétés

Les enzymes sont des protéines aux fonctions et mécanismes d'action très variés. Certaines de ces enzymes produites par *S. aureus* sont dédiées à sa virulence, ciblant spécifiquement des protéines et/ou fonctions de l'hôte. Un premier groupe qu'il est important de mentionner, bien que ne comprenant pas d'enzyme à proprement parlé, est celui des cofacteurs qui vont

faciliter la coagulation en changeant de conformation les prothrombines en staphylothrombines. Ce groupe comporte la coagulase [44,45] et le facteur de von Willebrand [46], tous deux servant à la classification des espèces de staphylocoques : la majorité des staphylocoques sont à coagulase-négatives, sauf quelques espèces comme *S. aureus*, *S. intermedius*, ou *S. schleiferi coagulans*.

La staphylokinase (Sak), codée dans le même îlot d'évasion de l'immunité innée que SCIN et CHIPS [40], est un cofacteur des plasmines qui (i) participent à la coagulation et (ii) clive également les IgG et la protéine C3 du complément, perturbant ainsi l'opsonisation de *S. aureus* [47]. Sak possède en plus une activité enzymatique sur certains peptides antimicrobiens, comme l' α -défensine et LL-37, neutralisant ainsi leurs effets [48].

Parmi les nombreuses enzymes qui participent à la virulence de *S. aureus*, trois groupes peuvent être décrits : les protéases et les lipases, qui viennent compléter la liste des enzymes avec les nucléases.

Les protéases vont cliver spécifiquement certaines protéines et sont classées en sous-groupes : les métalloprotéases, les sérines protéases [49,50], les cystéines protéase [51], les exfoliatines [52] (responsable de l'impétigo bulleux et du syndrome de l'épidermolyse toxinique staphylococcique) et la hyaluronidase [53].

Les lipases ciblent quant à elles les lipides membranaires et plus particulièrement les modifications dont elles sont l'objet (phosphorylations, estérification des glycérols...) [54]. Parmi les lipases, nous pouvons citer la β -toxine qui est une sphingomyélinase codée par le gène *hlyB* présent dans le génome-cœur de la bactérie [55,56]. Cependant, chez les souches d'origine humaine, il est souvent inactivé par la présence d'un prophage portant *iec* et le cluster d'évasion immunitaire contenant notamment SCIN et CHIPS, qui s'insère spécifiquement dans la cadre de lecture d'*hlyB*, ce qui rend les souches non-productrices de la toxine [40,57,58].

Enfin, les nucléases (Nuc et Nuc2) utilisent les molécules d'ARN et d'ADN comme substrat, et participent à la dégradation du biofilm et donc à la dissémination de *S. aureus*, ainsi qu'à l'échappement au *Neutrophil Extracellular Trap* (NET) produit par les neutrophiles [59–61].

4. Toxines sécrétées

Les toxines sécrétées par *S. aureus*, également appelées exotoxines, sont un élément majeur de sa virulence et représentent jusqu'à 10% de son sécrétome [62]. On dénombre plus de 40 gènes codant ces exotoxines, dont certaines possèdent des fonctions et des structures similaires. Cependant, malgré des similitudes, chacune possède des spécificités conférant à *S. aureus* un arsenal varié afin de déjouer les défenses immunitaires de l'hôte et de survivre.

i) Superantigènes (SAGs)

La famille des superantigènes regroupe trois sous-groupes : les entérotoxines (SEs), les entérotoxines-like (SE-*ls*), qui possèdent comme les SEs une activité mitogène, mais pas d'activité émétique, et la toxine du syndrome du choc toxique staphylococcique (TSST-1) [63]. Toutes ces toxines sont sécrétées et ciblent les lymphocytes T, en interagissant avec leurs récepteurs V β (TCR) et le complexes majeurs d'histocompatibilité de type II [64]. L'interaction de ces toxines avec ces récepteurs va induire une prolifération et une activation anarchique des lymphocytes T, conduisant à une réponse immunitaire inefficace, voir délétère pour l'hôte [65]. Il est actuellement décrit sept SEs allant de SEA à SEE plus SEG, toutes codées sur des éléments génétiques mobiles. On dénombre 15 SE-*ls*, de SE-*I*H à SE-*I*X, qui comme les SEs sont codées sur des éléments mobiles, sauf SE-*I*X et SE-*I*W qui ont été trouvées récemment dans le génome-cœur de *S. aureus* [66,67]. Enfin, la TSST-1 est retrouvée dans plusieurs îlots de pathogénicité. Certains SAGs sont associés à des pathologies très spécifiques, comme SEA avec les intoxications alimentaires [68], SEB, SEC et TSST-1 avec le choc toxique non menstruel et uniquement la TSST-1 pour le choc toxique menstruel [69].

ii) Les PSMs et la δ -toxine

Les PSMs sont des peptides amphipatiques codés dans le génome-cœur de la bactérie, comprenant : les PSM- α 1 à 4 et les PSM- β 1 et 2 codées dans deux opérons [70], et la δ -toxine (*hld*) codée au sein du gène RNAlII [71]. Ces toxines sont de courts peptides différemment chargés : de 20 à 25 acides aminés (AA) et chargés positivement ou neutres pour les PSM α et la δ -toxine, contre 43 à 45 AA pour les PSM- β chargés négativement [72]. Les PSM participent

à la formation du biofilm [73], à moduler la réponse immunitaire et à lyser les cellules eucaryotes [74,75]. La lyse cellulaire peut impacter tous les types cellulaires car elle ne dépend pas de récepteurs spécifiques contrairement aux leucocidines. Cependant leur rôle serait plus important au niveau intracellulaire après phagocytose de *S. aureus* afin d'échapper au lysosome, plutôt qu'au niveau extracellulaire, les PSMs pouvant y être inhibées par les lipoprotéines présentes dans le sérum [75–77].

iii) Hémolysine- α

L'hémolysine- α , également nommée Hla ou α -toxine, est une PFT, présente dans la quasi-totalité des souches de *S. aureus* [78]. Hla est sécrétée sous forme de monomère, et va interagir avec des récepteurs spécifiques à la surface des membranes cellulaires de l'hôte, entraînant son oligomérisation et la formation d'un pore menant à la lyse cellulaire (Figure 4) [79]. Les récepteurs cibles d'Hla sont la *Disintegrin and Metalloproteinase domain-containing protein 10* (ADAM10), présente à la surface des cellules épithéliales et endothéliales [80], ainsi que la *PLEKstrin-Homology domain-containing protein A7* (PLEKHA7) qui participe aux jonctions cellulaires [81]. Des études ont montré que Hla pouvait également cibler les érythrocytes, les plaquettes et certains leucocytes [82,83]. L'interaction entre Hla et son récepteur permet son oligomérisation avec cinq ou six autres monomères pour former un pré-pore, qui à la suite d'un changement conformationnel des protéines va former un pore en forme de tonneau grâce aux feuillettes- β (Figure 4) [84].

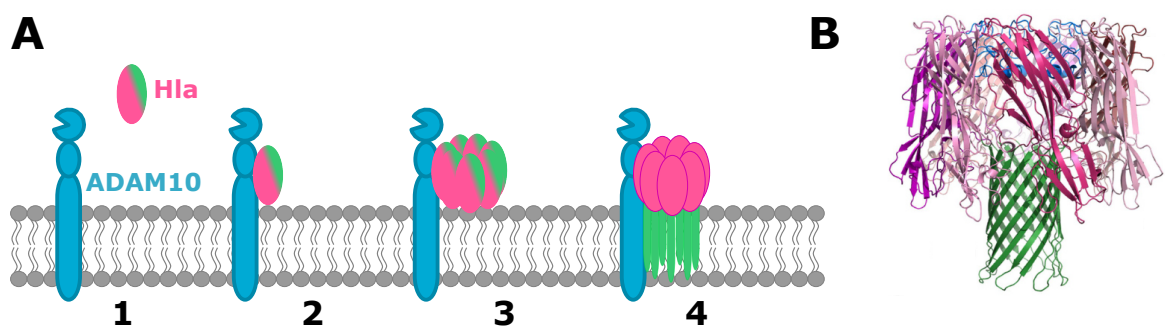


Figure 4 : Formation et structure du pore formé par la protéine Hla

A. Les différentes étapes de formation d'un pore par la protéine Hla. 1 - La protéine Hla sous forme de monomère est sécrétée dans l'environnement. 2 – Elle va reconnaître et se lier à son récepteur, ici ADAM10. 3 – L'interaction entre Hla et ADAM10 permet l'oligomérisation d'Hla en heptamère. 4 – Après oligomérisation les protéines changent de conformation afin de former un pore au travers de la membrane cellulaire. **B.** Structure d'un pore composé d'un heptamère d'Hla, obtenu par Song et *al.*, 1996, avec en vert le pore formé et en rose les parties restant à la surface de la cellule cible.

Hla est un facteur de virulence majeur pour *S. aureus* et impliqué dans de nombreuses pathologies dont les pneumonies en déstabilisant l'épithélium pulmonaire [85,86], et les infections de la peau [87,88]. Étant régulée positivement par le système *agr*, Hla fait partie des premiers facteurs de virulence exprimés en deuxième phase d'infection, après la colonisation du tissu [89–91].

iv) *Pore-forming toxins* à deux composants

Les PFT à deux composants, également connues sous le nom de leucocidines, sont des facteurs déterminants pour le succès infectieux de *S. aureus*, qui fonctionnent selon le même mécanisme que Hla en formant des pores membranaires lytiques à la surface de cellules cibles, mais qui contrairement à celle-ci, se composent avec deux sous-unités différentes. Il y a à ce jour sept leucocidines décrites : LukSF-PV (nommée également Leucocidine de Pantone-Valentine ou PVL), LukED, LukAB (également appelée LukGH), et les hémolysines- γ AB (HlgAB) et CB (HlgCB) retrouvées dans des isolats humains de *S. aureus*, LukMF et LukPQ retrouvées uniquement dans des souches isolées chez des animaux (qui ne seront pas détaillées par la suite) [51].

a) Prévalences

Les leucocidines sont codées en opéron ou dans des locus (Figure 5), appartenant soit au génome-cœur de la bactérie, comme c'est le cas pour les hémolysines- γ , soit à des éléments génétiques mobiles comme la PVL, ou des îlots de pathogénicité. Les prévalences de ces gènes ainsi que leurs origines sont détaillées dans le Tableau 1 [92,93].

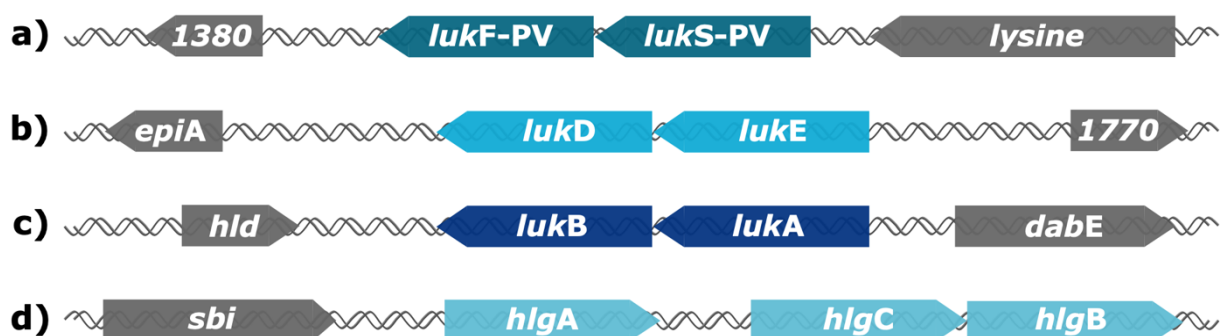


Figure 5 : Organisation génomique des leucocidines à deux composants

Représentation des opérons et locus des cinq leucocidines ciblant des cellules humaines, ainsi que des gènes présents en amont et en aval, d'après le génome de la souche USA300 FPR3757. **a)** Opéron de la toxine PVL, **b)** opéron de LukDE, **c)** opéron de LukAB (également nommée LukGH) et **d)** le locus de l'hémolysine- γ codant pour HlgAB et HlgCB, composé d'*hlgA* situé en amont de l'opéron *hlgCB*.

Leucocidines	Origines génomiques	Prévalences
LukSF-PV = PVL	Prophages contenant l'intégrase Sa2 : φPVL, φPVL108, φSa2mw, φSa2USA300, φSLT	2-3%
LukDE	Ilot de pathogénicité vSaβ	70%
LukAB = LukGH	Dans le génome-cœur	99%*
HlgAB	Dans le génome-cœur	99%
HlgCB	Dans le génome-cœur	99%

Tableau 1 : Origine et prévalence des gènes codant pour les leucocidines

* Donnée controversée, car moins étudiée que les autres leucocidines

D'après le tableau d'Alonzo et *al.*, 2014 et Seilie et *al.*, 2017.

b) Mécanismes

Comme pour Hla, chaque sous-unité est sécrétée sous forme de monomère. Le composant S (LukS-PV, LukE, HlgA et HlgC) va se lier à son récepteur, permettant ainsi sa dimérisation avec son composant F (LukF-PV, LukD et HlgB) (Figure 6). Une fois dimérisés, deux à trois sous-unités de chaque composant vont s'associer afin de former un pré-pore qui deviendra ensuite un pore après changement de conformation [94]. LukAB constitue une exception : les deux sous-unités forment un hétérodimère avant l'interaction avec le récepteur [95]. Excepté cette différence, le reste du mécanisme de formation du pore reste le même.

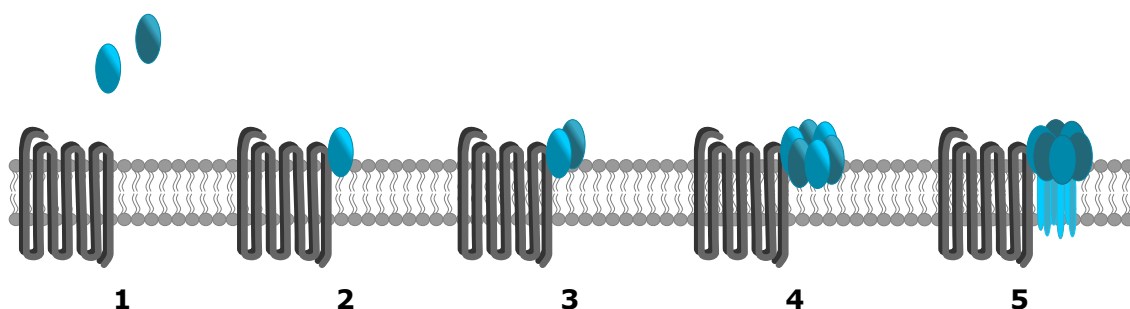


Figure 6 : Formation d'un pore par les leucocidines

Les différentes étapes de formation d'un pore par la PVL, LukGH, HlgAB et HlgCB. 1 – Les deux sous-unités (S en bleu clair et F en bleu foncé) sont sécrétées sous forme de monomère dans l'environnement. 2 – La sous-unité S va se lier à son récepteur spécifique. 3 – Suite à l'interaction entre la sous-unité S et son récepteur, la sous-unité F va pouvoir se dimériser avec la sous-unité S. 4 – Trois autres sous-unités S et trois autres sous-unités F vont s'oligomériser avec le dimère pour former un octamère. 5 – L'octamère formé va changer de conformation pour former un pore à travers la membrane de la cellule cible.

La formation du pore par LukAB est similaire, exceptée l'interaction avec le récepteur qui est réalisée par le dimère LukAB et non pas qu'avec LukA (sous-unité S), suite à la dimérisation dans l'environnement des deux sous-unités S et F.

En plus de leur activité lytique, les leucocidines sont capables à des concentrations sublytiques d'induire l'import de calcium extracellulaire [96,97], la production de cytokines pro-inflammatoires [98,99] et l'activation de l'inflammasome via NLRP3, lui-même activé par des efflux de potassium dus aux PFT [100,101].

c) Récepteurs

Malgré une forte homologie de séquence et de structure, les leucocidines ciblent des récepteurs différents, ce qui leur confère des tropismes cellulaires et des phénotypes différents, exceptées la PVL et l'hémolysine- γ CB qui utilisent toutes les deux les récepteurs C5aR1 et R2 [102]. Les différents récepteurs ciblés par chaque leucocidine, les cellules associées ainsi que les espèces sensibles à ces toxines sont récapitulés dans le Tableau 2.

Leucocidines	Récepteurs	Cellules	Espèces
LukSF-PV = PVL	C5aR1 C5aR2 CD45*	Neutrophiles Monocytes Macrophages	Homme +++ Lapin ++ Souris -
LukDE	CCR5 CXCR1 CXCR2 DARC	Neutrophiles Monocytes Macrophages Cellules dendritiques Lymphocytes-T Cellules NK Érythrocytes	Homme +++ Souris +++
LukAB = LukGH	CD11b	Neutrophiles Monocytes Macrophages Cellules dendritiques	Homme +++ Lapin ++ Souris +
HlgAB	CCR2 CXCR1 CXCR2 DARC	Neutrophiles Monocytes Macrophages Érythrocytes	Homme +++ Souris ++
HlgCB	C5aR1 C5aR2	Neutrophiles Monocytes Macrophages	Homme +++ Lapin ++ Souris +

Tableau 2 : Récepteurs et cellules cibles des leucocidines

* Récepteur interagissant avec LukF-PV et non LukS-PV contrairement aux autres.

D'après le tableau de Spaan et *al.*, 2017.

d) Pathogénies associées

La PVL, bien que peu présente dans l'ensemble des souches de *S. aureus* (Tableau 1), ses gènes sont plus fréquemment retrouvés dans certains isolats cliniques issus de pathologies spécifiques comme les pneumonies communautaires (50% à 75% des souches cliniques) [9,10], les infections ostéo-articulaires primitives sévères [103] ou la furonculose chronique [104]. Cette observation est en lien direct avec le rôle que joue la toxine dans ces infections, conférant à *S. aureus* un avantage pour sa survie. En ciblant les macrophages, les monocytes mais surtout les neutrophiles la PVL permet (i) d'éviter que le système immunitaire ne phagocyte la bactérie, et également (ii) de créer un contexte pro-inflammatoire délétère pour le tissu, menant à la nécrose de celui-ci [7,8,105]. De nombreuses études, avec des modèles *in vivo*, ont montré que la PVL était nécessaire à la virulence de certaines souches dans un contexte de pneumonie, et que des vaccins bloquant son action protégeaient les animaux de formes graves [14,106,107].

LukDE, en interagissant avec de nombreux récepteurs différents (Tableau 2), possède un spectre large de cellules cibles comparé aux autres leucocidines [108,109]. Cette particularité pourrait expliquer l'importance de cette toxine dans la virulence de *S. aureus* observée dans plusieurs modèles animaux dont : la nécrose de la peau chez le lapin [110], les infections systémiques chez la souris [111] et par injection rétro-orbitale de la toxine chez la souris [112].

LukAB est la dernière leucocidine à avoir été décrite en 2011 [113]. Son activité relative sur les cellules de lapins, et très faible sur les cellules murines, empêche actuellement d'explorer le rôle de la toxine dans des pathologies spécifiques grâce à des modèles *in vivo* [114]. Cependant, des expériences *in vitro* ont montré qu'elle joue un rôle important dans la survie de la bactérie face à la réponse immunitaire [115], et des analyses de sérum de patients ont montré la présence d'anticorps anti-LukAB, prouvant que la toxine est bien produite lors d'infection [116].

Enfin, il existe deux hémolysines- γ : HlgAB composé d'HlgA et d'HlgB, et HlgCB composé d'HlgC et d'HlgB [117]. Le tropisme cellulaire de ces deux toxines étant dépendant d'HlgA et d'HlgC, ces deux toxines ne ciblent pas les mêmes cellules et n'ont donc pas les mêmes effets [102].

Leurs impacts, mais également leur mécanisme d'action et leurs mécanismes de régulation, font l'objet d'un chapitre spécifique ci-après.

Afin que l'action de l'ensemble de ces facteurs de virulence soit optimale aux différentes étapes de l'infection pour assurer la survie et la croissance de *S. aureus*, il est nécessaire qu'ils soient exprimés de manière adéquates aux conditions spatio-temporelles auxquelles la bactérie est confrontée. Pour ce faire, plusieurs stratégies de régulation sont déployées par *S. aureus*.

5. Principaux mécanismes de régulation des facteurs de virulences

S. aureus possède plusieurs mécanismes pouvant réguler à différentes étapes l'expression de ses facteurs de virulences : au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel et traductionnel. La majorité des mécanismes décrits à ce jour se concentrent majoritairement au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel.

i) Le système *agr*

Le système *agr* est le premier régulateur global identifié chez *S. aureus*. Le système *agr* comprend une cassette de *quorum-sensing* composée (i) d'AgrB et AgrD, où AgrB permet la sécrétion du précurseur AgrD, qui lorsque secrété dans le milieu extracellulaire est sous la forme d'AIP (*auto-inducer protein*), (ii) d'un système à deux composants comprenant AgrC et AgrA, et (iii) d'un ARN régulateur : l'ARNIII (Figure 6) [118,119]. L'accumulation de l'auto-inducteur AIP avec l'augmentation de la densité bactérienne entraîne l'activation du récepteur AgrC, lequel active AgrA. Ce dernier est un activateur transcriptionnel de son propre promoteur P2 et d'autres gènes comme ceux des PSMs ainsi que du promoteur divergeant P3. P3 permet la synthèse de l'ARNIII qui est un régulateur majeur de *S. aureus* en formant des duplexes ARN-ARN [130]. Ces duplexes peuvent fonctionner différemment : (i) induire la dégradation d'ARNs cibles par la RNaseIII, (ii) activer la traduction, comme avec *hla*, ou (iii) inhiber la traduction, comme avec le la coagulase (Coa) [120].

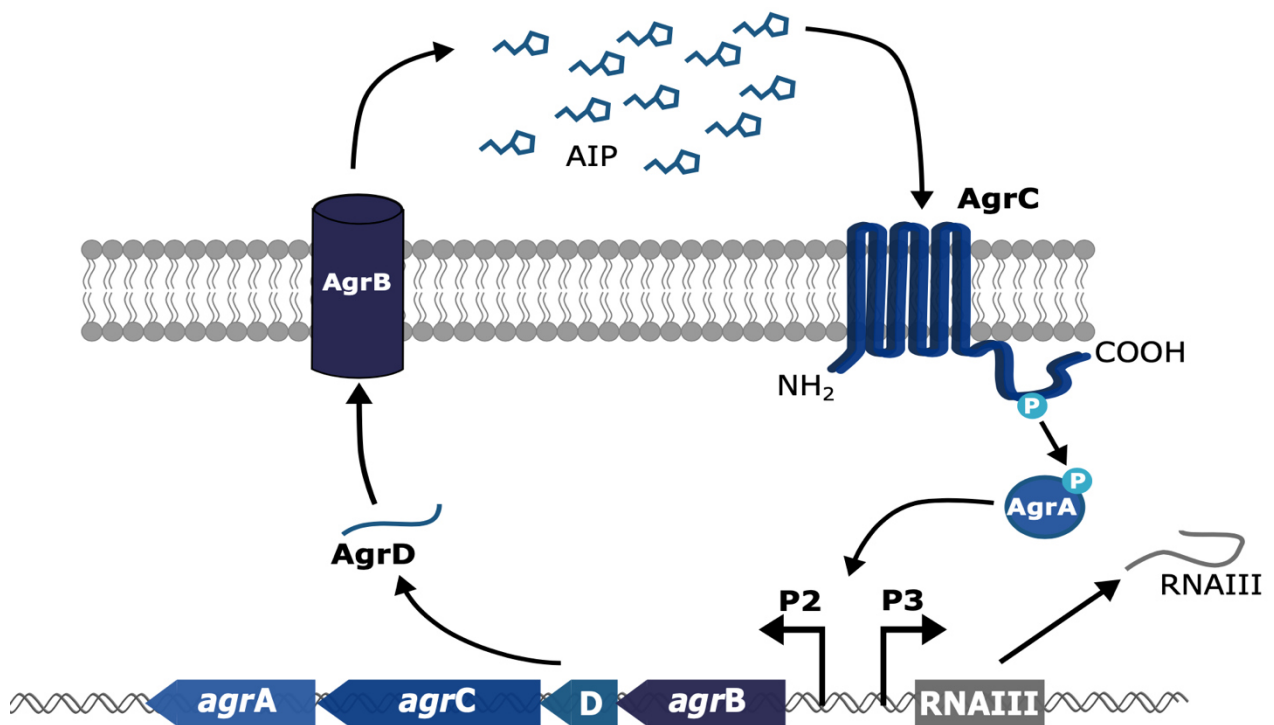


Figure 7 : Le système agr

Le système *agr* est composé d'*agrB*, d'*agrD*, d'*agrC* et d'*agrA*, organisés en opéron sous le contrôle du promoteur P2, ainsi que de l'ARNIII sous contrôle du promoteur P3. La protéine AgrB avec SpsB, permettent la sécrétion et la transformation d'AgrD en protéine auto-inductrice (AIP). L'accumulation d'AIP durant la croissance bactérienne va être détectée par le récepteur membranaire AgrC, qui va en réponse phosphoryler sa partie C-ter intracellulaire. Ce groupement phosphate va être transféré à AgrA, qui est un facteur transcriptionnel, qui peut ainsi activer la transcription des gènes du système *agr*. L'activation du promoteur P2 permet une auto-induction du système, et la transcription de l'ARNIII via le promoteur P3, qui permet la répression de *rot*, mais également l'expression de toxines comme Hla. Figure réalisée d'après Novick et *al.*, 2008.

ii) Les systèmes à deux composants

Les systèmes à deux composants, également appelés *two-component systems* (TCS), sont des mécanismes de régulation permettant une réponse adaptée à l'environnement. En effet, ces systèmes sont composés d'au moins une protéine senseur, en général une protéine membranaire possédant un domaine récepteur extracellulaire, et d'un facteur de transcription. Lorsque la protéine présente à la membrane bactérienne capte des signaux spécifiques dans l'environnement, une phosphorylation au niveau de sa partie intracellulaire permet d'activer le système. Cette phosphorylation permet ensuite d'activer le facteur de transcription, menant par conséquent à l'activation ou à l'inhibition de cibles spécifiques, en

réponse à l'environnement détecté. Il existe à ce jour 16 TCS décrits chez *S. aureus*, dont trois impliqués dans la régulation des facteurs de virulence : SaeRS, SrrAB et ArlRS [121,122].

iii) Les ARN régulateurs

Les ARN régulateurs regroupent un grand nombre d'ARN de taille variable, souvent non codant, qui peuvent moduler la dégradation et/ou la traduction d'ARNm. Parmi les différents modes d'action de ces ARN nous observons des interactions avec la région 5'-UTR et plus particulièrement avec le site de fixation du ribosome (RBS) et/ou dans la région codante pour la régulation de facteurs de virulence.

L'interaction avec la région 5'-UTR permet de réguler positivement ou négativement la traduction du transcrite en facilitant (cas de l'ARNIII avec l'ARNm *hla*) ou limitant l'accès au RBS (cas de l'ARNIII avec *rot*, *coa* ou *spa* ; cas de nombreux petits ARNnc avec différentes cibles) [120]. Les interactions dans la région 5'-UTR ou dans la région codante, par formation d'une structure ARN double brins, peuvent dans certains cas induire la dégradation de l'ARN par la RNaseIII. De nombreux ARN régulateurs ont été décrits à ce jour, cependant les mécanismes précis de leur mode d'action pour certains restent à être élucidés, comme c'est le cas pour Teg41 régulant les PSMs et SSR42 régulant l'hémolysine- α [123].

iv) Facteurs de transcription

Trois facteurs de transcription majeurs participent à la régulation des facteurs de virulence en plus de ceux mentionnés précédemment, et forment avec eux un système complexe de régulation très fine de la virulence, comme montré dans la Figure 8. Ces facteurs de transcription ; SarA (*Staphylococcal accessory regulator A*), Rot (*repressor of toxins*), et MgrA (*Multiple antibiotic resistance regulator*), appartiennent tous à la famille de protéine SarA, regroupant un grand nombre de facteurs de transcription et permettent de réguler positivement ou négativement des facteurs de virulence en se fixant au niveau des régions promotrices.

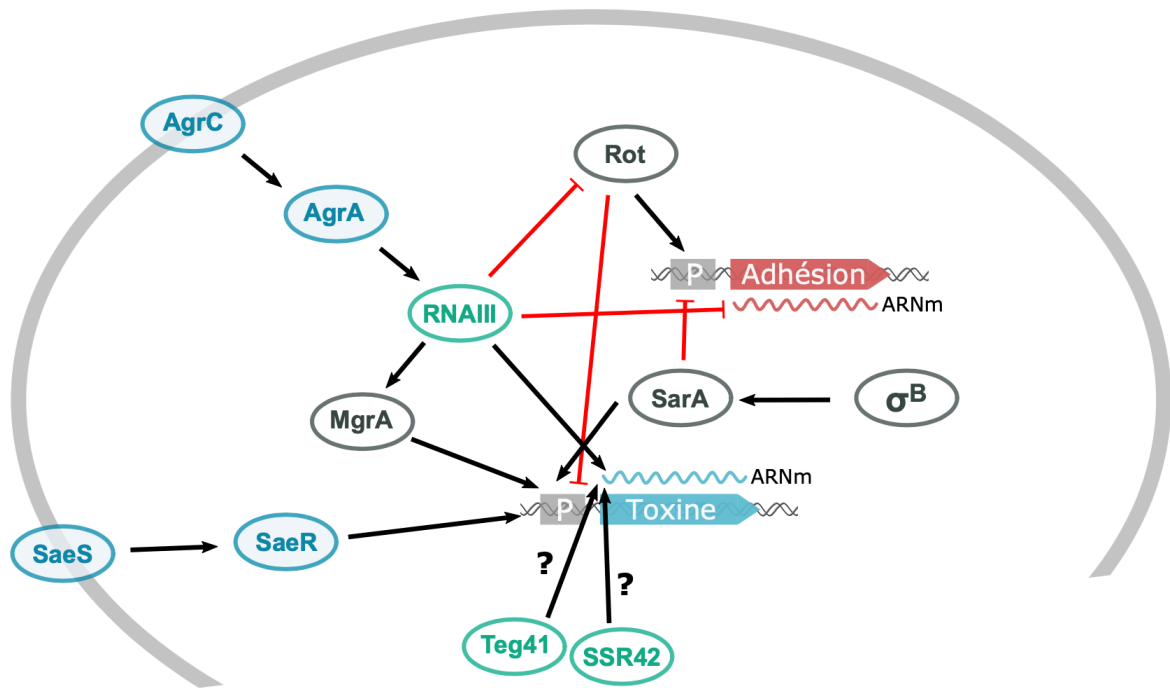


Figure 8 : Mécanismes de régulation des facteurs de virulence de *S. aureus*

Synthèse des différents mécanismes de régulation utilisés par *S. aureus* pour réguler ses facteurs de virulence, et des interactions entre eux. La régulation des facteurs d'adhésion (gène et ARNm représentés en rouge) et des toxines (gène et ARNm représentés en bleu) sont généralement inversées, avec dans un premier temps les facteurs d'adhésion, puis dans un second les toxines. Les systèmes à deux composants, incluant également les protéines AgrC et AgrA du système agr, sont représentés en bleu. Les facteurs de transcription sont représentés en gris, et les ARN régulateurs en vert. Les interactions activatrices sont représentées avec des flèches noires, et les négatives avec des lignes rouges. Les points d'interrogations signifient l'absence de mécanismes connus de régulation. Figure inspirée d'après la revue de Desgranges et *al.* 2019.

v) Facteur σ

Un dernier niveau de régulation passe par le facteur sigma utilisé par les ARNt, permettant de modifier, selon le facteur sigma utilisé, la spécificité de l'ARN polymérase pour certains promoteurs. Le facteur sigma primaire permet l'expression des gènes de ménages de la bactérie, tandis que les facteurs sigma alternatifs vont permettre selon les conditions, l'expression de gènes adaptés, comme par exemple avec le facteur sigma B qui module l'expression du système *agr* et de SarA, régulant indirectement leurs cibles, comme la TSST-1 (Figure 8) [122].

II. L'Hémolysine- γ

L'hémolysine- γ a été décrite pour la première fois en 1938 par Smith *et al.* [124]. Cependant, de cette période aux années 1990, la présence de deux composés S différents (HlgA et HlgC) n'est pas encore connue et une seule toxine est mentionnée [125,126]. Il faut attendre 1993 pour que le séquençage et la caractérisation du locus, avec la présence de trois gènes, pour que les deux toxines HlgAB et HlgCB soient distinguées [117,127].

1. Organisation génomique

Comme mentionné précédemment (Tableau 1), le locus de l'hémolysine- γ est présent dans presque toutes les souches de *S. aureus* avec une prévalence d'environ 99% [67,93,128]. Il est composé du gène *hlgA* en amont, d'une région intergénique puis des gènes *hlgCB* organisés sous forme d'opéron (Figure 5) [117,127,129]. Les gènes *hlgA* et *hlgCB* sont décrits pour avoir chacun leur propre promoteur [117].

2. Séquences protéiques et structures

1. Séquence protéique et homologie

La protéine HlgA comporte 309 AA, dont un peptide signal en N-ter de 29 AA, son poids moléculaire étant de 34,9 kDa avant clivage du peptide signal. HlgC est une protéine composée de 315 AA, avec également 29 AA utilisés pour le peptide signal en N-ter, et un poids moléculaire de 35,5 kDa. Enfin, la protéine HlgB est la plus grande des trois, avec 325 AA, dont 25 pour le peptide signal en N-ter, et pour une masse de 36,7 kDa [117, Uniprot].

HlgA et HlgC partagent 69% d'homologie de séquence, mais seulement 30% et 28% respectivement avec HlgB (Figure 9) [92,130]. Cette plus grande homologie entre HlgA et HlgC est dans la continuité des observations faites avec les autres leucocidines, où les composants



Figure 9 : Homologie de séquence entre HlgA, HlgC et HlgB

A. Alignement de séquence protéique des protéines HlgA, HlgC et HlgB, réalisé avec Uniprot en utilisant les séquences protéiques de la souche USA300 FPR3757. Les AA similaires pour les trois protéines sont en violet foncé, et ceux identiques pour seulement deux des trois protéines en violet clair. Les tirets représentent des insertions. **B.** Tableau donnant les pourcentages d'homologie de séquence entre les protéines HlgA, HlgC et HlgB.

S partagent une plus grande homologie entre eux qu'avec leur composant F respectifs excepté pour LukAB [130].

2. Structure secondaire et tertiaire

Les trois protéines sont composées de plusieurs structures secondaires, nécessaires à la structure tertiaire et à celle du pore dans un second temps. Toutes ont plusieurs feuillets- β qui permettent de former le domaine « *stem* » de la protéine, ainsi que les domaines « *cap* » et « *rim* ». Pour le domaine *rim* il y a également des hélices- α (Figure 10A et B).

Suite à la dimérisation d'HlgB avec HlgA ou HlgC, puis à l'oligomérisation en octamère, un changement majeur de conformation se produit, avec le déploiement du domaine « *stem* » au travers de la membrane de la cellule ciblée (Figure 10C) [131].

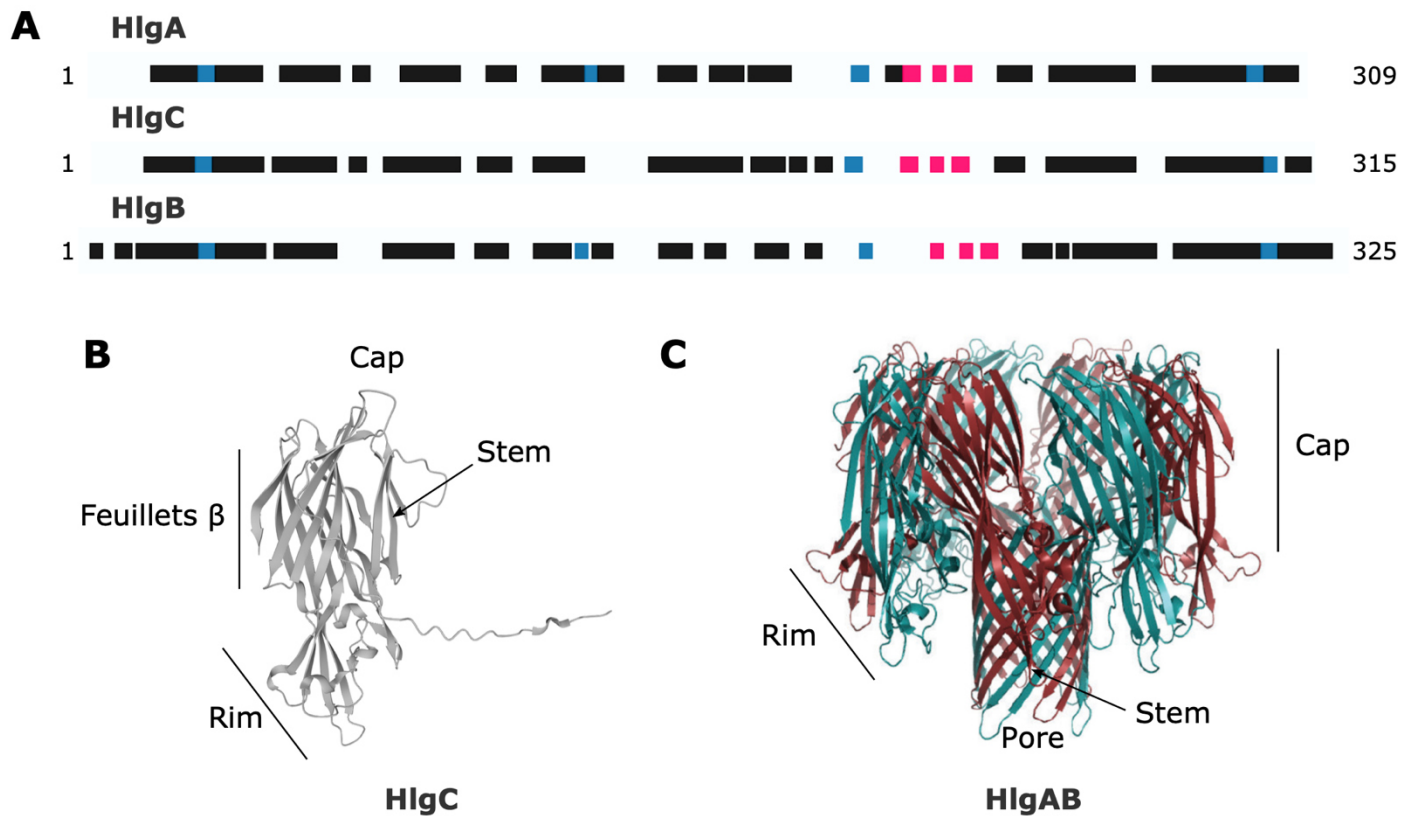


Figure 10 : Structures secondaires, tertiaires et du pore de l'hémolysine- γ

A. Représentation des structures secondaires pour HlgA (P0A074), HlgC (Q99RL1) et HlgB (P0A077) obtenues sur Uniprot. Les domaines noirs représentent des brins β , les bleus des coudes, et les roses des hélices. **B.** Structure de la protéine HlgC avec ses différents domaines, obtenu sur Uniprot (Q07227). **C.** Structure d'un pore formé par HlgAB avec les différents domaines, à partir de la figure issue de la revue d'Alonzo III et *al.*, 2014.

3. Régulation de l'expression de l'hémolysine gamma

Afin d'être efficace dans les conditions et au moment adéquats, chaque facteur de virulence de *S. aureus* est finement régulé comme illustré précédemment dans la partie I.2 Facteurs de virulence. Concernant l'hémolysine- γ , la majorité des études a investigué les systèmes de régulation transcriptionnels et post-transcriptionnels. Il est important de noter que des variations dans l'expression des hémolysines- γ sont directement imputables aux conditions expérimentales notamment dues aux milieux de culture ainsi qu'aux temps d'incubation utilisés, avec une meilleure expression en milieux CCY et BHI en fin de phase exponentielle / début de phase stationnaire, qu'en TSB ou RPMI et début/milieu de phase exponentielle [132–134]

1. Régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles

Parmi l'ensemble des mécanismes de régulation décrits précédemment, trois ont pu être impliqués dans la régulation d'*hlgA* et/ou *hlgC* et/ou *hlgB* (Figure 11).

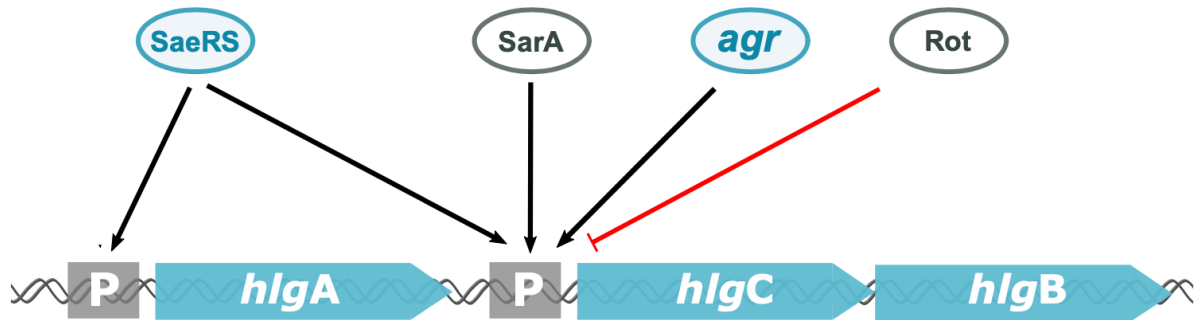


Figure 11 : Régulateurs transcriptionnels d'*hlgACB*

Représentation des principaux régulateurs transcriptionnel d'*hlgA* et d'*hlgCB*. Les mécanismes appartenant aux systèmes à deux composants, auquel le système *agr* peut être inclus, sont représentés en bleu, et les facteurs de transcription en gris. Les mécanismes régulant positivement l'expression des gènes sont indiqués par des flèches noires, et les inhibitions avec des barres rouges.

i) *Agr* et *rot*

Dans le cas de la régulation d'*hlgACB*, il a été montré que seul *hlgC* et *hlgB* étaient régulés positivement par le système *agr* et réprimé par *rot* [89,132,135,136], contrairement à *hlgA* où sa régulation passerait par d'autres mécanismes [132,137] (Figure 11). Néanmoins, les mécanismes précis de cette régulation ne sont pas encore identifiés.

ii) *SaeRS*

Le système *SaeRS* appartient au groupe des TCS, qui permettent une réponse adaptée selon l'environnement [121]. *SaeS* présent à la surface de la bactérie détecte des signaux issus de la phagocytose, comme les protéines HNP3-1, secrétées par les neutrophiles, et va à leur contact phosphoryler le facteur de transcription *SaeR* pour l'activer et permettre l'expression de gènes cibles en réponse aux stimulus externes [121,138].

SaeR reconnaît ses gènes cibles grâce à des séquences conservées présentes dans la région promotrice des gènes [139], dont celles d'*hlgA* et d'*hlgC* [140], afin de permettre la

transcription de ceux-ci. En plus de la présence de ces séquences consensus, de nombreuses études, avec notamment des mutants délétés pour le système SaeRS, ont montré que soit un seul [137,141,142], deux [136,140,143] ou les trois gènes [144] du locus de l'hémolysine- γ étaient régulés par ce système. La différence de résultats entre les études peut notamment s'expliquer par des conditions de culture différentes et des fonds génétiques différents. Néanmoins, SaeRS est bien un système majeur dans la régulation de l'expression d'*hlgACB*, permettant notamment leur expression en cas de présence des neutrophiles qui sont ciblés par HlgAB et HlgCB (Figure 11).

iii) SarA

La protéine SarA, pour *Staphylococcal accessory regulator A*, est un régulateur transcriptionnel cytoplasmique actif en fin de phase exponentielle et début de phase stationnaire de la croissance. Cette protéine régule l'activité promotrice de certains gènes cibles [145,146], mais également impacte la stabilité d'ARNm (*cna* et *spa* par exemple) [147,148]. Son rôle dans la régulation de l'hémolysine- γ se limite uniquement à celle de l'opéron *hlgCB* et non à *hlgA* (Figure 11). Une Sar Box a été trouvée en amont d'*hlgCB* [89], et la délétion de *sarA* induit une forte diminution de l'expression d'*hlgCB* [132].

iv) Autres régulateurs

D'autres études ont montré que certains mutants ou certaines conditions pouvaient impacter l'expression des hémolysines- γ , comme le mutant délété pour la protéine Fur nécessaire à l'adaptation de *S. aureus* selon les disponibilités en fer dans l'environnement, qui induit une augmentation d'*hlgC* [149]. La présence de sang favorise l'expression d'*hlgA* [134], alors que celle de neutrophiles induit l'expression des trois gènes [142,150,151]. Ces résultats confortent l'observation que la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des hémolysines- γ est complexe et le résultat de l'intégration de différentes informations captées par la bactérie pour s'adapter au mieux à son environnement.

2. Régulations post-traductionnelles

A ce jour il existe très peu d'études sur la régulation traductionnelle et post-traductionnelle de l'hémolysine- γ . Seule HlgC, pour laquelle il a été montré qu'une phosphorylation de la Thréonine 246 dépendant de la Protéine Kinase A, était nécessaire pour son activité [152,153]. Cette phosphorylation est observée en présence de neutrophiles, et une inhibition de la phosphorylation induit une diminution de l'activité, proportionnelle au niveau de phosphorylation de la protéine [153].

4. Pathologies associées

Le rôle des hémolysines- γ dans la pathogénicité de *S. aureus* a été investigué depuis de nombreuses années. Concernant HlgAB, celle-ci est associée aux infections de l'œil, avec notamment l'induction d'une forte réaction pro-inflammatoire, et une atteinte importante des tissus ophtalmiques [154,155]. De plus chez la souris, la production d'HlgAB participe à la pathogénicité de la bactérie dans les bactériémies, avec une inflammation et une charge bactérienne plus importantes, comparée à une souche ne produisant pas la toxine [156].

Contrairement à HlgAB, le rôle d'HlgCB dans la virulence de *S. aureus* est très peu décrit. Les cellules de souris n'étant pas sensibles à cette toxine [16], la plupart des expériences menées avec des mutants $\Delta hlgACB$ chez la souris ont donc montré le rôle d'HlgAB plutôt que celui d'HlgCB. Cependant, comme HlgCB cible les mêmes récepteurs que la PVL, un rôle similaire dans les pathologies où la PVL a été décrite comme étant un facteur de virulence majeur (pneumonie et furoncle) était attendu. Mais aucune étude à ce jour n'a montré de lien entre cette toxine et ces infections.

III. Pneumonie à *S. aureus*

Les pneumonies sont des infections des voies respiratoires avec une atteinte aigüe du parenchyme pulmonaire. Elles se caractérisent par une perte des capacités respiratoires dans un contexte clinique d'infection systémique. La présence du pathogène dans les poumons va induire une accumulation de pus et de liquide dans les alvéoles pulmonaires et une réaction inflammatoire [157]. Selon le type d'infection (nosocomiales [158] ou communautaires [157])

et la gravité, d'autres symptômes caractéristiques peuvent être observés, et dans certains cas très graves, les pneumonies à *S. aureus* peuvent entraîner le décès du patient.

1. Pneumonies d'acquisition nosocomiale

Les pneumonies nosocomiales sont des infections qui surviennent pendant ou après un séjour en milieu hospitalier. Elles sont caractérisées par plusieurs points : les sujets concernées sont généralement des patients âgés et /ou avec une ou plusieurs comorbidités [159] ce qui permet à des souches peu virulentes d'exercer leur pouvoir pathogène [160–162]. Enfin, les souches présentes en milieu hospitalier sont exposées à des niveaux plus importants d'antibiotiques, ce qui favorise la sélection de souches multi-résistantes, rendant le traitement de ces infections difficile. *S. aureus* est la principale cause de pneumonies nosocomiales dues à des bactéries Gram-positif, et représente jusqu'à 50% des souches isolées aux Etats-Unis, mais avec une moindre mesure en Europe. La majorité de ces souches sont résistantes à la méticilline [163–165].

2. Pneumonies communautaires

Les pneumonies communautaires à *S. aureus*, également appelées SA-CAP pour *S. aureus community-acquired pneumonia*, sont des infections rares mais généralement graves [157], qui par définition, surviennent chez des sujets sans lien avec un établissement de soins.

1. Prévalence

En Europe, les SA-CAP ne représentent que 1 à 5% des pneumonies communautaires [166,167], et 5% aux Etats-Unis [3], le principal agent responsable étant *Streptococcus pneumoniae*. Elles sont donc peu fréquentes, mais souvent graves avec un taux de mortalité entre 20 et 44,5% [9,10,157,161]. Elles surviennent chez les nourrissons, les enfants, les adultes jeunes avec peu de comorbidités et moins fréquemment chez les sujets plus âgés. Chez les enfants, des formes graves sont observées, accompagnées notamment de la nécrose du tissu pulmonaire due à l'infection [10,168].

2. Symptômes

Les SA-CAP sont généralement causées par des souches ayant un plus haut potentiel pathogénique que les souches de pneumonies nosocomiales, avec notamment une prévalence élevée de la PVL [9,161]. Les symptômes sont ceux d'une atteinte respiratoire sévère qui peut aller jusqu'à la nécessité d'une assistance cardio-respiratoire externe, ou une défaillance multiviscérale pouvant conduire au décès. Certains symptômes sont néanmoins très spécifiques de *S. aureus* et notamment des souches productrices de la PVL comme la survenue d'un rash (irruption cutanée), d'une leucopénie et d'une hémoptysie, cette dernière reflétant la nécrose de l'épithélium respiratoire [9,169].

3. Facteurs de virulence de *S. aureus* associés :

Les facteurs de virulence de *S. aureus* impliqués dans la pathogénie des CAP a fait l'objet d'un travail de revue bibliographique publié en mai 2021 dans mSphere et qui est joint à ce manuscrit.

(Page suivante)



Staphylococcus aureus Arsenal To Conquer the Lower Respiratory Tract

 Mariane Pivard,^a  Karen Moreau,^a  François Vandenesch^{a,b}

^aCIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Université de Lyon, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS de Lyon, Lyon, France

^bCentre National de Référence des Staphylocoques, Institut des agents infectieux, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

ABSTRACT *Staphylococcus aureus* is both a commensal and a pathogenic bacterium for humans. Its ability to induce severe infections is based on a wide range of virulence factors. *S. aureus* community-acquired pneumonia (SA-CAP) is rare and severe, and the contribution of certain virulence factors in this disease has been recognized over the past 2 decades. First, the factors involved in metabolism adaptation are crucial for *S. aureus* survival in the lower respiratory tract, and toxins and enzymes are required for it to cross the pulmonary epithelial barrier. *S. aureus* subsequently faces host defense mechanisms, including the epithelial barrier, but most importantly the immune system. Here, again, *S. aureus* uses myriad virulence factors to successfully escape from the host's defenses and takes advantage of them. The impact of *S. aureus* virulence, combined with the collateral damage caused by an overwhelming immune response, leads to severe tissue damage and adverse clinical outcomes. In this review, we summarize step by step all of the *S. aureus* factors implicated in CAP and described to date, and we provide an outlook for future research.

KEYWORDS *Staphylococcus aureus*, virulence factors, community-acquired pneumonia, physiopathology, immune response, community-acquired infections, pathophysiology, pneumonia

Staphylococcus aureus is detected in 30% of the population, mostly as a nasal commensal, but also in the throat, on the skin, and in the gastrointestinal tract (1). In addition to these innocuous interactions with the human host, *S. aureus* has the potential to develop a wide range of diseases in humans, from mild infections of the skin and soft tissues to severe and fatal infections, such as bacteremia and pneumonia (2).

S. aureus pneumonia can be divided into two categories, hospital-acquired pneumonia (very often ventilator-associated pneumonia) pertaining to nosocomial infections (3) and community-acquired pneumonia (CAP) (4). *S. aureus* is a major pathogen of hospital-acquired pneumonia, whereas *S. aureus* CAP (SA-CAP) represents only 5% of CAP cases admitted to intensive care units in the United States (5) and 1 to 5.6% in Europe (6, 7). However, the prevalence of *S. aureus* in CAP has increased in recent decades, mainly due to the emergence of new lineages of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) that have become highly prevalent in the community, notably in the United States (8–10). Moreover, despite being infrequent, SA-CAP is a severe disease; mortality ranges from 20 to 44.5%, and there are significant age-dependent disparities (6, 9, 11–14). Deciphering the molecular mechanisms involved in host-pathogen interactions is therefore central to better understand SA-CAP physiopathology.

The human body, but more specifically the airway and the lungs, have broad defense mechanisms against pathogen invasion (15–20), at the forefront of which is the pulmonary epithelium (17, 19, 21–23), followed by professional immune cells (24,

Citation Pivard M, Moreau K, Vandenesch F. 2021. *Staphylococcus aureus* arsenal to conquer the lower respiratory tract. *mSphere* 6:e00059-21. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00059-21>.

Editor Paul D. Fey, University of Nebraska Medical Center

Copyright © 2021 Pivard et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to François Vandenesch, francois.vandenesch@univ-lyon1.fr.

Published 19 May 2021

25). How *S. aureus* is able to challenge those mechanisms and successfully colonize tissue and replicate is thus a central question. For nearly 3 decades, the role and mechanisms of action of *S. aureus* toxins, adhesins, proteases, and regulatory proteins have been extensively investigated and characterized *in vitro* (26–33). Nonetheless, the pathological impact of each of these virulence factors on pulmonary infections in humans is not fully understood. Historically, clinical evidence of their involvement, or at least association, in the occurrence and/or outcome of pneumonia has been assessed for a very limited number of them, namely, the alpha-toxin (Hla) in 1999 (34), the superantigenic toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) in 2000 (35), and Panton-Valentine leucocidin (PVL) in 2002 (12). Since then, there has been growing evidence of the implication of these three toxins, as well as other virulence factors, at different steps of pulmonary infection.

This review follows step by step the mechanisms and virulence factors deployed by *S. aureus* during CAP, starting with the adaptation and invasion of the pulmonary tissue, followed by immune escape and the acute inflammatory response induced. Although pathogenesis is much more complex than this sequential description, this scheme was chosen for convenience of the review. The virulence factors involved in *S. aureus* CAP virulence with *in vitro* and/or *in vivo* evidence are summarized in Table 1. All *in vivo* data reported in this review were from animal models unless otherwise specified.

ADAPTATION AND INVASION

Very little is known about the mechanisms by which *S. aureus* induces lung infection in the absence of nasal carriage. However, it has been hypothesized that *S. aureus* reaches the lower respiratory tract from nasal colonization by air uptake during breathing by the host (1). Thus, nasal colonization by *S. aureus* and the associated increased risk of developing further infection has been thoroughly documented in cotton rats and mice (36, 37), as well as in clinical studies (38, 39), as reviewed by Sakr et al. (40) and by Kluytmans et al. (41); furthermore, nasal decolonization contributes to a decrease in deep *S. aureus* infections (42, 43). However, most studies were conducted on postoperative infections, therefore limiting our knowledge of the impact of *S. aureus* carriage on CAP occurrence. Nevertheless, the association between pneumonia and nasal colonization has been reported in several clinical studies (38, 41) and in two studies involving mouse models, in which previous nasal colonization increased the severity or the risk of developing pneumonia (37, 44). During nasal colonization, *S. aureus* upregulates several virulence factors (45), particularly adhesins such as clumping factor B (ClfB) (46, 47), wall teichoic acid (WTA) (36), and iron surface determinant A (IsdA), which is part of the iron acquisition pathway of *S. aureus* (29, 45). Recently, Yang et al. demonstrated that a vaccine against clumping factor A (ClfA) and IsdB, another protein from the iron acquisition pathway, reduces the severity of pneumonia in a mouse model after nasal injection (48), emphasizing the association of colonization factor expression with pneumonia. Overall, previous nasal colonization by *S. aureus* seems to be the main route of access to the lung. However, the mechanisms involved in the transition between the upper to the lower respiratory tract remain unclear.

Adaptation to the lung environment. *S. aureus* adapts to its new environment when it reaches the lungs and therefore modifies the expression of various factors in comparison with the nasal colonization state. Indeed, the lumen of the pulmonary tissue is poor in nutrients and metal ions, particularly iron (49), and is coated with pulmonary mucus (17, 50) that is composed of mucin (51) and surfactant proteins (18, 52). The low availability in nutrients reduces the overall energy metabolism of *S. aureus* with, notably, an upregulation of glycolysis and a downregulation of gluconeogenesis (53). Regarding iron uptake, *S. aureus* uses two main mechanisms, siderophores and heme acquisition by the Isd system or the heme transport system (Hts) (29, 54). The regulation of these mechanisms occurs predominantly through the ferric uptake regulator (Fur) (29), which is a central regulator for virulence adaptation and activation

TABLE 1 Virulence factors implicated in *S. aureus* virulence during pneumonia with *in vitro* and/or *in vivo* evidence

Virulence factor	Infection step	Role/mechanism(s) ^b	Reference(s) ^a
<i>agr</i> system	Adaptation	Virulence regulation	140, 200
Alpha-toxin (Hla)	Invasion	Pulmonary epithelial disruption	59, 100, 103
	Host defense escape	Ciliary beat frequency impairment	98, 100, 107
		Macrophage digestion avoidance	130
Beta-toxin	Mayhem in the lung	Cytokine production induction	101, 166, 167, 168
	Host defense escape	Ciliary beat frequency impairment	108
		Epithelial phagolysosome escape	113
Biofilm	Mayhem in the lung	Cytokine production induction	163, 166
	Adaptation	<i>S. aureus</i> aggregation and protection	62, 63
ClfA/ClfB	Colonization	Adhesion factor	47, 48
	Host defense escape	Macrophage phagocytosis inhibition	129
Cna	Colonization	Adhesion factor	201, 202
Complement-binding protein (Ecb)	Host defense escape	Complement inhibition	155
Delta-toxin (Hld)	Host defense escape	Epithelial phagolysosome escape	113
Enterotoxins B and C (SEB and SEC)	Mayhem in the lung	Abnormal T-lymphocyte activation	170, 171
Fibrinogen-binding protein (Efb)	Host defense escape	Complement inhibition	155
Fibrinogen-binding protein (Fnbp)	Colonization	Adhesion factor	65
	Adaptation	Biofilm component	65, 68
Fur and iron acquisition	Adaptation	Metabolism adaption	57
IgG binding protein (Sbi)	Host defense escape	Complement inhibition	152, 153
IsdB	Adaptation	Adaptation to iron deprivation	29, 48
Nuc	Host defense escape	NET DNA degradation	146, 147, 148
Panton-Valentine leucocidin (PVL)	Host defense escape	Macrophage and neutrophil lysis	119, 122, 123, 138
	Mayhem in the lung	Cytokine production induction	12, 120, 163
Phenol-soluble modulins α (PSMα)	Adaptation	Biofilm dispersion	86
	Host defense escape	Epithelial and macrophage phagolysosome escape	114
	Mayhem in the lung	Necroptosis induction	177
Phevalin	Host defense escape	Neutrophil lysis	141, 142
	Host defense escape	Epithelial phagolysosome escape	115
PhnD	Adaptation	<i>S. aureus</i> aggregation	59
Staphylococcal protein A (Spa)	Invasion	Pulmonary epithelial disruption	70, 97
	Host defense escape	Ig binding	157
		Abnormal B lymphocyte activation and death	157, 158, 159
SEIX	Mayhem in the lung	Cytokine production induction	70, 160
	Host defense escape	Necroptosis induction	177
		Neutrophil phagocytosis inhibition	143, 144
Serine protease SplA	Mayhem in the lung	Abnormal T-lymphocyte T activation	143
	Invasion	Mucine degradation	96
Staphopain A (ScpA)	Host defense escape	Surfactant protein A (SP-A) degradation	105
TSST-1	Mayhem in the lung	Cytokine production induction	35
		Abnormal T-lymphocyte T activation	170, 171

^aReferences for virulence factors implicated in pneumonia infection with animal models are highlighted in bold. References highlighted in italics present clinical evidence.

^bNET, neutrophil extracellular trap(s).

(55, 56). During lung infection, in the presence of low concentrations of iron, Fur promotes the *Isd* system (55, 57), as well as certain virulence factors, such as Hla and HlgC of gamma-hemolysin (57), and biofilm production through the upregulation of the *ica* operon (55, 58).

Aggregation and biofilm formation are pertinent mechanisms of bacterial adaptation to the lung environment, and *S. aureus* aggregates within a very short period of time (1 h after nasal inoculation), when it first interacts with the pulmonary epithelium (59). Among the *S. aureus* factors contributing to aggregation, PhnD, a phosphonate ABC transporter substrate binding protein, described in *S. epidermidis* for its contribution to biofilm (60), stabilizes the aggregate. Its depletion makes *S. aureus* more vulnerable to antibiotics and partially reduced lethality in a pneumonia mouse model (59). In addition to PhnD, in the sequence type 239 (ST239) MRSA lineage from Asia, a novel gene called *sasX* was identified as promoting nasal colonization and large bacterial aggregates (37). Further investigation on *sasX* has shown that its neutralization by specific antibodies reduces lung injuries *in vivo* (61). In addition to providing protection, this aggregate formation is the first step in the initiation of biofilm production (62).

Biofilm allows both the protection and replication of *S. aureus* (33, 62, 63). Its composition depends on the maturation state, the environment, and the bacterium's genetic background (64). However, several components are conserved, such as extracellular DNA, the microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs), and aggregation factors, as well as virulence factors that are mostly expressed in the last steps of the biofilm. Among the MSCRAMMs, most of them are already expressed during nasal colonization; these include fibrinogen-binding proteins (FnBPs), SdrC, and ClfB (26, 65–68). Among the other virulence factors potentially involved are protein A (Spa) (69, 70), either cell wall anchored or released into the extracellular milieu (71), as well as the CHIPS and SCIN proteins (72), both implicated in immune evasion (73, 74). Other compounds involved in biofilm formation were thoroughly described in a review by Paharik et al. (62).

Biofilm enhances resistance to phagocytosis and antimicrobial molecules (e.g., antibiotics), while also allowing *S. aureus* replication, leading to an increase in bacterial density and regulatory activity switching. At the beginning of lung colonization, only a few bacterial cells reach the lung epithelium, resulting in a low bacterial density and thus in an inactive quorum sensing (QS) regulatory system (*agr*) that leads to the low expression of its effector, RNAIII. In the absence of RNAIII, the transcriptional regulatory factor Rot represses the expression of several *S. aureus* virulence factors, including Hla, the PVL, and LukDE (75–77). This repression prevents a strong immune reaction in the early steps of the infection. Furthermore, Rot induces biofilm formation (78) and the expression of surface proteins (75, 79, 80) such as Spa, ClfB, and SdrC (66, 67). In the second step of colonization, biofilm formation allows *S. aureus* to replicate and to gradually increase its bacterial density, promoting the *agr* QS system. During its replication, *S. aureus* produces an accumulating amount of an autoinducing peptide (AIP), encoded by *agrD* of the *agrACDB* operon. Upon maturation and secretion via AgrB, AgrD AIP occurs in the form of a tailed thiolactone ring with autoinducing activity on the membrane protein, AgrC, belonging to a two-component regulatory system (TCS). The accumulation of AIP during exponential growth induces the autophosphorylation of AgrC in its cytoplasmic domain, leading to the activation of AgrA (the effector of the TCS), which in turn activates the *agrACDB* operon promoter in an autocatalytic circuit, as well as the divergent promoter P3 producing RNAIII (81, 82). RNAIII represses numerous cell wall-associated proteins and the global regulator Rot by an antisense RNase III-dependent mechanism (31, 83). Consequently, *S. aureus* expresses numerous virulence factors, such as PVL and Hla toxins (84, 85) and phenol-soluble modulins (PSM) (86, 87), which allow biofilm dispersion.

However, the *agr* system is not the only regulatory system involved in *S. aureus* virulence factor expression; SaeRS, a TCS which, unlike *agr*, is mainly activated by neutrophil signals (88, 89), also promotes the expression of toxins such as superantigens, hemolysins, and proteases (79, 88). In addition, a cytoplasmic regulator, SarA, activated during periods of metabolic stress or in the stationary growth phase, modulates virulence factor expression along with *agr* and SaeRS and upregulates the *agr* system (76, 90). Thus, *S. aureus* inaugurates lung colonization under the Rot regulation climax and later on, following bacterial replication, switches to a more aggressive state upon quorum sensing dependent activation of the *agr* system and SarA. This virulence state is exacerbated by the induction of the SaeRS system by the innate immune response (91). Specific mutations/variants of these regulatory systems, in particular for the *agr* system, have been related to more or less virulent strains in the context of pneumonia (92, 93).

This accurate adaptation of *S. aureus* progressively enables it to reach, colonize, and then invade the pulmonary tissue, from the mucus to the extracellular matrix (ECM).

Invasion. To colonize the tissue, *S. aureus* first passes through the mucus and then through the tight junctions (TJs) of lung epithelial cells (Fig. 1A). The mucus is produced by the goblet cells to protect the epithelium by trapping microorganisms and is therefore the first host rampart. It is composed of water, ions, lipids, surfactant proteins

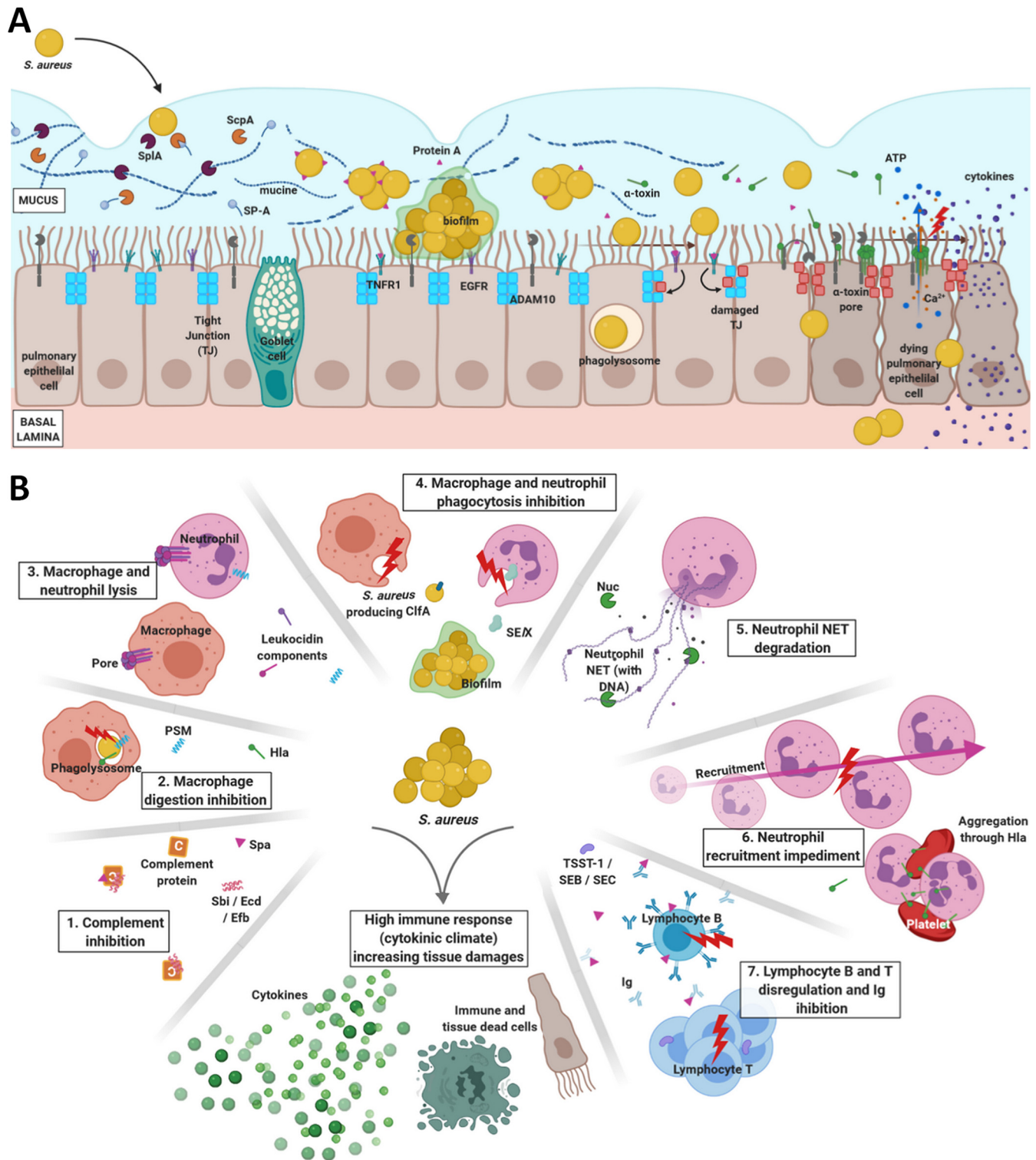


FIG 1 (A) *S. aureus* epithelial barrier invasion. *S. aureus* first crosses the mucus, which is made of mucine and surfactant protein A (SP-A). Both host proteins are degraded by serine protease StpA and staphopain A (ScpA), respectively. *S. aureus* rapidly aggregates and cleaves staphylococcal protein A (Spa) from the cell wall. The aggregation leads to biofilm formation and quorum sensing *agr* regulation activation. Spa simultaneously interacts with the TNFR1 and EGFR host receptors on the pulmonary epithelial cells, initiating the disruption of the epithelial barrier. Upon reaching a bacterial density threshold, the biofilm is dissipated and the bacteria produce invasins, including the alpha-toxin (Hla). Hla pursues Spa pulmonary epithelium disruption through (i) disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 (ADAM10) hijacking that induces tight junction (TJ) degradation and (ii) pore formation, which lyses the epithelial cells. In addition, pore formation causes ATP and Ca^{2+} leaks that impede the ciliary beat frequency required for effective mucus clearance. Finally, epithelial cells are able to endocytose *S. aureus*, which can survive within the phagolysosome and escapes from it to induce the cell death. (B) *S. aureus* mechanisms to escape the host immune system, leading to harmful immune response. 1. Complement proteins can be trapped by Spa, Sbi, Ecd, and Efb, inhibiting *S. aureus* opsonization. 2. *S. aureus* can survive, replicate, and kill macrophages after its phagocytosis, thanks to

(Continued on next page)

(18, 94), and highly glycosylated proteins such as mucins (95). To get through the mucus, *S. aureus* targets its major component, mucin, using the serine protease SplA, which cleaves mucin-16 from the human pulmonary cell line (Fig. 1A). A mutant with *splA* deleted displayed reduced lung invasion *in vivo* (96). Subsequently, Spa and Hla initiate the disruption of the epithelial barrier (Fig. 1A). Spa destabilizes the epithelial barrier through its interaction with the EGFR and TNFR1 receptors on the cell surface (70). Spa interaction induces the activation of the RhoA/ROCK/myosin light chain (MLC) eukaryotic cell pathway, which results in the disruption of TJ of the epithelium (97). Hla also plays an important role in tissue invasion, since it can participate in pulmonary epithelium disruption and destruction. Hla is a pore-forming toxin (PFT) (98) that targets the disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 (ADAM10) (99), which is expressed at the epithelium surface. The interaction between ADAM10 and Hla leads to numerous molecular reactions, starting with the oligomerization of Hla proteins to form an heptameric β -barrel pore in the membrane (98). Pore formation leads to the release of ions, notably Ca^{2+} , which allows not only TJ disruption (59, 100) but also cell lysis (Fig. 1A) (59, 99, 101, 102). Moreover, the recruitment of ADAM10 by Hla hijacks its function; therefore, ADAM10 participates in TJ degradation by cleaving it through its enzymatic activity (Fig. 1A) (103). Overall, Hla and Spa are essential *S. aureus* weapons when infecting the host lung, since they allow *S. aureus* to pass from the lung lumen to the ECM (Fig. 1A). Although the *agr* system is activated, repressing MSCRAMM expression, the remaining MSCRAMMs at the surface of *S. aureus* allow strong interaction between *S. aureus* and the ECM (104).

In summary, *S. aureus* adapts to its new environment by regulating specific metabolic and virulence pathways. Subsequently, during its passage from the mucus of the lumen to the ECM, *S. aureus* evades numerous host defense mechanisms provided by the epithelium and the host immune system.

HOST DEFENSE ESCAPE

The lungs are confronted by numerous microorganisms, from the commensal population to invaders. Different cells and defense mechanisms are deployed by the host to prevent invasion from pathogenic microbes. The pulmonary epithelium, along with its mucus layer, forms the first rampart, followed by the immune system, and *S. aureus* has developed toxins and enzymes to escape these defense mechanisms.

Pulmonary epithelium. Within the mucus, the surfactant components are proteins with antimicrobial activities that initiate the killing of entrapped microorganisms (52) before their physical expulsion by the mucociliary escalator (19, 94). *S. aureus* simultaneously targets mucins with SplA (Fig. 1A) and surfactants with staphopain A (ScpA), a hydrolyzing enzyme that degrades surfactant protein A (SP-A, not to be confounded with Spa [staphylococcal protein A]) (Fig. 1A) (105), an airway immune defense effector (52). The deterioration of SP-A enables *S. aureus* to aggregate and adhere to the pulmonary epithelium (105).

The ciliary beat of the pulmonary epithelial cells allows the clearance of mucus-embedded microorganisms. To avoid its elimination, *S. aureus* inhibits the mucociliary escalator in several ways. Pore formation by the oligomerization of Hla in the membrane of epithelial cells allows the release of ions, notably Ca^{2+} (98, 100), and the leak of ATP in the extracellular medium (106), both of which can modify the ciliary beat frequency

FIG 1 Legend (Continued)

Hla and PSM α . 3. Bicomponent leucocidin PVL, but also LukDE, LukAB, and HlgCB, can induce pore formation in neutrophil and macrophage membranes, leading to cell death. 4. *S. aureus* phagocytosis is prevented by biofilms and ClfA for macrophages and by biofilms and SEIX for neutrophils. 5. The nuclease Nuc can degrade neutrophil NET DNA to avoid trapping. 6. SCIN, CHIPS, Spa, and Sbi are proteins capable of inhibiting neutrophil recruitment. By aggregating platelets and neutrophils, Hla can also impede neutrophil recruitment at the infection location. 7. Both lymphocytes are targeted—B cells by Spa and T cells by TSST-1, SEB, and SEC. The interactions between the toxins and the lymphocytes dysregulates lymphocyte activation and replication. Spa can also interact with Ig, preventing its interaction with the bacteria. All of these mechanisms increase the immune response, generating acute inflammation that damages the pulmonary tissue, in addition to *S. aureus* damage. PSM, phenol-soluble modulins(s); NET, neutrophil extracellular trap(s). Figure created with BioRender.com.

(Fig. 1A) (107). In addition, the synergistic action of the beta-toxin with Hla between 8 and 12 h after their contact with the epithelial cells drastically decreases the ciliary beat required for effective mucus clearance (34, 108).

Finally, although the pulmonary epithelial cells are nonspecialized phagocytes, they can capture *S. aureus*. It is as yet unclear whether the epithelial cells actively phagocytose *S. aureus*, if it is *S. aureus* that invades the epithelial cell, or if it is a combination of both. Indeed, epithelial cells can internalize bacteria (109–111), a mechanism mediated in part by the efflux pump Tet38 of *S. aureus* (Fig. 1A) (111, 112). *S. aureus* is able to enter pulmonary epithelial cells through the interaction between the Tet38 efflux pump and CD36 eukaryotic cell membrane protein in A549 cells (lung epithelial cell line) (112). Following internalization, *S. aureus* rapidly escapes from the phagolysosome (2 h) and induces cell death via several effectors, namely PSM α , PSM β , Hld, beta-toxin (111, 113, 114), and a nonribosomal peptide (phevalin) previously identified in *Streptomyces* (115, 116) and which is required for full virulence *in vivo* (115).

Altogether, *S. aureus* possesses several toxins and enzymes that allow the bacteria to penetrate through the mucus and the epithelial barrier. Although the pulmonary epithelium is a major line of defense, the host also possesses other cells and mechanisms to protect itself, notably the immune response. However, even these defenses can be defeated by *S. aureus*.

Macrophages. Alveolar macrophages are the resident macrophages of the pulmonary tissue and the second line of defense when pathogens succeed in reaching and crossing the epithelium (20). Their major function is to phagocytose the pathogens or their debris, a function that is impaired by *S. aureus* through three major mechanisms.

The first mechanism that allows *S. aureus* to avoid macrophage phagocytosis is to destroy the macrophages using pore-forming toxins (PFT), also known as leucocidins. Leucocidins target specific cells through specific receptors at their membrane surfaces to induce pore formation, followed by cell death (Fig. 1B) (32). Five leucocidins, namely, LukAB (LukGH) (117), LukDE (118), HlgAB, HlgCB, and PVL (119, 120), target macrophages after their interactions with their receptors, namely, CD11b for LukAB, CCR5, and CXCR1/2 receptors for LukDE (118, 121), CCR2 and CXCR1/2 for HlgAB, C5aR1/R2 for HlgCB, and C5aR1/R2 and CD45 for the PVL (119, 122, 123). Except for the PVL, whose impact on pneumonia severity has been highlighted by several studies, including clinical ones (12, 14, 124–128), the roles of LukAB, LukDE, and HlgAB/CB have not yet been elucidated.

The second way for *S. aureus* to avoid phagocytosis is by protecting itself by hiding and forming agglomerates inside the biofilm (Fig. 1B) (63). In this context, ClfA, which is expressed during biofilm formation, as mentioned in the “Adaptation to the lung environment” paragraph, impairs macrophage phagocytosis (129). Although there is no direct evidence of ClfA involvement with alveolar macrophages, Yang et al. reported that immunity against ClfA reduces pneumonia severity in mice (48).

Finally, the third mechanism to counter phagocytosis is the capacity of *S. aureus* to survive within macrophages. The activation of the NLRP3 inflammasome by Hla leads to the recruitment of mitochondria away from the phagosome, thus preventing the digestion of the bacteria inside the phagolysosome (Fig. 1B) (130). In addition, two studies have reported the ability of *S. aureus* to survive, replicate, and finally kill macrophages (131), in particular due to PSM α (114).

Neutrophils. Neutrophils are professional antimicrobial cells that use phagocytosis, degranulation, antimicrobial proteins, and neutrophil extracellular traps (NET) to clear pathogens from infected tissues (20, 24). As a result, human neutrophils are one of the main targets of *S. aureus* toxins (132, 133).

First, as neutrophils are nonresident immune cells, *S. aureus* can impair neutrophil recruitment by the expression of CHIPS and SCIN factors, which are chemotaxis inhibitors (Fig. 1B) (24, 73, 74) and which are part of an “immune evasion cluster” present in human strains but generally not in bovine strains (134). Staphopain A can also inhibit the chemotaxis of neutrophils and their activation (Fig. 1B) (135); however, the role of these three proteins in the course of pneumonia in human remains to be confirmed.

Another possible mechanism preventing the proper localization of neutrophils at their target site is the aggregation of both platelets and neutrophils induced by Hla, thus disturbing their recruitment, a mechanism that may occur in the lung (Fig. 1B) (136).

Second, *S. aureus* is able to kill neutrophils, largely by the activity of PFT. The role of PVL is predominant in neutrophil lysis (137), notably demonstrated in rabbits and humanized mouse models of pneumonia (Fig. 1B) (124, 125, 138). The bicomponent leucocidins like HlgCB, which targets the same receptors as PVL, LukDE, and LukAB, have not been experimentally demonstrated as key players in *S. aureus* pneumonia so far. Conversely, the degradation products of PSM-lysed neutrophils (139) are responsible for lung injuries in mice (140). Moreover, PSMs can kill neutrophils upon *S. aureus* phagocytosis (141), and PSM α 3 synergizes with PVL to kill neutrophils (Fig. 1B) (142).

Another way to inhibit the function of neutrophils is to block their phagocytosis. Superantigen exoprotein (SAG) is a group of toxins that includes the toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) and 18 staphylococcal enterotoxins (SE). These are responsible for polyclonal T-cell receptor (TCR) activation, leading to massive T-cell expansion and cytokine secretion. In 2011, a staphylococcal enterotoxin-like protein, SEIX, encoded in the core genome, was identified as being implicated in *S. aureus* virulence in a rabbit model of pneumonia (143). Recently, one of its mechanisms was characterized; unlike the other SAG, this mechanism does not involve interaction with T cells, but it inhibits neutrophil phagocytosis (Fig. 1B) (144), leading to increased mortality in a pneumonia rabbit model.

Finally, NET are a well-organized and structured combination of DNA and cytosolic proteins that entrap pathogens in order to kill them and prevent their dissemination (145). DNA is one of the major components of NET; therefore, the secretion of Nuc, a nuclease produced by *S. aureus*, is very relevant means of escaping from NET (Fig. 1B) (146). In a murine pulmonary infection model, secretion of Nuc in the lung decreased *S. aureus* clearance and increased mortality (147). *S. aureus* is also able to counteract NET by other mechanisms, such as the conversion of NET into deoxyadenosine, which induces immune cell death (148). However, this mechanism was explored in kidney abscess in a mouse model and not in pneumonia.

Opsinization and humoral response. Phagocytosis by specialized cells such as macrophages and neutrophils can be induced by the recognition of bacterial cell walls or opsonins, such as complement proteins or antibodies (mostly IgG) (149, 150), that target both cell wall-associated proteins and exotoxins (151). In addition to its direct action on phagocytic cells, *S. aureus* targets the complement or antibody-mediated opsonization pathways.

S. aureus secretes proteins that inhibit complement proteins, such as Sbi, which complexes complement proteins (152, 153), and Ecb (also known as Ehp), which inhibits the convertase activity of the C3 complement protein, as does Efb through its C terminus (154). Deletion mutants of Ecb and Efb proteins are reported to provoke reduced mortality *in vivo* (Fig. 1B) (155). Other proteins, such as SCIN and CHIPS, which inhibit neutrophil chemotaxis through the complement, and Spa, have been reported to impede the complement; nonetheless, their involvement in pneumonia through complement inhibition has yet to be proved (156).

Spa is important in *S. aureus* virulence in the context of pneumonia, as mentioned previously, and, in addition to epithelium disruption, Spa impedes the humoral response. It is cleaved and released in to the extracellular environment (71) and is able to bind Ig and prevent interaction with the target epitope (157). Furthermore, it interferes in lymphocyte B activation and proliferation, leading to (i) the reduction of phagocytosis of *S. aureus* (157), (ii) antibody production impediment (158), and (iii) disordered activation, finally leading to the death of the B cells (Fig. 1B) (159). These mechanisms have not yet been studied in the context of pneumonia; however, due to the significant interaction between Spa and the variable heavy 3 (VH3)-type B cell receptors, these phenomena would very likely occur in the lungs.

Overall, *S. aureus* has developed a wide range of proteins to inhibit and escape host defenses, including the immune system. Nevertheless, the presence of *S. aureus*, and the lysis and dysregulation of epithelial and immune cells, lead to an acute inflammatory response. This acute inflammation can still be an advantage for *S. aureus*, by contributing to overall tissue damage.

MAYHEM IN THE LUNG

Cytokine production. The acute inflammatory response first results in the accumulation of cytokines produced by the lung epithelial cells (Fig. 1B). More specifically, during *S. aureus* infection, the interaction between *S. aureus* and the Toll-like receptor 2 (TLR2) of the epithelial cell induces the NF- κ B pathway, and the production of proinflammatory cytokines and tumor necrosis factor (TNF) (156). Furthermore, via its interaction with TNFR1 (70, 160), Spa primes the secretion of interleukin-8 (IL-8) and of IL-16, an immune cell chemoattractant (161), which is responsible for lung damage *in vivo* (160). This phenomenon is amplified by the activation of EGFR, which increases the availability of TNFR1 at the cell surface (162). Moreover, the interaction between Hla and ADAM10 induces the secretion of IL-1 β by the epithelium; the knockout of ADAM10 in mice protects against lethal *S. aureus* pneumonia through the reduction of IL-1 β production (101). The PVL toxin also leads to IL-1 β production by macrophages, acting in a paracrine manner to trigger IL-8 secretion by the epithelial cells (163). Finally, TSST-1 also induces the production of TNF and IL-8 by the pulmonary epithelium and thus promotes inflammation (35). Taken together, the epithelium initiates a strong cytokinetic response in order to mobilize the immune system.

The pulmonary epithelial cells produce cytokines when in contact with *S. aureus* toxins, as do the immune cells via the NLRP3 inflammasome pathway (Fig. 1B). The inflammasome is an intracytoplasmic multiprotein complex activated by cell stresses or infections and is responsible for the release of proinflammatory cytokines, including IL-1 β (164, 165). Beta-toxin, gamma-hemolysin (25, 163, 166), PVL (25, 120, 163), and Hla (166–168) trigger the NLRP3 inflammasome in macrophages, monocytes, and neutrophils, resulting in proinflammatory IL-1 β and IL-18 secretion that is responsible for necrotic injuries and severe pneumonia *in vivo* (167). The inhibition of the inflammasome in the pneumonia mouse model results in a decrease of cytokines in the pulmonary tissue and therefore in decreased lung injuries (169). In addition to inflammasome activation in immune cells, most of these toxins, such as PVL and gamma-hemolysin, can lyse macrophages and neutrophils (119, 122), leading to an involuntary release of cytokines and exacerbating local inflammation.

Lymphocyte response dysregulation. In addition to this cytokine storm, *S. aureus* impacts several other immune mechanisms, including the activation of lymphocytes (Fig. 1B). As mentioned above, SA α g TSST-1, along with the enterotoxins SEB, SEC, and SEIX, induces nonspecific T-lymphocyte activation and proliferation and, as a result, increases lung damage (143, 170). This polyclonal activation of T cells participates in the cytokinetic storm, as T cells promote inflammation through cytokine release. These deleterious effects are circumvented by antibodies against TSST-1, SEB, and SEC in rabbit models (171). In addition, Parker et al. have demonstrated that this T-cell activation contributes to *S. aureus* pathogenicity by increasing lung damage (172). Therefore, the inhibition of abnormal T-cell activation might be a therapeutic option for future development.

B lymphocytes, implicated in antibody responses, are also targeted, especially by Spa. The latter first monopolizes the immunoglobulin response by promoting anti-Spa immunoglobins produced by plasma cells and B cells, instead of immunoglobins against other secreted toxins, such as Hla or PVL (158). Second, Spa, by its ability to interact with B cell receptors, reduces their proliferation, but it predominantly induces B cells apoptosis after 36 to 48 h via the caspase pathway (159) via Spa shedding from the bacterial surface (71). As immunotherapies provide good evidence of efficacy to reduce the risk of occurrence and severity of *S. aureus* pneumonia in animals (173), and

also in humans (174), the impedance of B cells by *S. aureus* may contribute to the persistence of infection.

Thus, both types of lymphocyte are impaired by *S. aureus*, with, on the one hand, an increase of inflammation by the T lymphocytes and, on the other hand, an inefficient humoral response dependent on B lymphocytes, allowing persistent *S. aureus* infection.

Necroptosis induction and efferocytosis inhibition. Necroptosis is a cellular suicide mechanism used by microorganism-infected cells to prevent the replication and spread of the intruder (175). It leads to the activation of a proinflammatory pathway (IL-6, TNF, IL-1 α , and IL-1 β) that recruits phagocytes to clear debris after cell death and phagocytose dying cells (efferocytosis). The latter mechanism is important for the resolution of inflammation and tissue integrity restoration (176).

S. aureus is able to impact both mechanisms. First, it increases necroptosis, leading to acute cytokine release through secretion of toxins. Indeed, Hla, LukAB, and PSM participate in necroptosis mechanism induction by activating RIP1/RIP3/MLKL signaling in macrophages. Necroptosis impairment or inhibition of these toxins in the pneumonia mouse model decreases *S. aureus* virulence and improves its clearance (177). Regarding efferocytosis, to date only Hla has been reported as an inhibitor; by interacting with alveolar macrophages, it reduces their ability to phagocytose dying neutrophils (178). In 2014, Greenlee et al. demonstrated that when phagocytosed by neutrophils, *S. aureus* survives in the phagolysosome and decreases the efferocytosis of neutrophils by macrophages. In addition, *S. aureus* increases the production of cytokines by macrophages, exacerbating inflammation in the tissue (179). However, the pathophysiological impact of this phenomenon has not yet been assessed in any disease models, and more studies are required to further understand the manipulation of these mechanisms by *S. aureus*.

Other cell death mechanisms are also impeded or diverted and were recently reviewed by Groud et al. (180).

Taken together, *S. aureus* pneumonia can lead to severe outcomes due to the tissue necrosis induced by *S. aureus* itself, but also to immune-driven inflammation. The reduction of this inflammation is one way to prevent lung tissue damage. This has been demonstrated in pneumonia mouse models, in which cytokine production was hindered by the inhibition of NF- κ B signaling (181), NLRP3 inflammasome inhibition (169), and IL-1R signaling (182). Another way is to inhibit *S. aureus* toxins, notably by using passive immunotherapy approaches, such as neutralization with antibodies targeting Hla, PVL, HlgACB, and LukDE. This strategy has been demonstrated to be effective to protect animal models from *S. aureus* pneumonia (126, 127).

DISCUSSION AND PERSPECTIVES

S. aureus CAP are rare but severe infections with a high rate of lethality (9, 13). We describe here an arsenal of virulence factors produced by *S. aureus* that are implicated in its adhesion and adaptation to, as well as invasion of, the lung epithelium. The adaptation includes profound metabolic changes of the bacterium, notably in response to iron and nutrient limitations (53). However, most studies have assessed the impact of a given virulence factor using isogenic mutants or specific inhibitors, and therefore by comparing the presence/absence of the protein studied. These approaches omitted the notion of protein abundance. Indeed, most virulence factors belong to the bacterial core genome, and thus *in vivo* their impact on the host should reasonably depend on their level of expression. Only a few studies focusing on *S. aureus* pneumonia have investigated this parameter. Nevertheless, they offer new perspectives in the investigation of *S. aureus* virulence. For instance, in 2013, a link was established between mortality in the rabbit pneumonia model and Hla and PVL concentrations in lung samples (183). In humans, a severe outcome in ventilator-associated pneumonia was associated with higher Hla production *in vitro* (184). Quantitative approaches assessing the full

spectrum of *S. aureus* virulence factors remain essential to fully understand the multifactorial nature of bacterial pathogenesis.

An additional aspect that is often discussed but difficult to explore is research using human samples and associated clinical data. As described in this review, several experimental models (cell culture and animal models) have been used to study interactions between *S. aureus* and the lung environment. Although animal models tend to mimic the highly complex human physiopathology during pneumonia as well as possible, they remain simplistic, with obvious biases such as species-specific receptor polymorphisms, leading to great variations in susceptibility to a given toxin depending on the animal species (32). This phenomenon has been perfectly deciphered for PVL, for which, surprisingly, our closest relative (nonhuman primate) was mostly resistant to the toxin (185). Therefore, caution is necessary when drawing conclusion for human based on cellular or animal models describing *S. aureus* infection mechanisms.

One aspect not explored in this review is the complexity of the lung microbiota, which may impact both the transition from colonization to invasive infection and *S. aureus* virulence. These aspects were more explored in other settings, such as cystic fibrosis patients or hospital-acquired pneumonia, but are poorly defined in the context of CAP (186, 187). Finally, we did not develop the impact of other clinical conditions on CAP occurrence or severity, such as host comorbidity factors and the role of previous viral infection damaging the pulmonary epithelium. For example, several clinical and experimental studies have reported a consistent link between previous influenza infections and the severity of SA-CAP (44, 188–197). Influenza infections induce a switch in *S. aureus* to a more virulent status (44), and the virus damages the host epithelium (188, 191, 194) but also promotes *S. aureus* intrusion and adhesion to the pulmonary tissue (189, 192, 195). Another means for *S. aureus* to reach the lung is via the hematogenous route in the course of bacteremia. Clinical observations suggest that in the case of pneumonia initiated by the air route of infection only one lobe can be infected, whereas multilobar infections can be observed upon bacteremia. However, there is no experimental evidence suggesting that specific virulence factors are associated with one or the other route of infection; yet, it is of interest to note that Hla was shown to impact the severity of pneumonia by the hematogenous route in rabbit. Conversely, epidermal differentiation inhibitor B (EdinB), initially described as a potential virulence factor in skin infection by impairing the maturation of keratinocytes, was shown to increase *S. aureus* translocation to the blood in the course of pneumonia in mice (198, 199); however, this remains to be fully investigated.

S. aureus is able to cause severe infections, notably in the lung, through the production of an array of toxins and proteins. These virulence factors are highly efficient in counteracting the host's defense, including the immune system, which is even used to the advantage of *S. aureus*. With the emergence of new strains that possess newly discovered genes or accessory genes encoding toxins, such as the MRSA USA300 clones or the ST239 lineage that are implicated in CA pneumonia infection, better understanding of *S. aureus* virulence mechanisms is required to develop new therapeutic strategies.

In conclusion, the present review illustrates how it is the association of several virulence factors at specific infection steps, and the host response to these factors, that leads to severe staphylococcal pneumonia.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Thomas Henry for critical review of the manuscript. The manuscript was proofread and corrected by a native English speaker working for Hospices Civils de Lyon (P. Robinson).

M.P. was primarily responsible for writing the original draft. K.M. and F.V. contributed to its review and editing the final version.

We report no conflict of interest.

This study was not supported by a specific grant.

REFERENCES

- Deinhardt-Emmer S, Sachse S, Geraci J, Fischer C, Kwetkat A, Dawczynski K, Tuchscher L, Löffler B. 2018. Virulence patterns of *Staphylococcus aureus* strains from nasopharyngeal colonization. *J Hosp Infect* 100:309–315. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.12.011>.
- Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. 2015. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev* 28:603–661. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>.
- Jean S-S, Chang Y-C, Lin W-C, Lee W-S, Hsueh P-R, Hsu C-W. 2020. Epidemiology, treatment, and prevention of nosocomial bacterial pneumonia. *J Clin Med* 9:275. <https://doi.org/10.3390/jcm9010275>.
- David MZ, Daum RS. 2010. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev* 23:616–687. <https://doi.org/10.1128/CMR.00081-09>.
- Jain S, Self WH, Wunderink RG, Fakhran S, Balk R, Bramley AM, Reed C, Grijalva CG, Anderson EJ, Courtney DM, Chappell JD, Qi C, Hart EM, Carroll F, Trabue C, Donnelly HK, Williams DJ, Zhu Y, Arnold SR, Ampofo K, Waterer GW, Levine M, Lindstrom S, Winchell JM, Katz JM, Erdman D, Schneider E, Hicks LA, McCullers JA, Pavia AT, Edwards KM, Finelli L. 2015. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U.S. adults. *N Engl J Med* 373:415–427. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1500245>.
- de Miguel-Díez J, López-de-Andrés A, Hernández-Barrera V, Jiménez-Trujillo I, Méndez-Bailón M, de Miguel-Yanes JM, Jiménez-García R. 2017. Impact of COPD on outcomes in hospitalized patients with community-acquired pneumonia: analysis of the Spanish national hospital discharge database (2004–2013). *Eur J Intern Med* 43:69–76. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2017.06.008>.
- Walden AP, Clarke GM, McKechnie S, Hutton P, Gordon AC, Rello J, Chiche J-D, Stueber F, Garrard CS, Hinds CJ; on behalf of the ESICM/ECCRN GenOSept Investigators. 2014. Patients with community acquired pneumonia admitted to European intensive care units: an epidemiological survey of the GenOSept cohort. *Crit Care* 18:R58. <https://doi.org/10.1186/cc13812>.
- Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, Liassine N, Bes M, Greenland T, Reverdy M-E, Etienne J. 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerging Infect Dis* 9:978–984. <https://doi.org/10.3201/eid0908.030089>.
- Vardakas KZ, Matthaiou DK, Falagas ME. 2009. Incidence, characteristics and outcomes of patients with severe community acquired-MRSA pneumonia. *Eur Respir J* 34:1148–1158. <https://doi.org/10.1183/09031936.00041009>.
- Francis JS, Doherty MC, Lopatin U, Johnston CP, Sinha G, Ross T, Cai M, Hansel NN, Perl T, Ticehurst JR, Carroll K, Thomas DL, Nuernberger E, Bartlett JG. 2005. Severe community-onset pneumonia in healthy adults caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the Panton-Valentine leukocidin genes. *Clin Infect Dis* 40:100–107. <https://doi.org/10.1086/427148>.
- Masters IB, Isles AF, Grimwood K. 2017. Necrotizing pneumonia: an emerging problem in children? *Pneumonia (Nathan)* 9:11. <https://doi.org/10.1186/s41479-017-0035-0>.
- Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet J-C, Lina G, Bes M, Vandenesch F, Piémont Y, Brousse N, Floret D, Etienne J. 2002. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotizing pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* 359:753–759. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)07877-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)07877-7).
- Dalponete R de S, Heluany GCV, Michels M, Madeira K, Prado C de E. 2020. Surgical treatment of necrotizing pneumonia in children: a 10-year assessment. *Rev Col Bras Cir* 47:e20202374.
- Gillet Y, Tristan A, Rasigade J-P, Saadatian-Elahi M, Bouchiat C, Bes M, Dumitrescu O, Leloire M, Dupieux C, Laurent F, Lina G, Etienne J, Vanhems P, Argaud L, Vandenesch F. 2020. Risk factors of severity in community-acquired staphylococcal pneumonia. medRxiv doi:<https://doi.org/10.1101/2020.07.31.20162875>.
- White ES. 2015. Lung extracellular matrix and fibroblast function. *Ann Am Thorac Soc* 12:S30–S33. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201406-240MG>.
- Gu B-H, Madison MC, Corry D, Kheradmand F. 2018. Matrix remodeling in chronic lung diseases. *Matrix Biol* 73:52–63. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.03.012>.
- Hasan S, Sebo P, Osicka R. 2018. A guide to polarized airway epithelial models for studies of host-pathogen interactions. *FEBS J* 285:4343–4358. <https://doi.org/10.1111/febs.14582>.
- Knudsen L, Ochs M. 2018. The micromechanics of lung alveoli: structure and function of surfactant and tissue components. *Histochem Cell Biol* 150:661–676. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1747-9>.
- Leiva-Juárez MM, Kolls JK, Evans SE. 2018. Lung epithelial cells: therapeutically inducible effectors of antimicrobial defense. *Mucosal Immunol* 11:21–34. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.71>.
- Quinton LJ, Mizgerd JP. 2015. Dynamics of lung defense in pneumonia: resistance, resilience, and remodeling. *Annu Rev Physiol* 77:407–430. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021014-071937>.
- Invernizzi R, Lloyd CM, Molyneux PL. 2020. Respiratory microbiome and epithelial interactions shape immunity in the lungs. *Immunology* 160:171–182. <https://doi.org/10.1111/imm.13195>.
- Bals R, Hiemstra PS. 2004. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J* 23:327–333. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00098803>.
- Hiemstra PS, McCray PB, Bals R. 2015. The innate immune function of airway epithelial cells in inflammatory lung disease. *Eur Respir J* 45:1150–1162. <https://doi.org/10.1183/09031936.00141514>.
- Rigby KM, DeLeo FR. 2012. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. *Semin Immunopathol* 34:237–259. <https://doi.org/10.1007/s00281-011-0295-3>.
- Riches DWH, Martin TR. 2018. Overview of innate lung immunity and inflammation. *Methods Mol Biol* 1809:17–30. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8570-8_2.
- Foster TJ. 2019. Surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Spectr* 7. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0046-2018>.
- Tam K, Torres VJ. 2019. *Staphylococcus aureus* secreted toxins and extracellular enzymes. *Microbiol Spectr* 7. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0039-2018>.
- Spaulding AR, Salgado-Pabón W, Kohler PL, Horswill AR, Leung DYM, Schlievert PM. 2013. Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. *Clin Microbiol Rev* 26:422–447. <https://doi.org/10.1128/CMR.00104-12>.
- Hammer ND, Skaar EP. 2011. Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* iron acquisition. *Annu Rev Microbiol* 65:129–147. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102851>.
- Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M. 2014. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol* 12:49–62. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3161>.
- Wang B, Muir TW. 2016. Regulation of virulence in *Staphylococcus aureus*: molecular mechanisms and remaining puzzles. *Cell Chem Biol* 23:214–224. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.01.004>.
- Spaan AN, van Strijp JAG, Torres VJ. 2017. Leukocidins: staphylococcal bi-component pore-forming toxins find their receptors. *Nat Rev Microbiol* 15:435–447. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.27>.
- Joo H-S, Otto M. 2015. Mechanisms of resistance to antimicrobial peptides in staphylococci. *Biochim Biophys Acta* 1848:3055–3061. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.02.009>.
- Yun YS, Min YG, Rhee CS, Jung IH, Koh YY, Jang TY, Jung DH. 1999. Effects of alpha-toxin of *Staphylococcus aureus* on the ciliary activity and ultrastructure of human nasal ciliated epithelial cells. *Laryngoscope* 109:2021–2024. <https://doi.org/10.1097/00005537-199912000-00024>.
- Aubert V, Schneeberger D, Sauty A, Winter J, Sperisen P, Aubert J-D, Spertini F. 2000. Induction of tumor necrosis factor alpha and interleukin-8 gene expression in bronchial epithelial cells by toxic shock syndrome toxin 1. *Infect Immun* 68:120–124. <https://doi.org/10.1128/iai.68.1.120-124.2000>.
- Burian M, Rautenberg M, Kohler T, Fritz M, Krismer B, Unger C, Hoffmann WH, Peschel A, Wolz C, Goerke C. 2010. Temporal expression of adhesion factors and activity of global regulators during establishment of *Staphylococcus aureus* nasal colonization. *J Infect Dis* 201:1414–1421. <https://doi.org/10.1086/651619>.
- Li M, Du X, Villaruz AE, Diep BA, Wang D, Song Y, Tian Y, Hu J, Yu F, Lu Y, Otto M. 2012. MRSA epidemic linked to a quickly spreading colonization and virulence determinant. *Nat Med* 18:816–819. <https://doi.org/10.1038/nm.2692>.
- Paling FP, Wolkewitz M, Bode LGM, Klouwenberg PMCK, Ong DSY, Depuydt P, de Bus L, Sifakis F, Bonten MJM, Kluytmans JA JW. 2017. *Staphylococcus aureus* colonization at ICU admission as a risk factor for

- developing *S. aureus* ICU pneumonia. Clin Microbiol Infect 23:49:e9-49–e14. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.09.022>.
39. Wertheim HF, Vos MC, Ott A, Belkum A, van Voss A, Kluytmans JA, van Keulen PH, Vandenbroucke-Grauls CM, Meester MH, Verbrugh HA. 2004. Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. Lancet 364:703–705. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16897-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16897-9).
 40. Sakr A, Brégeon F, Mège J-L, Rolain J-M, Blin O. 2018. *Staphylococcus aureus* nasal colonization: an update on mechanisms, epidemiology, risk factors, and subsequent infections. Front Microbiol 9:2419. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02419>.
 41. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev 10:505–520. <https://doi.org/10.1128/CMR.10.3.505>.
 42. Sakr A, Brégeon F, Rolain J-M, Blin O. 2019. *Staphylococcus aureus* nasal decolonization strategies: a review. Expert Rev Anti Infect Ther 17:327–340. <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1604220>.
 43. Humphreys H, Becker K, Dohmen PM, Petrosillo N, Spencer M, van Rijen M, Wechsler-Fördös A, Pujol M, Dubouix A, Garau J. 2016. *Staphylococcus aureus* and surgical site infections: benefits of screening and decolonization before surgery. J Hosp Infect 94:295–304. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2016.06.011>.
 44. Reddinger RM, Luke-Marshall NR, Hakansson AP, Campagnari AA. 2016. Host physiologic changes induced by influenza A virus lead to *Staphylococcus aureus* biofilm dispersion and transition from asymptomatic colonization to invasive disease. mBio 7:e01235-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01235-16>.
 45. Jenkins A, Diep BA, Mai TT, Vo NH, Warren P, Suzich J, Stover CK, Sellman BR. 2015. Differential expression and roles of *Staphylococcus aureus* virulence determinants during colonization and disease. mBio 6:e02272-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.02272-14>.
 46. Wertheim HFL, Walsh E, Choudhury R, Melles DC, Boelens HAM, Miajlovic H, Verbrugh HA, Foster T, van Belkum A. 2008. Key role for clumping factor B in *Staphylococcus aureus* nasal colonization of humans. PLoS Med 5:e17. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050017>.
 47. Mulcahy ME, Geoghegan JA, Monk IR, O'Keefe KM, Walsh EJ, Foster TJ, McLoughlin RM. 2012. Nasal colonisation by *Staphylococcus aureus* depends upon clumping factor B binding to the squamous epithelial cell envelope protein Iorocrin. PLoS Pathog 8:e1003092. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003092>.
 48. Yang L, Cai C, Feng Q, Shi Y, Zuo Q, Yang H, Jing H, Wei C, Zhuang Y, Zou Q, Zeng H. 2016. Protective efficacy of the chimeric *Staphylococcus aureus* vaccine candidate IC in sepsis and pneumonia models. Sci Rep 6:20929. <https://doi.org/10.1038/srep20929>.
 49. Baker EH, Baines DL. 2018. Airway glucose homeostasis: a new target in the prevention and treatment of pulmonary infection. Chest 153:507–514. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.05.031>.
 50. Aberdein JD, Cole J, Bewley MA, Marriott HM, Dockrell DH. 2013. Alveolar macrophages in pulmonary host defence: the unrecognized role of apoptosis as a mechanism of intracellular bacterial killing. Clin Exp Immunol 174:193–202. <https://doi.org/10.1111/cei.12170>.
 51. Roy MG, Livraghi-Butrico A, Fletcher AA, McElwee MM, Evans SE, Boerner RM, Alexander SN, Bellinghausen LK, Song AS, Petrova YM, Tuvim MJ, Adachi R, Romo I, Bordt A, Bowden MG, Sisson JH, Woodruff PG, Thornton DJ, Rousseau K, De la Garza MM, Moghaddam SJ, Karmouty-Quintana H, Blackburn MR, Drouin SM, Davis CW, Terrell KA, Grubb BR, O'Neal WK, Flores SC, Cota-Gomez A, Lozupone CA, Donnelly JM, Watson AM, Hennessy CE, Keith RC, Yang IV, Barthel L, Henson PM, Janssen WJ, Schwartz DA, Boucher RC, Dickey BF, Evans CM. 2014. Muc5b is required for airway defence. Nature 505:412–416. <https://doi.org/10.1038/nature12807>.
 52. Wright JR. 2005. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. Nat Rev Immunol 5:58–68. <https://doi.org/10.1038/nri1528>.
 53. Chaffin DO, Taylor D, Skerrett SJ, Rubens CE. 2012. Changes in the *Staphylococcus aureus* transcriptome during early adaptation to the lung. PLoS One 7:e41329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041329>.
 54. Marchetti M, De Bei O, Bettati S, Campanini B, Kovachka S, Gianquinto E, Spyrikis F, Ronda L. 2020. Iron metabolism at the interface between host and pathogen: from nutritional immunity to antibacterial development. Int J Mol Sci 21:2145. <https://doi.org/10.3390/ijms21062145>.
 55. Johnson M, Sengupta M, Purves J, Tarrant E, Williams PH, Cockayne A, Muthaiyan A, Stephenson R, Ledala N, Wilkinson BJ, Jayaswal RK, Morrissey JA. 2011. Fur is required for the activation of virulence gene expression through the induction of the *sae* regulatory system in *Staphylococcus aureus*. Int J Med Microbiol 301:44–52. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.05.003>.
 56. Porcheron G, Dozois CM. 2015. Interplay between iron homeostasis and virulence: Fur and RyhB as major regulators of bacterial pathogenicity. Vet Microbiol 179:2–14. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.03.024>.
 57. Torres VJ, Attia AS, Mason WJ, Hood MI, Corbin BD, Beasley FC, Anderson KL, Stauff DL, McDonald WH, Zimmerman LJ, Friedman DB, Heinrichs DE, Dunman PM, Skaar EP. 2010. *Staphylococcus aureus* Fur regulates the expression of virulence factors that contribute to the pathogenesis of pneumonia. Infect Immun 78:1618–1628. <https://doi.org/10.1128/IAI.01423-09>.
 58. Johnson M, Cockayne A, Morrissey JA. 2008. Iron-regulated biofilm formation in *Staphylococcus aureus* Newman requires *ica* and the secreted protein Emp. Infect Immun 76:1756–1765. <https://doi.org/10.1128/IAI.01635-07>.
 59. Hook JL, Islam MN, Parker D, Prince AS, Bhattacharya S, Bhattacharya J. 2018. Disruption of staphylococcal aggregation protects against lethal lung injury. J Clin Invest 128:1074–1086. <https://doi.org/10.1172/JCI95823>.
 60. Lam H, Kesselly A, Stegalkina S, Kleanthous H, Yethon JA. 2014. Antibodies to PhnD inhibit staphylococcal biofilms. Infect Immun 82:3764–3774. <https://doi.org/10.1128/IAI.02168-14>.
 61. Liu Q, Du X, Hong X, Li T, Zheng B, He L, Wang Y, Otto M, Li M. 2015. Targeting surface protein SasX by active and passive vaccination to reduce *Staphylococcus aureus* colonization and infection. Infect Immun 83:2168–2174. <https://doi.org/10.1128/IAI.02951-14>.
 62. Paharik AE, Horswill AR. 2016. The staphylococcal biofilm: adhesins, regulation, and host response. Microbiol Spectr 4. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0022-2015>.
 63. Thurlow LR, Hanke ML, Fritz T, Angle A, Aldrich A, Williams SH, Engbretsen IL, Bayles KW, Horswill AR, Kielian T. 2011. *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation *in vivo*. J Immunol 186:6585–6596. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002794>.
 64. Moormeier DE, Bayles KW. 2017. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. Mol Microbiol 104:365–376. <https://doi.org/10.1111/mmi.13634>.
 65. Geoghegan JA, Monk IR, O'Gara JP, Foster TJ. 2013. Subdomains N2N3 of fibronectin binding protein A mediate *Staphylococcus aureus* biofilm formation and adherence to fibrinogen using distinct mechanisms. J Bacteriol 195:2675–2683. <https://doi.org/10.1128/JB.02128-12>.
 66. Barbu EM, Mackenzie C, Foster TJ, Höök M. 2014. SdrC induces staphylococcal biofilm formation through a homophilic interaction. Mol Microbiol 94:172–185. <https://doi.org/10.1111/mmi.12750>.
 67. Feuillie C, Formosa-Dague C, Hays LMC, Vervaecq O, Derclaye S, Brennan MP, Foster TJ, Geoghegan JA, Dufrene YF. 2017. Molecular interactions and inhibition of the staphylococcal biofilm-forming protein SdrC. Proc Natl Acad Sci U S A 114:3738–3743. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616805114>.
 68. Herman-Bausier P, El-Kirat-Chatel S, Foster TJ, Geoghegan JA, Dufrene YF. 2015. *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A mediates cell-cell adhesion through low-affinity homophilic bonds. mBio 6:e00413-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.00413-15>.
 69. Merino N, Toledo-Arana A, Vergara-Irigaray M, Valle J, Solano C, Calvo E, Lopez JA, Foster TJ, Penadés JR, Lasa I. 2009. Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 191:832–843. <https://doi.org/10.1128/JB.01222-08>.
 70. Gómez MI, Lee A, Reddy B, Muir A, Soong G, Pitt A, Cheung A, Prince A. 2004. *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. Nat Med 10:842–848. <https://doi.org/10.1038/nm1079>.
 71. Becker S, Frankel MB, Schneewind O, Missiakas D. 2014. Release of protein A from the cell wall of *Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci U S A 111:1574–1579. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317181111>.
 72. Sultan AR, Swierstra JW, Lemmens-den Toom NA, Snijders SV, Hansenová Maňásková S, Verbon A, van Wamel WJB. 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. <https://doi.org/10.1128/IAI.00352-18>.
 73. de Haas CJ, Veldkamp KE, Peschel A, Weerkamp F, Van Wamel WJB, Heezius ECJM, Poppelier MJ, Van Kessel KPM, van Strijp JAG. 2004. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial anti-inflammatory agent. J Exp Med 199:687–695. <https://doi.org/10.1084/jem.20031636>.

74. Postma B, Poppelier MJ, van Galen JC, Prossnitz ER, van Strijp JAG, de Haas CJC, van Kessel KPM. 2004. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* binds specifically to the C5a and formylated peptide receptor. *J Immunol* 172:6994–7001. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.11.6994>.
75. Killikelly A, Benson MA, Ohneck EA, Sampson JM, Jakoncic J, Spurrier B, Torres VJ, Kong X-P. 2015. Structure-based functional characterization of repressor of toxin (Rot), a central regulator of *Staphylococcus aureus* virulence. *J Bacteriol* 197:188–200. <https://doi.org/10.1128/JB.02317-14>.
76. Jenul C, Horswill AR. 2019. Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. *Microbiol Spectr* 7. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018>.
77. Balasubramanian D, Ohneck EA, Chapman J, Weiss A, Kim MK, Reyes-Robles T, Zhong J, Shaw LN, Lun DS, Ueberheide B, Shopsin B, Torres VJ. 2016. *Staphylococcus aureus* coordinates leukocidin expression and pathogenesis by sensing metabolic fluxes via RpiRc. *mBio* 7:e00818-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00818-16>.
78. Mootz JM, Benson MA, Heim CE, Crosby HA, Kavanaugh JS, Dunman PM, Kielian T, Torres VJ, Horswill AR. 2015. Rot is a key regulator of *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Mol Microbiol* 96:388–404. <https://doi.org/10.1111/mmi.12943>.
79. Benson MA, Lilo S, Nygaard T, Voyich JM, Torres VJ. 2012. Rot and SaeRS cooperate to activate expression of the staphylococcal superantigen-like exoproteins. *J Bacteriol* 194:4355–4365. <https://doi.org/10.1128/JB.00706-12>.
80. Said-Salim B, Dunman PM, McAleese FM, Macapagal D, Murphy E, McNamara PJ, Arvidson S, Foster TJ, Projan SJ, Kreiswirth BN. 2003. Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot. *J Bacteriol* 185:610–619. <https://doi.org/10.1128/jb.185.2.610-619.2003>.
81. Bronesky D, Wu Z, Marzi S, Walter P, Geissmann T, Moreau K, Vandenesch F, Caldelari I, Romby P. 2016. *Staphylococcus aureus* RNAIII and its regulon link quorum sensing, stress responses, metabolic adaptation, and regulation of virulence gene expression. *Annu Rev Microbiol* 70:299–316. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095708>.
82. Novick RP, Geisinger E. 2008. Quorum sensing in staphylococci. *Annu Rev Genet* 42:541–564. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.1.10807.091640>.
83. Geisinger E, Adhikari RP, Jin R, Ross HF, Novick RP. 2006. Inhibition of *rot* translation by RNAIII, a key feature of *agr* function. *Mol Microbiol* 61:1038–1048. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05292.x>.
84. Novick RP, Ross HF, Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B, Moghazeh S. 1993. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J* 12:3967–3975.
85. Cheung GYC, Wang R, Khan BA, Sturdevant DE, Otto M. 2011. Role of the accessory gene regulator *agr* in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Infect Immun* 79:1927–1935. <https://doi.org/10.1128/IAI.00046-11>.
86. Periasamy S, Joo H-S, Duong AC, Bach T-HL, Tan VY, Chatterjee SS, Cheung GYC, Otto M. 2012. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:1281–1286. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115006109>.
87. Peschel A, Otto M. 2013. Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nat Rev Microbiol* 11:667–673. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3110>.
88. Liu Q, Yeo W-S, Bae T. 2016. The SaeRS two-component system of *Staphylococcus aureus*. *Genes (Basel)* 7:81–20. <https://doi.org/10.3390/genes7100081>.
89. Geiger T, Goerke C, Mainiero M, Kraus D, Wolz C. 2008. The virulence regulator Sae of *Staphylococcus aureus*: promoter activities and response to phagocytosis-related signals. *J Bacteriol* 190:3419–3428. <https://doi.org/10.1128/JB.01927-07>.
90. Cheung AL, Nishina K, Manna AC. 2008. SarA of *Staphylococcus aureus* binds to the *sarA* promoter to regulate gene expression. *J Bacteriol* 190:2239–2243. <https://doi.org/10.1128/JB.01826-07>.
91. Reyes D, Andrey DO, Monod A, Kelley WL, Zhang G, Cheung AL. 2011. Coordinated regulation by AgrA, SarA, and SarR to control *agr* expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 193:6020–6031. <https://doi.org/10.1128/JB.05436-11>.
92. Montgomery CP, Boyle-Vavra S, Adem PV, Lee JC, Husain AN, Clasen J, Daum RS. 2008. Comparison of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pulsotypes USA300 and USA400 in a rat model of pneumonia. *J Infect Dis* 198:561–570. <https://doi.org/10.1086/590157>.
93. Villaruz AE, Bubeck Wardenburg J, Khan BA, Whitney AR, Sturdevant DE, Gardner DJ, DeLeo FR, Otto M. 2009. A point mutation in the *agr* locus rather than expression of the Panton-Valentine leukocidin caused previously reported phenotypes in *Staphylococcus aureus* pneumonia and gene regulation. *J Infect Dis* 200:724–734. <https://doi.org/10.1086/604728>.
94. Knowles MR, Daniels LA, Davis SD, Zariwala MA, Leigh MW. 2013. Primary ciliary dyskinesia: recent advances in diagnostics, genetics, and characterization of clinical disease. *Am J Respir Crit Care Med* 188:913–922. <https://doi.org/10.1164/rccm.201301-0059CI>.
95. Ridley C, Thornton DJ. 2018. Mucins: the frontline defence of the lung. *Biochem Soc Trans* 46:1099–1106. <https://doi.org/10.1042/BST20170402>.
96. Paharik AE, Salgado-Pabon W, Meyerholz DK, White MJ, Schlievert PM, Horswill AR. 2016. The Spl serine proteases modulate *Staphylococcus aureus* protein production and virulence in a rabbit model of pneumonia. *mSphere* 1:e00208-16. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00208-16>.
97. Soong G, Martin FJ, Chun J, Cohen TS, Ahn DS, Prince A. 2011. *Staphylococcus aureus* protein A mediates invasion across airway epithelial cells through activation of RhoA GTPase signaling and proteolytic activity. *J Biol Chem* 286:35891–35898. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.295386>.
98. von Hoven G, Qin Q, Neukirch C, Husmann M, Hellmann N. 2019. *Staphylococcus aureus* α -toxin: small pore, large consequences. *Biol Chem* 400:1261–1276. <https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0472>.
99. Wilke GA, Bubeck Wardenburg J. 2010. Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:13473–13478. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001815107>.
100. Kwak Y-K, Vikström E, Magnusson K-E, Vécsey-Semjén B, Colque-Navarro P, Möllby R. 2012. The *Staphylococcus aureus* alpha-toxin perturbs the barrier function in Caco-2 epithelial cell monolayers by altering junctional integrity. *Infect Immun* 80:1670–1680. <https://doi.org/10.1128/IAI.00001-12>.
101. Becker REN, Berube BJ, Sampedro GR, DeDent AC, Bubeck Wardenburg J. 2014. Tissue-specific patterning of host innate immune responses by *Staphylococcus aureus* α -toxin. *J Innate Immun* 6:619–631. <https://doi.org/10.1159/000360006>.
102. Kiedrowski MR, Paharik AE, Ackermann LW, Shelton AU, Singh SB, Starner TD, Horswill AR. 2016. Development of an *in vitro* colonization model to investigate *Staphylococcus aureus* interactions with airway epithelia. *Cell Microbiol* 18:720–732. <https://doi.org/10.1111/cmi.12543>.
103. Inoshima I, Inoshima N, Wilke G, Powers M, Frank K, Wang Y, Wardenburg JB. 2011. A *Staphylococcus aureus* pore-forming toxin subverts the activity of ADAM10 to cause lethal infection. *Nat Med* 17:1310–1314. <https://doi.org/10.1038/nm.2451>.
104. Josse J, Laurent F, Diot A. 2017. Staphylococcal adhesion and host cell invasion: fibronectin-binding and other mechanisms. *Front Microbiol* 8:2433. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02433>.
105. Kantyka T, Pyrc K, Gruca M, Smagur J, Plaza K, Guzik K, Zeglen S, Ochman M, Potempa J. 2013. *Staphylococcus aureus* proteases degrade lung surfactant protein A potentially impairing innate immunity of the lung. *J Innate Immun* 5:251–260. <https://doi.org/10.1159/000345417>.
106. Baaske R, Richter M, Möller N, Ziesemer S, Eiffler I, Müller C, Hildebrandt J-P. 2016. ATP release from human airway epithelial cells exposed to *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *Toxins (Basel)* 8:365–313. <https://doi.org/10.3390/toxins8120365>.
107. Hayashi T, Kawakami M, Sasaki S, Katsumata T, Mori H, Yoshida H, Nakahari T. 2005. ATP regulation of ciliary beat frequency in rat tracheal and distal airway epithelium. *Exp Physiol* 90:535–544. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2004.028746>.
108. Kim CS, Jeon SY, Min YG, Rhyoo C, Kim JW, Yun JB, Park SW, Kwon TY. 2000. Effects of beta-toxin of *Staphylococcus aureus* on ciliary activity of nasal epithelial cells. *Laryngoscope* 110:2085–2088.
109. Moldovan A, Fraunholz MJ. 2019. In or out: phagosomal escape of *Staphylococcus aureus*. *Cell Microbiol* 21:e12997. <https://doi.org/10.1111/cmi.12997>.
110. Giese B, Dittmann S, Paprotka K, Levin K, Weltrowski A, Biehler D, Läm Tn-T, Sinha B, Fraunholz MJ. 2009. Staphylococcal alpha-toxin is not sufficient to mediate escape from phagolysosomes in upper-airway epithelial cells. *IAI* 77:3611–3625. <https://doi.org/10.1128/IAI.01478-08>.
111. Strobel M, Pfortner H, Tuchscherl L, Völker U, Schmidt F, Kramko N, Schnittler H-J, Fraunholz MJ, Löffler B, Peters G, Niemann S. 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. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.06.020>.
112. Truong-Bolduc QC, Khan NS, Vyas JM, Hooper DC. 2017. Tet38 efflux pump affects *Staphylococcus aureus* internalization by epithelial cells

- through interaction with CD36 and contributes to bacterial escape from acidic and nonacidic phagolysosomes. *Infect Immun* 85:e00862-16. <https://doi.org/10.1128/IAI.00862-16>.
113. Giese B, Glowinski F, Paprotka K, Dittmann S, Steiner T, Sinha B, Fraunholz MJ. 2011. Expression of δ -toxin by *Staphylococcus aureus* mediates escape from phago-endosomes of human epithelial and endothelial cells in the presence of β -toxin. *Cell Microbiol* 13:316–329. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01538.x>.
 114. Grosz M, Kolter J, Paprotka K, Winkler A-C, Schäfer D, Chatterjee SS, Geiger T, Wolz C, Ohlsen K, Otto M, Rudel T, Sinha B, Fraunholz M. 2014. Cytoplasmic replication of *Staphylococcus aureus* upon phagosomal escape triggered by phenol-soluble modulins α . *Cell Microbiol* 16:451–465. <https://doi.org/10.1111/cmi.12233>.
 115. Blättner S, Das S, Paprotka K, Eilers U, Krischke M, Kretschmer D, Remmele CW, Dittrich M, Müller T, Schuelein-Voelk C, Hertlein T, Mueller MJ, Huettel B, Reinhardt R, Ohlsen K, Rudel T, Fraunholz MJ. 2016. *Staphylococcus aureus* exploits a non-ribosomal cyclic dipeptide to modulate survival within epithelial cells and phagocytes. *PLoS Pathog* 12:e1005857. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005857>.
 116. Alvarez ME, White CB, Gregory J, Kydd GC, Harris A, Sun HH, Gillum AM, Cooper R. 1995. Phevalin, a new calpain inhibitor, from a *Streptomyces* sp. *J Antibiot* 48:1165–1167. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.48.1165>.
 117. Melehani JH, James DBA, DuMont AL, Torres VJ, Duncan JA. 2015. *Staphylococcus aureus* leukocidin A/B (LukAB) kills human monocytes via host NLRP3 and ASC when extracellular, but not intracellular. *PLoS Pathog* 11:e1004970. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004970>.
 118. Alonzo F, Kozhaya L, Rawlings SA, Reyes-Robles T, DuMont AL, Myszkowski DG, Landau NR, Unutmaz D, Torres VJ. 2013. CCR5 is a receptor for *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED. *Nature* 493:51–55. <https://doi.org/10.1038/nature11724>.
 119. Spaan AN, Vrieling M, Wallet P, Badiou C, Reyes-Robles T, Ohneck EA, Benito Y, de Haas CJC, Day CJ, Jennings MP, Lina G, Vandenesch F, van Kessel KPM, Torres VJ, van Strijp JAG, Henry T. 2014. The staphylococcal toxins γ -haemolysin AB and CB differentially target phagocytes by employing specific chemokine receptors. *Nat Commun* 5:5438. <https://doi.org/10.1038/ncomms6438>.
 120. Holzinger D, Gieldon L, Mysore V, Nippe N, Taxman DJ, Duncan JA, Broglie PM, Marketon K, Austermann J, Vogl T, Foell D, Niemann S, Peters G, Roth J, Löffler B. 2012. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin induces an inflammatory response in human phagocytes via the NLRP3 inflammasome. *J Leukoc Biol* 92:1069–1081. <https://doi.org/10.1189/jlb.0112014>.
 121. Reyes-Robles T, Alonzo F, Kozhaya L, Lacy DB, Unutmaz D, Torres VJ. 2013. *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED targets the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 to kill leukocytes and promote infection. *Cell Host Microbe* 14:453–459. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.09.005>.
 122. Spaan AN, Henry T, van Rooijen WJM, Perret M, Badiou C, Aerts PC, Kemmink J, de Haas CJC, van Kessel KPM, Vandenesch F, Lina G, van Strijp JAG. 2013. The staphylococcal toxin Panton-Valentine leukocidin targets human C5a receptors. *Cell Host Microbe* 13:584–594. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.04.006>.
 123. Tromp AT, Van Gent M, Abrial P, Martin A, Jansen JP, De Haas CJC, Van Kessel KPM, Bardoel BW, Kruse E, Bourdonnay E, Boettcher M, McManus MT, Day CJ, Jennings MP, Lina G, Vandenesch F, Van Strijp JAG, Jan Lebbink R, Haas P-JA, Henry T, Spaan AN. 2018. Human CD45 is an F-component-specific receptor for the staphylococcal toxin Panton-Valentine leukocidin. *Nat Microbiol* 3:708–717. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0159-x>.
 124. Diep BA, Chan L, Tattavin P, Kajikawa O, Martin TR, Basuino L, Mai TT, Marbach H, Braughton KR, Whitney AR, Gardner DJ, Fan X, Tseng CW, Liu GY, Badiou C, Etienne J, Lina G, Matthay MA, DeLeo FR, Chambers HF. 2010. Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:5587–5592. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912403107>.
 125. Schlievert PM. 2009. Cytolysins, superantigens, and pneumonia due to community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 200:676–678. <https://doi.org/10.1086/605333>.
 126. Vu TTT, Nguyen NTQ, Tran VG, Gras E, Mao Y, Jung DH, Tkaczyk C, Sellman BR, Diep BA. 2019. Protective efficacy of monoclonal antibodies neutralizing alpha-hemolysin and bicomponent leukocidins in a rabbit model of *Staphylococcus aureus* necrotizing pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 64:e02220-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.02220-19>.
 127. Diep BA, Le VTM, Visram ZC, Rouha H, Stulik L, Dip EC, Nagy G, Nagy E. 2016. Improved protection in a rabbit model of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* necrotizing pneumonia upon neutralization of leukocidins in addition to alpha-hemolysin. *Antimicrob Agents Chemother* 60:6333–6340. <https://doi.org/10.1128/AAC.01213-16>.
 128. Diep BA, Le VTM, Badiou C, Le HN, Pinheiro MG, Duong AH, Wang X, Dip EC, Aguiar-Alves F, Basuino L, Marbach H, Mai TT, Sarda MN, Kajikawa O, Matute-Bello G, Tkaczyk C, Rasigade J-P, Sellman BR, Chambers HF, Lina G. 2016. IVIG-mediated protection against necrotizing pneumonia caused by MRSA. *Sci Transl Med* 8:357ra124. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aag1153>.
 129. Palmqvist N, Patti JM, Tarkowski A, Josefsson E. 2004. Expression of staphylococcal clumping factor A impedes macrophage phagocytosis. *Microbes Infect* 6:188–195. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.11.005>.
 130. Cohen TS, Boland ML, Boland BB, Takahashi V, Tovchigrechko A, Lee Y, Wilde AD, Mazaitis MJ, Jones-Nelson O, Tkaczyk C, Raja R, Stover CK, Sellman BR. 2018. *S. aureus* evades macrophage killing through NLRP3-dependent effects on mitochondrial trafficking. *Cell Rep* 22:2431–2441. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.027>.
 131. Flannagan RS, Heit B, Heinrichs DE. 2016. Intracellular replication of *Staphylococcus aureus* in mature phagolysosomes in macrophages precedes host cell death, and bacterial escape and dissemination. *Cell Microbiol* 18:514–535. <https://doi.org/10.1111/cmi.12527>.
 132. Thammarongsa V, Kim HK, Missiakas D, Schneewind O. 2015. Staphylococcal manipulation of host immune responses. *Nat Rev Microbiol* 13:529–543. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3521>.
 133. Spaan AN, Surewaard BGJ, Nijland R, van Strijp JAG. 2013. Neutrophils versus *Staphylococcus aureus*: a biological tug of war. *Annu Rev Microbiol* 67:629–650. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155746>.
 134. van Wamel WJB, Rooijackers SHM, Ruyken M, van Kessel KPM, van Strijp JAG. 2006. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. *J Bacteriol* 188:1310–1315. <https://doi.org/10.1128/JB.188.4.1310-1315.2006>.
 135. Laarman AJ, Mijneer G, Mootz JM, van Rooijen WJM, Ruyken M, Malone CL, Heezus EC, Ward R, Milligan G, van Strijp JAG, de Haas CJC, Horswill AR, van Kessel KPM, Rooijackers SHM. 2012. *Staphylococcus aureus* staphopain A inhibits CXCR2-dependent neutrophil activation and chemotaxis. *EMBO J* 31:3607–3619. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.212>.
 136. Parimon T, Li Z, Bolz DD, McIndoo ER, Bayer CR, Stevens DL, Bryant AE. 2013. *Staphylococcus aureus* α -hemolysin promotes platelet-neutrophil aggregate formation. *J Infect Dis* 208:761–770. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit235>.
 137. Löffler B, Hussain M, Grundmeier M, Brück M, Holzinger D, Varga G, Roth J, Kahl BC, Proctor RA, Peters G. 2010. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS Pathog* 6:e1000715. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000715>.
 138. Prince A, Wang H, Kitur K, Parker D. 2017. Humanized mice exhibit increased susceptibility to *Staphylococcus aureus* pneumonia. *J Infect Dis* 215:1386–1395.
 139. Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, Bach T-HL, Queck SY, Li M, Kennedy AD, Dorward DW, Klebanoff SJ, Peschel A, DeLeo FR, Otto M. 2007. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat Med* 13:1510–1514. <https://doi.org/10.1038/nm1656>.
 140. Zhou Y, Niu C, Ma B, Xue X, Li Z, Chen Z, Li F, Zhou S, Luo X, Hou Z. 2018. Inhibiting PSM α -induced neutrophil necroptosis protects mice with MRSA pneumonia by blocking the agr system. *Cell Death Dis* 9:1–14. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0398-z>.
 141. Surewaard BGJ, de Haas CJC, Vervoort F, Rigby KM, DeLeo FR, Otto M, van Strijp JAG, Nijland R. 2013. Staphylococcal alpha-phenol soluble modulins contribute to neutrophil lysis after phagocytosis. *Cell Microbiol* 15:1427–1437. <https://doi.org/10.1111/cmi.12130>.
 142. Hongo I, Baba T, Oishi K, Morimoto Y, Ito T, Hiramatsu K. 2009. Phenol-soluble modulins alpha 3 enhances the human neutrophil lysis mediated by Panton-Valentine leukocidin. *J Infect Dis* 200:715–723. <https://doi.org/10.1086/605332>.
 143. Wilson GJ, Seo KS, Cartwright RA, Connelley T, Chuang-Smith ON, Merriman JA, Guinane CM, Park JY, Bohach GA, Schlievert PM, Morrison WI, Fitzgerald JR. 2011. A novel core genome-encoded superantigen contributes to lethality of community-associated MRSA necrotizing

- pneumonia. *PLoS Pathog* 7:e1002271. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002271>.
144. Tuffs SW, James DBA, Bestebroer J, Richards AC, Goncheva MI, O'Shea M, Wee BA, Seo KS, Schlievert PM, Lengeling A, van Strijp JA, Torres VJ, Fitzgerald JR. 2017. The *Staphylococcus aureus* superantigen SEIX is a bifunctional toxin that inhibits neutrophil function. *PLoS Pathog* 13:e1006461. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006461>.
 145. Papayannopoulos V. 2018. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol* 18:134–147. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.105>.
 146. Schilcher K, Andreoni F, Uchiyama S, Ogawa T, Schuepbach RA, Zinkernagel AS. 2014. Increased neutrophil extracellular trap-mediated *Staphylococcus aureus* clearance through inhibition of nuclease activity by clindamycin and immunoglobulin. *J Infect Dis* 210:473–482. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu091>.
 147. Berends ETM, Horswill AR, Haste NM, Monestier M, Nizet V, von Köckritz-Blickwede M. 2010. Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *J Innate Immun* 2:576–586. <https://doi.org/10.1159/000319909>.
 148. Thamavongsa V, Missiakas DM, Schneewind O. 2013. *Staphylococcus aureus* degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death. *Science* 342:863–866. <https://doi.org/10.1126/science.1242255>.
 149. Gordon S. 2016. Phagocytosis: an immunobiological process. *Immunity* 44:463–475. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.026>.
 150. Flannagan RS, Heit B, Heinrichs DE. 2015. Antimicrobial mechanisms of macrophages and the immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*. *Pathogens* 4:826–868. <https://doi.org/10.3390/pathogens4040826>.
 151. van den Berg S, Bowden MG, Bosma T, Buist G, van Diji JM, van Wamel WJ, de Vogel CP, van Belkum A, Bakker-Woudenberg IAJM. 2011. A multiplex assay for the quantification of antibody responses in *Staphylococcus aureus* infections in mice. *J Immunol Methods* 365:142–148. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.12.013>.
 152. Burman JD, Leung E, Atkins KL, O'Seaghdha MN, Lango L, Bernadó P, Bagby S, Svergun DI, Foster TJ, Isenman DE, van den Elsen JMH. 2008. Interaction of human complement with Sbi, a staphylococcal immunoglobulin-binding protein: indications of a novel mechanism of complement evasion by *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 283:17579–17593. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800265200>.
 153. Haupt K, Reuter M, van den Elsen J, Burman J, Hällich S, Richter J, Skerka C, Zipfel PF. 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. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000250>.
 154. Jongerius I, Köhl J, Pandey MK, Ruyken M, van Kessel KPM, van Strijp JAG, Rooijackers SHM. 2007. Staphylococcal complement evasion by various convertase-blocking molecules. *J Exp Med* 204:2461–2471. <https://doi.org/10.1084/jem.20070818>.
 155. Jongerius I, von Köckritz-Blickwede M, Horsburgh MJ, Ruyken M, Nizet V, Rooijackers SHM. 2012. *Staphylococcus aureus* virulence is enhanced by secreted factors that block innate immune defenses. *J Innate Immun* 4:301–311. <https://doi.org/10.1159/000334604>.
 156. Parker D, Ahn D, Cohen T, Prince A. 2016. Innate immune signaling activated by MDR bacteria in the airway. *Physiol Rev* 96:19–53. <https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2015>.
 157. Falugi F, Kim HK, Missiakas DM, Schneewind O. 2013. Role of protein A in the evasion of host adaptive immune responses by *Staphylococcus aureus*. *mBio* 4:e00575-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00575-13>.
 158. Pauli NT, Kim HK, Falugi F, Huang M, Dulac J, Henry Dunand C, Zheng N-Y, Kaur K, Andrews SF, Huang Y, DeDent A, Frank KM, Charnot-Katsikas A, Schneewind O, Wilson PC. 2014. *Staphylococcus aureus* infection induces protein A-mediated immune evasion in humans. *J Exp Med* 211:2331–2339. <https://doi.org/10.1084/jem.20141404>.
 159. Goodyear CS, Silverman GJ. 2003. Death by a B cell superantigen: *in vivo* VH-targeted apoptotic supraclonal B cell deletion by a staphylococcal toxin. *J Exp Med* 197:1125–1139. <https://doi.org/10.1084/jem.20020552>.
 160. Ahn DS, Parker D, Planet PJ, Nieto PA, Bueno SM, Prince A. 2014. Secretion of IL-16 through TNFR1 and calpain-caspase signaling contributes to MRSA pneumonia. *Mucosal Immunol* 7:1366–1374. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.24>.
 161. Cruikshank WW, Kornfeld H, Center DM. 2000. Interleukin-16. *J Leukoc Biol* 67:757–766. <https://doi.org/10.1002/jlb.67.6.757>.
 162. Gómez MI, Seaghdha MO, Prince AS. 2007. *Staphylococcus aureus* protein A activates TACE through EGFR-dependent signaling. *EMBO J* 26:701–709. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601554>.
 163. Perret M, Badiou C, Lina G, Burbaud S, Benito Y, Bes M, Cottin V, Couzon F, Juruj C, Dauwalder O, Goutagny N, Diep BA, Vandenesch F, Henry T. 2012. Cross-talk between *Staphylococcus aureus* leukocidins-intoxicated macrophages and lung epithelial cells triggers chemokine secretion in an inflammasome-dependent manner. *Cell Microbiol* 14:1019–1036. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01772.x>.
 164. Sanford BA, Thomas VL, Ramsay MA. 1989. Binding of staphylococci to mucus *in vivo* and *in vitro*. *Infect Immun* 57:3735–3742. <https://doi.org/10.1128/AI.57.12.3735-3742.1989>.
 165. Franchi L, Muñoz-Planillo R, Núñez G. 2012. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat Immunol* 13:325–332. <https://doi.org/10.1038/ni.2231>.
 166. Muñoz-Planillo R, Franchi L, Miller LS, Núñez G. 2009. A critical role for hemolysins and bacterial lipoproteins in *Staphylococcus aureus*-induced activation of the Nlrp3 inflammasome. *J Immunol* 183:3942–3948. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900729>.
 167. Kebaier C, Chamberland RR, Allen IC, Gao X, Broglie PM, Hall JD, Jania C, Doerschuk CM, Tilley SL, Duncan JA. 2012. *Staphylococcus aureus* α -hemolysin mediates virulence in a murine model of severe pneumonia through activation of the NLRP3 inflammasome. *J Infect Dis* 205:807–817. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir846>.
 168. Craven RR, Gao X, Allen IC, Gris D, Wardenburg JB, McElvania-TeKippe E, Ting JP, Duncan JA. 2009. *Staphylococcus aureus* α -hemolysin activates the NLRP3-inflammasome in human and mouse monocytic cells. *PLoS One* 4:e7446. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007446>.
 169. Wu S, Huang J. 2017. Resveratrol alleviates *Staphylococcus aureus* pneumonia by inhibition of the NLRP3 inflammasome. *Experimental and Therapeutic Medicine* 14:6099–6104. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5337>.
 170. Strandberg KL, Rotschafer JH, Vetter SM, Buonpane RA, Kranz DM, Schlievert PM. 2010. Staphylococcal superantigens cause lethal pulmonary disease in rabbits. *J Infect Dis* 202:1690–1697. <https://doi.org/10.1086/657156>.
 171. Spaulding AR, Lin Y-C, Merriman JA, Brosnahan AJ, Peterson ML, Schlievert PM. 2012. Immunity to *Staphylococcus aureus* secreted proteins protects rabbits from serious illnesses. *Vaccine* 30:5099–5109. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.05.067>.
 172. Parker D, Ryan CL, Alonzo F, Torres VJ, Planet PJ, Prince AS. 2015. CD4⁺ T cells promote the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* pneumonia. *J Infect Dis* 211:835–845. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu525>.
 173. Stulik L, Rouha H, Labrousse D, Visram ZC, Badarau A, Maierhofer B, Groß K, Weber S, Kramarić MD, Glojnaric I, Nagy G, Croisier D, Nagy E. 2019. Preventing lung pathology and mortality in rabbit *Staphylococcus aureus* pneumonia models with cytotoxin-neutralizing monoclonal IgGs penetrating the epithelial lining fluid. *Sci Rep* 9:5339. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41826-6>.
 174. François B, Mercier E, Gonzalez C, Asehounne K, Nseir S, Fiancette M, Desachy A, Plantefève G, Meziani F, de Lame P-A, Laterre P-F, MASTER 1 study group. 2018. Safety and tolerability of a single administration of AR-301, a human monoclonal antibody, in ICU patients with severe pneumonia caused by *Staphylococcus aureus*: first-in-human trial. *Intensive Care Med* 44:1787–1796. <https://doi.org/10.1007/s00134-018-5229-2>.
 175. Sridharan H, Upton JW. 2014. Programmed necrosis in microbial pathogenesis. *Trends in Microbiology* 22:199–207. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.01.005>.
 176. Kourtzelis I, Hajishengallis G, Chavakis T. 2020. Phagocytosis of apoptotic cells in resolution of inflammation. *Front Immunol* 11:553. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00553>.
 177. Kitur K, Parker D, Nieto P, Ahn DS, Cohen TS, Chung S, Wachtel S, Bueno S, Prince A. 2015. Toxin-induced necroptosis is a major mechanism of *Staphylococcus aureus* lung damage. *PLoS Pathogens* 11:e1004820. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004820>.
 178. Cohen TS, Jones-Nelson O, Hotz M, Cheng L, Miller LS, Suzich J, Stover CK, Sellman BR. 2016. *S. aureus* blocks efferocytosis of neutrophils by macrophages through the activity of its virulence factor alpha toxin. *Sci Rep* 6:1–8. <https://doi.org/10.1038/srep35466>.
 179. Greenlee-Wacker MC, Rigby KM, Kobayashi SD, Porter AR, DeLeo FR, Nauseef WM. 2014. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by human neutrophils prevents macrophage efferocytosis and induces programmed necrosis. *J Immunol* 192:4709–4717. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302692>.
 180. Groud JA, Rich HE, Alcorn JF. 2019. Host-pathogen interactions in gram-positive bacterial pneumonia. *Clin Microbiol Rev* 32:e00107-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00107-18>.

181. Shaukat A, Guo Y-F, Jiang K, Zhao G, Wu H, Zhang T, Yang Y, Guo S, Yang C, Zahoor A, Akhtar M, Umar T, Shaukat I, Rajput SA, Hassan M, Deng G. 2019. Ginsenoside Rb1 ameliorates *Staphylococcus aureus*-induced acute lung injury through attenuating NF- κ B and MAPK activation. *Microb Pathog* 132:302–312. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.05.003>.
182. Labrousse D, Perret M, Hayez D, Da Silva S, Badiou C, Couzon F, Bes M, Chavanet P, Lina G, Vandenesch F, Croisier-Bertin D, Henry T. 2014. Kinect@/IL-1ra blocks the IL-1/IL-8 inflammatory cascade during recombinant Pantone Valentine leukocidin-triggered pneumonia but not during *S. aureus* infection. *PLoS One* 9:e97546. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097546>.
183. Diep BA, Afasizheva A, Le HN, Kajikawa O, Matute-Bello G, Tkaczyk C, Sellman B, Badiou C, Lina G, Chambers HF. 2013. Effects of linezolid on suppressing *in vivo* production of staphylococcal toxins and improving survival outcomes in a rabbit model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* necrotizing pneumonia. *J Infect Dis* 208:75–82. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit129>.
184. Stulik L, Malafa S, Hudcova J, Rouha H, Henics BZ, Craven DE, Sonnevend AM, Nagy E. 2014. α -Hemolysin activity of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* predicts ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 190:1139–1148. <https://doi.org/10.1164/rccm.201406-1012OC>.
185. Spaan AN, Schiepers A, de Haas CJC, van Hooijdonk DDJJ, Badiou C, Contamin H, Vandenesch F, Lina G, Gerard NP, Gerard C, van Kessel KPM, Henry T, van Strijp JAG. 2015. Differential interaction of the staphylococcal toxins Pantone-Valentine leukocidin and γ -hemolysin CB with human C5a receptors. *J Immunol* 195:1034–1043. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500604>.
186. Yin Y, Hountras P, Wunderink RG. 2017. The microbiome in mechanically ventilated patients. *Curr Opin Infect Dis* 30:208–213. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000352>.
187. Granchelli AM, Adler FR, Keogh RH, Kartsonaki C, Cox DR, Liou TG. 2018. Microbial interactions in the cystic fibrosis airway. *J Clin Microbiol* 56:e00354-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.00354-18>.
188. Deinhardt-Emmer S, Haupt KF, Garcia-Moreno M, Geraci J, Forstner C, Pletz M, Ehrhardt C, Löffler B. 2019. *Staphylococcus aureus* pneumonia: preceding influenza infection paves the way for low-virulent strains. *Toxins (Basel)* 11:734. <https://doi.org/10.3390/toxins11120734>.
189. de Bentzmann S, Tristan A, Etienne J, Brousse N, Vandenesch F, Lina G. 2004. *Staphylococcus aureus* isolates associated with necrotizing pneumonia bind to basement membrane type I and IV collagens and laminin. *J Infect Dis* 190:1506–1515. <https://doi.org/10.1086/424521>.
190. Siemens N, Oehmcke-Hecht S, Mettenleiter TC, Kreikemeyer B, Valentin-Weigand P, Hammerschmidt S. 2017. Port d'entrée for respiratory infections—does the influenza A virus pave the way for bacteria? *Front Microbiol* 8:2602. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02602>.
191. Bloes DA, Haasbach E, Hartmayer C, Hertlein T, Klingel K, Kretschmer D, Planz O, Peschel A. 2017. Phenol-soluble modulins contribute to influenza A virus-associated *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Infect Immun* 85:e00620-17. <https://doi.org/10.1128/IAI.00620-17>.
192. Collins LF, Anderson BD, Gray GC. 2017. A case of influenza A (H3N2) complicated by community-acquired pneumonia and death in a young healthy adult during the 2013–2014 season. *Front Public Health* 5:1. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00001>.
193. Kobayashi SD, Olsen RJ, LaCasse RA, Safronetz D, Ashraf M, Porter AR, Braughton KR, Feldmann F, Clifton DR, Kash JC, Bailey JR, Gardner DJ, Otto M, Brining DL, Kreiswirth BN, Taubenberger JK, Parnell MJ, Feldmann H, Musser JM, DeLeo FR. 2013. Seasonal H3N2 influenza A virus fails to enhance *Staphylococcus aureus* co-infection in a non-human primate respiratory tract infection model. *Virulence* 4:707–715. <https://doi.org/10.4161/viru.26572>.
194. Abood RN, McHugh KJ, Rich HE, Ortiz MA, Tobin JM, Ramanan K, Robinson KM, Bomberger JM, Kolls JK, Manni ML, Pociask DA, Alcorn JF. 2019. IL-22-binding protein exacerbates influenza, bacterial super-infection. *Mucosal Immunol* 12:1231–1243. <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0188-7>.
195. Rowe HM, Meliopoulos VA, Iverson A, Bomme P, Schultz-Cherry S, Rosch JW. 2019. Direct interactions with influenza promote bacterial adherence during respiratory infections. *Nat Microbiol* 4:1328–1336. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0447-0>.
196. Jia L, Zhao J, Yang C, Liang Y, Long P, Liu X, Qiu S, Wang L, Xie J, Li H, Liu H, Guo W, Wang S, Li P, Zhu B, Hao R, Ma H, Jiang Y, Song H. 2018. Severe pneumonia caused by coinfection with influenza virus followed by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* induces higher mortality in mice. *Front Immunol* 9:3189. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03189>.
197. Beumer MC, Koch RM, van Beuningen D, OudeLashof AM, van de Veerdonk FL, Kolwijck E, van der Hoeven JG, Bergmans DC, Hoedemaekers CWE. 2019. Influenza virus and factors that are associated with ICU admission, pulmonary co-infections and ICU mortality. *J Crit Care* 50:59–65. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2018.11.013>.
198. Crémieux A-C, Saleh-Mghir A, Danel C, Couzon F, Dumitrescu O, Lilin T, Perronne C, Etienne J, Lina G, Vandenesch F. 2014. α -Hemolysin, not Pantone-Valentine leukocidin, impacts rabbit mortality from severe sepsis with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *J Infect Dis* 209:1773–1780. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit840>.
199. Courjon J, Munro P, Benito Y, Visvikis O, Bouchiat C, Boyer L, Doye A, Lepidi H, Ghigo E, Lavigne J-P, Vandenesch F, Lemichez E. 2015. EDIN-B promotes the translocation of *Staphylococcus aureus* to the bloodstream in the course of pneumonia. *Toxins (Basel)* 7:4131–4142. <https://doi.org/10.3390/toxins7104131>.
200. Heyer G, Saba S, Adamo R, Rush W, Soong G, Cheung A, Prince A. 2002. *Staphylococcus aureus agr* and *sarA* functions are required for invasive infection but not inflammatory responses in the lung. *Infect Immun* 70:127–133. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.1.127-133.2002>.
201. Valotteau C, Prystopiuk V, Pietrocola G, Rindi S, Peterle D, De Filippis V, Foster TJ, Speziale P, Dufrene YF. 2017. Single-cell and single-molecule analysis unravels the multifunctionality of the *Staphylococcus aureus* collagen-binding protein Cna. *ACS Nano* 11:2160–2170. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.6b08404>.
202. Kang M, Ko Y-P, Liang X, Ross CL, Liu Q, Murray BE, Höök M. 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.454462>.

IV. Spectrométrie de masse : protéomique ciblée

La spectrométrie de masse (SM) est une technique d'identification et de quantification de petites (métabolites) à grosses molécules (protéines). Dans une approche dite de protéomique ciblée (*Selected Reaction Monitoring* = SRM), seules les protéines d'intérêt sont recherchées dans l'échantillon, permettant ainsi d'alléger le temps d'analyse comparée à une analyse « *shotgun* » où l'ensemble des peptides détectés est analysé pour identifier les protéines présentes dans l'échantillon [170]. En revanche, contrairement à cette dernière, la protéomique ciblée est plus sensible et permet une approche quantitative.

1. Technique et design expérimental

1. Généralités techniques

La SRM utilise un couplage entre chromatographie liquide (LC) et la SM afin de séparer les molécules d'intérêt et de les analyser de manière séquentielle selon leurs paramètres physico-chimiques. Cependant, une contrainte majeure de cette technique est la taille des molécules analysées. Des protéines trop grandes ne pouvant être suivies en spectrométrie de masse, il est donc nécessaire de travailler sur des peptides obtenus après digestion enzymatique. La trypsine est très couramment utilisée pour digérer les échantillons, et cliver les protéines après une lysine ou une arginine sauf si celles-ci sont suivies d'une proline [170,171].

L'échantillon digéré est analysé avec une première étape de séparation avec la LC, puis avec la SM qui utilise un triple quadripôle. Le triple quadripôle permet de distinguer les peptides présents et d'obtenir des informations indirectes sur leur abondance. Le triple quadripôle va d'abord en Q1 reséparer les peptides selon leur rapport masse/charge, puis en Q2 fragmenter les peptides pour obtenir des transitions (fragments de peptides), et enfin en Q3 les transitions sont à nouveau séparées selon leur rapport masse/charge permettant de les détecter à des temps de rétention différents, et avec des intensités différentes selon leurs propriétés et leur abondance (Figure 12) [171].

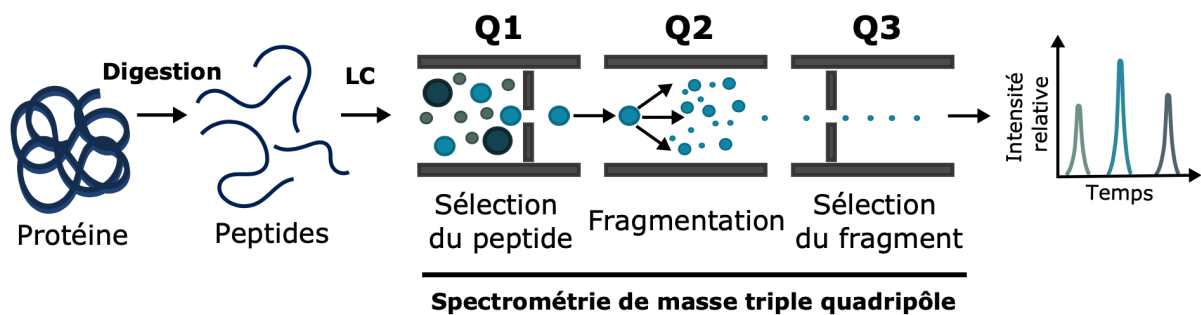


Figure 12 : Représentation schématique de l'analyse par spectrométrie de masse ciblée

La protéine d'intérêt est digérée avec de la trypsine, libérant différents peptides. Ces peptides sont ensuite séparés une première fois par une étape de chromatographie liquide (LC), puis par une première étape de spectrométrie de masse en passant dans le quadripôle Q1. Les peptides isolés suite à cette étape sont ensuite fractionnés dans le quadripôle Q2 avant la dernière étape de sélection et de mesure des fragments dans le quadripôle Q3.

2. Design des peptides

Afin que la SRM soit quantitative, le choix des peptides issus des protéines d'intérêt à suivre, est primordial et doit répondre à certains critères. Tout d'abord les peptides doivent être issus de la digestion à la trypsine des protéines d'intérêt, d'une taille comprise entre 6AA et 25AA, et doivent être retrouvés uniquement en un seul exemplaire et seulement dans la protéine d'intérêt (spécificité du peptide). Ce dernier critère se vérifie en comparant la séquence du peptide à l'ensemble du génome de l'organisme dont est issu l'échantillon. Enfin, plusieurs peptides pour une même protéine sont nécessaires pour confirmer sa présence dans l'échantillon et permettre une bonne quantification. Cette étape de design expérimental est le point limitant de la SRM : toutes protéines ou variants non inclus à cette étape ne seront pas analysés ensuite. Il est donc très important d'avoir une bonne connaissance *a priori* sur les protéines d'intérêt (l'existence de variants ou non) et sur la question biologique qui est posée, afin de couvrir l'ensemble des protéines recherchées [170,172].

Une fois les peptides définis, ceux-ci sont testés afin de vérifier leur réponse à la SM, et plus particulièrement dans des conditions similaires à celles de l'échantillon. Seuls ceux qui répondent bien sont ensuite conservés.

Une fois le set de peptides défini, deux approches différentes peuvent être mises en place pour obtenir les informations quantitatives : soit une approche de quantification absolue, soit une approche de quantification relative.

2. Quantification absolue

La quantification absolue permet d'obtenir avec une grande précision les quantités des protéines recherchées. Pour cela, des peptides alourdis (peptides identiques à ceux recherchés mais avec des isotopes différents modifiant ainsi très légèrement leurs masses afin de pouvoir les distinguer des peptides de l'échantillon) et à des concentrations connues sont ajoutés aux échantillons. Le fait que ces peptides soient lourds permet de les distinguer des peptides issus de l'échantillon sans changer de manière trop importante leurs propriétés physico-chimiques et donc leur réponse à la LC-MS. Ainsi il est possible d'établir une corrélation entre l'intensité du signal obtenu pour le peptide lourd et sa concentration, permettant d'estimer précisément la concentration du peptide de l'échantillon selon son intensité de signal [173].

Cette technique a l'avantage d'être extrêmement précise (ng/mL) et de permettre le dosage de protéines très faiblement présentes dans un échantillon. Cependant, le nombre de peptides lourds qu'il est possible d'ajouter dans un échantillon est limité et leur coût est très élevé.

3. Quantification relative

La quantification relative ne dépend pas de peptides alourdis, mais d'une condition de référence à laquelle sont comparés les échantillons. Pour des protéines données, leur abondance est connue dans un échantillon de référence. En comparant cet échantillon et l'intensité de ses signaux pour les peptides des protéines d'intérêt, à ceux obtenus dans les échantillons à analyser, il est possible de déterminer si les protéines sont plus ou moins présentes [170,172].

Cette approche, bien que moins quantitative que la quantification absolue, permet d'obtenir, pour un très grand nombre de cibles, une information quantitative, pour un contexte donné, et pour un coût bien moindre comparé à la quantification absolue.

V. Objectifs de thèse

Les pneumonies communautaires à *S. aureus* sont des infections rares mais graves, associées à un fort taux de mortalité. Il existe à ce jour plusieurs facteurs de virulence associés à la sévérité des SA-CAP, i.e. la PVL, Hla ou encore la Protéine A, comme décrit dans ma revue bibliographique publiée dans la revue mSphere. Cependant, peu d'études ont permis de démontrer un lien entre ces facteurs et des données cliniques, la majorité reposant sur des études *in vitro* ou avec des modèles animaux *in vivo*. Une autre limite de ces approches est l'utilisation de comparaison entre présence et absence de ces facteurs de virulence avec des souches cliniques ou non, et l'utilisation de mutants. Ce type d'approche occulte la notion de quantité. De plus, le rôle de l'hémolysine- γ CB, qui cible les mêmes cellules que la PVL, n'a jamais été étudiée dans ce contexte, bien que présente dans la quasi-totalité des souches de *S. aureus*.

Ainsi le premier objectif de mes travaux de thèse a été de déterminer les facteurs de virulence de *S. aureus* associés à la sévérité des PC. Pour ce faire nous avons développé avec l'équipe du Pr. Jérôme Lemoine une nouvelle approche de spectrométrie de masse, afin de quantifier, pour 136 isolats cliniques de PC sévère, 44 facteurs de virulence de *S. aureus*. Les analyses statistiques entre les données cliniques associées aux 136 souches, et les résultats de spectrométrie, ont permis de mettre en évidence le rôle de certains facteurs de virulence de manière dose-dépendante. Ces résultats font l'objet d'une soumission d'article dans le journal PLOS Biology.

Le second objectif a été d'étudier le rôle d'HlgCB dans le contexte de pneumonie, mais également des mécanismes de régulation de son expression, entre différentes souches cliniques. Le rôle d'HlgCB dans la virulence de *S. aureus*, notamment dans des souches *pvl* négatives, a été démontré, ainsi que les différents mécanismes responsables des variations d'expression d'HlgC et d'hlgB. Ces résultats font l'objet d'une soumission d'article dans le journal Genes & Development.

Enfin, lors de l'investigation des mécanismes de régulation de l'expression d'HlgCB nous avons découvert l'existence de nouveaux transcrits. Nous avons recherché dans un premier temps l'origine de ces transcrits, et dans un second temps leurs rôles potentiels sur la virulence de *S. aureus*.

L'ensemble de ces travaux a permis une meilleure compréhension des différents facteurs de virulence de *S. aureus* impliqués dans un contexte de pneumonie. Et notamment du rôle de l'hémolysine- γ CB, et de ces mécanismes de régulation qui permettent des expressions différentielles selon les souches.

Axe 1 : Les facteurs de virulence impliqués dans les pneumonies communautaires sévères : approche par protéomique ciblée

I. Introduction

Les pneumonies communautaires à *S. aureus* sont rares, mais sont souvent des infections graves avec un fort taux de mortalité. De nombreuses études ont décrits différents facteurs de virulence de *S. aureus* impliqués dans sa virulence. Certains de ces facteurs, dont la PVL, sont codés sur des éléments génétiques accessoires, et ne sont donc présents que dans un nombre restreint de souches. D'autres, comme l'hémolysine- α (Hla) et la Protéine A (Spa), font partie du génome-cœur de la bactérie. Dans les deux cas, leur implication dans la virulence de *S. aureus* a été démontrée en comparant des souches qui possèdent les gènes, versus des souches qui ne les ont pas (souches négatives pour les gènes accessoires) ou délétées pour ces gènes (mutants). L'inconvénient de telles approches est qu'elles évincent la notion de quantité, bien que des niveaux d'expression et de production variables de ces facteurs de virulence, notamment pour ceux appartenant au génome-cœur, sont attendus entre les souches. De plus, ces études se focalisent généralement sur un, deux, ou trois facteurs maximum, ce qui ne permet pas d'étudier l'impact et l'implication de l'ensemble des facteurs de virulence participant à l'infection.

L'objectif des travaux présentés ici, a été de mettre en place une technique de spectrométrie de masse à haut débit en collaboration avec l'équipe du Pr. Jérôme Lemoine de l'Institut des Sciences Analytiques de Lyon, afin d'obtenir rapidement et à moindre coût, une vue d'ensemble du virulome de souches cliniques. Cette approche permet en effet d'obtenir des données semi-quantitatives pour 44 facteurs de virulence de *S. aureus*. Pour preuve de concept, une première étude a été réalisée avec l'analyse des facteurs impliqués dans les pneumonies communautaires sévères (PCS) de manière dose-dépendante, sur une cohorte de 136 souches de *S. aureus* isolées de patients atteints de PCS.

La première étape a été de choisir les facteurs de virulence d'intérêt et de valider les peptides choisis pour leurs détections, grâce à l'analyse de différentes souches possédant ou non les facteurs recherchés, pour vérifier leur sensibilité et leur spécificité. En parallèle, la bonne corrélation entre la détection des protéines ribosomales et la densité bactérienne a été testée afin de pouvoir les utiliser comme normalisateur et obtenir les résultats semi-quantitatifs. Après validation de la méthode, les 136 souches de la cohorte de PCS ont été cultivées dans des conditions identiques puis analysées en spectrométrie de masse. Les résultats semi-quantitatifs obtenus ont pu ensuite faire l'objet d'une analyse biostatistique avec les données cliniques associées à chaque souche.

Les résultats semi-quantitatifs obtenus nous ont permis de mettre en évidence de fortes variations entre souches pour certains facteurs de virulence, comme pour la V8 protéase (SspA) ou la catalase (KatA), avec jusqu'à 10 log₂ de différence, alors que d'autres varient très peu, comme BlaI ou IsaB. L'analyse en composante principale entre les virulomes des souches et leurs types agr ou leurs CC nous a montré que le fond génétique n'est pas un élément déterminant pour expliquer le profil protéique des souches. Enfin, nous avons trouvé grâce à l'analyse des corrélations entre les différents facteurs de virulence que les protéines codées en opéron (PVL, LukDE, PSMs,...) sont bien corrélées entre elles, sauf, de manière inattendue l'hémolysine- γ CB. D'autres corrélations attendues, dues aux mécanismes de régulation de ces protéines, ont également pu être retrouvées (Hld et Spa (négative), Hld et Hla (positive)), alors que certaines étaient inattendues (SplB et LukG ou EdinB et ETD).

Nous avons ensuite étudié les corrélations entre les quantités de protéines et les données cliniques reflétant la sévérité de la maladie (mortalité, hémoptysie, leucopénie et la survie) par deux approches : uni et multivariée. Bien que plusieurs facteurs de virulence soient ressortis significativement de l'analyse univariée avec le décès, seule la PVL était encore positivement corrélée en analyse multivariée, confirmant les résultats obtenus dans de précédentes études, mais avec ici la preuve d'un effet dose-dépendante. Ce résultat a été en plus conforté avec l'analyse de la survie où seule la PVL a été retrouvée. Nous avons trouvé d'autres facteurs de virulence positivement corrélés avec les autres données cliniques : BlaZ avec l'hémoptysie et Nuc et TSST-1 avec la leucopénie. En plus de ces facteurs, HlgB corrèle positivement également avec ces deux données cliniques, mais comme HlgC est ressorti

comme négativement corrélé avec ces données, il est difficile d'interpréter ce résultat. Néanmoins un rôle de l'hémolysine- γ CB est assez probable car : (i) HlgCB cible le même récepteur que la PVL à la surface des cellules myéloïdes, et (ii) 6 des 15 des hyperproducteurs d'HlgC parmi les souches PVL négatives (15/72) sont décédés (taux de mortalité de 40%) contre un taux de mortalité de 24% (14/57) pour les hypoproducteurs.

Enfin, comme plusieurs facteurs de virulence ont des modes d'action similaires, nous avons décidé d'étudier si des groupes de protéine regroupant ces fonctions (adhésion, dommage membranaire, superantigènes, protéases et échappement immunitaire) pouvaient corrélérer avec les données cliniques. Cependant, aucune de ces catégories n'est ressortie significativement corrélée.

L'ensemble de résultats permettent de confirmer qu'une telle approche est pertinente pour étudier : (i) le niveau de production de nombreux facteurs de virulence simultanément et les liens entre eux et (ii) l'impact de ses facteurs pour une pathologie donnée, de manière dose-dépendante.

II. [Article scientifique :](#)

Staphylococcus aureus virulence factor expression matters: input from targeted proteomics shows Panton-Valentine leucocidin impact on mortality

Mariane Pivard, Sylvere Bastien, Iulia Macavei, Nicolas Mouton, Jean-Philippe Rasigade, Florence Couzon, Romain Carrière, Karen Moreau, Jérôme Lemoine, Francois Vandenesch

Soumission en cours dans le journal : **PLOS Biology**

(Article page suivante)

Staphylococcus aureus virulence factor expression matters: input from targeted proteomics shows Panton-Valentine leucocidin impact on mortality

Authors: Mariane Pivard¹, Sylvere Bastien¹, Iulia Macavei², Nicolas Mouton², Jean-Philippe Rasigade^{1,3}, Florence Couzon¹, Romain Carrière², Karen Moreau¹, Jérôme Lemoine², Francois Vandenesch^{1,3*}

¹CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Université de Lyon, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS de Lyon; Lyon, France.

² Institut des Sciences Analytiques, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR 5280; Villeurbanne, France.

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

In the case of opportunistic pathogens such as *Staphylococcus aureus*, the transition from commensalism to invasion and disease as well as disease severity in the course of an infection remain poorly predictable on the sole basis of virulence gene content. To determine whether variations in the levels of expression of the numerous *S. aureus* virulence factors could affect disease occurrence and/or severity, we developed a targeted proteomic approach that monitored 149 peptide surrogates targeting 44 proteins. Semi-quantification was achieved by normalisation on the signal of ribosomal proteins. We then evaluated this approach on a series of *S. aureus* strains from 136 patients presenting a severe community-acquired pneumonia, all admitted to an intensive care unit. After adjusting to the Charlson Comorbidity Index score, the multivariable analysis of severity parameters found that HlgB, Nuc, and Tst-1 were positively associated while Blal and HlgC were negatively associated with leukopenia. BlaZ and HlgB were positively associated with haemoptysis and HlgC was negatively associated with haemoptysis. Regarding mortality, both logistic (OR 1.28; 95%CI[1.02;1.60]) and survival (HR 1.15; 95%CI[1.016;1.302]) models indicated that only PVL was associated with death in a dose-dependent manner. Beyond highlighting the decisive role of PVL in community-acquired pneumonia severity, this study brings the proof of concept that “expression matters” and proposes a method that can be routinely implemented in laboratories for *S. aureus* and which could be developed for other commensal bacteria.

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is detected in 30% of the population, mostly as a nasal commensal, but also in the throat, on the skin, and in the gastrointestinal tract [1]. In addition to this innocuous interaction with the human host, *S. aureus* has the potential to develop a wide range of diseases in humans, from mild infections of the skin and soft tissues to severe and fatal infections, such as bacteraemia and pneumonia [2]. Whilst all *S. aureus* strains encode a core set of major virulence factors, such as protein A, coagulase, and Phenol Soluble Modulins (PSMs) [3–5], the virulence gene content is not enough to predict the transition from commensalism to invasion and disease, nor can it predict disease severity. This suggests that the expression level of these factors must also be considered. However, there have been very few attempts to determine whether variations in the expression level of the numerous *S. aureus* virulence factors could affect disease occurrence and/or severity in the course of an infection [6–9].

In an attempt to answer this question, we developed a targeted proteomic approach, a technology of choice for implementing a cost-effective highly multiplexed protein assay. An assay targeting 44 virulence factors and resistance markers was deployed on a triple quadrupole mass spectrometer operating in Multiple Reaction Monitoring (MRM). This approach was evaluated on a series of *S. aureus* isolates from 136 patients presenting a severe community-acquired pneumonia (CAP).

MATERIALS AND METHODS

Proteomic validation set.

Twenty *S. aureus* strains were selected from the Whole Genome sequenced biobank of the French National Reference Centre for Staphylococci. The

rationale for strain selection was to obtain positive representative isolates for each of the virulence factors of interest, allowing to estimate the detectability of the method for each protein.

Strains and data of the proteomic test set.

Clinical isolates and accompanying clinical data were obtained from a previously published French cohort of severe CAP [10]. The clinical features retained for the present study were those representing severity and outcome in the cohort study: death, leukopenia (defined as total leukocyte count < 3 G/L), and haemoptysis extracted from the Gillet study [10] (Table S2). The age-adapted Charlson Comorbidity Index score was retained as a control covariate to adjust prediction models to the baseline characteristics of the patients. Patients aged less than 3y (n=20), who were previously found to present very distinct clinical presentation and outcome compared to older patients, were excluded. Patients co-infected with several *S. aureus* strains (n=3) were also excluded. Finally, 4 isolates were excluded *a posteriori* because they harboured a rare allelic variant of the Protein A which prevented its quantification by the detection method used (2 strains from deceased patients and 2 from patients who survived). Altogether, 136 isolates and patients were included in the final analyses (Table S2).

Sample preparation

1 mL of 8h-culture in Casein Hydrolysate Yeast Extract (CCY) was collected and denatured at 90°C for 1h. 70 µL of 150-212 µm glass beads (Sigma-Aldrich) and 50 µL of a trypsin solution (1 mg/mL in 150 mM NH₄HCO₃; Porcine pancreas grade, Sigma-Aldrich) were added to 200 µL of bacterial cell suspension, and sonicated during 10 minutes at 50°C (Bioruptor ultrasonicator, Diagenode). Digestion was finally stopped by adding 5 µL of formic acid (Sigma-Aldrich) and the Eppendorf tubes were centrifuged at 10000 g during 5 minutes. 180 µL of the supernatant was finally

transferred into 2 mL screw cap tubes (Labbox) endowed with a 250 μ L glass insert.

Targeted mass spectrometry analysis

The Scheduled Multiple Reaction Monitoring (MRM) experiments were deployed on a hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer 6500 QTRAP (AB Sciex, Toronto) equipped with an ESI Turbo VTM ion source operating at 550 °C and using an ion spray voltage of 5500 volts. The settings of curtain gas and nebulising gas 1 and gas 2 were adjusted to 50, 70, and 60 psi, respectively. The instrument and the data acquisition and processing were controlled by the Analyst 1.6.2 software. Unit mass resolution was fixed for Q1 and Q3 in MRM mode.

The tandem mass spectrometer was hyphenated to a liquid chromatography set-up comprising 2 binary pumps (1290 series, Agilent technologies). For each experiment, 80 μ L of the trypsin digest was injected and submitted to on-line Solid Phase Extraction on a PLRP-S, 12.5 mm x 2.1 mm column (Waters) connected to a Rheodyne 10-injection port valve. Peptides were desalted with 100% water containing 0.1% formic acid v/v (LC-MS grade, Fisher Scientific) for 3 minutes at a flow rate of 100 μ L/min. After the valve switching, peptides were separated on a Waters BEH C18 column (100 mm x 2.1 mm; 3.5 μ m particle size) using the following gradient: 98% water, solvent A (LC-MS grade, Fisher Scientific) containing 0.1% formic acid (v/v) and 2% acetonitrile, solvent B (LC-MS grade, Fisher Scientific) containing 0.1% formic acid (v/v) for 3 minutes followed by a 17-minute linear gradient to reach 35% of solvent B. The scheduling window was fixed at 1.2 minute around the expected retention time of the peptide targets, which kept the dwell time above 5 milliseconds and ensured at least 10 data points per reconstructed transition peak.

Peptide and protein detection validation

MultiQuant TM 2.1 software (AB Sciex) was used to process the raw data leading to automated chromatographic peak detection for each transition signal as well as the calculation of their absolute area (MQ4 algorithm). Peak detection parameters were set as follows: a Gaussian smooth width of 2.0 point, a retention time half window of 35 seconds, a baseline subtraction window of 2 minutes, and a 50% noise level for baseline. A reference transition ratio (TR) was calculated for each peptide from the synthetic form (equation 1), which validated effective detection of peptide surrogates during the analyses of the *S. aureus* strain collection. Only the peptides with a TR standard deviation below 20% relative to the mean TR were ultimately validated.

$$\text{Equation 1} \quad TR = \frac{\text{Peak area of the most intense transition}}{\text{Sum of the peak areas of the three transitions}}$$

Protein quantification

It is assumed that the MS1 signal and the most intense transitions of the best flying peptides correlate with protein abundance [11] and therefore can be used as proxy for label-free quantification. To take into account any putative sensitivity deviation of the mass spectrometer instrument and variation of bacteria cell density in the suspension, quantification of each virulence protein was derived from the calculated ratio between the sum of area of the three transitions of a peptide quantifier of the virulence protein and the average of the sum of the three transitions of three peptides deriving from three ribosomal proteins (equation 2): IYPGENVGR (30S protein S11), EMSVLELNDLVK (50S protein L7/L12), ALQSAGLEVTAIR (50S protein L27). Ribosomal proteins were used as internal relative standard as their expression level correlates with cell number amplification during the exponential growing phase [12–14].

$$\text{Equation 2. Quantification} = \frac{\text{Sum of the 3 transitions of peptide quantifier of virulence protein}}{\text{Sum of the 3 transitions of peptide quantifier of protein 50S-L13}}$$

Statistical analysis

We used visualisation, correlation, and regression procedures to assess the relationships between the expression level of virulence factors, the genetic background of the isolates, and the clinical outcome of the infected patient. The anonymised data and software codes required to reproduce the results are available at [<https://github.com/Mpvrd/Proteomic>].

Relative protein quantities were log₂-transformed before analysis to improve the interpretation of model coefficients, as this transformation allows to express coefficients as the change of the response variable per doubling of the protein quantity. To avoid obtaining infinitely negative values after transformation, relative protein quantities equal to zero were replaced with the smallest non-zero quantity for the same protein and divided by 2 before being log₂ transformed. All analyses used R software v4.0.3 (R Core Team [2019]).

To visualise the variations of the virulome according to the genetic background of the strains, principal component analysis of the log₂-transformed relative protein quantities was conducted. The linear correlation between the log₂-transformed relative quantities of proteins was tested for significance using a Pearson correlation test.

The associations between clinical outcomes (death, leukopenia, haemoptysis) and the relative quantities of virulence factors were analysed in logistic regression models. Univariate models were constructed separately for each protein, and multivariable models included all proteins at once to estimate their independent effect on the outcome. All models (including the separate univariate models) included the Charlson score as a covariate to adjust for patient health at baseline. To reduce the risk of model instability due to multicollinearity

between protein quantities, strongly correlated proteins (Pearson correlation >0.5, p-value <0.05) encoded in the same operon were identified and only one protein of the operon, selected arbitrarily, was retained for statistical analysis. Coefficients of the logistic regression models were reported as odds ratios with 95% confidence intervals based on a normal approximation. The associations between relative protein quantities and the delay from hospital admission to death or hospital discharge were analysed using Cox survival regression models, both univariate and multivariable, using the same predictors as the logistic regression models. Coefficients of the survival regression models were expressed as hazard ratios with 95% confidence intervals based on a normal approximation.

We examined whether groups of proteins, rather than individual proteins, collectively predicted clinical outcomes. To this aim, functionally-related proteins were grouped in categories listed in Table S4. For each of the previously described models, the point estimate of the pooled coefficients of proteins in a category was obtained as the sum of the coefficients of individual proteins. The variance of the pooled coefficients was obtained as the sum of the covariance matrix of the individual coefficients, as described elsewhere [15]. The variances of the pooled coefficients were then used to construct 95% confidence intervals based on the same normal approximation as the individual coefficients. These pooled coefficients were interpreted as the collective effect of the proteins in the category on the clinical outcome predicted by the model.

RESULTS

MRM assay development and choice of the peptide surrogates

A list of 44 virulence factors and resistance markers, including the most commonly

accepted candidates [4,16], was designed (Table S1). The first phase of the assay development aimed at designing the reporter peptide candidates to be tested with respect to their detectability in a validation set of 20 *S. aureus* strains. All predicted proteotypic sequences obtained by in silico trypsin digestion and containing between 5 and 25 amino acids were retained as candidate peptides. Although methionine or tryptophan residues have a propensity to undergo uncontrolled oxidations that may impair the sensitivity of the assay method [17], peptides containing these residues were nevertheless retained to expand the panel of peptides sampled. Conversely, peptides containing cysteine residues were systematically excluded to avoid the reduction and alkylation steps of the disulfide bridges, which could complicate the sample preparation protocol in the perspective of being able to implement this assay method as a routine test in a near future.

MRM assays targeting the panel of peptide candidates were built using the Skyline web tool without a priori knowledge of the chromatographic retention times (<https://skyline.ms/project/home/software/Skyline/begin.view>). As usually recommended, only transitions corresponding to Y type fragment ions were retained to build the testing methods, owing to their propensity to induce the most intense and less interfered signals. No more than 50 peptide candidates, i.e. 150 transitions, were included in each MRM assay so as to ensure that a minimum of 8 data points were collected per reconstructed ion chromatogram. A manual inspection of the raw data using the Skyline tool enabled to establish an intermediate list of peptide reporter candidates. A peptide reporter was considered putatively detected when the retention times of its respective transitions were perfectly aligned on the chromatogram and when it was detected in at least one strain of the validation set. Among the 44 virulence factors, at least one peptide reporter candidate was

pinpointed for 33 proteins. In the specific case of PSM α 1 and PSM α 4 polypeptides, the short sequences and the location of arginine and lysine residues imposed the selection of only one and two peptides, respectively, that were therefore directly synthesised. For the remaining 9 proteins (Table S1, red characters), no peak could be confidently assigned on the chromatogram, indicating that these virulence factors were either not expressed or expressed at a concentration below the detection limit in the strains of the validation set. Given their potential relevance in pathogenesis, these proteins were maintained in the final assay. Hence, the synthetic forms of all peptides, were then monitored in order to accurately validate their retention time and optimise the ionisation and fragmentation parameters. Since the absolute retention time of each peptide was accurately assessed, it enabled the building of a unique scheduled MRM method targeting the 149 reporter peptides (Table S1). These peptides covered all potential allelic variations for each protein of the 136 strains of the test set that had been sequenced. DNA sequences are available at [Data not available yet on LENA].

As the quantifier of Spa targets the repeat region of this protein, relative quantification may be biased depending on the number of repeats in the strains. However, no correlation was found between Spa expression and the number of repeats in each strain of the test set (Figure S1). In addition, the differences of up to 8 log₂ (i.e. 256 fold) observed between strains are much higher than the 1 to 3 fold expected differences based on the number of repeats. Therefore, Spa quantification was retained in the analysis without controlling for the number of Spa repeats in the quantification values.

The proteome of clinical strains is highly diverse

The MRM assay was applied to the 136 isolates from patients with CAP (Table S2). The results of the targeted proteomics revealed a broad

variation in the expression of each of these factors ranging from 2 log₂ (e.g. SEA) to almost 8 log₂ for numerous proteins such as Spa, SdrD, Nuclease, Hld, PVL, and others (Figure 1). However, for 7 proteins (EdinC, ETA, ETB, MecC, SEB, SED, and SEH), only very few strains produced the proteins or the levels were too low to allow detection. These proteins were *a posteriori* removed from the analysis to avoid unnecessary background noise due to the lack of variance between strains.

Given the large diversity in the genetic background of the corresponding strains ([10] and Table S2), the possibility that the proteome could be correlated with the genetic background was tested by principal component analysis. Neither the four *accessory gene regulator (agr)*

types nor the 21 clonal complexes (CC) and 2 sequence types (ST) of the collection explained the proteome distribution, as no proteomic profile could be associated with any of these genetic backgrounds (Figure 2). We then searched for correlations between the 37 proteins by constructing a correlation heatmap (Figure 3). Strong correlations were observed for numerous virulence factors reflecting the fact that they are encoded in operons. This was the case for the LukSF-PV, LukDE, and PSM α -4 operons. The absence of correlation between HlgC and HlgB of the HlgCB operon, however, likely reflects post-transcriptional regulatory steps on this operon. Strong correlations were also observed for proteins whose expression are immediately dependent on a common regulatory

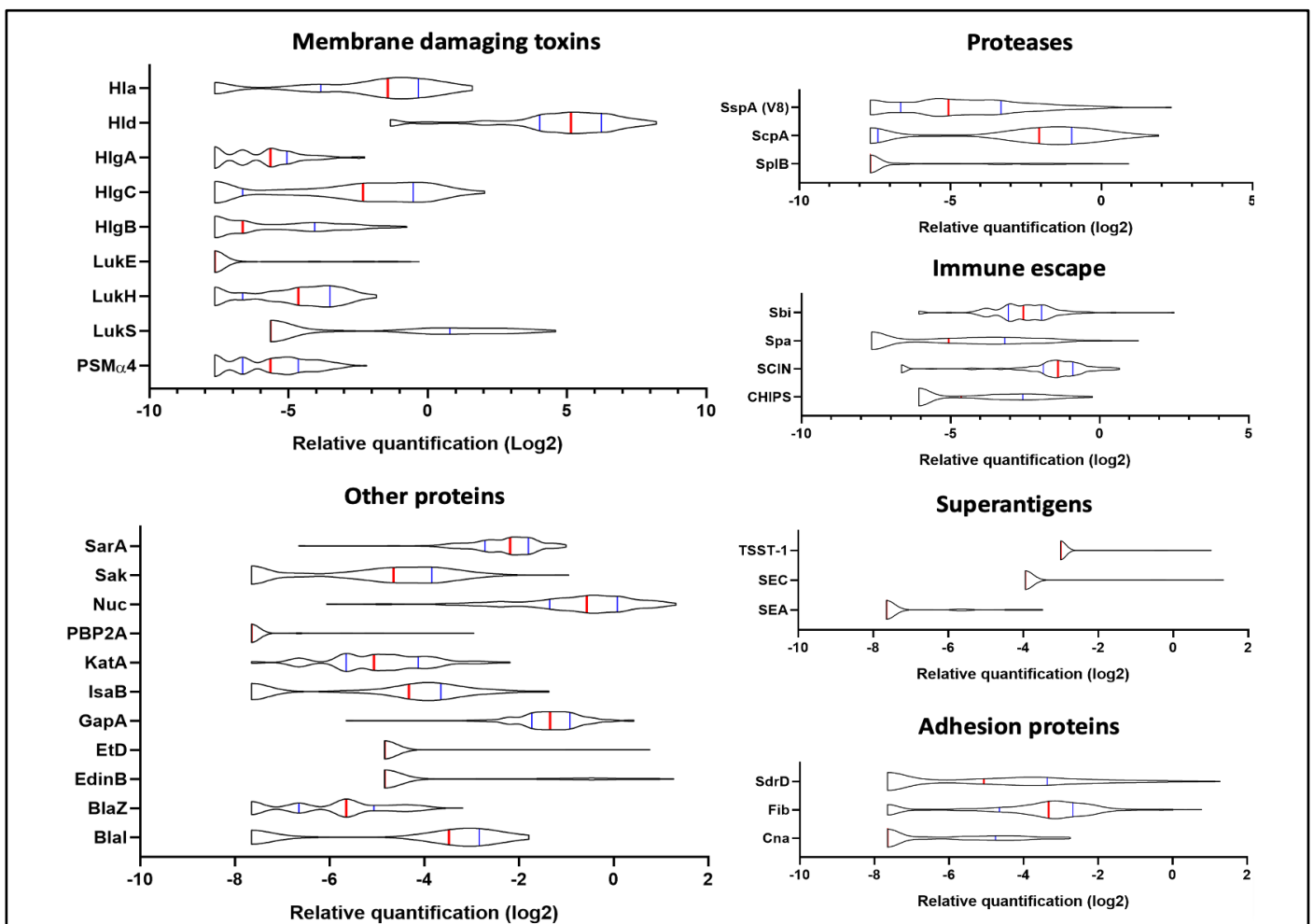
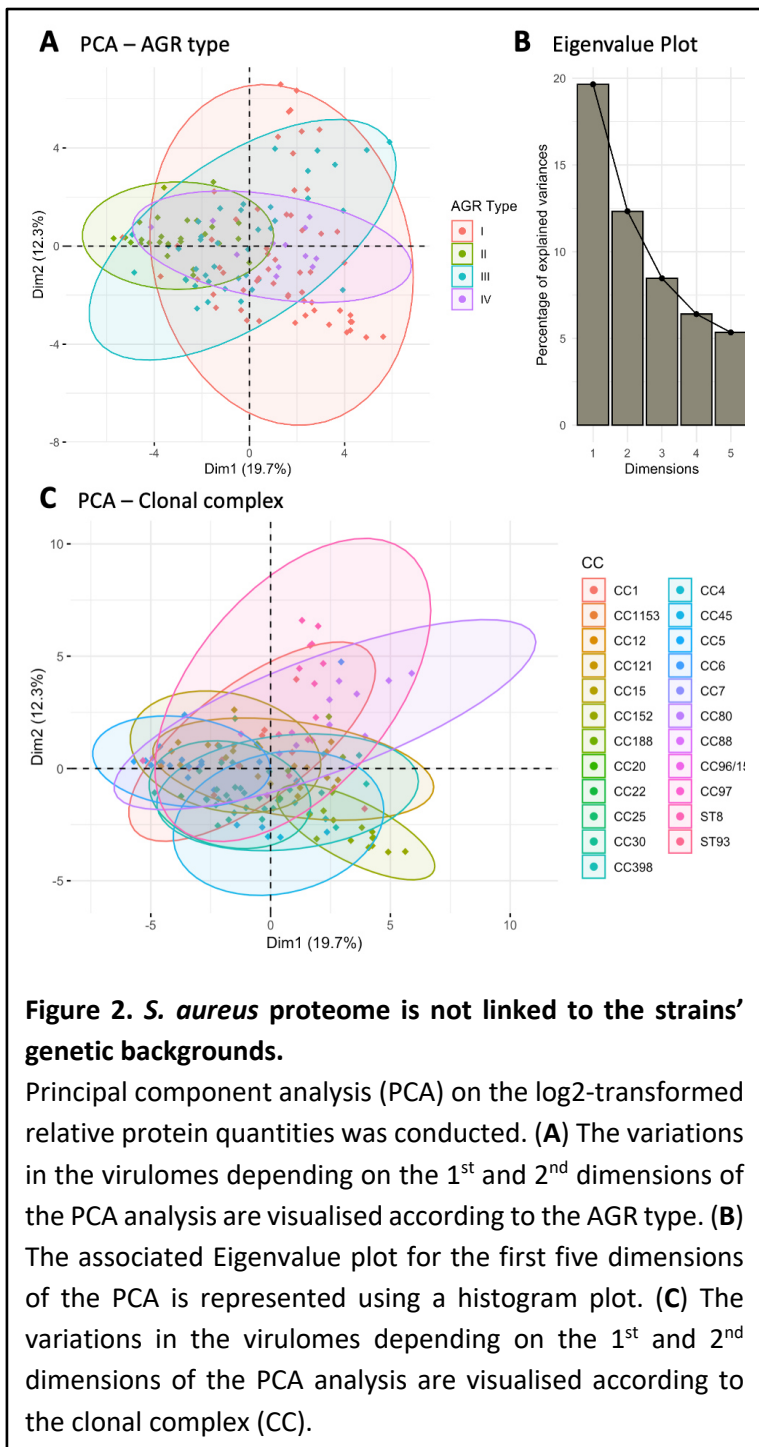


Figure 1. Variations in the expression of virulence factors between clinical strains

The relative amount of virulence factors expressed in log₂ and categorised into functional groups are represented using violin plots. A total of 136 clinical strains were analysed. The red vertical lines represent the medians and the blue lines represent the 1st and 3rd quartiles.



pathway, as is the case for the PSMs and Hld which are the first targets downstream of the *agr* activation pathway. Conversely some unexpected correlations were observed such as that of EdinB with Exfoliative toxin D, LukG with SplB, and Spa with SspA (V8 protease, Figure 3).

PVL impacts mortality in a dose-dependent manner

We examined the possible association of previously identified severity parameters (death,

haemoptysis, and leukopenia) [10] with the proteomic data, assuming that such an analysis based on quantitative data could reveal novel associations, particularly regarding the virulence factors present in all strains. To increase the robustness of the analysis, we first took into account the multi-collinearity of several factors, notably those encoded in operons, except when they were not strongly correlated as were HlgC and HlgB. The final list of factors was tested in univariate and multivariable regression, controlled on the Charlson score. The univariate analysis highlighted several virulence factors associated with severity (positively or negatively) in a dose-dependent manner. Those that were associated with death were PVL, Pbp2A, Glutamyl endopeptidase (V8 protease), BlaZ, Hla, PSM α 1-4, EdinB, LukH, Hld, SdrD, and Fib (Figure 4A). Those associated with haemoptysis were EdinB, PVL, BlaZ, Hld, Glutamyl endopeptidase (V8 protease), Nuc, Etd, LukH, and Spa (Figure S2A), and those associated with leukopenia were Glutamyl endopeptidase (V8 protease), EdinB, Nuc, Hld, PVL, HlgB, SspP (staphopain), PSM α 1-4, Etd, Sak, SarA, Hla, LukGH, SCIN, Spa, and Fib (Figure S3A). However, in multivariable regression analysis, only PVL remained associated with death in a dose-dependent manner (odds ratio 1.28 95% CI 1.02 to 1.60; Figure 4B). HlgB, Nuc, and Tsst-1 were positively associated with leukopenia while BlaI and HlgC were negatively associated with leukopenia (Figure S3B). Finally, BlaZ and HlgB were positively associated with haemoptysis and HlgC was negatively associated with haemoptysis (Figure S2B). When restricting the analysis to PVL-positive strains/patients, PVL production was significantly higher in deceased versus non-deceased patients (Figure 5). In multivariable survival analysis, only PVL was associated with death (1.15 95% IC 1.016 to 1.302; Table S3). The expression of Hla and of several factors identified in univariate analysis was significantly correlated with the expression of PVL in PVL-positive strains (Figure S4 to S6),

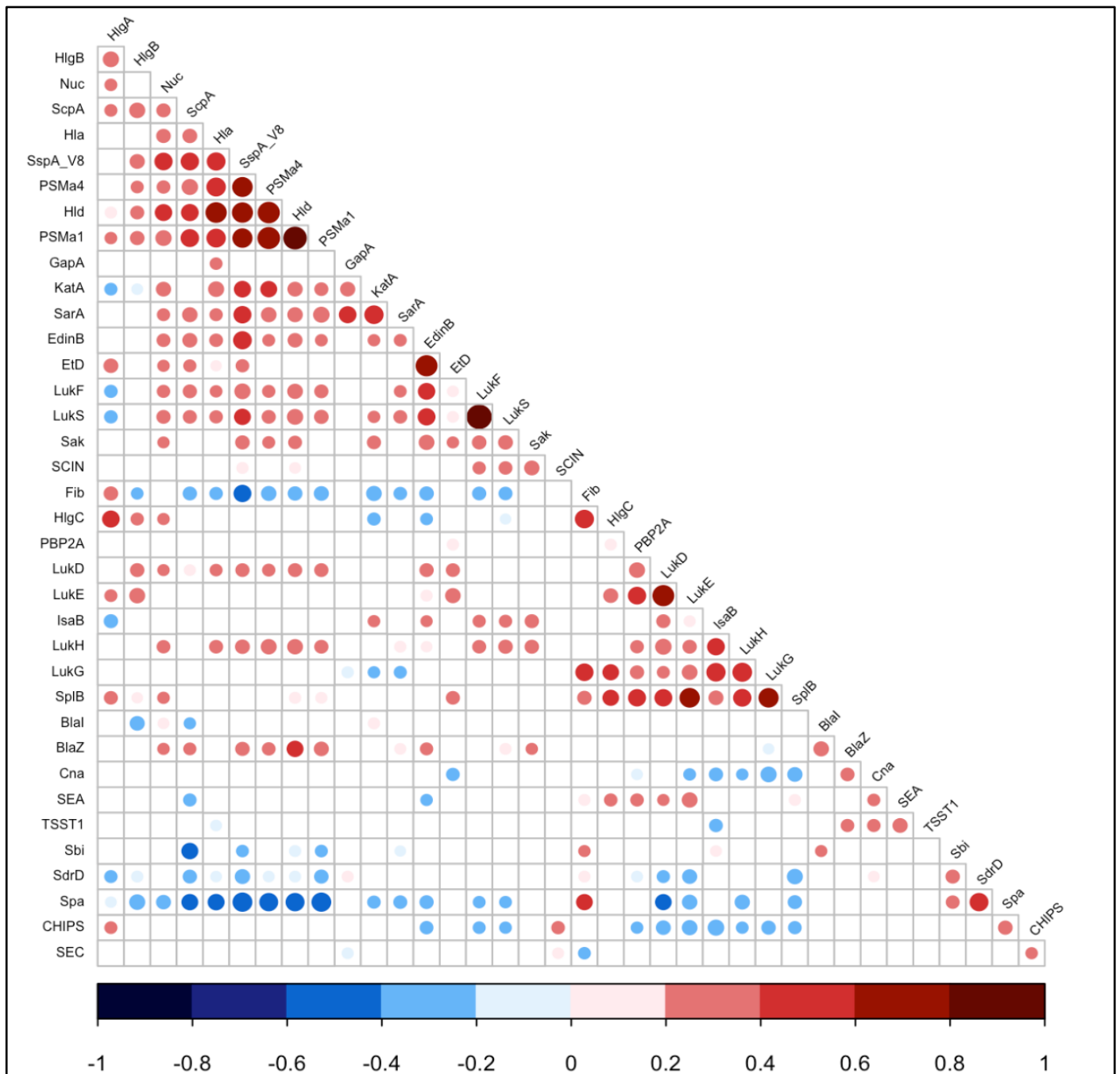


Figure 3. Expression correlations between *S. aureus* virulence factors.

Linear correlations between the expressions of 37 virulence factors were tested using Pearson correlation test. Non-significant correlations are represented as empty squares and significant correlations as dots. The dot size is negatively proportional to the p-value. The Pearson coefficient values are represented as dark blue for negative values to dark red for positive ones.

thus demonstrating that these factors were actually confounding variables.

Functional clustering of virulence factors.

S. aureus virulence factors are often functionally synergistic if not redundant without necessarily targeting the same receptors. To test this hypothesis, 20/37 toxins were functionally

clustered into five categories corresponding to adhesion proteins, membrane-damaging toxins, superantigenic toxins, immunoglobulin-binding proteins, and proteases (Table S4). These five categories were tested for their potential association with the studied severity parameters but no significant association was found (Table S4).

DISCUSSION

In the present study, we developed a multiplexed scheduled-MRM assay targeting 162 peptides used as surrogates for the detection and quantification of a panel of virulence factors expressed by *S. aureus*. Since the objective was to evaluate a putative correlation between the expression level of these factors and the severity of human diseases, notably CAP, the repeatability and accuracy of the quantification process are critical to provide usable quantitative data. Although secondary, the objective of the methodological development stage was also to ensure that the assay technique could then be used routinely to characterise the strains sent to the French National Reference Center for

Staphylococci and, in the future, to any clinical laboratory mastering mass spectrometry.

The vast majority of studies implementing targeted proteomic techniques for protein quantification describe the use of stable heavy isotope labelled (SIL) peptides as internal standards. Although relevant, particularly in the context of complex preparation methods as it compensates the bias due to the loss of sample [17], this approach has many limitations. The most obvious pertains to the cost of the labelled peptides if the method is highly multiplexed. The tedious longitudinal internal standard concentration quality controls, both in stock and working solutions, required to assess individual SIL peptide concentration, is another limitation

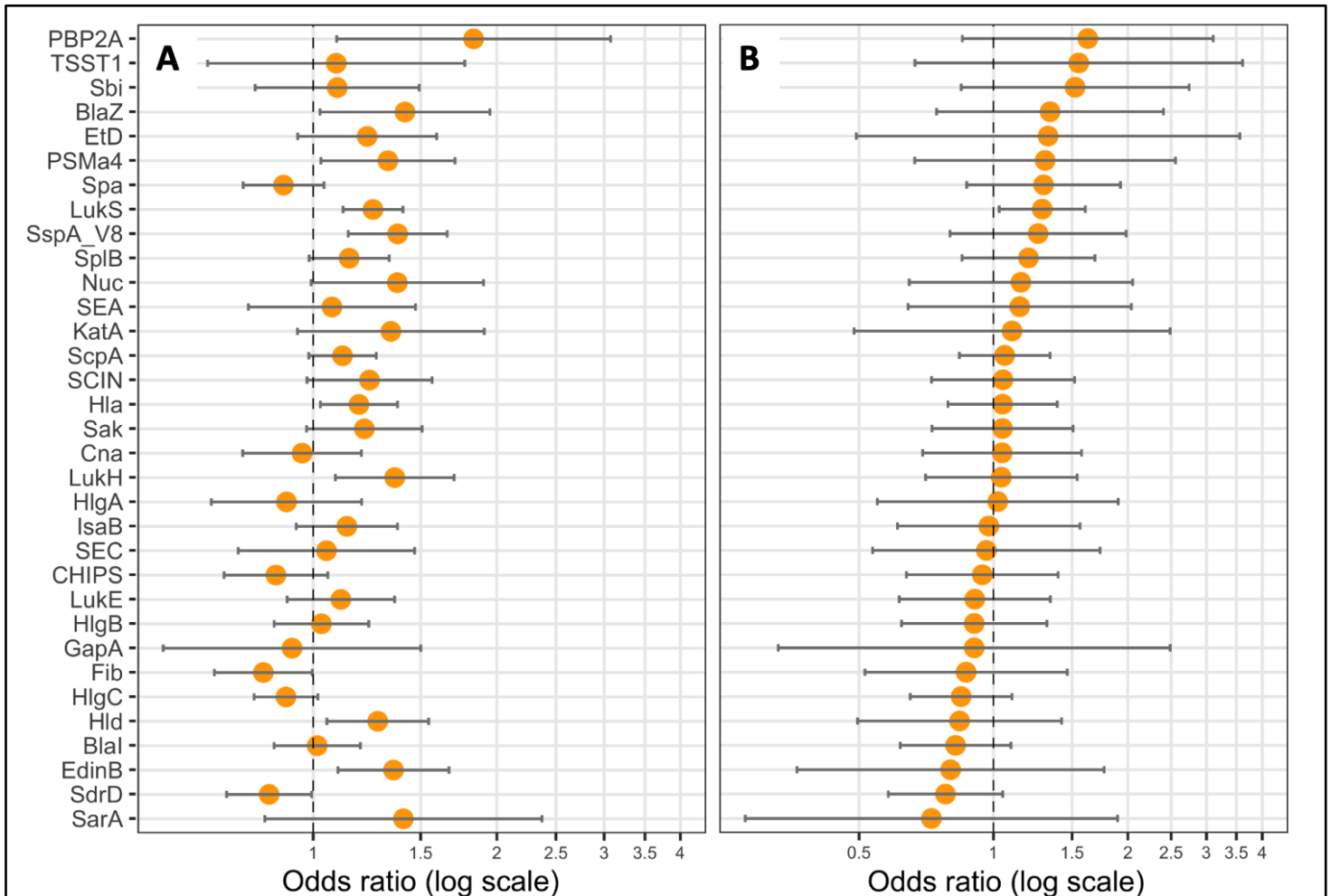


Figure 4. PVL (LukS) expression is correlated with death

Logistic regression models including Charlson score as covariate were performed, with either the expression level of (A) one protein (univariate), or (B) all proteins (multivariable) as explicative variables, and death as the response variable. Coefficients were reported as odds ratios (orange dots) with 95% confidence intervals (error bars).

worth mentioning. It should also be noted that the use of SIL peptides does not dispense with the need for normalisation on protein quantity and thus on the number of cells processed. Considering the aforementioned specifications and drawbacks related to the use of SIL peptides, the normalisation of the expression level of the virulence proteins was herein based on an internal standardisation relative to ribosomal proteins. Indeed, in a context of non-limiting nutrient concentration, the ribosomal protein content is fine-tuned for fitness strategy allocation, and thus exhibits a linear relationship with growth rate and hence, cell number [12–14]. The relevance and reliability of this relative quantification strategy based on the absolute signal of peptides deriving from ribosomal proteins is supported by a previous study demonstrating a good correlation between the expression level of proteins involved in various antibiotic resistance mechanisms and the resistance phenotypes of bacterial strains [18].

The quest for robustness, repeatability, and affordability of an assay, which could eventually be implemented as a routine test, requires streamlining the number of steps of the pre-analytical sample processing which may be the source of bias. Compared to conventional protocols of bottom-up proteomics, the sample preparation was greatly simplified in the present approach. Indeed, the reduction and alkylation of the thiol group of the disulfide bond was omitted, cell lysis and trypsin digestion steps were performed concomitantly, and the time-consuming off-line or on-line peptide desalting prior to mass spectrometry analysis was avoided. Herein, this last step could be avoided because a robust micro-flow chromatographic format was preferred to the gold standard nano-chromatography encountered in most proteomics experiments. When the amount of starting biological sample is not limiting, the micro-flow format shows similar sensitivity while offering greater repeatability and robustness,

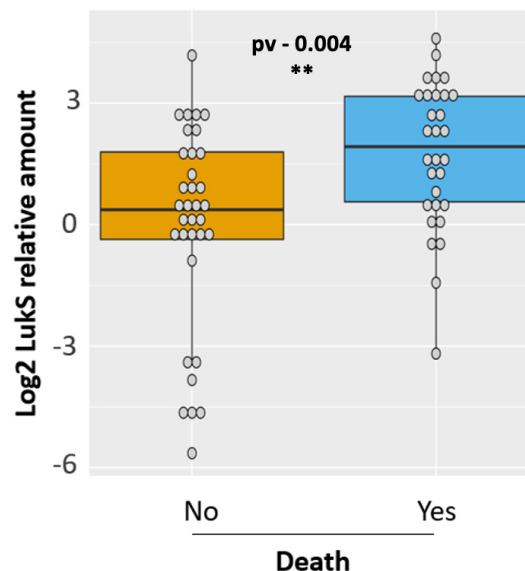


Figure 5. Strains isolated from deceased patients produce more PVL

Relative amount of log₂-transformed LukS from PVL-positive strains isolated from deceased (blue, n=30) and non-deceased (orange, n=34) patients are represented by dot plots. The medians with 25th and 75th percentiles are represented by box plots. A logistic regression model including CCI as covariate was performed, p-value < 0.01 - **.

especially when hyphenated with a triple quadrupole mass spectrometer. Such analytical platforms, which are already in place in certain hospitals for various clinical purposes, some being certified to perform In Vitro Diagnostics tests, could thus advantageously be used in the context of bacterial virulence assessment.

When applied to a large series of unrelated *S. aureus* isolates, the first noteworthy feature revealed by the approach was the diversity of protein expression levels, independently of strain lineage. This is consistent with a recent study showing significant lineage-independent variability in the cytotoxicity of *S. aureus* strains [19]. The coordinated expression of *S. aureus* virulence factors has been studied for decades, since the description and characterisation of the major *agr* global regulon, followed by the discovery of a plethora of regulatory proteins and RNA (for review [20,21]). It is known that *agr* represses the expression of numerous surface proteins such as coagulase,

ClfA, FnbpAB, Spa, and others, and upregulates the expression of several toxins including Hla, PVL, certain superantigens, nucleases, and proteases [18]. Hence, positive and negative correlations are expected within and between these two groups of factors, respectively, and were observed at the protein level in the present study. Moreover, several of the virulence factors studied herein are encoded in operons, which should lead to, if not an equimolar production, at least a strong positive correlation in the expression of the two proteins. This was not the case for HlgC and HlgB, suggesting that, depending on the strain, a more complex regulation may occur at the level of transcription (e.g., *hlgB* transcription generated by an alternative promoter) or translation (e.g., HlgB or C translation efficiency may vary between strains due to subtle nucleotide variations in the RBS or upstream).

CAP due to *S. aureus* is rare but severe and is often associated with the production of a rarely encountered toxin, PVL [25,26]. This toxin which targets the C5a receptor at the surface of granulocytes, monocytes, and macrophages [27] was shown to impact severity of *S. aureus* pneumonia in a rabbit model [28], and is a risk factor for mortality in adolescent and adult patients with severe CAP [10]. However, mortality still remained important in patients infected with PVL-negative strains, who represented nearly half the cohort previously studied [10]. The contribution of core-genome encoded virulence factors can therefore not be dismissed, particularly since experimental studies have demonstrated the importance of Hla, Protein A, staphylococcal nuclease, and many other virulence factors in the pathogenesis of staphylococcal pneumonia (for review see [29]). The lack of dose-dependent correlation between these virulence factors and death observed herein might reflect the dominant effect of PVL and the limited size of the PVL-negative group. Regarding the case of HlgCB, which targets the

same receptor as PVL at the surface of myeloid cells [30,31], the former was anticipated to impact severity in a dose-dependent manner in PVL-negative strains. However, in multivariable analysis, HlgB was positively associated with haemoptysis and leukopenia whilst HlgC was negatively associated with these markers of CAP severity. These apparently conflicting results may reflect the complexity of the interplay between these toxins or may be explained by the functional duality of HlgB which composes both the HlgAB and HlgCB toxins, each having specific biological functions [30]. However, it is worth mentioning that in patients infected with PVL-negative strains, mortality was 40% (6/15) in HlgC high-level producing strains compared to 24% (14/57) in HlgC low-level producing strains (data not shown). This suggests that the small sample size has likely prevented any significant association between HlgCB expression and death from being observed.

The association of nuclease with leukopenia is remarkable since nuclease has never been shown to have a direct impact on circulating neutrophils, even though it has been shown to degrade neutrophil extracellular traps, promoting immune cell death [32]. The association of TSST-1 with leukopenia observed herein is also novel in humans and could result from the extravasation of cells in a Vbeta-unrestricted manner, as demonstrated experimentally in rabbits [33]. The inverse association of BlaZ and Blal with two severity parameters is in accordance with the molecular circuit of the *bla* operon since Blal represses the transcription of *blaZ* encoding the Beta-lactamase BlaZ [34]. Beta-lactamase hyperproduction can reduce the efficacy of penicillinase-resistant penicillins commonly used for staphylococcal infections such as oxacillin and 1st generation cephalosporins [35], thus causing treatment failure [36].

The lack of association with severity when grouping 20 virulence factors into five functional categories is unexpected, as the results of animal studies have shown an additive neutralising effect of a therapeutic antibody targeting five pore-forming toxins [37]. Altogether, these results may reflect that CAP, as opposed to VAP in which Hla plays a major role [9], is a disease in which the main contributor to death is PVL. For this toxin, the correlation between the observed clinical severity and the *in vitro* expression level provides additional evidence for causality and not simple mere association.

Although the 37 virulence factors studied herein include the most studied candidates, this relatively low number is a main limitation of the present study. This number was dictated by technical (multiplexing capacity) and economic constraints: the need to setup a cost-effective approach that can be applied to large sets of isolates. Moreover, we made the hypothesis that *in vitro* expression could predict an *in vivo* behaviour. The fact that the expression of PVL predicted death in the context of CAP legitimates this approach. However, the results herein cannot conclude firmly on the role of the virulence factors other than PVL, as the single *in vitro* condition used might not be optimal for all of them. Other culture media, possibly including various stress conditions, should be developed in future studies to improve the model. Another limitation is the choice of a cohort of patients with CAP to evaluate the potential value of this approach. We hope that the application of this method to other clinical conditions such as bacteraemia, infective endocarditis, VAP, or bone and joint infections will uncover novel associations between disease presentation, complications, or outcome and the quantitative expression of virulence factors.

Acknowledgments:

We thank the scientists, engineers, and technicians of the French National Reference

Center for Staphylococci for strain characterisation, and Véréna Landel from the Hospices Civils de Lyon (France) for help in manuscript preparation.

Funding:

Agence Nationale de la Recherche IDAREV (JL, FV, SB)

Agence Nationale de la Recherche RHU IDBIORIV (JL, FV, SB, IM, MP)

Author contributions:

Conceptualisation: FV, JL

Methodology: JPR, KM, FC, RC, JL, FV

Investigation: MP, SB, IM, NM, RC, JPR, FC

Visualisation: MP, SB, JPR

Funding acquisition: JL, FV

Project administration: JL, FV

Supervision: JL, FV

Writing – original draft: MP, IL, NM, FC, FV

Writing – review & editing: SB, JPR, KM, JL, FV

References

1. Deinhardt-Emmer S, Sachse S, Geraci J, Fischer C, Kwetkat A, Dawczynski K, et al. Virulence patterns of *Staphylococcus aureus* strains from nasopharyngeal colonization. *J Hosp Infect.* 2018;100: 309–315. doi:10.1016/j.jhin.2017.12.011
2. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28: 603–661. doi:10.1128/CMR.00134-14
3. Foster TJ. Surface Proteins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Spectr.* 2019;7. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0046-2018
4. Tam K, Torres VJ. *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. *Microbiol Spectr.* 2019;7. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0039-2018

5. Peschel A, Otto M. Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11: 667–673. doi:10.1038/nrmicro3110
6. Recker M, Laabei M, Toleman MS, Reuter S, Saunderson RB, Blane B, et al. Clonal differences in *Staphylococcus aureus* bacteraemia-associated mortality. *Nat Microbiol.* 2017;2: 1381–1388. doi:10.1038/s41564-017-0001-x
7. Deinhardt-Emmer S, Haupt KF, Garcia-Moreno M, Geraci J, Forstner C, Pletz M, et al. *Staphylococcus aureus* Pneumonia: Preceding Influenza Infection Paves the Way for Low-Virulent Strains. *Toxins (Basel).* 2019;11. doi:10.3390/toxins11120734
8. Bordeau V, Cady A, Revest M, Rostan O, Sassi M, Tattevin P, et al. *Staphylococcus aureus* Regulatory RNAs as Potential Biomarkers for Bloodstream Infections. *Emerg Infect Dis.* 2016;22: 1570–1578. doi:10.3201/eid2209.151801
9. Stulik L, Malafa S, Hudcova J, Rouha H, Henics BZ, Craven DE, et al. α -Hemolysin Activity of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Predicts Ventilator-associated Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;190: 1139–1148. doi:10.1164/rccm.201406-1012OC
10. Gillet Y, Tristan A, Rasigade J-P, Saadatian-Elahi M, Bouchiat C, Bes M, et al. Prognostic factors of severe community-acquired staphylococcal pneumonia in France. *Eur Respir J.* 2021;58: 2004445. doi:10.1183/13993003.04445-2020
11. Ludwig C, Claassen M, Schmidt A, Aebersold R. Estimation of absolute protein quantities of unlabeled samples by selected reaction monitoring mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 2012;11: M111.013987. doi:10.1074/mcp.M111.013987
12. Hidalgo D, Martínez-Ortiz CA, Palsson BO, Jiménez JI, Utrilla J. Regulatory perturbations of ribosome allocation in bacteria reshape the growth proteome with a trade-off in adaptation capacity. *iScience.* 2022;25. doi:10.1016/j.isci.2022.103879
13. Scott M, Klumpp Stephan, Mateescu M Eduard, Hwa Terence. Emergence of robust growth laws from optimal regulation of ribosome synthesis. *Molecular Systems Biology.* 2014;10: 747. doi:10.15252/msb.20145379
14. Bosdriesz E, Molenaar D, Teusink B, Bruggeman FJ. How fast-growing bacteria robustly tune their ribosome concentration to approximate growth-rate maximization. *The FEBS Journal.* 2015;282: 2029–2044. doi:10.1111/febs.13258
15. Rasigade J-P, Barray A, Shapiro JT, Coquisart C, Vigouroux Y, Bal A, et al. A viral perspective on worldwide non-pharmaceutical interventions against COVID-19. *medRxiv;* 2020. p. 2020.08.24.20180927. doi:10.1101/2020.08.24.20180927
16. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12: 49–62. doi:10.1038/nrmicro3161
17. Carr SA, Abbatiello SE, Ackermann BL, Borchers C, Dornon B, Deutsch EW, et al. Targeted Peptide Measurements in Biology and Medicine: Best Practices for Mass Spectrometry-based Assay Development Using a Fit-for-Purpose Approach *. *Molecular & Cellular Proteomics.* 2014;13: 907–917. doi:10.1074/mcp.M113.036095
18. Cecchini T, Yoon E-J, Charretier Y, Bardet C, Beaulieu C, Lacoux X, et al. Deciphering Multifactorial Resistance Phenotypes in *Acinetobacter baumannii* by Genomics and Targeted Label-free Proteomics *. *Molecular & Cellular Proteomics.* 2018;17: 442–456. doi:10.1074/mcp.RA117.000107
19. Laabei M, Peacock SJ, Blane B, Baines SL, Howden BP, Stinear TP, et al. Significant variability exists in the cytotoxicity of global methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *Microbiology (Reading).* 2021;167. doi:10.1099/mic.0.001119
20. Bronesky D, Wu Z, Marzi S, Walter P, Geissmann T, Moreau K, et al. *Staphylococcus aureus* RNAIII and Its

- Regulon Link Quorum Sensing, Stress Responses, Metabolic Adaptation, and Regulation of Virulence Gene Expression. *Annual Review of Microbiology*. 2016;70: 299–316. doi:10.1146/annurev-micro-102215-095708
21. Felden B, Bouloc P. Regulatory RNAs in bacteria: From identification to function. *Methods*. 2017;117: 1–2. doi:10.1016/j.ymeth.2017.03.018
 22. Geisinger E, Adhikari RP, Jin R, Ross HF, Novick RP. Inhibition of rot translation by RNAIII, a key feature of agr function. *Mol Microbiol*. 2006;61: 1038–1048. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05292.x
 23. Reyes D, Andrey DO, Monod A, Kelley WL, Zhang G, Cheung AL. Coordinated regulation by AgrA, SarA, and SarR to control agr expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2011;193: 6020–6031. doi:10.1128/JB.05436-11
 24. Xue T, You Y, Shang F, Sun B. Rot and Agr system modulate fibrinogen-binding ability mainly by regulating clfB expression in *Staphylococcus aureus* NCTC8325. *Med Microbiol Immunol*. 2012;201: 81–92. doi:10.1007/s00430-011-0208-z
 25. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet J-C, Lina G, Bes M, et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Pantone-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet*. 2002;359: 753–759. doi:10.1016/S0140-6736(02)07877-7
 26. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter M-O, Gauduchon V, et al. Involvement of Pantone-Valentine Leukocidin—Producing *Staphylococcus aureus* in Primary Skin Infections and Pneumonia. *Clin Infect Dis*. 1999;29: 1128–1132. doi:10.1086/313461
 27. Spaan AN, Henry T, van Rooijen WJM, Perret M, Badiou C, Aerts PC, et al. The Staphylococcal Toxin Pantone-Valentine Leukocidin Targets Human C5a Receptors. *Cell Host & Microbe*. 2013;13: 584–594. doi:10.1016/j.chom.2013.04.006
 28. Diep BA, Chan L, Tattavin P, Kajikawa O, Martin TR, Basuino L, et al. Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus aureus* Pantone-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. *PNAS*. 2010;107: 5587–5592. doi:10.1073/pnas.0912403107
 29. Pivard M, Moreau K, Vandenesch F. *Staphylococcus aureus* Arsenal To Conquer the Lower Respiratory Tract. *mSphere*. 2021;6: e00059-21. doi:10.1128/mSphere.00059-21
 30. Spaan AN, Vrieling M, Wallet P, Badiou C, Reyes-Robles T, Ohneck EA, et al. The staphylococcal toxins γ -haemolysin AB and CB differentially target phagocytes by employing specific chemokine receptors. *Nature Communications*. 2014;5: 5438. doi:10.1038/ncomms6438
 31. Spaan AN, Schiepers A, Haas CJC de, Hooijdonk DDJJ van, Badiou C, Contamin H, et al. Differential Interaction of the Staphylococcal Toxins Pantone–Valentine Leukocidin and γ -Hemolysin CB with Human C5a Receptors. *The Journal of Immunology*. 2015;195: 1034–1043. doi:10.4049/jimmunol.1500604
 32. Thammavongsa V, Missiakas DM, Schneewind O. *Staphylococcus aureus* degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death. *Science*. 2013;342: 863–866. doi:10.1126/science.1242255
 33. Waclavicek M, Stich N, Rappan I, Bergmeister H, Eibl MM. Analysis of the early response to TSST-1 reveals Vbeta-unrestricted extravasation, compartmentalization of the response, and unresponsiveness but not anergy to TSST-1. *J Leukoc Biol*. 2009;85: 44–54. doi:10.1189/jlb.0108074
 34. Hackbarth CJ, Chambers HF. blaI and blaR1 regulate beta-lactamase and PBP 2a production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1993;37: 1144–1149. doi:10.1128/AAC.37.5.1144

35. Croes S, Beisser PS, Terporten PH, Neef C, Deurenberg RH, Stobberingh EE. Diminished in vitro antibacterial activity of oxacillin against clinical isolates of borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16: 979–985. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.02956.x
36. Hryniewicz MM, Garbacz K 2017. Borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA) – a more common problem than expected? *Journal of Medical Microbiology.* 66: 1367–1373. doi:10.1099/jmm.0.000585
37. Rouha H, Badarau A, Visram ZC, Battles MB, Prinz B, Magyarics Z, et al. Five birds, one stone: neutralization of α -hemolysin and 4 bi-component leukocidins of *Staphylococcus aureus* with a single human monoclonal antibody. *MAbs.* 2015;7: 243–254. doi:10.4161/19420862.2014.985132

Supplementary Data

Staphylococcus aureus virulence factor expression matters: input from targeted proteomics shows Panton-Valentine leucocidin impact on mortality

Authors: Mariane Pivard¹, Sylvere Bastien¹, Iulia Macavei², Nicolas Mouton², Jean-Philippe Rasigade^{1,3}, Florence Couzon¹, Romain Carrière², Karen Moreau¹, Jérôme Lemoine², Francois Vandenesch^{1,3*}

Authors' affiliations:

¹ CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Université de Lyon, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS de Lyon; Lyon, France.

² Institut des Sciences Analytiques, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR 5280; Villeurbanne, France.

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

Supplementary figures:

Fig. S1 The number of repeats in the spa gene does not impact its quantification

Fig. S2 BlaZ and HlgB are correlated with haemoptysis

Fig. S3 Nuc and the TSST-1 are correlated with leukopenia

Fig. S4 The expression levels of Hla and PVL are correlated

Fig. S5 The expression levels of Hld and PVL are correlated

Fig. S6 The expression levels of SspA and PVL are correlated

List of supplementary tables:

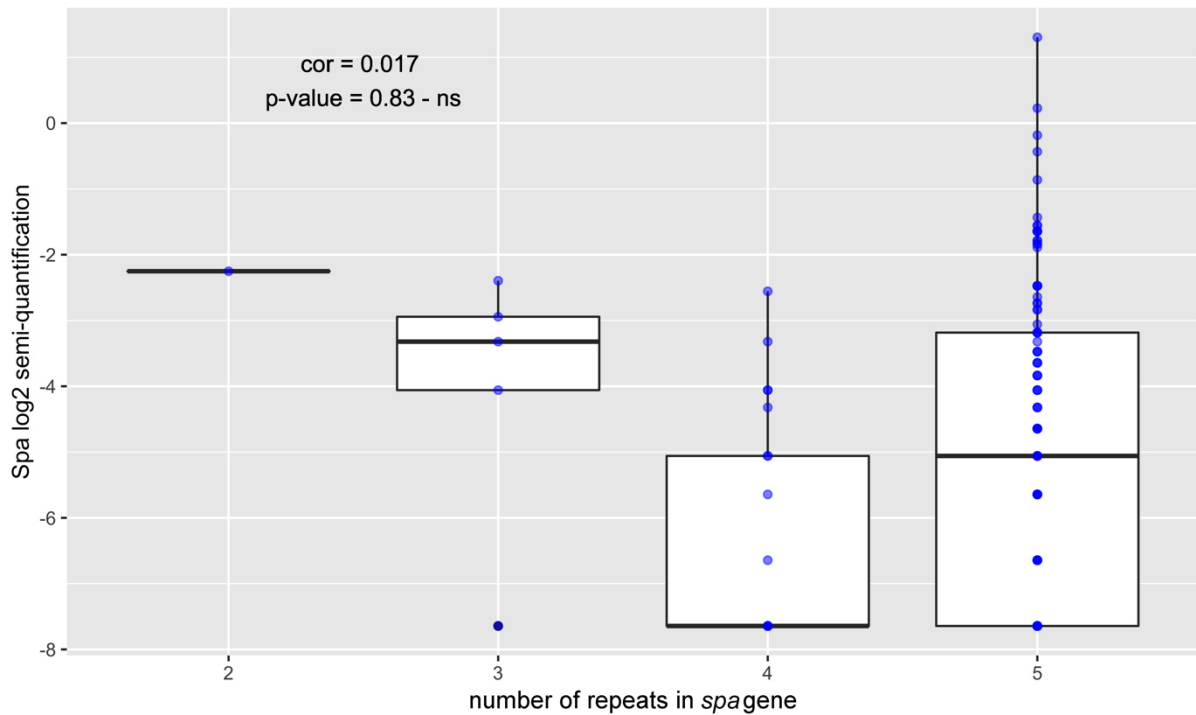
Table S1 Proteins targeted and peptides used

Table S2 CA-pneumonia strains and clinical data

Table S3 Multivariable survival analysis results

Table S4 Multivariable analysis with functional groups

Supplementary figures:



Supplementary Figure S1. The number of repeats in the *spa* gene does not impact its quantification.

The relative amount of log₂-transformed Spa is represented by dot plots (blue dots) according to the number of immunoglobulin-binding repeats present in the *spa* gene of each strain, determined using genome sequencing. Medians with 25th and 75th percentiles are represented by box plots. A Pearson correlation test between Spa semi-quantification and the number of repeats was performed, p-value > 0.05 - ns.

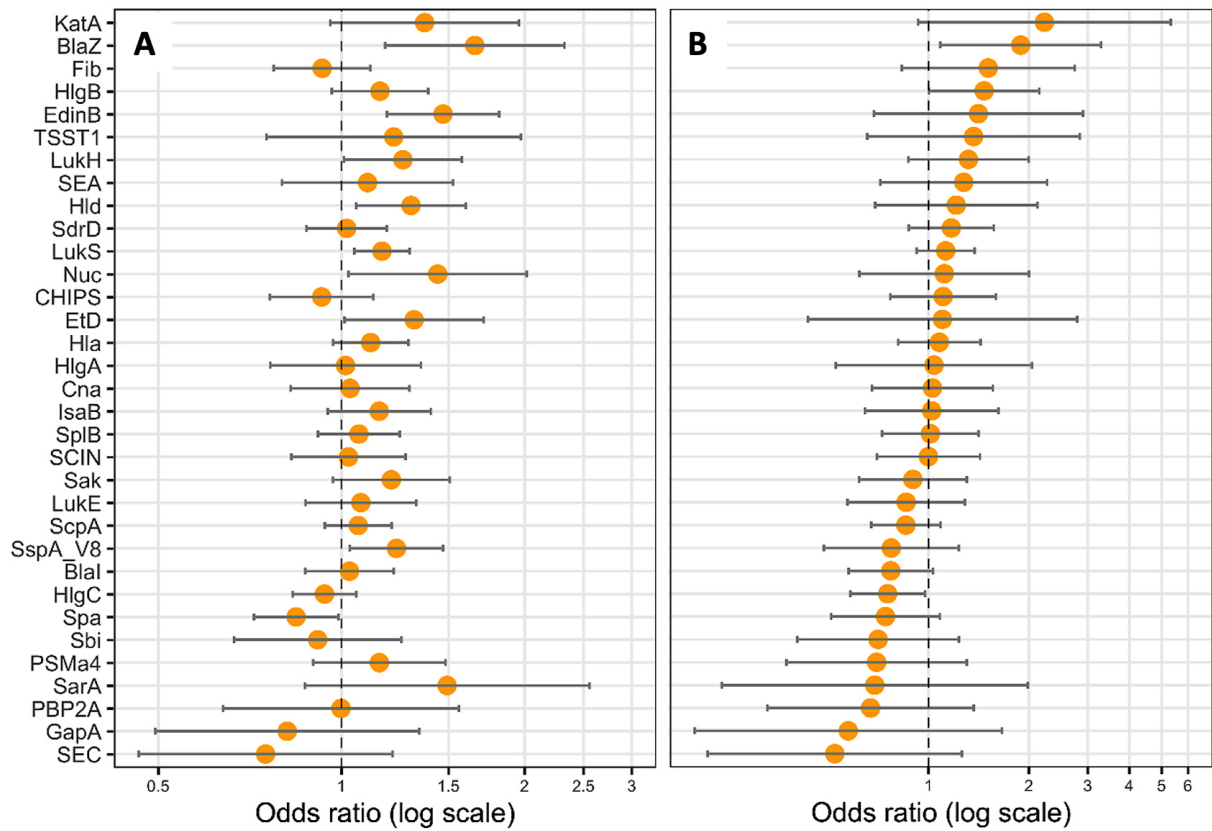
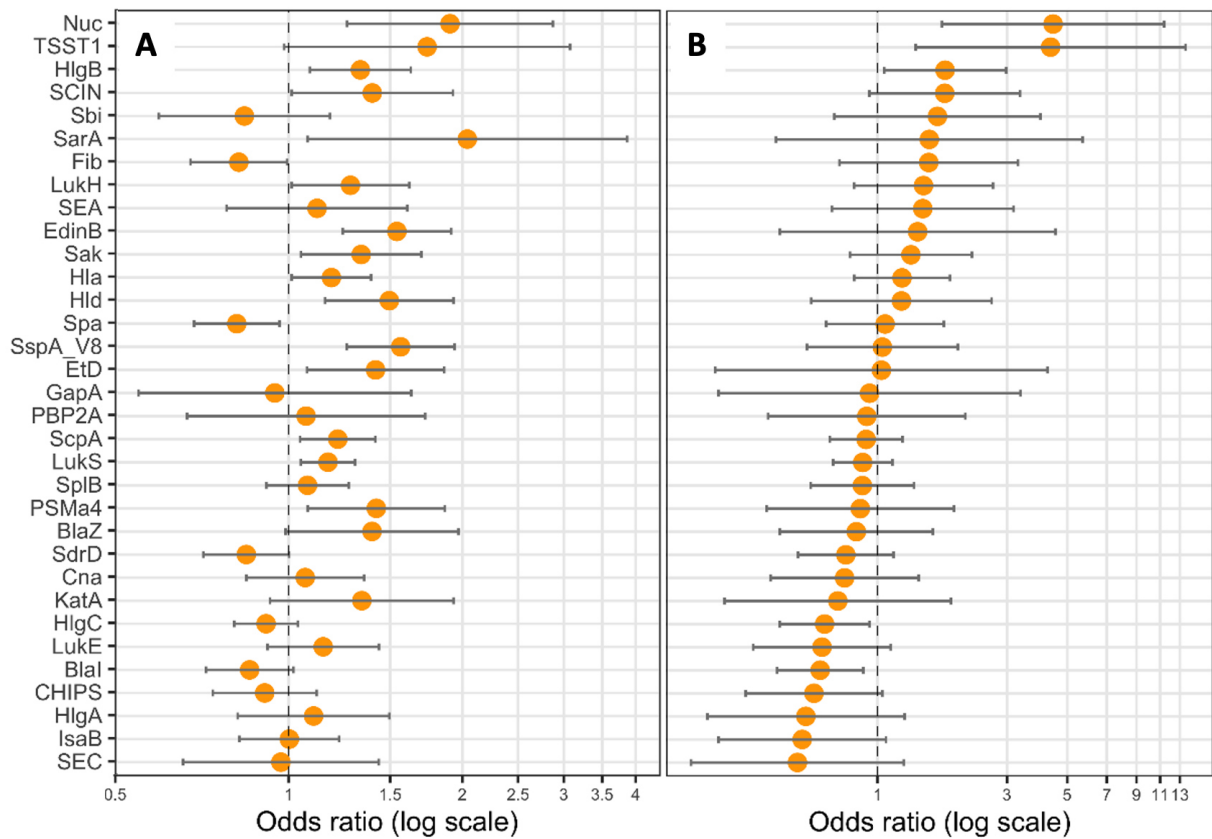


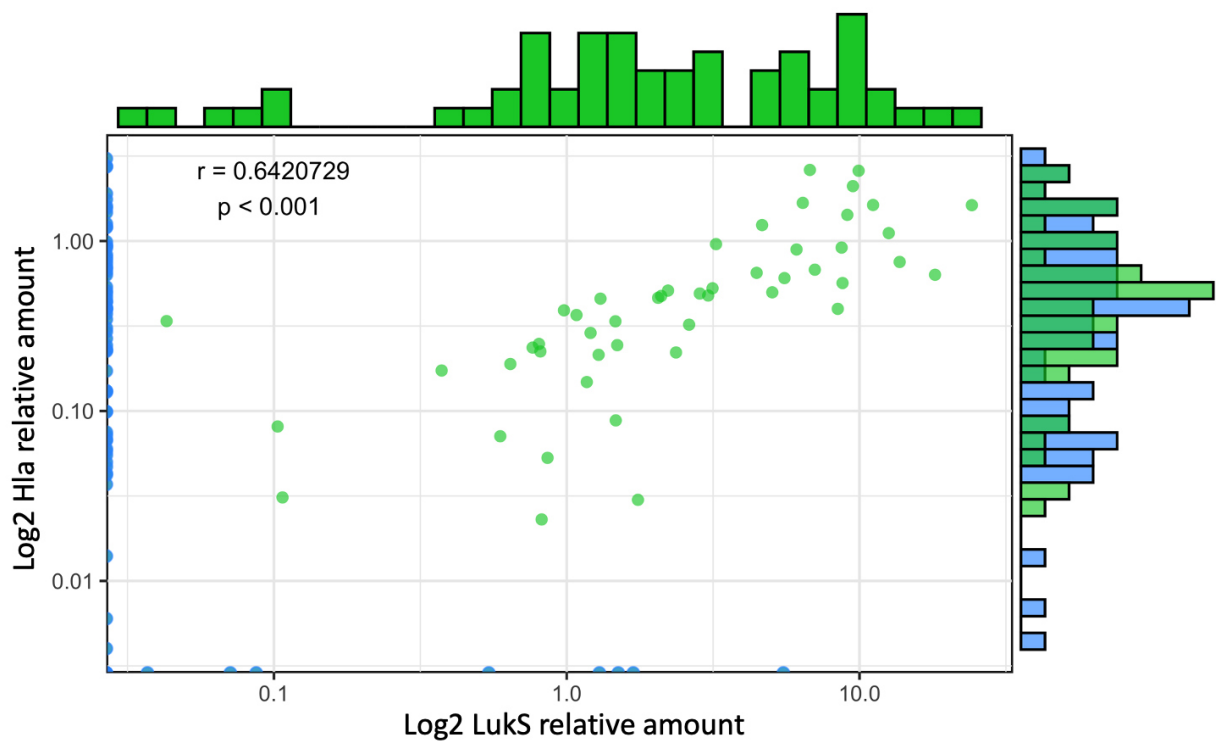
Figure S2. BlaZ and HlgB expressions are correlated with haemoptysis

Logistic regression models including CCI as covariate were performed, with either the expression level of (A) one protein (univariate), or (B) all proteins (multivariate) as explicative variables, and haemoptysis as the response variable. Coefficients were reported as odds ratios (orange dots) with 95% confidence intervals (error bars).



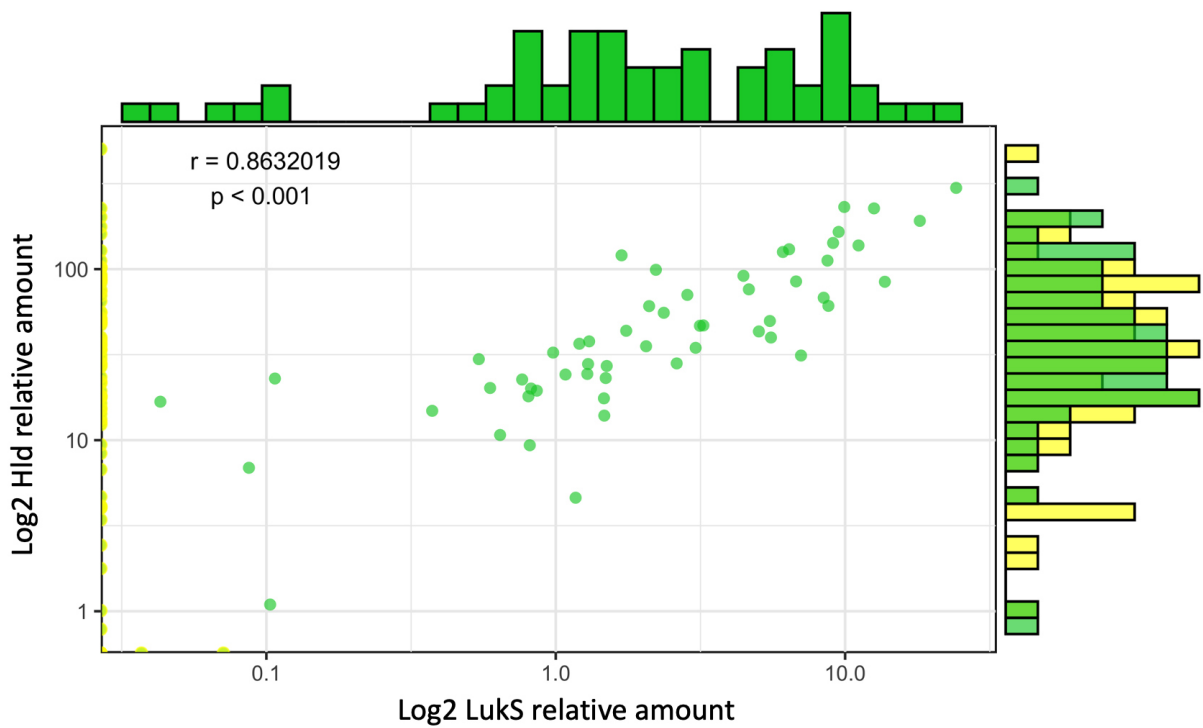
Supplementary Figure S3. Nuc and the TSST-1 expression are correlated with leukopenia

Logistic regression models including CCI as covariate were performed, with either (A) one protein (univariate), or (B) all proteins (multivariate) as explicative variables, and leukopenia (<3G/L) as the response variable. Coefficients were reported as odds ratios (orange dots) with 95% confidence intervals (error bars).



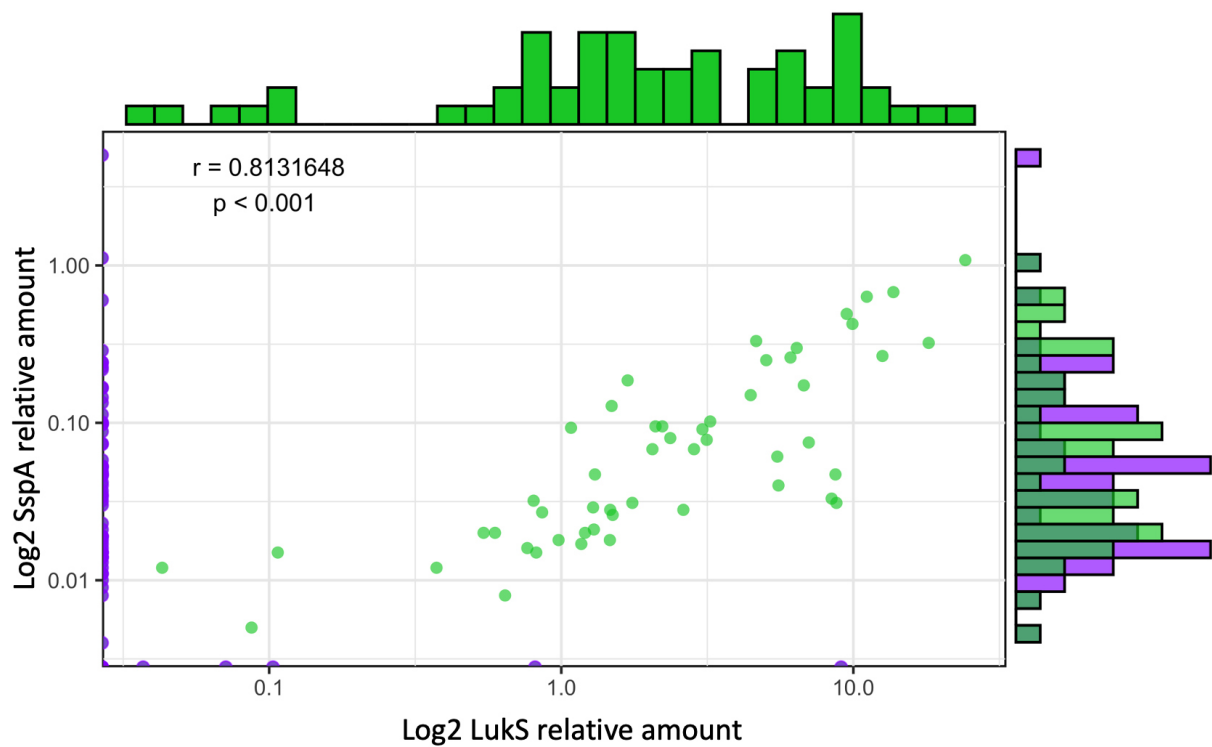
Supplementary Figure S4. The expression levels of Hla and PVL are correlated

Log₂-transformed Hla relative quantities were plotted against the log₂-transformed relative quantities of LukS. The density of strains expressing similar protein quantities is represented by histograms, on top for LukS and on the right side for Hla, except for null values. Green dots represent strains with quantification for both Hla and LukS, and blue dots represent strains with at least one null value. A Pearson correlation test was performed.



Supplementary Figure S5. The expression levels of Hld and PVL are correlated

Log2-transformed Hla relative quantities were plotted against the log2-transformed relative quantities of LukS. The density of strains expressing similar protein quantities is represented by histograms, on top for LukS and on the right side for Hld, except for null values. Green dots represent strains with quantification for both Hld and LukS, and yellow dots represent strains with at least one null value. A Pearson correlation test was performed.



Supplementary Figure S6. The expression levels of SspA and PVL are correlated

Log2-transformed SspA relative quantities were plotted against the log2-transformed relative quantities of LukS. The density of strains expressing similar protein quantities is represented by histograms, on top for LukS and on the right side for SspA, except for null values. Green dots represent strains with quantification for both SspA and LukS, and purple dots represent strains with at least one null value. A Pearson correlation test was performed.

List of supplementary tables:

Table S1 Proteins targeted and peptides used

Table S2 CA-pneumonia strains and clinical data

Table S3 Multivariate survival analysis results

Table S4 Multivariate analysis with functional groups

Proteins targeted and peptides used

Protein name	Targeted reporter peptides	Discovery (D) /Synthetic (S)
Blal	EIEELR	S
	DILNDISK	S
	SLVLNFAK	D/S
BlaZ	FAYASTSK	D/S
	SGDTLIK	S
	DTSTPAAFGK	S
CHIP	NSAQFEK	S
	SSYVINGPGK	D/S
	NSGLPTTLGK	D/S
Cna	ITVDNTK	D/S
	YTVEELTK	D/S
	DISSTNVDTLTVSPSK	D/S
EdinB	LSENIQEQVR	S
	NSSPINTPLR	S
	SANGDVNK	S
EdinC	SSTSDSVVYVR	S
	TTELSNIALADDVK	S
	LLNLDYLSSVK	S
EtA	GQTSATGVLIGK	D/S
	SEIELTTLR	D/S
	LELIGYPFDHK	D/S
EtB	NPSNIIFTPAQNR	D/S
	SPYNSVGTVFVK	D/S
	VTAQELDYLTR	S
	ESPYGQGLDLAIK	D/S
EtD	NTIITNYHVS	S
	GETIASGVLIGK	S
	GGQYGLPFGILFNR	D/S
Fib	LIQAQNLVR	S
	THTVSAHR	S
	AVNLVSFEYK	D/S
GapA	FTGEVEVDGGFR	D/S
	TLAYLAELSK	D/S
	VPVATGSLTELTVVLEK	D/S
Hla	TGTTDIGSNTTVK	S
	TGDLVTYDK	D/S
	TILESPTDK	S
	IGGLIGANVSIGHTLK	D/S
	VQLQLPDNEVAQISDYPR	S
Hld	WIIDTVNK	D/S
	MAQDIISTIGDLVK	D/S
HlgA	LGYNIGGNFQSAPSIGGSGSFNYSK	S
	DSNVDLINYLK	S
	LAITQNIQDFVK	S
HlgB	ATGNINSGFVKPNPNVDYDFSK	S
	YNVSISSQSNDSVNVVDYAPK	S
	SNFNPEFLSVLSHR	S
HlgC	DALILK	S
	GSSDTSEFEITYGR	S
	WPFQYNIQGLK	S
	YVSLINYLK	D/S
	WGVVTQNIQDFVK	S
IsaB	VVEVTVGHTPYK	D/S
	EADSGIFYQNAK	S
	GNEASQLQFVVK	D/S
KatA	FSTVAGER	D/S
	LFSYGDAQR	D/S
	LTGVFGHPVSDR	S
	DNPFDLTK	D/S
	GSGAFGTFTVTK	D/S
	AAGNINSGYK	D/S

LukD	LIGTDSK	S
	SFSETINYK	S
	DSYDPTYGNELFLGGDK	D/S
	GNFNPEFISVLSHK	D/S
LukE	NQNTVFTSTYEVDWQNILLK	S
	TISYTQK	S
	SYVSEVDK	S
	ANTNIENIGDGAIEVIK	S
LukG	YLFVQSPNGPTGSAR	S
	TLLDQSTSHK	S
	ILDPNGYWNSTLR	S
LukH	LSALYEVDWK	S
	NSTAPDDIGK	S
	YPSEYHVDFQVK	S
	TEILDQLPK	S
PBP2A	IATVENPELSFASK	S
	IYNSLGVK	D/S
	SYANLIGK	D/S
	VALELGSK	D/S
MecC	YEVVNGNIDLK	D/S
	LAYGEEEIVDR	S
	IALALGAK	S
	SYNLQINTIK	S
Nuc	ILTSIALK	S
	AIDGDTVK	S
	YGPEASAFK	D/S
PSMa1	GLAYIYADGK	D/S
PSMa4	SLIEQFTGK	S
LukF-PV	MAIVGTIIK	S
	AIIDIFAK	S
	QSNLNAGQNFLEYHK	S
	DTISSQFYWGSK	S
LukS-PV	GNFNPEFIGVLSR	D/S
	SVQWGIK	D/S
	ANSFITSLGK	D/S
Sak	TNDPNVDLINYLPK	D/S
	VVELDPSAK	D/S
	IEVTTYDK	D/S
sara	GFVVPDLSEHIK	S
	QPQVVK	D/S
	DIINHLNYK	S
	IESLLSR	S
Sbi	TVLILVNAQQR	D/S
	ITEANNEIEL	S
	GITEEQR	S
SCIN	AQEVFSESLK	D/S
	VEVPQIQSPK	D/S
	YQLQK	S
	LANELK	S
SdrD	NEAQASTSLPTSNEYQNEK	S
	IYNEIDEALK	D/S
	SLLDELNVNELATGSLNTYYK	S
	ESVQSTTGK	S
SEA	STNEDLNTK	S
	GISGVTVTLK	D/S
	QNTVPLETVK	D/S
	SELQGTALGNLK	S
SEB	NVTVQELDLQAR	D/S
	GFFTDHSWYNLLVDFDSK	D/S
	LGNYDNVR	D/S
SEC	VLYDDNHVSAINVK	D/S
	LYEFNNSPYETGYIK	D/S
	SVTAQELDIK	D/S
	NTISFEVQTDK	D/S
	FLAHDLIYNISDK	D/S

SED	LYNNDTLGGK	D/S
	IEFDSSDGSK	D/S
	VSYDLFDVK	D/S
SEH	SDEISGEK	D/S
	ETELIR	D/S
	NVTLQELDIK	D/S
	VIGANVWVDGIQK	D/S
Spa	LNESQAPK	S
	DDPSQSANVLGEAQK	D/S
	NGFIQSLK	D/S
SplB	YAAGAK	S
	ITAHPNSDK	S
	IINYPGK	S
	EDVSVIQVEER	D/S
SspA (V8)	DTLLTNK	S
	EHANVILPNDR	S
	YSGEGLAIVK	S
SspP	HVQVNVEDK	D/S
	TESIPTGNNVTQLK	S
	YTINVSSFLSK	S
TSST-1	HQLTQIHGLYR	S
	LPTPIELPLK	D/S
	QLAISTLDFEIR	D/S

CA-pneumonia strains and clinical data

Number	AGR types	Clonal complexes	Death	Time hosp (days)	Charlson score	Rash	Haemoptysis	Leukopenia	Leukopenia_Bin	Sequencing Number
1	III	CC1	no	18	3	no	no	12	no	ST20150832
2	I	ST8	yes	3	3	no	no	1.2	yes	ST20160536
3	III	CC80	no	39	2	no	no	13.1	no	ST20150547
4	II	CC5	no	7	0	no	no	31	no	ST20110311
5	I	CC7	no	34	0	no	no	14.86	no	ST20130718
6	III	CC80	no	68	1	no	no	1.2	yes	ST20130523
7	I	CC398	no	19	0	yes	no	2.3	yes	ST20110239
8	I	CC45	no	80	0	no	no	6.9	no	ST20113005
9	II	CC5	no	64	6	no	no	14	no	ST20150434
10	I	CC25	no	22	3	no	yes	13.8	no	ST20112082
11	II	CC15	no	12	0	no	yes	34.8	no	ST20151867
12	II	CC15	no	44	1	no	no	8.9	no	ST20120369
13	II	CC5	no	24	0	no	no	43.8	no	ST20130351
14	II	CC12	yes	5	2	no	no	13	no	ST20130052
15	I	CC398	yes	3	0	no	no	1.9	yes	ST20160175
16	II	CC15	no	84	3	no	yes	108	no	ST20150602
17	IV	CC121	no	30	0	yes	yes	8.8	no	ST20130406
18	II	CC15	yes	32	0	no	yes	0.8	yes	ST20110288
19	IV	CC121	no	NA	0	no	no	16	no	ST20130951
20	III	CC30	no	62	2	no	no	1.28	yes	ST20162160
21	III	CC80	yes	0	2	no	no	1.4	yes	ST20150326
22	I	CC188	yes	11	2	no	yes	63.22	no	ST20130900
23	I	CC152	yes	1	0	no	yes	1.15	yes	ST20150065
24	I	CC45	no	23	0	yes	no	37.4	no	ST20130419
25	II	CC5	no	10	2	no	no	10.5	no	ST20140245
26	II	CC5	no	NA	1	no	no	18	no	ST20131246
27	II	CC15	no	13	0	no	no	14	no	ST20140716
28	II	CC12	no	25	1	no	yes	4.4	no	ST20102113
29	III	CC30	no	83	1	no	no	5.5	no	ST20160419
30	I	CC398	no	32	1	no	no	19.6	no	ST20121941
31	I	CC152	yes	0	0	no	yes	0.9	yes	ST20130329
32	II	CC5	no	26	0	no	no	21.5	no	ST20152009
33	I	CC398	no	180	4	no	no	6.3	no	ST20142146
34	I	CC45	yes	5	0	no	no	1.8	yes	ST20130447
35	III	CC1	yes	46	2	no	no	8.4	no	ST20160289
36	II	CC5	no	12	2	no	yes	5.77	no	ST20120435
37	III	CC96/154	no	6	0	no	no	5.3	no	ST20140246
38	III	CC80	yes	37	0	no	yes	0.8	yes	ST20140340
39	I	CC398	no	29	1	no	no	3.9	no	ST20140244
40	III	CC1	no	33	5	no	yes	32.46	no	ST20160340
41	I	CC152	yes	1	0	no	yes	1.82	yes	ST20141260
42	I	CC398	no	36	2	no	yes	1.4	yes	ST20130242
43	II	CC5	yes	23	4	no	no	21.4	no	ST20131798
44	IV	CC121	no	74	2	no	no	NA	NA	ST20150894
45	II	CC1153	no	11	0	no	yes	13.2	no	ST20160538
46	IV	CC121	yes	1	3	yes	no	3	no	ST20121202
47	III	ST93	no	NA	0	no	no	9.5	no	ST20141442
48	I	CC152	yes	0	0	no	yes	1.7	yes	ST20120554
49	I	CC97	no	NA	2	no	no	2.3	yes	ST20141333
50	IV	CC121	yes	31	3	yes	no	4.18	no	ST20110365
51	III	CC30	yes	8	0	no	no	19.6	no	ST20141965
52	III	CC30	no	38	2	no	yes	8.4	no	ST20130355
53	I	CC45	yes	54	5	no	no	73.7	no	ST20150104
54	IV	CC121	yes	0	0	no	no	6	no	ST20160284
55	III	CC80	no	15	2	no	no	144.3	no	ST20141344
56	III	CC30	no	29	0	no	no	5.2	no	ST20160215
57	I	ST8	yes	1	0	no	yes	15	no	ST20122003
58	III	CC30	no	44	3	yes	no	5.2	no	ST20110380
59	I	CC152	no	35	1	no	no	15	no	ST20160427
60	I	CC152	yes	6	2	no	yes	0.4	yes	ST20160106
61	III	CC30	no	25	1	no	no	NA	NA	ST20152410
62	I	CC188	no	133	3	no	no	6.9	no	ST20141600
63	II	CC5	no	30	2	no	no	7.93	no	ST20130112
64	IV	CC121	no	114	0	yes	no	7	no	ST20112281
65	I	CC152	no	45	0	no	yes	18	no	ST20120148
66	I	ST8	yes	14	7	no	no	20	no	ST20130335
67	III	CC1	no	24	0	inc	yes	8.6	no	ST20130407
68	I	ST8	no	28	2	no	no	15.57	no	ST20150691
69	III	CC30	no	35	0	no	no	25	no	ST20120351
70	I	CC398	yes	7	0	no	yes	0.9	yes	ST20150597
71	I	CC45	no	NA	5	no	no	11	no	ST20130781
72	III	CC30	no	29	0	yes	yes	0.8	yes	ST20141450
73	I	CC152	no	58	0	no	yes	1.86	yes	ST20121931
74	II	CC5	no	268	1	no	no	1.9	yes	ST20141860
75	I	CC6	no	43	4	no	no	2.5	yes	ST20120250
76	I	ST8	no	11	0	no	no	1.18	yes	ST20150100
77	III	CC30	no	27	3	no	no	12	no	ST20140284
78	I	CC398	no	19	2	no	no	15.65	no	ST20150295
79	I	ST8	yes	57	5	no	yes	16.94	no	ST20112998
80	III	CC80	yes	1	3	no	yes	7.2	no	ST20130086
81	III	CC30	yes	14	2	no	no	0.7	yes	ST20130138
82	I	CC45	no	28	2	no	no	5	no	ST20130639
83	I	CC398	no	19	2	no	no	5.7	no	ST20121344
84	I	CC152	yes	1	0	no	no	2.8	yes	ST20130250
85	II	CC15	yes	4	0	inc	no	14	no	ST20140414
86	II	CC5	no	20	1	no	yes	2.6	yes	ST20110315
87	I	ST8	no	33	2	no	no	12	no	ST20112053
88	IV	CC121	yes	2	3	yes	yes	0.26	yes	ST20130282
89	III	CC30	no	17	0	no	yes	9.39	no	ST20130251
90	I	CC398	no	20	0	no	no	1.4	yes	ST20120222
91	III	CC80	no	25	5	no	no	12.91	no	ST20131768
92	III	CC1	yes	1	3	no	yes	0.39	yes	ST20160612
93	I	CC398	yes	1	3	no	yes	2	yes	ST20161998
94	I	CC152	no	31	0	no	no	7.39	no	ST20102242
95	III	CC88	yes	7	0	no	no	5.8	no	ST20111304
96	III	CC80	yes	0	2	no	yes	4	no	ST20110118
97	I	CC152	yes	39	0	no	yes	1.42	yes	ST20160469
98	III	CC30	yes	2	0	no	no	2.24	yes	ST20130348
99	III	CC30	no	83	0	yes	no	6.9	no	ST20140412
100	III	CC80	yes	41	4	no	yes	1.1	yes	ST20130342

101	I	CC22	no	41	6	inc	no	7.05	no	ST20140881
102	I	CC20	no	51	3	no	no	9.5	no	ST20130415
103	I	ST8	yes	1	5	no	no	1.53	yes	ST20120426
104	I	CC398	no	20	5	no	yes	16.9	no	ST20112234
105	I	ST8	no	15	1	no	no	17.35	no	ST20121965
106	IV	CC121	no	96	1	no	no	5.59	no	ST20130088
107	II	CC15	yes	6	2	no	yes	0.5	yes	ST20150054
108	I	CC152	yes	0	0	no	yes	2	yes	ST20130194
109	IV	CC121	yes	8	3	no	no	42	no	ST20111434
110	III	CC1	no	58	1	no	no	4.1	no	ST20130243
111	I	CC152	no	42	2	no	no	1.2	yes	ST20130532
112	I	ST8	yes	8	5	no	no	31.11	no	ST20120387
113	I	ST8	yes	1	4	no	no	27.4	no	ST20120543
114	IV	CC121	no	32	1	yes	no	17.4	no	ST20130333
115	III	CC30	no	28	3	no	no	21.1	no	ST20102330
116	II	CC15	no	27	0	no	no	3.8	no	ST20110208
117	I	CC398	yes	7	5	no	no	12.58	no	ST20150327
118	II	CC5	no	41	0	yes	no	5.4	no	ST20111364
119	III	CC88	yes	5	4	no	yes	7.3	no	ST20150123
120	III	CC30	no	49	1	no	no	14.8	no	ST20141938
121	III	CC80	no	NA	0	no	no	16.6	no	ST20110372
122	I	CC22	no	68	0	no	yes	1.8	yes	ST20130268
123	I	CC188	no	18	0	no	no	14.4	no	ST20121827
124	I	ST8	no	57	1	no	yes	0.43	yes	ST20112509
125	II	CC5	no	26	6	no	no	27.5	no	ST20141827
126	I	CC398	no	36	4	no	no	9.3	no	ST20130287
127	II	CC5	yes	25	2	no	yes	27.3	no	ST20141370
128	IV	CC121	yes	0	2	yes	yes	2.6	yes	ST20140235
129	III	CC30	no	157	4	no	yes	25.6	no	ST20112044
130	III	CC30	yes	0	2	no	yes	NA	NA	ST20150515
131	I	CC152	no	22	0	no	no	4.6	no	ST20120249
132	II	CC15	no	14	0	no	no	13.23	no	ST20111713
133	III	CC30	no	84	3	no	no	15.4	no	ST20150064
134	III	CC1	yes	7	4	no	no	5	no	ST20131047
135	I	CC4	yes	3	2	no	no	NA	NA	ST20130193
136	I	CC398	yes	1	1	inc	yes	1.7	yes	ST20130276

Multivariate survival analysis results

Proteins & Charlson	CI - 2.5 %	CI - 97.5 %	coef	exp(coef)	se(coef)	z	Pr(> z)
Charlson score	0.935	1.427	0.144	1.155	0.108	1.337	0.181
BlaI	0.804	1.187	-0.023	0.977	0.099	-0.233	0.816
BlaZ	0.633	1.468	-0.036	0.964	0.214	-0.17	0.865
CHIPS	0.686	1.299	-0.057	0.944	0.163	-0.353	0.724
Cna	0.682	1.299	-0.06	0.942	0.164	-0.366	0.715
EdinB	0.526	1.562	-0.098	0.906	0.278	-0.354	0.724
EtD	0.512	1.793	-0.042	0.959	0.32	-0.132	0.895
Fib	0.643	1.525	-0.01	0.99	0.22	-0.045	0.964
GapA	0.367	1.536	-0.287	0.75	0.366	-0.785	0.432
Hla	0.863	1.354	0.078	1.081	0.115	0.677	0.498
Hld	0.592	1.302	-0.13	0.878	0.201	-0.647	0.517
HlgA	0.667	1.656	0.05	1.051	0.232	0.215	0.83
HlgB	0.669	1.14	-0.136	0.873	0.136	-0.998	0.318
HlgC	0.779	1.143	-0.058	0.944	0.098	-0.591	0.554
IsaB	0.702	1.377	-0.017	0.983	0.172	-0.101	0.919
KatA	0.547	1.762	-0.018	0.982	0.298	-0.061	0.952
LukE	0.761	1.375	0.023	1.023	0.151	0.151	0.88
LukH	0.752	1.38	0.018	1.019	0.155	0.119	0.905
PBP2A	0.695	1.645	0.067	1.069	0.22	0.304	0.761
Nuc	0.661	1.492	-0.007	0.993	0.208	-0.034	0.973
PSMa4	0.729	1.684	0.103	1.108	0.214	0.48	0.631
LukS	1.017	1.302	0.14	1.151	0.063	2.221	0.026
Sak	0.817	1.393	0.065	1.067	0.136	0.477	0.633
SarA	0.437	2.24	-0.011	0.989	0.417	-0.026	0.979
Sbi	0.801	2.027	0.242	1.274	0.237	1.022	0.307
SCIN	0.81	1.462	0.085	1.089	0.151	0.563	0.573
SdrD	0.765	1.116	-0.079	0.924	0.096	-0.819	0.413
SEA	0.71	1.721	0.1	1.106	0.226	0.445	0.656
SEC	0.659	1.546	0.009	1.009	0.218	0.042	0.966
Spa	0.889	1.478	0.136	1.146	0.13	1.051	0.293
SplB	0.821	1.35	0.052	1.053	0.127	0.408	0.683
SspA_V8	0.969	1.857	0.294	1.341	0.166	1.771	0.077
ScpA	0.941	1.358	0.123	1.13	0.094	1.306	0.192
TSST1	0.791	2.322	0.304	1.355	0.275	1.106	0.269

Multivariate analysis with functional groups:

Functional groups:

adhesion proteins	Cna	Fib	Sdrd						
membrane-damaging toxins	Hla	Hld	HlgA	HlgB	HlgC	LukE	LukH	LukS	PSM α 4
superantigens	SEA	SEC	TSST-1						
proteases	SplB	ScpA	EtD	SspA (V8)					
immune escape proteins	Spa	Sbi	SCIN	CHIPS					

Death	coef	sd	Z	exp_coef	CI - 2.5%	CI - 97.5%
adhesion proteins	-0.345	0.324	-1.063	0.708	0.375	1.338
membrane-damaging toxins	0.089	0.485	0.183	1.093	0.422	2.827
superantigens	0.538	0.551	0.977	1.713	0.582	5.04
proteases	0.75	0.574	1.307	2.116	0.688	6.513
immune escape proteins	0.671	0.392	1.71	1.956	0.907	4.219
Haemoptysis	coef	sd	Z	exp_coef	CI - 2.5%	CI - 97.5%
adhesion proteins	0.595	0.38	1.564	1.813	0.86	3.819
membrane-damaging toxins	0.28	0.489	0.574	1.324	0.508	3.449
superantigens	-0.095	0.548	-0.174	0.909	0.31	2.664
proteases	-0.307	0.586	-0.523	0.736	0.233	2.322
immune escape proteins	-0.548	0.373	-1.469	0.578	0.278	1.201
Leukopenia	coef	sd	Z	exp_coef	CI - 2.5%	CI - 97.5%
adhesion proteins	-0.115	0.467	-0.247	0.891	0.357	2.226
membrane-damaging toxins	-0.43	0.651	-0.661	0.65	0.182	2.329
superantigens	1.172	0.691	1.697	3.228	0.834	12.498
proteases	-0.153	0.814	-0.188	0.858	0.174	4.231
immune escape proteins	0.601	0.52	1.155	1.824	0.658	5.06

III. Résultats complémentaires et perspectives

L'utilisation d'une approche de protéomique ciblée oblige *a priori* de sélectionner une liste de facteur d'intérêt que l'on souhaite inclure dans notre méthode. Cette première étape est critique, limitant par définition le nombre de cibles suivies. L'ajout de nouveaux facteurs de virulence permettrait d'augmenter la possibilité de trouver de manière exhaustive ceux impliqués dans la virulence de *S. aureus*, tout en gardant l'approche semi-quantitative. Initialement, 90 facteurs de virulence et mécanismes de résistance aux antibiotiques devaient être inclus dans la méthode (Tableau 3). Cependant plusieurs contraintes nous ont forcé à réduire ce nombre à 44 facteurs. Tout d'abord certaines protéines ne permettent pas d'obtenir, après digestion à la trypsine, des peptides répondants aux exigences de la méthode (taille adéquate, présents seulement dans la protéine d'intérêt, composition en AA...). D'autres contiennent des séquences répétées, notamment les protéines d'adhésion (comme FnbPA et B), qui peuvent empêcher de fournir des résultats semi-quantitatifs fiables, car les peptides ciblant ces régions sont retrouvés en quantité variable selon le nombre de répétition et ne reflète donc pas la quantité de la protéine présente. Une troisième limite est la réponse de certains peptides à la spectrométrie de masse. En effet, certains peptides, en raison de leurs propriétés physico-chimiques, ne répondent pas bien à la LC-MS, ne permettant pas de les distinguer du bruit de fond de l'échantillon. Cette réponse peptide-spécifique à la LC-MS n'est souvent pas prévisible, et détectée tardivement dans le développement technologique de la méthode, puisque les peptides ont dû déjà être synthétisés et testés pour déceler le problème. Enfin, une dernière contrainte est celle des variations alléliques au sein d'une même protéine. Les variants protéiques par définition ont un ou plusieurs AA de différence comparés à une séquence de référence définie. Ces différences en AA entraînent des changements des propriétés physico-chimiques des peptides obtenus. Ainsi il est nécessaire de suivre pour une même protéine de nombreux peptides correspondants aux différents variants, afin de pouvoir couvrir un maximum de diversité présente dans les souches testées. Ce dernier aspect est actuellement optimisé grâce au développement par les bio-informaticiens de notre laboratoire d'un outil bio-informatique qui vise à déterminer le nombre de peptides nécessaires et leurs séquences associées, pour couvrir 98% de la variabilité observée à partir des génomes de *S. aureus* accessibles au Centre National de Référence des Staphylocoques et sur NCBI. Ces outils ont déjà permis pour le virulome de

Protéine	Fonction	Protéine	Fonction	Protéine	Fonction
AlsD	Décarboxylase	FusC	Résistance Acide fusarique	SCIN	Immunomodulateur
BlaI	BlaZ répresseur	GapA	Déshydrogénase	SdrC	Adhésion
BlaR	BlaZ régulateur	Hla	PFT	SdrD	Adhésion
BlaZ	Résistance Bétalactamase	Hld	PFT	SEA	Entérotoxine
Cap5A	Capsule	HlgA	PFT	SEB	Entérotoxine
Cap8A	Capsule	HlgB	PFT	SEC	Entérotoxine
Cat1	Résistance Chloramphénicol	HlgC	PFT	SED	Entérotoxine
CcrA	Résistance antibiotique	IcaA	Biofilm	SEE	Entérotoxine
CcrB	Résistance antibiotique	IcaC	Biofilm	SEG	Entérotoxine
Cfr	Résistance Chloramphénicol	IcaD	Biofilm	SE-H	Entérotoxine
CHIP	Immunomodulateur	IsaB	Immunomodulateur	SE-I	Entérotoxine
ClfA	Adhésion	IsdB	Adhésion	SE-J	Entérotoxine
ClfB	Adhésion	KatA	Catalase	SE-K	Entérotoxine
Cna	Adhésion	LukD	PFT	SE-L	Entérotoxine
Coa	Coagulase	LukE	PFT	SE-M	Entérotoxine
CtsR	Régulateur transcriptionnel	LukF-PV	PFT	SE-N	Entérotoxine
EdinA	Toxine	LukS-PV	PFT	SE-O	Entérotoxine
EdinB	Toxine	MecA	Résistance Bétalactamase	SE-Q	Entérotoxine
EdinC	Toxine	MecC	Résistance Bétalactamase	SE-U	Entérotoxine
Erma	Résistance Érythromycine	MupA	Régulateur transcriptionnel	Spa	Adhésion
ErmB	Résistance Érythromycine	NorA	Résistance Quinolones	SpiA	Sérine protéase
ErmC	Résistance Érythromycine	NorB	Résistance Quinolones	SpiB	Sérine protéase
EsxA	Système de sécrétion	Nuc	Nucléase	SplE	Sérine protéase
EtA	Exfoliatine	PSMa1	PFT	SspA	Glutamyl peptidase
EtB	Exfoliatine	PSMa4	PFT	SspB	Staphopain
EtD	Exfoliatine	SaeS	Régulation virulence	SspP	Staphopain
Fib	Adhésion	Sak	Staphylokinase	Tet38	Résistance Tétracycline
FnbpA	Adhésion	SarA	Régulation virulence	TetK	Résistance Tétracycline
FnbpB	Adhésion	SarZ	Régulation virulence	TetR	TetK régulateur
FosB	Résistance Fosfomycine	Sbi	Immunomodulateur	TSST-1	Superantigène

Tableau 3 : Protéines recherchées initialement en protéomique

S. aureus composé de 41 protéines (5 protéines retirées et 1 ajoutée comparé à l'étude), l'implémentation de 81 peptides dans la méthode pour couvrir leurs diversités (Tableau 4). Avec ces nouveaux peptides inclus dans la méthode, une approche plus exhaustive sera mise en place, ce qui limitera le risque de manquer des facteurs de virulence impliqués dans certaines pathologies lors de futures analyses.

Protéine	Nombre de peptide		Protéine	Nombre de peptide	
	Avant	Après		Avant	Après
Blal	3	0	LukH	4	3
BlaZ	3	5	MecA	4	8
CHIPS	3	6	MecC	4	6
Cna	3	0	Nuc	3	5
Coa	0	4	PSMa1	1	1
EdinB	3	4	PSMa4	2	2
EdinC	3	3	LukF-PV	3	5
EtA	3	5	LukS-PV	3	3
EtB	3	3	Sak	3	7
EtD	3	4	SarA	5	7
Fib	3	0	Sbi	3	4
GapA	3	0	SCIN	5	5
Hla	5	7	SdrD	2	5
Hld	2	4	SEA	4	7
HlgA	3	7	SEB	4	4
HlgB	3	7	SEC	3	4
HlgC	4	10	SED	3	5
IcaA	3	5	SEH	4	4
IsaB	3	0	Spa	3	5
KatA	5	5	SplB	4	6
LukD	5	8	SspA	3	6
LukE	4	5	SspP	3	10
LukG	3	8	TSST1	3	7

Tableau 4 : Protéines du virulome de *S. aureus* recherchées dans la méthode actuelle

Ensemble des protéines recherchées pendant l'étude (Avant) et celles recherchées après l'implémentation de nouveaux peptides pour couvrir la diversité (Après), ainsi que le nombre de peptides utilisés.

En effet, l'avantage et l'objectif de cette méthode sont de permettre l'étude de nombreux facteurs de virulence sans *a priori*, qui ne sont pas spécifiques à une seule pathologie, sur un grand panel de souches, isolés de patient atteints de différentes pathologies. Ainsi, avec des cohortes comparables à celle utilisée dans ce manuscrit, provenant par exemple d'infections

ostéoarticulaires ou d'endocardites et bactériémies, il sera possible de (i) mettre en évidence des facteurs potentiels permettant de discriminer les souches issues d'un type d'infection à un autre et (ii) de déterminer quels sont les principaux facteurs responsables de la virulence de *S. aureus* pour une pathologie donnée.

Au-delà de ces challenges techniques relatif à la LC-MS, plusieurs études ont déjà mis en évidence que, selon les milieux de cultures utilisés, certains facteurs de virulence ne sont pas exprimés de la même manière [132,174]. Nous avons également pu mettre cela en évidence, en comparant le virulome d'USA300 et de ST80 cultivées soit en milieu BHI soit en milieu CCY. Dans le milieu BHI la production de PSMs était favorisée mais pas celle de la PVL ou de l'hémolyse- γ , contrairement au milieu CCY qui favorise la production de ces dernières mais pas spécifiquement celle des PSMs (Figure 13A).

De plus, le temps d'incubation et donc la phase de croissance de nos cultures (début de phase exponentielle, phase exponentielle, début de phase stationnaire ou phase stationnaire), impactent également les quantités de facteurs de virulence produits et leurs accumulations, avec notamment les facteurs d'adhésion, exprimés plutôt en début de phase exponentielle, alors que les toxines comme Hla ou les PSMs seront produites plutôt en milieu et fin de phase exponentielle [90]. En comparant le temps 8h à 18h, correspondant au début de phase stationnaire et phase stationnaire tardive respectivement, nous avons déjà pu observer l'accumulation d'Hld dans les deux fonds génétiques, et de la dégradation pour plusieurs autres protéines (i.e. EdinB, ETD, LukGH et Spa) (Figure 13B).

Ainsi le choix des conditions de culture semble particulièrement important, notamment quand le but est de rechercher des associations entre ces cultures *in vitro* et des données cliniques, qui correspondent à des conditions physiologiques très différentes pour les bactéries, qui sont confrontées à un environnement beaucoup plus complexe et hostile *in vivo*. Les biais induits par le choix du milieu et temps de culture doivent être pris en compte lors de l'interprétation des résultats, même si (i) des souches produisant extrêmement peu ou inversement beaucoup d'une protéine auront tendance à avoir un profil similaire dans d'autres conditions, et que (ii) des résultats précédemment obtenus, notamment sur le rôle de la PVL dans un contexte de

pneumonie [9,10], confortent ceux obtenus dans notre étude, démontrant la pertinence et la robustesse d'une telle approche.

	USA300		ST80			USA300		ST80	
	BHI	CCY	BHI	CCY		8H	18H	8H	18H
Blal	0.09	0.13	0.11	0.13	Blal	0.13	0.26	0.13	0.10
BlaZ	0.09	0.09	0	0	BlaZ	0.09	0.29	0	0
CHIPS	0.79	0.86	0	0	CHIPS	0.86	0.78	0	0
Cna	0.03	0	0.02	0	Cna	0	0	0	0
EdinB	0	0	0.10	1.99	EdinB	0	0	1.99	0.56
ETD	0	0	0.06	1.44	ETD	0	0	1.44	0.48
Fib	0.47	0.31	0.32	0.41	Fib	0.31	0.73	0.41	0.32
GapA	0.70	0.27	1.32	0.33	GapA	0.27	0.35	0.33	0.24
Hla	0.28	0.46	0.08	0.27	Hla	0.46	0.40	0.27	0.14
Hld	124.82	54.20	24.97	32.41	Hld	54.20	104.11	32.41	46.61
HlgA	0.04	0.14	0.01	0.09	HlgA	0.14	0.09	0.09	0.10
HlgB	0.01	0.05	0.02	0.11	HlgB	0.05	0.04	0.11	0.06
HlgC	0	3.47	0	1.61	HlgC	3.47	4.14	1.61	0.26
IsaB	0.10	0.05	0.06	0.11	IsaB	0.05	0.09	0.11	0.10
KatA	0.15	0.10	0.08	0.11	KatA	0.10	0.22	0.11	0.07
LukD	0	3.05	0	0.92	LukD	3.05	3.63	0.92	0.14
LukE	0	0.02	0	0.04	LukE	0.02	0.01	0.04	0.01
LukG	0.09	0.72	0.06	0.41	LukG	0.72	0.09	0.41	0.14
LukH	0.16	1.47	0.09	0.90	LukH	1.47	0.98	0.90	0.37
PBP2A	0.09	0.06	0.27	0.38	PBP2A	0.06	0.07	0.38	0.22
Nuc	0.09	1.93	0.02	1.76	Nuc	1.93	2.31	1.76	0.58
PSMa1	84.78	8.64	17.17	4.28	PSMa1	8.64	11.24	4.28	5.12
PSMa4	39.30	8.40	22.29	6.55	PSMa4	8.40	7.94	6.55	3.32
LukF-PV	0.13	21.78	0.05	7.30	LukF-PV	21.78	22.83	7.30	0.94
LukS-PV	0.05	11.23	0.01	3.44	LukS-PV	11.23	11.32	3.44	0.49
Sak	0.02	0.25	0.02	0.47	Sak	0.25	0.30	0.47	0.23
SarA	0.75	0.51	0.57	0.46	SarA	0.51	0.56	0.46	0.33
Sbi	0.44	0.15	0.21	0.13	Sbi	0.15	0.19	0.13	0.09
SCIN	0.53	0.90	0.29	0.63	SCIN	0.90	1.01	0.63	0.41
SdrD	0.02	0.02	0.02	0.02	SdrD	0.02	0.01	0.02	0.01
SEA	0.07	0.08	0.03	0.06	SEA	0.08	0.09	0.06	0.04
Spa	1.97	0.81	0.37	0.31	Spa	0.81	0.07	0.31	0.22
SpIB	0	1.36	0	0.15	SpIB	1.36	1.33	0.15	0.02
SspA	0.05	0.24	0.01	0.09	SspA	0.24	0.31	0.09	0.02
SspP	0.03	0.19	0.01	0.07	SspP	0.19	0.08	0.07	0.02

Figure 13 : Impact du milieu et du temps de culture sur le virulome

Quantification relative de 35 facteurs de virulence de *S. aureus* à partir de culture d'USA300 et de ST80, soit en milieu BHI soit en milieu CCY pendant 8H (A), soit pendant 8H ou 18H en milieu CCY (B). Les protéines pour lesquelles les changements de condition ont eu un impact fort sont mises en évidence en bleu.

Axe 2 : L'hémolysine- γ CB : facteur de virulence de *S. aureus* impliqué dans les pneumonies, dont l'expression est finement dépendante de la séquence génomique

I. Introduction

L'hémolysine- γ CB est une PFT qui cible les mêmes récepteurs que la PVL à la surface des neutrophiles, macrophages et monocytes. Cependant, contrairement à la PVL impliquée dans la virulence de *S. aureus* dans les pneumonies et furonculoses, cette dernière n'est associée à aucune pathologie particulière. Suite à notre étude sur une cohorte de patients ayant fait des pneumonies communautaires sévères où (i) la PVL était le seul facteur de virulence associé avec le décès de manière dose-dépendante, et (ii) HlgB était associée positivement avec la leucopénie et l'hémoptysie alors qu'HlgC l'était négativement, nous avons décidé d'investiguer le rôle de cette toxine dans les pneumonies. De plus, comme elle est codée dans le génome-cœur de la bactérie, et donc présente dans quasiment toutes les souches de *S. aureus*, nous avons voulu étudier s'il y avait des variations d'expression entre souches et si oui, définir les mécanismes sous-jacents à la régulation de celles-ci.

Afin de tester le rôle de l'hémolysine- γ CB dans les pneumonies, nous avons comparé la virulence de 3 souches cliniques, deux souches PVL positives (USA300 et ST80) et 1 souche PVL négative (PEN), dans un modèle lapin de pneumonie. La souche PEN, forte productrice d'HlgC a montré une virulence aussi importante que celles d'USA300 et ST80. Un mutant pour HlgC de cette souche a confirmé que sa virulence passe en grande majorité par la production d'HlgC et donc de l'hémolysine- γ CB.

Nous avons également quantifié précisément les quantités d'HlgC et d'HlgB produites par 39 souches cliniques de la cohorte, dont les souches PEN, USA300 et ST80. L'objectif étant d'investiguer l'absence de corrélation entre HlgC et HlgB observée dans l'étude protéomique et de voir si dans des souches cliniques de fonds génétiques différents de fortes variations de

productions sont observables. Nous avons pu faire deux observations suite aux résultats obtenus : (i) il y a de fortes variations de niveau d'expression d'HlgCB entre les souches cliniques, avec jusqu'à 2 log₁₀ de différence, et (ii) il existe deux profils distincts, avec un profil majoritaire où les souches ont des niveaux d'HlgC quasiment équivalents à ceux d'HlgB, et un autre profil concernant 4 souches, dont USA300, où les niveaux d'HlgC sont très faibles et bien inférieurs à ceux d'HlgB.

Suite à ces observations nous avons recherché les mécanismes moléculaires responsables des variations d'expression et des deux profils en étudiant (i) l'activité promotrice, (ii) la stabilité des ARNs et (iii) la traductibilité de ceux-ci, dans les fonds génétiques d'USA300, ST80 et PEN. Les résultats obtenus nous ont permis de déterminer que l'activité promotrice dans la souche PEN, supérieure à celle de ST80 permet d'expliquer la différence entre les deux souches, malgré une stabilité et une traductibilité comparables des transcrits. Pour USA300, le profil observé s'explique par une activité promotrice plus faible que celle de PEN, mais surtout par une traductibilité d'*hlgC* abolie, contrairement à celle d'*hlgB*, à cause d'un SNP en région 5'-UTR qui impacterait la structure de l'ARN et donc l'accessibilité au site de fixation du ribosome (RBS). L'absence de traduction empêche une protection de l'ARN par les ribosomes, réduisant considérablement sa stabilité dans ce fond génétique.

Enfin, l'étude du profil d'expression de l'hémolysine- γ CB par Northern blot nous a permis de mettre en évidence un transcrit additionnel à celui d'*hlgCB*, correspondant à *hlgB* seul. Ce transcrit est issu de la maturation d'*hlgCB* par plusieurs RNases, dont la RNase Y, et peut être traduit, bien que sa traduction dans nos conditions de culture ne semble pas effective. Cependant, HlgB entre également dans la constitution de la toxine HlgAB, incluant donc HlgA qui appartient au locus de l'hémolysine- γ mais est codée en amont de l'opéron *hlgCB*. Il est donc possible que l'ARNm *hlgB* soit traduit dans des situations nécessitant pour la bactérie la production de la toxine HlgAB indépendamment d'HlgCB.

L'ensemble de ces travaux a mis en évidence le rôle de l'hémolysine- γ dans la virulence de *S. aureus* dans un contexte de pneumonie. Cependant ce rôle semble dépendre des quantités produites, qui elles-mêmes dépendent de nombreux facteurs. En effet, la

production d'HIgC repose sur l'activité promotrice de l'opéron et sur sa séquence nucléotidique, notamment de la région 5'-UTR, qui impacte la traductibilité de celui-ci.

II. [Article scientifique :](#)

Complex regulation of gamma-hemolysin expression impacts *S. aureus* virulence

Mariane Pivard, Isabelle Caldelari, Virginie Brun, Delphine Croisier, Michel Jaquinod, Nelson Anzala, Benoît Gilquin, Chloé Teixeira, Yvonne Benito, Florence Couzon, Pascale Romby, Karen Moreau, François Vandenesch

Soumission en cours dans le journal : **Genes & Development**

(Article page suivante)

Complex regulation of gamma-hemolysin expression impacts *S. aureus* virulence

Mariane Pivard¹, Isabelle Caldelari², Virginie Brun^{3,4}, Delphine Croisier⁵, Michel Jaquinod³, Nelson Anzala⁵, Benoît Gilquin^{3,4}, Chloé Teixeira¹, Yvonne Benito^{6,7}, Florence Couzon¹, Pascale Romby², Karen Moreau¹, François Vandenesch^{1,6,7}

1 – CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Université de Lyon, Inserm U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR5308, ENS de Lyon, Lyon, France.

2 - Architecture et Réactivité de l'ARN, Université de Strasbourg, CNRS, IBMC, 15 Rue René Descartes 67084 Strasbourg, France

3 - Université Grenoble Alpes, Inserm, CEA, UMR BioSanté U1292, CNRS, CEA, FR2048, Grenoble, France

4 - Université Grenoble Alpes, CEA, LETI, Clinatec, Grenoble, France

5 - Vivexia, Dijon, France

6- Institut des agents infectieux, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

7 - Centre National de Référence des Staphylocoques, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

***Staphylococcus aureus* gamma-hemolysin CB (HlgCB) is a core-genome encoded pore-forming toxin that targets the C5a receptor like Panton-Valentine Leucocidin, and whose expression varies between community-acquired pneumonia isolates. We first show that high HlgCB synthesis is associated with mortality in a rabbit model of pneumonia, confirming human observations. Absolute quantification of HlgCB by mass spectrometry showed that although HlgC and HlgB are encoded on a single operon, there levels are dissociated in 10% of the clinical strains studied. HlgCB amount and HlgC/HlgB ratio both depend on promotor activity, mRNA stability, and translatability. A single SNP in the 5'-UTR strongly impaired *hlgC* translation in the USA300 strain leading to a strong decrease in HlgC but not in HlgB; the level of HlgB likely being maintained by the presence of a processed *hlgB* mRNA. This work illustrates a butterfly effect where subtle genomic variations have a major impact on phenotype and virulence.**

Introduction

The Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus* can provoke various severe diseases in humans such as bacteremia, endocarditis, and pneumonia. Its capacity to develop a wide range of infections is due to its ability to produce a large diversity of virulence factors including immune evasion molecules, adhesins, and toxins (Thammavongsa et al. 2015; Tam and Torres 2019). *S. aureus* accounts for approximately 25% of nosocomial pneumonia (Jean et al. 2020) and can be responsible for severe community-acquired pneumonia (CAP) with high mortality rates (Gillet

et al. 2021; Vardakas et al. 2009; Masters et al. 2017; Gillet et al. 2002). In this last context, the bi-component pore-forming toxin (PFT) Panton-Valentine leucocidin (PVL), which targets the C5a and C5L2 receptors on neutrophils, monocytes, and macrophages, and the CD45 receptor on leukocytes (Spaan et al. 2013; Tromp et al. 2018, 45), has been associated with severity independently from other virulence determinants and methicillin resistance (Gillet et al. 2021). Nevertheless, although PVL is present in almost 50% of strains isolated from patients with severe CAP (Gillet et al. 2021), the remaining cases are

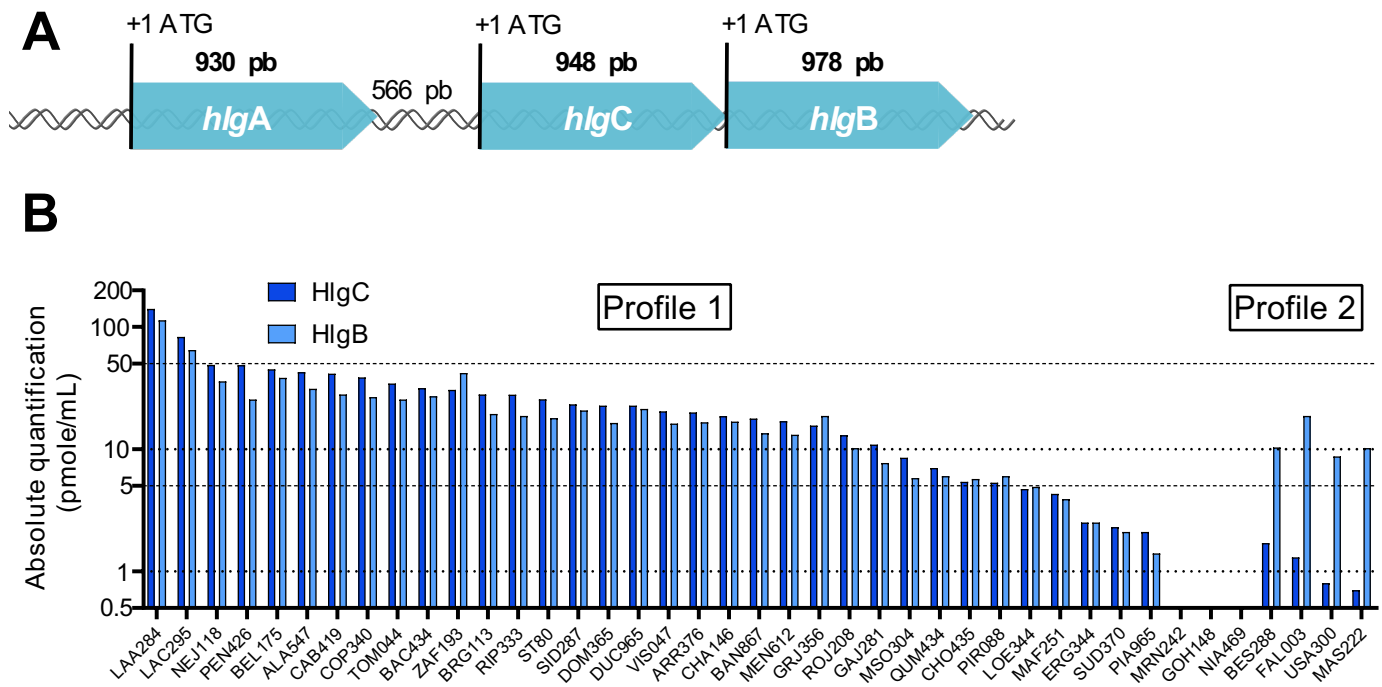


Figure 1. Gamma-hemolysin genomic locus: two distinct profiles and high variation in HlgCB production between clinical isolates

(A) Schematic representation of the gamma-hemolysin genomic locus. The size of the coding and intergenic regions are expressed in base pair (bp). (B) HlgC (dark blue) and HlgB (light blue) were quantified using isotope-dilution targeted proteomics on *S. aureus* culture supernatants. ST80, USA300, and 39 clinical isolates from severe-CAP were cultured in CCY for 8 h, supernatants were collected and analyzed by targeted mass spectrometry. Quantifications are represented on a log₁₀ scale in pmole/mL. Two distinct profiles are observed: similar levels of HlgC and HlgB on the left side and higher levels of HlgB compared to HlgC on the right side. For three strains, HlgC and HlgB were below the detection level.

caused by PVL-negative strains and are still associated with 30% mortality (Gillet et al. 2021), suggesting that other virulence factors are involved. One plausible candidate is gamma-hemolysin CB (HlgCB), which is present in almost all strains (Grumann et al. 2014) and also targets the C5a receptors of myeloid cells (Spaan et al. 2014, 2015). Its genes are part of the gamma-hemolysin *hlgACB* locus; *hlgA* is upstream the *hlgCB* operon (Fig. 1A) (Cooney et al. 1993), allowing the formation of two toxins, HlgAB and HlgCB. Although HlgAB is known to be involved in bloodstream (Lubkin et al. 2019) and corneal (Dajcs et al. 2002) infections by binding the CCR2 and CXCR1/2 receptors on neutrophils, macrophages, and monocytes, and the DARC receptor on erythrocytes, HlgCB is not typically associated with any specific disease. Recently, the semi-quantitative proteomic analysis of exotoxins applied to 136 strains isolated from severe CAP

suggested that high HlgCB production in PVL-negative strains could be associated with higher mortality. It also showed that HlgB and HlgC levels were not correlated, contrarily to other operon-encoded virulence factors such as LukDE and LukSF-PV (Pivard et al. 2022). We thus decided to investigate the molecular mechanisms leading to HlgC and HlgB expression variations among clinical isolates and assess whether HlgCB is a major determinant for pneumonia severity in a rabbit model (Stulik et al. 2019). Besides identifying a new translatable *hlgB* mRNA as a maturation product of *hlgCB*, the present data shows that the variation in HlgC and HlgB production results from at least three parameters: promoter strength, *hlgCB* mRNA stability, and translation efficiency, which is dependent on a single nucleotide polymorphism (SNP) in the 5'UTR of *hlgC* mRNA. Furthermore, the high expression of HlgCB by clinical isolates induced high mortality in the rabbit

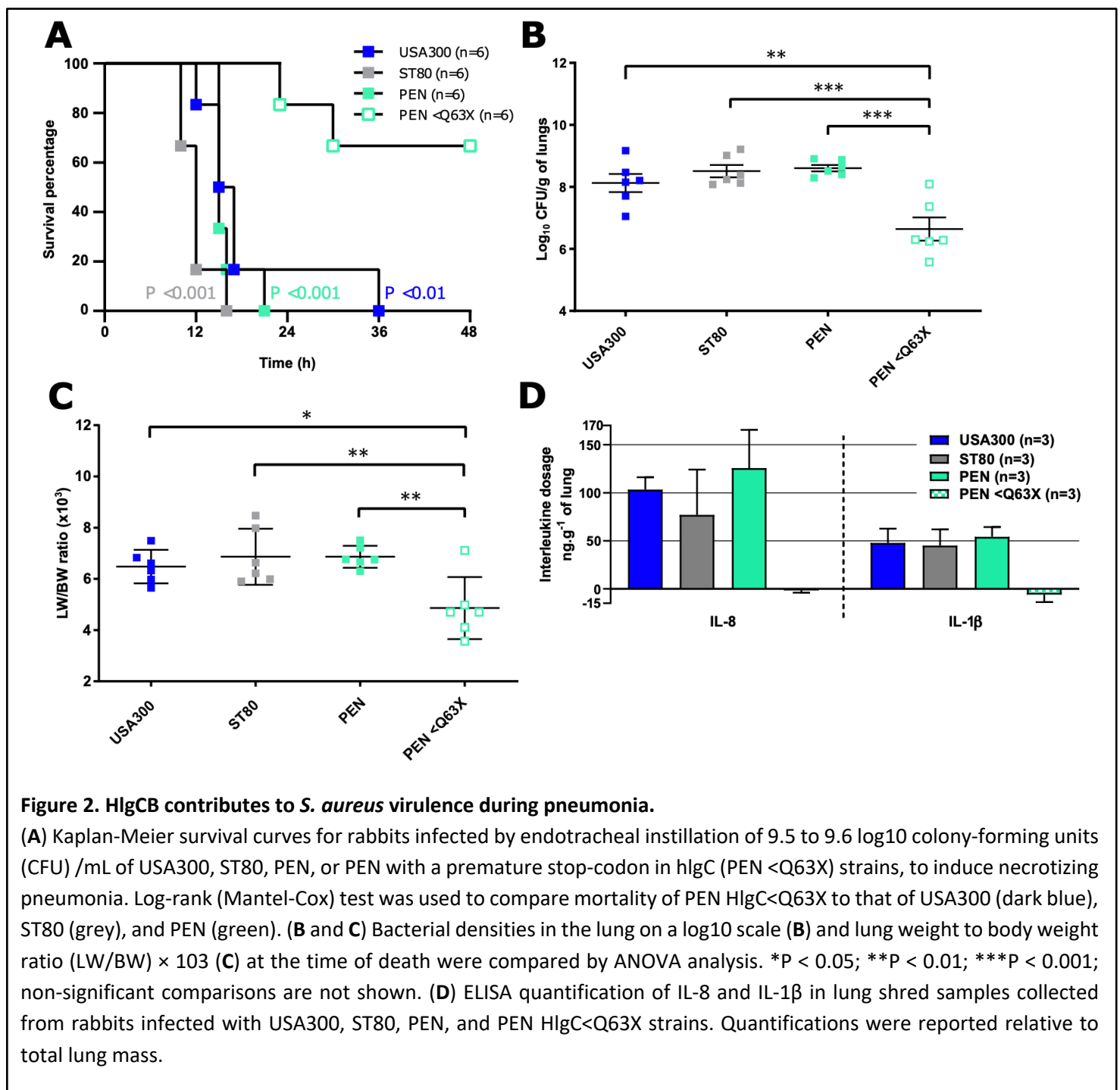
model, a result in line with the hypothesis that HlgCB might be associated with severe *S. aureus* CAP.

Results

High variation in HlgCB production among clinical strains: two distinct profiles

To validate the previous semi-quantitative proteomic analysis of exotoxins (Pivard et al. 2022), the two virulence factors HlgC and HlgB were quantified using isotope-dilution targeted

proteomics in a subset of 39 clinical isolates of the previous cohort. The USA300 SF8300 (USA300) and HT20020209-LUG1799 (ST80) strains were used as control strains because their exoprotein profile and virulence in various animal models are well-defined (Diep et al. 2010, 2016). Absolute quantification showed considerable HlgC and HlgB variations between isolates with two distinct profiles. In four strains including USA300, the amount of HlgB protein was 6 to 14 times higher than that of HlgC which was very low. In most of



the other strains, including ST80 and the PVL-negative PEN strain isolated from a deceased patient (Gillet et al. 2021), similar amounts of HlgB and HlgC were observed, and in the majority of cases the total amount of protein was higher than in the first group (Fig. 1B).

High levels of HlgCB impacts severity in a rabbit model of pneumonia

To experimentally confirm that high levels of HlgCB increases the virulence of *S. aureus* and the mortality rate of CAP, the PEN strain was tested in a rabbit model of pneumonia. Its virulence was compared to USA300 and ST80, both highly lethal PVL-positive MRSA strains (Diep et al. 2010, 2016). All infected rabbits died within 48 h (Fig. 2A) with high lung bacterial densities and high lung weight to body weight ratio (LW/BW) (Fig. 2B and 2C). To determine whether the virulence of PEN was caused by its high production of HlgCB, a premature stop-codon was inserted in the *hlgC* gene (PEN<Q63X) to prevent the production of HlgC and thus HlgCB. Proteomics indicated that HlgB was still produced in PEN<Q63X, albeit to a lower level than in the PEN WT strain (Supplementary Table S1). Rabbits infected with PEN<Q63X showed significantly greater survival (Fig. 2A) and less severe bacterial density and LW/BW ratio (Fig. 2B and 2C) than rabbits infected with PEN WT. In addition, no inflammatory response was observed in rabbits infected by PEN<Q63X, whereas similar levels of IL-1 β and IL-8 were quantified in rabbits infected by USA300, ST80, and PEN WT strains (Fig. 2D). These data strongly demonstrate that, *in vivo*, high levels of HlgCB in PVL-negative strains correlate with severe outcome and mortality.

Analysis of *hlgCB* operon reveals a processed *hlgB* transcript

To correlate the proteomic profiles of USA300, ST80, and PEN strains with RNA levels, Northern blot analysis was performed on the three strains using specific probes complementary to *hlgA*, *hlgC*,

and *hlgB* mRNAs. The *hlgC* and *hlgB* probes unveiled the expected bi-cistronic *hlgCB* transcript (Fig. 3A). A significant variation in *hlgCB* expression was observed, with PEN producing more *hlgCB* mRNA than USA300 and ST80. As expected, no correlation between *hlgCB* and *hlgA* mRNA expression was found. Indeed, both USA300 and PEN yielded more *hlgA* mRNA than ST80, although ST80 produced more *hlgCB* mRNA than USA300. These data suggest that the bi-cistronic *hlgCB* mRNA is transcribed under its own promoter. In addition, the *hlgB*-specific probe revealed the presence of a smaller product, the size of which corresponded to *hlgB* alone. Moreover, *hlgB* transcript level was much higher than that of *hlgCB* in USA300, while the yields of the two transcripts were roughly equivalent in ST80 and PEN strains. We then investigated whether the *hlgB* transcript was under the control of a specific promoter upstream *hlgB*. The 932 bp upstream the *hlgB* start codon of USA300 and ST80 strains (the sequence of PEN being strictly identical to USA300) were cloned into the pALC1484 plasmid in front of the *gfp* gene. GFP signal quantification failed to detect any promoter activity, as demonstrated by the absence of signal for both the *hlgB*-upstream region tested (pALC-PhlgB) and the empty vector (pALC- \emptyset), unlike the positive control (pACL-P16S) containing the 16S-encoding gene promoter (Fig. 3B and Supplementary Fig. S1). The transcriptional starts of *hlgB* and *hlgCB* transcripts were then characterized by primer extension in ST80 and USA300 (Supplementary Fig. S2B). The results showed three possible start sites located at -80, -104, and -136 upstream the *hlgB* start codon whereas only one stop positioned at -35 upstream *hlgC* was found (Fig. 3C and Supplementary Fig. S2). Since *bona fide* mRNA can be distinguished from processed RNA by the presence of a 5'-triphosphate, the Terminator™ 5'-phosphate-dependent exonuclease, which preferentially digests RNA carrying a 5'-monophosphate, was then used. Northern blot experiments showed full

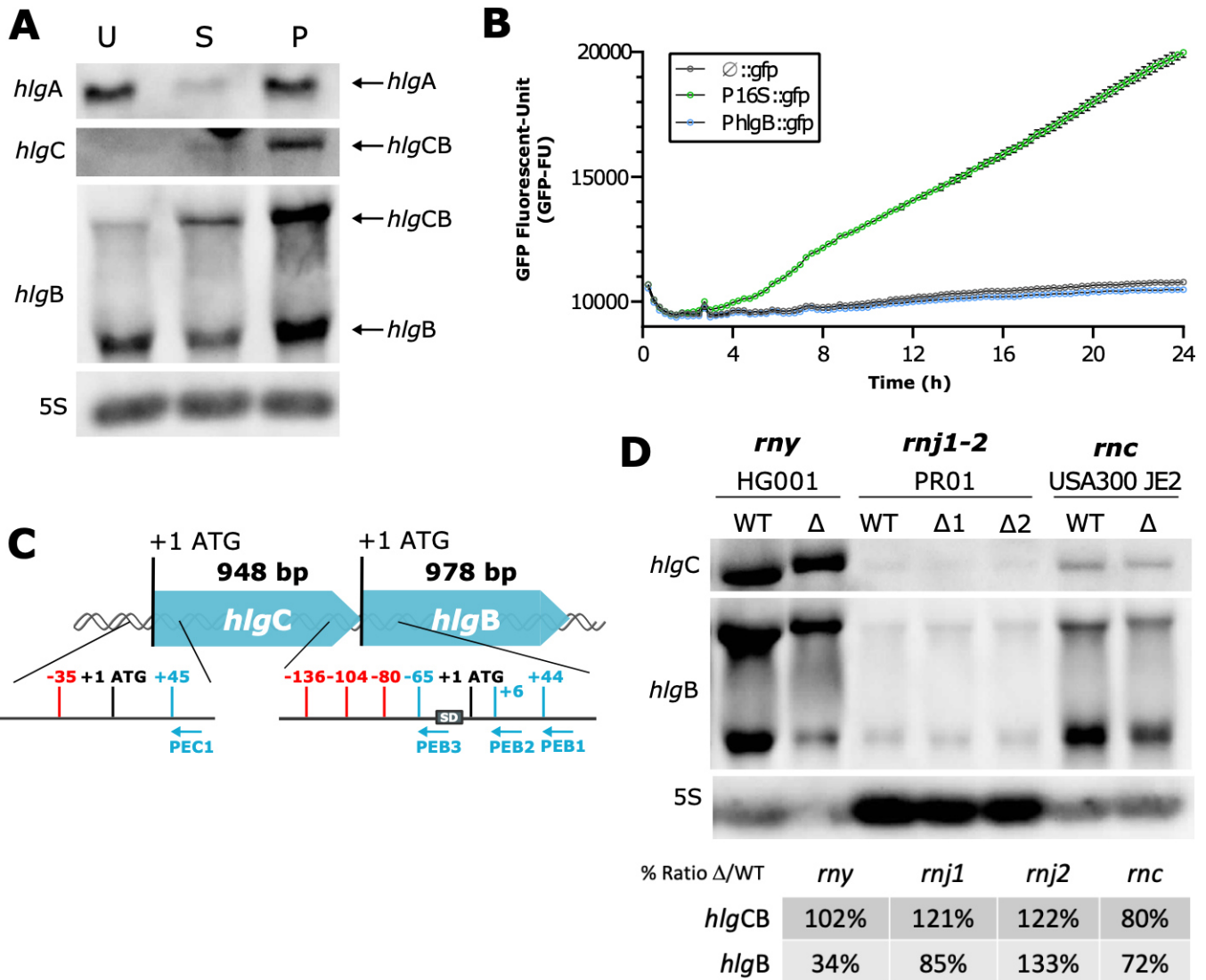


Figure 3. Different expression levels of *hlgA* and *hlgCB* mRNA in three clinical strains: an additional *hlgB* transcript, produced from the processing of *hlgCB* mRNA

(A) Northern blot analysis of the gamma-hemolysin expression in USA300 (U), ST80 (S), and PEN (P) strains. Total RNA were extracted from 8 h CCY cultures. Probes targeting *hlgA*, *hlgC*, and *hlgB* mRNA were used and are indicated on the left side. The *hlgB* probe detected two transcripts: *hlgCB* mRNA and *hlgB* mRNA, as mentioned on the right side. 5S rRNA (5S) was used as a loading control. (B) The existence of an *hlgB*-specific promoter within the *hlgC* gene was tested using transcriptional fusions in the USA300 strain. The 926bp region upstream *hlgB* and including *hlgB* ATG was cloned into the pACL-1484 plasmid in front of the *gfp* gene (*PhlgB::gfp*). The 16S rRNA promoter was used as positive control (*P16S::gfp*) and the plasmid with no insert as a negative control ($\emptyset::gfp$). Promoter activity was measured by GFP signal quantification (GFP Fluorescence Unit – GFP-FU) overtime, during a 24 h kinetic, with a 15 min interval time in CCY medium containing chloramphenicol. Mean with standard-error from biological triplicates are represented in grey for pACL- \emptyset , in green for pACL-P16S, and in blue for pACL-*hlgB*. (C) Schematic summary of primer extension results. Primer extension was performed on total RNA from USA300 and ST80 strains using 5'-radiolabeled primers complementary to *hlgC* (PEC1) and *hlgB* (PEB1, PEB2, and PEB3) sequences. All identified +1 are in red, primers are in blue, and *hlgB* Shine-Dalgarno (SD) is represented with a grey box. (D) Northern blot analysis of *hlgCB* and *hlgB* transcripts in wild type (WT) and mutant (Δ) strains of the main *S. aureus* RNases. Total RNAs were prepared after 8 h in CCY culture of HG001 WT strain and Δrny (RNase Y) mutant, PR01 WT strain and $\Delta rnj1$ and $\Delta rnj2$ (RNases J1 and J2) mutants, and USA300 JE2 WT strain and Δrnc (RNase III) mutant, and run on 1% agarose gels. After transfer onto a nitrocellulose membrane, *hlgC* and *hlgB* mRNAs were revealed after hybridization of the membrane with specific probes. 5S rRNA (5S) was used as a loading control and was run on a separate gel in parallel to the experiment. Mutant (Δ)/WT ratios are given as percentages of the signal quantified and normalized on 5S signal.

degradation of the short *hlgB* mRNA for the three strains, reinforcing the involvement of a processing event. Surprisingly, the *hlgCB* mRNA was also sensitive to the exonuclease treatment while the control *bona fide* sRNA *RsaI* was resistant (Supplementary Fig. S3). Finally, we explored the impact of the major RNases on the generation of *hlgB* mRNA using single mutant strains deleted of the genes encoding either RNase Y, RNase J1, RNase J2, or RNase III (Fig. 3D). Deletion of RNase Y caused a reproducible reduction in *hlgB* RNA level (66%) as did the Δrnc mutant strain to a lesser extent (28%). In the PR01 genetic background, even though the *hlgCB* and *hlgB* levels were rather low, the *rnj1* or *rnj2* deletion had no noticeable effect. Altogether, these data suggest that the *hlgB* transcript results from the processing of the *hlgCB* transcript, which probably involves several RNases including RNase Y.

Promoter activity and mRNA stability impact *hlgCB* expression

We then assessed the strength of the *hlgCB* promoter and the mRNA stability of the *hlgCB* transcript in the three prototypic strains. A fragment of 434 bp upstream the *hlgC* start codon (*PhlgC*) from USA300, ST80, and PEN strains (Supplementary Fig. S4), was cloned in front of the *gfp* gene in plasmids that were introduced into the three genetic backgrounds. The *PhlgC* of PEN was significantly stronger than the *PhlgC* of the two other strains regardless of the genetic background in which the plasmid was expressed. The *PhlgC* of USA300 and ST80 had lower but similar strengths in PEN and ST80 backgrounds while the *PhlgC* of USA300 was slightly stronger than the *PhlgC* of ST80 in the USA300 background (Fig. 4A).

The *hlgCB* and *hlgB* mRNA stabilities were then determined for the three strains using rifampicin assay. Quantification showed that *hlgB* transcript is more stable than *hlgCB* in all strains with noticeable variations between the strains. In USA300, the *hlgCB* mRNA is far less stable than *hlgB* (half-lives: 1 min 21 compared to 8 min 10,

respectively) and is also less stable than *hlgCB* from ST80 and PEN strains (3 min 50 and 4 min 46, respectively). The difference between *hlgCB* and *hlgB* is smaller for ST80 (3 min 50 and 10 min 21, respectively) and PEN strains (4 min 46 and 6 min 16, respectively; Fig. 4B).

Altogether, promoter activity and *hlgCB* mRNA stability are characteristic of each genetic background. PEN produces more *hlgCB* mRNA through its strong promoter and has a similar mRNA stability than *hlgCB* in ST80, whereas USA300 presents a weaker promoter than PEN and its *hlgCB* mRNA has a lower stability than the corresponding mRNAs in ST80 and PEN strains.

An SNP drastically changes *hlgCB* translatability independently of the genetic background

We then questioned whether the polymorphisms in nucleotide sequences of *hlgCB* mRNA may impact ribosome binding and translation efficiency. USA300 and PEN strains only have a 1 nt difference in their 5'UTR sequence at position -13, close to the ribosome binding site. Of note, ST80 has numerous SNPs in the *hlgC* coding region compared to USA300 and PEN but shares the same polymorphism as PEN in the 5'UTR (Fig. 5A).

Formation of a simplified initiation complex was analyzed using toe-printing assays. The experiments were performed using *S. aureus* 30S subunits, the initiator tRNA^{Met}, and *in vitro* transcribed *hlgCB* and *hlgB* mRNAs of the three strains. Using an oligonucleotide specific to *hlgC*, a clear toe-print was observed at position +16 from the initiation codon of ST80 and PEN *hlgC* transcripts, but no signal was detected for USA300 mRNA (Fig. 5B). A similar experiment was performed using an *hlgB* specific oligonucleotide to investigate the accessibility of *hlgB* ribosome binding site characterized by a strong Shine-Dalgarno sequence. A clear toe-print at position +16 was observed for all *hlgCB* mRNAs (Supplementary Fig. S5A) and for the *hlgB* transcript (Supplementary Fig. S5B). These data show that the ribosome binding site of *hlgB* mRNA

is accessible to promote the formation of a translation initiation complex whatever the mRNA context.

In vitro translation assays were then performed using *S. aureus* 70S ribosomes and *hlgCB* mRNA of the three strains or *hlgB* mRNA of ST80, as there is no polymorphism in *hlgB*. The results clearly showed that the *hlgB* and the *hlgCB* transcripts can produce HlgB protein. For HlgC, the amount of

protein synthesized was much lower from USA300 *hlgCB* mRNA compared to PEN and ST80 transcripts (Fig. 5C). Hence, HlgB and HlgC levels appeared almost equimolar among ST80 and PEN *hlgCB* mRNAs, but not for USA300 *hlgCB* mRNA. These results confirm the impact of the 5'UTR SNP on translatability and show that *hlgB* can be translated independently from both *hlgCB* and *hlgB* mRNAs *in vitro*. Because the translation of *hlgC* is impaired in USA300, the synthesis of HlgB

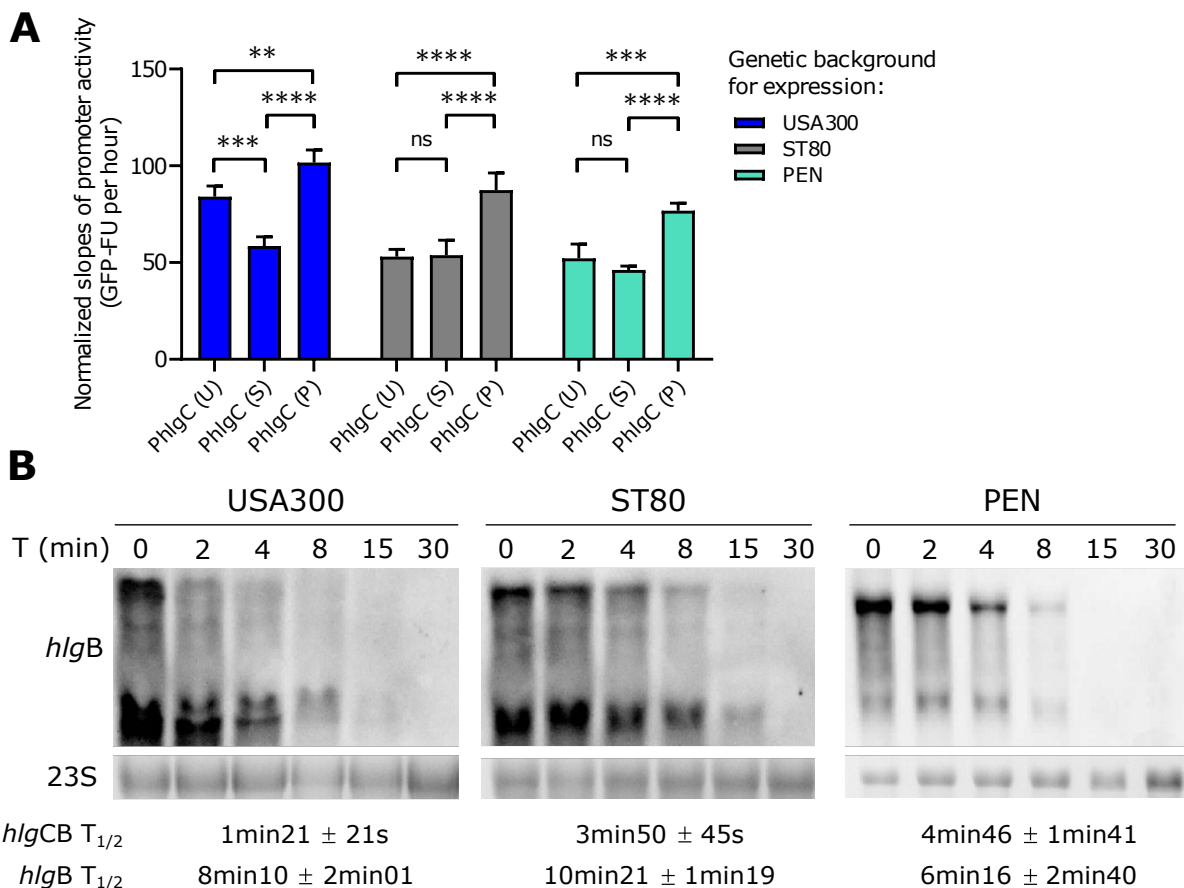
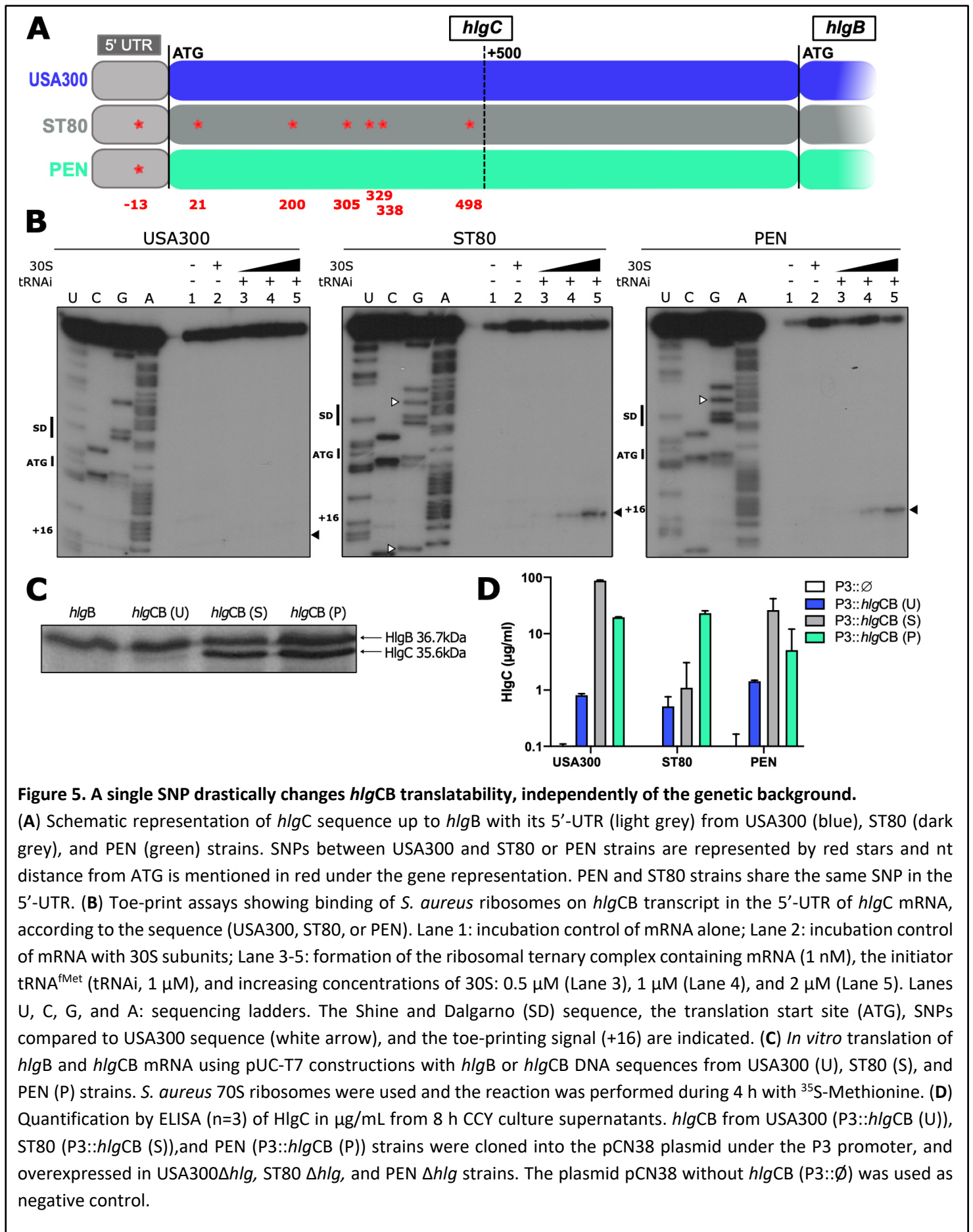


Figure 4. Both promoter activity and mRNA stability/degradation impact *hlgCB* expression

(A) The *hlgC* promoter (*PhlgC*) activity was tested according to its original genetic background and when expressed in autologous and heterologous genetic backgrounds. The 434 bp region upstream and including *hlgC* ATG from USA300 (*PhlgC* (U)), ST80 (*PhlgC* (S)) and PEN (*PhlgC* (P)) strains were cloned into the pACL-1484 plasmid in front of the *gfp* gene. Plasmids were transduced into the three strains: USA300, ST80, and PEN. Promoter activity was measured through GFP signal quantification overtime (GFP Fluorescence unit – GFP-FU), during a 24 h kinetic in CCY. The promoter activity slopes were estimated between the 4 h and 18 h time points, from the mean of biological triplicates, and normalized with negative control. Tuckey's multiple comparisons test was performed, ns – $P_{adj} > 0.05$; ** – $P_{adj} < 0.01$; *** – $P_{adj} < 0.001$; and **** – $P_{adj} < 0.0001$ (B) Determination of *hlgCB* and *hlgB* mRNA stability upon rifampicin exposure. Culture of USA300, ST80, and PEN strains in CCY were treated with rifampicin at 5 h of growth. Total RNA was extracted prior rifampicin addition (T = 0 min) and from 2 min to 30 min after rifampicin addition (T (min)). *hlgCB* and *hlgB* mRNAs were probed with the *hlgB* probe. Ethidium bromide-stained 23S rRNA (23S) was used as a loading control from the same gels. The calculated half-lives (T_{1/2}) of *hlgCB* and *hlgB* mRNA relative to 23S are presented below the gel pictures and represent the mean of biological triplicates.

(Fig. 5C) resulted most probably from an internal entry of the ribosome at the *hlgB* initiation site or

from the processed form of *hlgB* as shown by the toe-printing assays (Supplementary Fig. S5).



In order to validate the importance of the 5'UTR SNP on translation efficiency *in vivo*, the *hlgCB* coding sequence from each strain was placed under the control of the P3 promoter and introduced into the three different genetic backgrounds deleted for *hlgABC* genes. As expected, the USA300 sequence, irrespective of the genetic background, produced low levels of HlgC (Fig. 5D). Conversely, both the ST80 and PEN sequences allowed efficient HlgC synthesis. The ST80 sequence under the P3 promoter led to a greater amount of HlgC than PEN sequence, most probably due to its slightly higher RNA stability (Fig. 5D). Overall, the presence of a single SNP in the 5'UTR of *hlgC* has a strong consequence on ribosome recruitment and translation efficiency.

Discussion

In this study, we first demonstrated that the PVL-negative strain PEN was as virulent as the PVL-positive strains USA300 and ST80, and that this virulence was mainly driven by HlgCB production. When highly produced, HlgCB leads to rapid mortality, strong production of cytokines in the lung, and high bacterial load in the rabbit model of pneumonia, similarly to what is observed with PVL (Diep et al. 2010, 2016). Consistently, although HlgCB targets the same receptors as LukS-PV, it interacts with different motifs, leading to better cell permeabilization (Spaan et al. 2015). Since all *S. aureus* strains possess the *hlg* locus (McCarthy and Lindsay 2013; von Eiff et al. 2004) but not all cause severe CAP (Gillet et al. 2021), the present study strengthens the hypothesis that expression matters (Pivard et al. 2022).

To decipher the mechanisms leading to a variation in HlgCB expression and production among clinical strains, we investigated various levels of regulation including promoter activity, mRNA stability, and translatability. Differences in promoter activity were expected due to the polymorphisms between PEN and ST80 (2 SNPs) or USA300 strains (2 SNPs and 1 insertion) (Supplementary Fig. S4). A variation in expression due to differences in

promoter sequences has already been reported for other toxins such as the α -toxin (Tavares et al. 2014). Surprisingly, the promoter activity of *PhlgC* from USA300 was weaker when expressed in the two other strain backgrounds, suggesting an indirect effect caused by the modulation of an unknown transcriptional regulator. In addition, the stability and translatability of mRNA rely on its sequence and resulting structure; in USA300, the weak efficiency of *hlgC* translation probably resulted in an mRNA more vulnerable to degradation (Dar and Sorek 2018), leading to almost no production of HlgC. Strikingly, the difference in translation efficiency between USA300, PEN, and ST80 strains is related to a single SNP in the 5'UTR of the *hlgCB* operon. Other studies have shown that the introduction of mutations in the 5'UTR of mRNAs in *E. coli* and *B. subtilis* can induce changes in the mRNA structure with consequences on ribosome recruitment at initiation sites and on translation efficiencies (de Smit and van Duin 1990, 1994; Evfratov et al. 2017; Yarchuk et al. 1992; Mearls et al. 2018). Secondary structure prediction of *hlgC* 5'UTR revealed a hairpin structure that partially sequesters the weak SD sequence (Supplementary Fig. S6). The G-13-U mutation in USA300 could give rise to an additional base pair that would reinforce the stability of the hairpin structure. Interestingly, the three strains that have an HlgCB profile similar to USA300, carry either the same SNP at position -13 (FAL003 and MAS222) or an SNP at position -7 (BES288). For BES strain, the SNP at position -7 (G to U) reduces the strength of the SD, and an additional base pair can be formed (Supplementary Fig. S6). It is thus tempting to propose that these two SNPs (-13 and -7) would decrease helix breathing to hinder ribosome binding and/or decrease SD efficiency. In addition, ST80 contains 6 additional SNPs in the coding sequence that do not alter the sequence of HlgC, and thus are considered to be silent. However, a recent study performed in yeast revealed that both synonymous and non-synonymous mutations

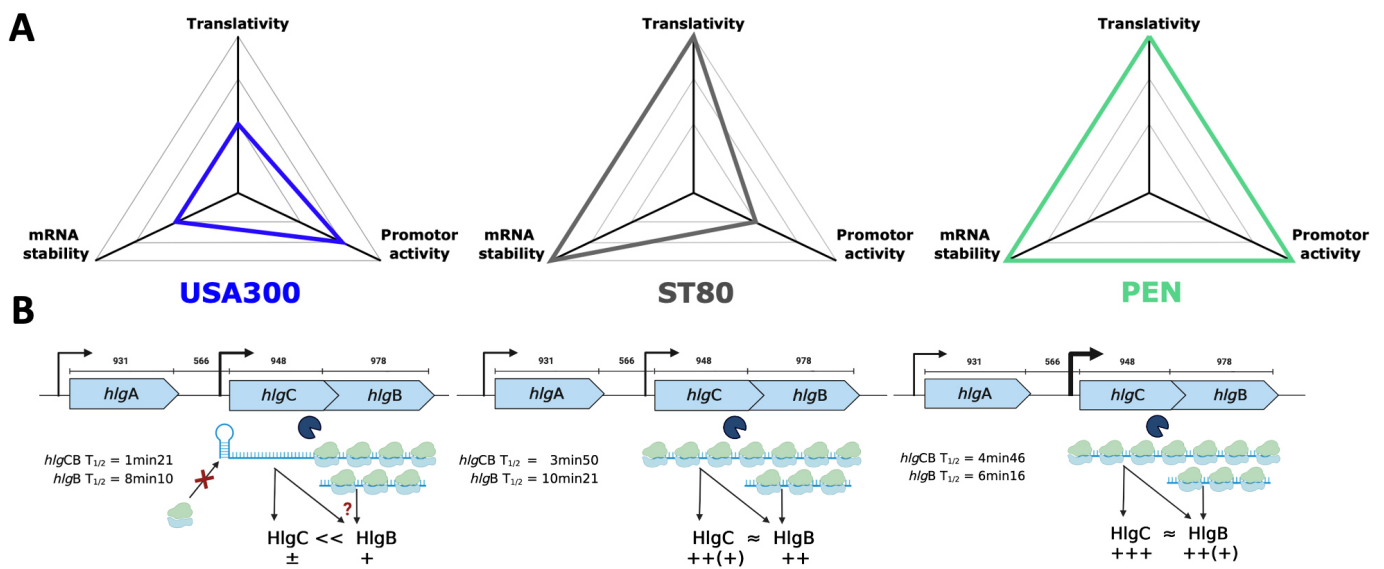


Figure 6. Regulatory mechanisms impacting gamma-hemolysin production

(A) Kiviati diagram representing the different mechanisms explored in this study, and their importance regarding HlgC production in USA300 (blue), ST80 (grey), and PEN (green) strains, with an arbitrary scale unit. The larger the area is, the greater the amount of HlgC will be. For HlgB, the maturated *hlgB* mRNA modifies this correlation between the three mechanisms and the production, especially for USA300 strain. (B) Model for the different levels of regulation of HlgC and HlgB production. In USA300 strain, HlgC production is impaired due to an SNP impeding ribosome recruitment at the *hlgC* initiation site. Translational coupling might thus be abolished and HlgB synthesis might come from the internal entry of the ribosome at the initiation site of *hlgB* on *hlgCB* mRNA or from the processed transcript.

in coding sequences resulted in a significant reduction in fitness and that the mutations frequently alter mRNA levels (Shen et al. 2022). Therefore, we do not exclude that the SNPs in the coding sequence might have consequences on the translation speed and/or mRNA stability in ST80. Considering all the data obtained herein, we propose the following scenario to explain the variation in HlgCB levels among clinical strains (Fig. 6). The PEN strain has a strong promoter leading to high amount of translatable and stable *hlgCB* mRNA, allowing a high production of HlgCB. ST80, despite a weaker *hlgC* promoter than PEN, shows better mRNA stability and translatability than USA300 and allows a large production of HlgCB. Both ST80 and PEN strains thus produce high levels of HlgC and HlgB. In contrast, USA300 has an intermediate *hlgC* promoter activity, an SNP in the 5'-UTR of *hlgC* mRNA that prevents *hlgC* translation, and a more unstable *hlgC* mRNA, resulting in very low levels of HlgC (Fig. 6). Altogether, these three levels of *hlgC* regulation contribute to the protein levels measured by

absolute quantification in the three strains. Interestingly, although several SNPs between the three strains in and upstream the *hlgC* sequence are observed and responsible for the variation in HlgC production, no SNP was identified in *hlgB* and its protein level was less affected among clinical strain. This might be due to a dual evolutionary constraint, as HlgB also forms heterodimers with HlgA. The high variability in core genome gene expression raises the question of the evolutionary pressure that led to the selection of this expression diversity, which may represent a fine and specific adaptation to the context, such as interactions with the host in which each strain develops. It is very likely that other determinants modulate the overall level of HlgCB production in clinical strains, such as transcriptional or post-transcriptional regulators. As illustrated in this study and elsewhere, epistasis effects as well as the non-coding and coding sequences, all play roles in the expression of virulence factors (Laabei et al. 2014; Read and Massey 2014; Priest et al. 2012). The continuous increase in GWAS (Read and Massey

2014; Denamur et al. 2022; Young et al. 2021) performance for the analysis of large sets of strains may allow, in the future, the identification of these other contributors.

The discovery of a new *hlgB* transcript in this study adds to the overall complexity. Since no promoter activity was detected upstream *hlgB* and the three different 5' ends carry a 5'-monophosphate, this new transcript is not a *bona fide* mRNA and the maturation process likely involves several RNases. Previous RNA sequencing performed on different strains showed the presence of an antisense RNA against *hlgC* and more *hlgB* than *hlgC* transcript, (Mozos et al. 2013) supporting the existence of a processed form of *hlgB*. Whether the antisense RNA is involved in the maturation process of *hlgB* remains to be determined. The processed *hlgB* mRNA appears to be translated *in vitro* and, in the case of USA300 where *hlgC* translation is impeded leading to an unstable mRNA, the synthesis of HlgB might originate from the *hlgB* mRNA. As the HlgB component is used for both HlgCB and HlgAB toxins (Dalla Serra et al. 2005), the *hlgB* transcripts could be translated under specific conditions to allow the production of HlgB independently of HlgC, in order to form the HlgAB toxin. Unlike *hlgC* and *hlgB*, *hlgA* is encoded upstream *hlgCB* operon and possesses its own promoter (Cooney et al. 1993; Balasubramanian et al. 2016). Indeed, there was no correlation herein between *hlgA* and *hlgCB* mRNAs levels, an observation supported by previous studies in which *hlgA* and *hlgCB* expression differed from each other (Bronner et al. 2000). On one hand, *hlgCB* is up-regulated by the *agr* system (Bronner et al. 2000; Dunman et al. 2001), SarA (Bronner et al. 2000; Dunman et al. 2001), and SaeRS regulation system (Liang et al. 2006; Flack et al. 2014; Voyich et al. 2009; Yamazaki et al. 2006; Nygaard et al. 2010) but down-regulated by *rot* (Saïd-Salim et al. 2003). On the other hand, *hlgA* is mostly regulated by the SaeRS system (Venkatasubramaniam et al. 2018; Voyich et al. 2009; Yamazaki et al. 2006; Sun et al.

2010), but not by *agr* nor SarA (Bronner et al. 2000; Venkatasubramaniam et al. 2018). The dissociated regulation of *hlgA* and *hlgB* remains unexpected since HlgA requires HlgB to induce pore-formation (Yamashita et al. 2011). One hypothesis is that the *hlgB* transcript might be appropriate in specific conditions to optimize the formation of the HlgAB toxin. To further complexify the matter, non-equimolar productions of HlgA and HlgB may be relevant in certain conditions, as HlgA alone antagonizes its receptors (CXCR1, CXCR2 and CCR2) preventing neutrophil activation (Spaan et al. 2014).

This work illustrates the complexity of virulence factor expression in clinical strains, where a given gene can produce a protein at highly variable levels not only due to the corresponding promoter activity. Furthermore, proteins from an operon may not be expressed equimolarly, and proteins belonging to different operons but who are supposed to form an equimolar assembly may not be produced at equivalent levels. It is very likely that such phenomena will be discovered in other bacterial species as they probably participate in the evolutionary plasticity of bacteria.

Material and Methods

Bacterial strains and growth conditions

All strains and plasmids used in this study are listed in Supplementary Table S2. *S. aureus* strains were routinely cultured overnight in Tryptic Soy Broth (TSB, DIFCO), then diluted at OD₆₀₀=0.05 in CCY (3% wt/vol yeast extract, 2% bacto-casamino acids, 2.3% sodium pyruvate, 0.63% Na₂HPO₄, and 0.041% KH₂PO₄) and grown for 5 h (Rifampicin test) or 8 h at 37°C with shaking. When required, chloramphenicol was added at the concentration of 10 µg/mL.

For animal experiments, strains were inoculated into 5 mL of CCY medium and incubated overnight at 37°C with shaking. Then, 500 µL of this culture

were inoculated in CCY and agitated for 4 h at 37°C to reach the exponential growth phase.

Construction of mutant strains

The *S. aureus* *hlgC* stop codon mutant was created in the clinical PEN strain using the pCasSA-BEC genome editing system as previously described (Gu et al. 2018) (Supplementary M&M). The entire *hlgACB* locus was also deleted in USA300, ST80, and PEN strains by double recombination process as previously described (Boisset et al. 2007) (Supplementary M&M).

Absolute quantification of HlgC and HlgB in clinical strains using targeted proteomics

S. aureus clinical strains were cultured 8 h in CCY medium and centrifuged at 10 000 rpm for 5 min at 4°C to separate bacterial pellets. For each strain, 50 µl of supernatant (50 µg of proteins) were reduced, alkylated, and digested using LysC/trypsin mix (Promega) (Hodille et al. 2016). To quantify HlgC and HlgB, two signature peptides were selected and purchased in an isotopically-labeled version (AQUA QuantPro, Thermo Fisher Scientific) to serve as quantification standards: YVSLINYLP[¹³C₆, ¹⁵N₂]K (HlgC) and SNFNPEFLSVLSH[¹³C₆, ¹⁵N₄]R (HlgB). These labeled peptides were added to the digested supernatant at a final concentration of 2.1 pmoles/mL. Then, the digest was desalted on a C18 ZipTip (MacroSpin Harvard) before drying by vacuum centrifugation and storage at -20°C. Dried peptide digest was solubilized in 40 µL of 2% acetonitrile and 0.1% formic acid, and 6 µL of this solution was analyzed via targeted proteomics. Targeted proteomic analyses were performed on a 6500 QTrap mass spectrometer (AB Sciex) operating in the selected reaction mode (SRM). Liquid chromatography (LC) separation was performed on an Ultimate 3000 system (Thermo Scientific). The parameters for LC separation and scheduled SRM acquisitions are presented in the Supplementary M&M. LC-SRM data analysis was performed using Skyline software. All transitions

were individually inspected and excluded if they were deemed unsuitable for quantification (low signal-to-noise ratio, obvious interference). Unlabeled/labeled peak area ratios were calculated for each SRM transition and these ratios were used to determine the corresponding mean peptide ratio. HlgC and HlgB concentrations in *S. aureus* supernatants were calculated based on the mean ratio of each signature peptide.

Rabbit model of pneumonia

Immunocompetent New Zealand White male rabbits (body weight 2.8 to 3.2 kilograms) were challenged at Vivexia (Dijon, France) by an intrabronchial instillation of 0.5 ml of *S. aureus* strains diluted at 9.49 to 9.61 log₁₀ CFU/mL in sterile saline solution (Otec®, NaCl 0,9%) to induce pneumonia. The inoculum was gently flushed through the tracheal catheter under laryngoscopic control. The catheter was immediately removed, the animals were rapidly extubated, and allowed to go back to their cage. Post-infection rabbits' survival rate was then recorded 2 to 3 times a day. If they had not spontaneously died, animals were euthanized 48 h after the challenge. Lungs were collected for cytokine and bacterial load estimation: each lung (right and left) was weighed and homogenized in 10 mL of sterile saline solution. Bacterial densities were counted in crude lung homogenates by plating 10-fold dilutions on Chapman agar and incubating the plates for 24 h at 37°C. Bacterial concentrations were expressed as log₁₀ CFU/g. All procedures in the protocol were approved by the local ethics committee for animal experiments and by the *Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche* (APAFIS#22710-201911071356264 v1).

Cytokine quantification

IL-8 and IL-1β cytokines were quantified by ELISA using the Rabbit IL-1 beta ELISA Kit and Rabbit IL-8 ELISA Kit (Invitrogen). Aliquots of 2 mL of lung homogenate shred in saline solution were centrifuged during 30 min at 10 000 rpm and 4°C,

before appropriate dilution in Assay Diluent solution. ELISA were then performed by strictly following the supplier's protocols. The final concentration was reported on the total mass of the lung. Three biological replicates were used for each strain tested.

Northern blot analysis

Total RNA was prepared from 10 mL of 8 h culture following the procedure described for the FastRNA pro blue kit (MP Biomedicals) with the Fastprep apparatus (MP Biomedicals). Electrophoresis of total RNA (10 to 30 µg) was performed on 1.5% agarose gel containing 25 mM guanidium thiocyanate. After migration, RNAs were transferred by capillarity on nitrocellulose membranes (GE Healthcare Life Sciences). Hybridization with specific digoxigenin (DIG)-labelled probe complementary to *hlgA*, *hlgC*, *hlgB*, *RsaI*, and 5S rRNA sequences (Supplementary Table S3) followed by luminescent detection were carried out as previously described (Desgranges et al. 2022).

Primer extension assays

To determine the transcriptional start sites of *hlgCB* and *hlgB* mRNAs, primer extension assays were performed as previously described (Lalaouna et al. 2019). Briefly, 30 µg of total RNAs from USA300 and ST80 strains were reversed transcribed with AMV reverse transcriptase (NEB) using 5' radiolabelled primers (for *hlgC* (PEC1) and for *hlgB* (PEB1, PEB2, and PEB3); Supplementary Table S3). The sequencing ladders were obtained from *hlgCB* or *hlgB* PCR products (amplified with primers listed in Supplementary Table S2) and the Vent (exo-) DNA polymerase (NEB Biolabs). All samples were fractionated on a 10% polyacrylamide - 8 M urea gel in 1x TBE. After migration, gel was exposed to an autoradiography film.

Promoter activity assays

The regions upstream *hlgC* (434 bp) and *hlgB* (929 bp) and including their start codons, were amplified from USA300, PEN, and ST80 gDNAs for *hlgC* and only ST80 gDNA for *hlgB* (because no sequence differences were observed between the three strains) using oligonucleotides PhlgC-*EcoRI*-F with PhlgC-*XbaI*-R and PhlgB-*PvuII*-F with PhlgB-*KpnI*-R for *hlgC* and *hlgB* upstream regions, respectively (Supplementary Table S2). Then, amplicons were fused to the *gfppuv* gene by ligation in pALC1484 plasmid (Wolz et al. 2000) using adequate restriction enzymes (Supplementary Table S3). The 16S rRNA promoter was cloned into pACL1484 as a positive control, as previously described (Nonfoux et al. 2018). All constructions were verified by PCR and sequencing using pALC-F and pACL-R oligonucleotides (Supplementary Table S3). Plasmids were first electroporated in RN4220 strain prior transformation by electroporation in USA300, ST80, and PEN strains. A 96-well plate (Greiner bio-one – 655090) was inoculated with 200 µL per well of OD₆₀₀=0.05 culture in CCY + 10 µg/mL of chloramphenicol and incubated at 37° for 24 h. GFP measurements were performed with Infinite 200Pro (TECAN) apparatus, with an excitation wavelength at 488 nm and an emission wavelength at 535 nm. Both GFP signal and OD₆₀₀ were measured every 15 min for 24 h. Each strain was evaluated in triplicate.

RNA stability assays

hlgCB and *hlgB* mRNA stability were determined by rifampicin assays. Briefly, USA300, ST80, and PEN strains were grown for 5 h in 200 mL of CCY, and treated with 1 mL of rifampicin at 30 mg/mL to inhibit transcription. Total RNA was extracted before (time 0) and after rifampicin addition at 2, 4, 8, 15, and 30 min. Northern blots were performed using 23S rRNA as loading control.

Toe-printing assays

hlgCB and *hlgB* mRNA transcripts were first synthesized from linearized pUC-T7 vectors

(Geissmann et al. 2009). The *hlgCB* sequences from USA300, ST80, and PEN strains, and *hlgB* from ST80 strain, containing their 5'UTR, were amplified by PCR using pUCT7-*hlgC*- or -*hlgB*-*StuI*-F with pUCT7-*hlgB*-*BamHI*-R primers (Table S3), containing the T7 promoter. After linearization by *BamHI* and *in vitro* transcription using T7 RNA polymerase, the DNA template was digested with DNase I (Sigma) and the RNAs were purified with phenol-chloroform alcohol isoamyl, precipitated in absolute ethanol and cleaned-up with Micro Bio-Spin Chromato Column (Biorad) (Desgranges et al. 2022). Toe-printing assays were performed on *hlgCB* and *hlgB* transcripts. The RNAs were first annealed to appropriate 5'end-radiolabeled oligonucleotide as previously described (Desgranges et al. 2022). The ternary ribosomal complex containing purified *S. aureus* 30S ribosome (Khusainov et al. 2017) (0.5, 1, and 2 μ M), initiator tRNA^{fMet} (1 μ M), and RNA transcripts (1 nM) was formed at 37°C. After reverse transcription, the DNA fragments were sized on 8% polyacrylamide-urea gel electrophoresis. Sequencing ladders were run in parallel to identify the toe-print signals.

***In vitro* translation assays**

The translatability of *hlgCB* and *hlgB* mRNAs were assessed using the PURExpress® Δ Ribosome Kit (NEB) supplemented with purified *S. aureus* 70S ribosomes (Khusainov et al. 2017). The ribosomes were first reactivated by incubation at 37°C for 10 min. The reactions were performed 4 h at 37°C with various plasmids (200 ng; pUC-T7::*hlgCB* from USA300, ST80, and PEN strains and pUC-T7::*hlgB* from ST80 strain) and *S. aureus* 70S (30 pmoles) in 5 μ L of Buffer A, 1.5 μ L of factors, 1 μ L of RNasin (Promega), and 1 μ L of ³⁵S-Methionine. The Laemmli Buffer was added to the samples, which were loaded on 15% PAGE-SDS with Page Ruler™ Plus Protein Product (ThermoFisher) run in parallel. After migration, the gel was heat-vacuum transferred on a Whatman paper and the data were revealed by autoradiography.

Over-expression of *hlgCB* mRNA

The sequence from -39 nt upstream *hlgC* ATG to +60 nt after *hlgB* stop codon was amplified with *hlgCB*-*PstI*-F and *hlgCB*-*BamHI*-R oligos (Table S3) from gDNA of USA300 (*hlgCB* (U)), ST80 (*hlgCB* (S)), and PEN (*hlgCB* (P)) strains. Then, amplicons were cloned into the pCN38-P3 plasmid using adequate restriction enzymes downstream the P3 promoter. All constructions were verified by PCR and sequencing. Plasmids were first electroporated in RN4220 prior transformation by electroporation in USA300 Δ *hlg*, ST80 Δ *hlg*, and PEN Δ *hlg* strains. All strains were cultivated overnight in TSB with chloramphenicol and then subcultured at OD₆₀₀=0.05 in CCY without antibiotic and incubated during 8 h. Supernatants were centrifuged 5 min at 10 000 rpm at 4°C and stored at -80°C.

HlgC quantification by ELISA

HlgC quantification was performed by sandwich ELISA using a custom-made mouse monoclonal antibody (R&D Biotech) and a custom-made polyclonal rabbit F(ab)'2 biotinylated antibody (R&D Biotech), both raised against HlgC. A 96-well NUNC Maxisorp plate (Thermo Scientific) was coated with anti-HlgC monoclonal antibody at 10 μ g/mL overnight at 20°C. After 5 consecutive washes with PBS Tween 0.05% (PBS-T), wells were saturated 1h30 at 20°C with blocking solution of PBS-T, low fat milk (5 g/L) and BSA (1 g/L). Standard dilutions (15–1000 ng/mL) of recombinant HlgC or culture supernatant were denatured 1 h at 95°C, loaded in duplicate, and incubated for 2 h at 37 °C. Plate was washed, and polyclonal rabbit F(ab)'2 biotinylated antibody (1,55 μ g/mL) was added and incubated 1h30 at 37°C. After a new washing step, ExtrAvidin-Peroxidase antibody (Sigma) targeting biotin molecule and peroxidase HRP-conjugated was added and incubated 1 h at 20°C. A final wash was performed prior revelation with 75 μ L of substrate tetramethylbenzidine (KPL SureBlue™, SeraCare). The reaction was stopped with H₂SO₄ at

1 N. The plates were read at 450 nm in a Biorad Model 680 microplate reader.

References for Supplementary data

(Arnaud et al. 2004) (Horinouchi and Weisblum 1982) (Nair et al. 2011) (Diep et al. 2008) (Perret et al. 2012) (Vandenesch et al. 2003) (Herbert et al. 2010) (Marincola et al. 2012) (Redder and Linder 2012) (Diep et al. 2006) (Fey et al. 2013) (Charpentier et al. 2004) (Gruber et al. 2008)

Competing Interest Statement

All authors declare no conflicting of interest.

Acknowledgements

We thank Sylvère Bastien for bioinformatics support, Xanthe Adams for technical help, Pr. Christiane Wolz, Pr. Peter Redder and Dr. Paul Verhoven for providing strains, Iulia Macavei and Jérôme Lemoine for proteomics analysis, and Véréna Landel from the Hospices Civils de Lyon (France) for help in manuscript preparation.

This work was funded by the ANR Ribostaph and by the RHU IDBIORIV.

Authors contribution:

Conceptualization: MP, IC, KM, PR, FV

Investigation: MP, IC, VB, DC, MJ, NA, BG, YB, FC

Important intellectual content: MP, IC, VB, CT, KM, PR, FV

Supervision: IC, KM, PR, FV

Writing – original draft: MP, IC, KM, PR, FV

Writing – review & editing: All

References

Arnaud M, Chastanet A, Débarbouillé M. 2004. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* 70: 6887–6891.

Balasubramanian D, Ohneck EA, Chapman J, Weiss A, Kim MK, Reyes-Robles T, Zhong J, Shaw LN, Lun DS, Ueberheide B, et al. 2016. Staphylococcus aureus Coordinates Leukocidin Expression and Pathogenesis by Sensing Metabolic Fluxes via RpiRc. *mBio* 7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4916384/> (Accessed April 21, 2020).

Boisset S, Geissmann T, Huntzinger E, Fechter P, Bendridi N, Possedko M, Chevalier C, Helfer AC, Benito Y, Jacquier A, et al. 2007. Staphylococcus aureus RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Genes Dev* 21: 1353–1366.

Bronner S, Stoessel P, Gravet A, Monteil H, Prévost G. 2000. Variable Expressions of Staphylococcus aureus Bicomponent Leucotoxins Semiquantified by Competitive Reverse Transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* 66: 3931–3938.

Charpentier E, Anton AI, Barry P, Alfonso B, Fang Y, Novick RP. 2004. Novel cassette-based shuttle vector system for gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* 70: 6076–6085.

Cooney J, Kienle Z, Foster TJ, O'Toole PW. 1993. The Gamma-Hemolysin Locus of Staphylococcus aureus Comprises Three Linked Genes, Two of Which Are Identical to the Genes for the F and S Components of Leukocidin. *J Biol Chem* 268: 4.

Dajcs JJ, Thibodeaux BA, Girgis DO, O'Callaghan RJ. 2002. Corneal Virulence of Staphylococcus aureus in an Experimental Model of Keratitis. *DNA and Cell Biology* 21: 375–382.

Dalla Serra M, Coraiola M, Viero G, Comai M, Potrich C, Ferreras M, Baba-Moussa L, Colin DA, Menestrina G, Bhakdi S, et al. 2005. Staphylococcus aureus Bicomponent γ -Hemolysins, HlgA, HlgB, and HlgC, Can Form Mixed Pores Containing All Components. *J Chem Inf Model* 45: 1539–1545.

Dar D, Sorek R. 2018. Extensive reshaping of bacterial operons by programmed mRNA decay. *PLoS Genet* 14: e1007354.

de Smit MH, van Duin J. 1994. Control of translation by mRNA secondary structure in Escherichia coli. A quantitative analysis of literature data. *J Mol Biol* 244: 144–150.

de Smit MH, van Duin J. 1990. Secondary structure of the ribosome binding site determines translational efficiency: a quantitative analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 7668–7672.

Denamur E, Condamine B, Esposito-Farèse M, Royer G, Clermont O, Laouenan C, Lefort A, de Lastours V, Galardini M, COLIBAFI, et al. 2022. Genome wide association study of Escherichia coli bloodstream infection isolates identifies genetic determinants for the portal of entry but not fatal outcome. *PLoS Genet* 18: e1010112.

Desgranges E, Barrientos L, Herrgott L, Marzi S, Toledo-Arana A, Moreau K, Vandenesch F, Romby P, Caldelari I.

2022. The 3'UTR-derived sRNA RsaG coordinates redox homeostasis and metabolism adaptation in response to glucose-6-phosphate uptake in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* 117: 193–214.
- Diep BA, Chan L, Tattevin P, Kajikawa O, Martin TR, Basuino L, Mai TT, Marbach H, Braughton KR, Whitney AR, et al. 2010. Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. *PNAS* 107: 5587–5592.
- Diep BA, Gill SR, Chang RF, Phan TH, Chen JH, Davidson MG, Lin F, Lin J, Carleton HA, Mongodin EF, et al. 2006. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 367: 731–739.
- Diep BA, Le VTM, Badiou C, Le HN, Pinheiro MG, Duong AH, Wang X, Dip EC, Aguiar-Alves F, Basuino L, et al. 2016. IVIG-mediated protection against necrotizing pneumonia caused by MRSA. *Sci Transl Med* 8: 357ra124.
- Diep BA, Palazzolo-Ballance AM, Tattevin P, Basuino L, Braughton KR, Whitney AR, Chen L, Kreiswirth BN, Otto M, DeLeo FR, et al. 2008. Contribution of Panton-Valentine leukocidin in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *PLoS One* 3: e3198.
- Dunman PM, Murphy E, Haney S, Palacios D, Tucker-Kellogg G, Wu S, Brown EL, Zagursky RJ, Shlaes D, Projan SJ. 2001. Transcription Profiling-Based Identification of *Staphylococcus aureus* Genes Regulated by the agr and/or sarA Loci. *Journal of Bacteriology* 183: 7341–7353.
- Evfratov SA, Osterman IA, Komarova ES, Pogorelskaya AM, Rubtsova MP, Zatsepin TS, Semashko TA, Kostryukova ES, Mironov AA, Burnaev E, et al. 2017. Application of sorting and next generation sequencing to study 5'-UTR influence on translation efficiency in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 45: 3487–3502.
- Fey PD, Endres JL, Yajjala VK, Widhelm TJ, Boissy RJ, Bose JL, Bayles KW. 2013. A genetic resource for rapid and comprehensive phenotype screening of nonessential *Staphylococcus aureus* genes. *mBio* 4: e00537-00512.
- Flack CE, Zurek OW, Meishery DD, Pallister KB, Malone CL, Horswill AR, Voyich JM. 2014. Differential regulation of staphylococcal virulence by the sensor kinase SaeS in response to neutrophil-derived stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E2037–E2045.
- Geissmann T, Chevalier C, Cros M-J, Boisset S, Fechter P, Noiroit C, Schrenzel J, François P, Vandenesch F, Gaspin C, et al. 2009. A search for small noncoding RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a conserved sequence motif for regulation. *Nucleic Acids Research* 37: 7239–7257.
- Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet J-C, Lina G, Bes M, Vandenesch F, Piémont Y, Brousse N, Floret D, et al. 2002. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* 359: 753–759.
- Gillet Y, Tristan A, Rasigade J-P, Saadatian-Elahi M, Bouchiat C, Bes M, Dumitrescu O, Leloire M, Dupieux C, Laurent F, et al. 2021. Prognostic factors of severe community-acquired staphylococcal pneumonia in France. *Eur Respir J* 58: 2004445.
- Gruber AR, Lorenz R, Bernhart SH, Neuböck R, Hofacker IL. 2008. The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Res* 36: W70-74.
- Grumann D, Nübel U, Bröker BM. 2014. *Staphylococcus aureus* toxins – Their functions and genetics. *Infection, Genetics and Evolution* 21: 583–592.
- Gu T, Zhao S, Pi Y, Chen W, Chen C, Liu Q, Li M, Han D, Ji Q. 2018. Highly efficient base editing in *Staphylococcus aureus* using an engineered CRISPR RNA-guided cytidine deaminase. *Chem Sci* 9: 3248–3253.
- Herbert S, Ziebandt A-K, Ohlsen K, Schäfer T, Hecker M, Albrecht D, Novick R, Götz F. 2010. Repair of global regulators in *Staphylococcus aureus* 8325 and comparative analysis with other clinical isolates. *Infect Immun* 78: 2877–2889.
- Hodille E, Alekseeva L, Berkova N, Serrier A, Badiou C, Gilquin B, Brun V, Vandenesch F, Terman DS, Lina G. 2016. Staphylococcal Enterotoxin O Exhibits Cell Cycle Modulating Activity. *Front Microbiol* 7: 441.
- Horinouchi S, Weisblum B. 1982. Nucleotide sequence and functional map of pC194, a plasmid that specifies inducible chloramphenicol resistance. *J Bacteriol* 150: 815–825.
- Jean S-S, Chang Y-C, Lin W-C, Lee W-S, Hsueh P-R, Hsu C-W. 2020. Epidemiology, Treatment, and Prevention of Nosocomial Bacterial Pneumonia. *J Clin Med* 9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7019939/> (Accessed April 23, 2020).
- Khusainov I, Vicens Q, Ayupov R, Usachev K, Myasnikov A, Simonetti A, Validov S, Kieffer B, Yusupova G, Yusupov M, et al. 2017. Structures and dynamics of hibernating ribosomes from *Staphylococcus aureus* mediated by intermolecular interactions of HPF. *EMBO J* 36: 2073–2087.

- Laabei M, Recker M, Rudkin JK, Aldeljawi M, Gulay Z, Sloan TJ, Williams P, Endres JL, Bayles KW, Fey PD, et al. 2014. Predicting the virulence of MRSA from its genome sequence. *Genome Res* 24: 839–849.
- Lalaouna D, Baude J, Wu Z, Tomasini A, Chicher J, Marzi S, Vandenesch F, Romby P, Caldelari I, Moreau K. 2019. RsaC sRNA modulates the oxidative stress response of *Staphylococcus aureus* during manganese starvation. *Nucleic Acids Res* 47: 9871–9887.
- Liang X, Yu C, Sun J, Liu H, Landwehr C, Holmes D, Ji Y. 2006. Inactivation of a two-component signal transduction system, SaeRS, eliminates adherence and attenuates virulence of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 74: 4655–4665.
- Lubkin A, Lee WL, Alonzo F, Wang C, Aligo J, Keller M, Girgis NM, Reyes-Robles T, Chan R, O'Malley A, et al. 2019. *Staphylococcus aureus* Leukocidins Target Endothelial DARC to Cause Lethality in Mice. *Cell Host Microbe* 25: 463–470.e9.
- Marincola G, Schäfer T, Behler J, Bernhardt J, Ohlsen K, Goerke C, Wolz C. 2012. RNase Y of *Staphylococcus aureus* and its role in the activation of virulence genes. *Mol Microbiol* 85: 817–832.
- Masters IB, Isles AF, Grimwood K. 2017. Necrotizing pneumonia: an emerging problem in children? *Pneumonia (Nathan)* 9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5525269/> (Accessed April 6, 2020).
- McCarthy AJ, Lindsay JA. 2013. *Staphylococcus aureus* innate immune evasion is lineage-specific: a bioinformatics study. *Infect Genet Evol* 19: 7–14.
- Mearls EB, Jackter J, Colquhoun JM, Farmer V, Matthews AJ, Murphy LS, Fenton C, Camp AH. 2018. Transcription and translation of the sigG gene is tuned for proper execution of the switch from early to late gene expression in the developing *Bacillus subtilis* spore. *PLoS Genet* 14: e1007350.
- Mozos IR de los, Vergara-Irigaray M, Segura V, Villanueva M, Bitarte N, Saramago M, Domingues S, Arraiano CM, Fechter P, Romby P, et al. 2013. Base Pairing Interaction between 5'- and 3'-UTRs Controls icaR mRNA Translation in *Staphylococcus aureus*. *PLOS Genetics* 9: e1004001.
- Nair D, Memmi G, Hernandez D, Bard J, Beaume M, Gill S, Francois P, Cheung AL. 2011. Whole-genome sequencing of *Staphylococcus aureus* strain RN4220, a key laboratory strain used in virulence research, identifies mutations that affect not only virulence factors but also the fitness of the strain. *J Bacteriol* 193: 2332–2335.
- Nonfoux L, Chiaruzzi M, Badiou C, Baude J, Tristan A, Thioulouse J, Muller D, Prigent-Combaret C, Lina G. 2018. Impact of Currently Marketed Tampons and Menstrual Cups on *Staphylococcus aureus* Growth and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Production In Vitro. *Appl Environ Microbiol* 84: e00351-18.
- Nygaard TK, Pallister KB, Ruzevich P, Griffith S, Vuong C, Voyich JM. 2010. SaeR binds a consensus sequence within virulence gene promoters to advance USA300 pathogenesis. *J Infect Dis* 201: 241–254.
- Perret M, Badiou C, Lina G, Burbaud S, Benito Y, Bes M, Cottin V, Couzon F, Juruj C, Dauwalder O, et al. 2012. Cross-talk between *Staphylococcus aureus* leukocidins-intoxicated macrophages and lung epithelial cells triggers chemokine secretion in an inflammasome-dependent manner. *Cell Microbiol* 14: 1019–1036.
- Pivard M, Bastien S, Macavei I, Mouton N, Rasigade J-P, Couzon F, Carriere R, Moreau K, Lemoine J, Vandenesch F. 2022. *Staphylococcus aureus* virulence factor expression matters: input from targeted proteomics shows Pantone-Valentine leucocidin impact on mortality. 2022.09.18.508069. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.09.18.508069v1> (Accessed September 20, 2022).
- Priest NK, Rudkin JK, Feil EJ, van den Elsen JMH, Cheung A, Peacock SJ, Laabei M, Lucks DA, Recker M, Massey RC. 2012. From genotype to phenotype: can systems biology be used to predict *Staphylococcus aureus* virulence? *Nat Rev Microbiol* 10: 791–797.
- Read TD, Massey RC. 2014. Characterizing the genetic basis of bacterial phenotypes using genome-wide association studies: a new direction for bacteriology. *Genome Med* 6: 109.
- Redder P, Linder P. 2012. New Range of Vectors with a Stringent 5-Fluoroorotic Acid-Based Counterselection System for Generating Mutants by Allelic Replacement in *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* 78: 3846–3854.
- Saïd-Salim B, Dunman PM, McAleese FM, Macapagal D, Murphy E, McNamara PJ, Arvidson S, Foster TJ, Projan SJ, Kreiswirth BN. 2003. Global Regulation of *Staphylococcus aureus* Genes by Rot. *Journal of Bacteriology* 185: 610–619.
- Shen X, Song S, Li C, Zhang J. 2022. Synonymous mutations in representative yeast genes are mostly strongly non-neutral. *Nature*.
- Spaan AN, Henry T, van Rooijen WJM, Perret M, Badiou C, Aerts PC, Kemmink J, de Haas CJC, van Kessel KPM, Vandenesch F, et al. 2013. The Staphylococcal Toxin

- Panton-Valentine Leukocidin Targets Human C5a Receptors. *Cell Host & Microbe* 13: 584–594.
- Spaan AN, Schiepers A, Haas CJC de, Hooijdonk DDJJ van, Badiou C, Contamin H, Vandenesch F, Lina G, Gerard NP, Gerard C, et al. 2015. Differential Interaction of the Staphylococcal Toxins Panton–Valentine Leukocidin and γ -Hemolysin CB with Human C5a Receptors. *The Journal of Immunology* 195: 1034–1043.
- Spaan AN, Vrieling M, Wallet P, Badiou C, Reyes-Robles T, Ohneck EA, Benito Y, de Haas CJC, Day CJ, Jennings MP, et al. 2014. The staphylococcal toxins γ -haemolysin AB and CB differentially target phagocytes by employing specific chemokine receptors. *Nature Communications* 5: 5438.
- Stulik L, Rouha H, Labrousse D, Visram ZC, Badarau A, Maierhofer B, Groß K, Weber S, Kramarić MD, Glojnarić I, et al. 2019. Preventing lung pathology and mortality in rabbit *Staphylococcus aureus* pneumonia models with cytotoxin-neutralizing monoclonal IgGs penetrating the epithelial lining fluid. *Sci Rep* 9: 5339.
- Sun F, Li C, Jeong D, Sohn C, He C, Bae T. 2010. In the *Staphylococcus aureus* Two-Component System sae, the Response Regulator SaeR Binds to a Direct Repeat Sequence and DNA Binding Requires Phosphorylation by the Sensor Kinase SaeS. *J Bacteriol* 192: 2111–2127.
- Tam K, Torres VJ. 2019. *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. *Microbiol Spectr* 7.
- Tavares A, Nielsen JB, Boye K, Rohde S, Paulo AC, Westh H, Schønning K, de Lencastre H, Miragaia M. 2014. Insights into alpha-hemolysin (Hla) evolution and expression among *Staphylococcus aureus* clones with hospital and community origin. *PLoS One* 9: e98634.
- Thammavongsa V, Kim HK, Missiakas D, Schneewind O. 2015. Staphylococcal manipulation of host immune responses. *Nat Rev Microbiol* 13: 529–543.
- Tromp AT, Van Gent M, Abrial P, Martin A, Jansen JP, De Haas CJC, Van Kessel KPM, Bardoel BW, Kruse E, Bourdonnay E, et al. 2018. Human CD45 is an F-component-specific receptor for the staphylococcal toxin Panton-Valentine leukocidin. *Nat Microbiol* 3: 708–717.
- Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, Liassine N, Bes M, Greenland T, Reverdy M-E, et al. 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerging Infect Dis* 9: 978–984.
- Vardakas KZ, Matthaiou DK, Falagas ME. 2009. Incidence, characteristics and outcomes of patients with severe community acquired-MRSA pneumonia. *European Respiratory Journal* 34: 1148–1158.
- Venkatasubramaniam A, Kanipakala T, Ganjbaksh N, Mehr R, Mukherjee I, Krishnan S, Bae T, Aman MJ, Adhikari RP. 2018. A Critical Role for HlgA in *Staphylococcus aureus* Pathogenesis Revealed by A Switch in the SaeRS Two-Component Regulatory System. *Toxins* 10: 377.
- von Eiff C, Friedrich AW, Peters G, Becker K. 2004. Prevalence of genes encoding for members of the staphylococcal leukotoxin family among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 49: 157–162.
- Voyich JM, Vuong C, DeWald M, Nygaard TK, Kocianova S, Griffith S, Jones J, Iverson C, Sturdevant DE, Braughton KR, et al. 2009. The SaeR/S Gene Regulatory System is Essential for Innate Immune Evasion by *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 199: 1698–1706.
- Wolz C, Pöhlmann-Dietze P, Steinhuber A, Chien Y-T, Manna A, Van Wamel W, Cheung A. 2000. Agr-independent regulation of fibronectin-binding protein(s) by the regulatory locus sar in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* 36: 230–243.
- Yamashita K, Kawai Y, Tanaka Y, Hirano N, Kaneko J, Tomita N, Ohta M, Kamio Y, Yao M, Tanaka I. 2011. Crystal structure of the octameric pore of staphylococcal γ -hemolysin reveals the β -barrel pore formation mechanism by two components. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 17314–17319.
- Yamazaki K, Kato F, Kamio Y, Kaneko J. 2006. Expression of γ -hemolysin regulated by sae in *Staphylococcus aureus* strain Smith 5R. *FEMS Microbiol Lett* 259: 174–180.
- Yarchuk O, Jacques N, Guillerez J, Dreyfus M. 1992. Interdependence of translation, transcription and mRNA degradation in the lacZ gene. *J Mol Biol* 226: 581–596.
- Young BC, Wu C-H, Charlesworth J, Earle S, Price JR, Gordon NC, Cole K, Dunn L, Liu E, Oakley S, et al. 2021. Antimicrobial resistance determinants are associated with *Staphylococcus aureus* bacteraemia and adaptation to the healthcare environment: a bacterial genome-wide association study. *Microb Genom* 7.

Supplementary Material & Methods

Construction of mutant strains

Codon stop mutant

Annealed *hlgC* spacer oligos (Table S3) were first inserted into the pncasSA-BEC plasmid (pncasSA-BEC-*hlgC*) by Golden Gate assembly (NEB). Then, pncasSA-BEC-*hlgC* was electroporated into the *S. aureus* RN4220. The colonies were selected on TSB agar plates containing chloramphenicol (10 mg/L) at 30 °C. pncasSA-BEC-*hlgC* plasmid isolated from the RN4220 strain was transformed into *S. aureus* PEN strain by electroporation. The colonies were also selected on TSB agar plates with chloramphenicol (10 mg/L) at 30 °C. The successful *hlgC* inactivation strain was confirmed by PCR and sequencing, and the pncasSA-BEC-*hlgC* was then cured by culturing the cells at 42 °C for 12 h without adding chloramphenicol.

pMAD deletion

Briefly, two DNA PCR fragments generated using oligonucleotides *hlg525-SmaI* with *hlg2631-XhoI* and *hlg5916-XhoI* with *hlg7578-SalI* (Table S2), corresponding to the chromosomal DNA regions upstream *hlgA* and downstream *hlgB*, respectively, were cloned into the pMAD, an X-gal and thermo-sensitive plasmid⁵⁸. The resulting plasmid, pLUG1041, was electroporated into RN4220, and then into USA300 and ST80. For PEN, which is macrolide resistant, the plasmid pLUG1041 was modified by insertion of the chloramphenicol resistance gene *cat* from PC194 plasmid⁵⁹ into the multiple cloning sites. Transformants were grown at non-permissive temperature (37°C), to select cells in which the plasmid had been integrated into the chromosome by homologous recombination. To favor the second recombination event, a single colony was grown at 30°C for 10 generations and plated at 37°C overnight. Cells, which have lost the plasmid vector through a double crossing over event, were detected on *Xgal* agar plates. PCR amplifications and sequencing were used to confirm the deletion of the *hlgACB* genes in the modified strains.

Absolute quantification of HlgC and HlgB in clinical strains using targeted proteomics

Targeted proteomics analyses were performed on a 6500 QTrap mass spectrometer (AB Sciex) operating in the selected reaction mode (SRM). Liquid chromatography (LC) separation was performed on an Ultimate 3000 system (Thermo Fischer) coupled to a C18 Kinetex™ column (2.6 μm, 100 Å, 2.1 mm, 10 cm) using a two-solvent system with solvent A (2% acetonitrile, 0.1% formic acid) and solvent B (80% acetonitrile, 0.1% formic acid). Peptide separation was performed over 40 min by applying a gradient from 2% to 32% solvent B in 30 min, and from 32% to 90% solvent B in 10 min, at a flow rate of 50 μL/min. Mass spectrometry data were acquired in positive mode with an ion spray voltage of 4200 V; curtain gas was used at 30 p.s.i. and the interface heater temperature was set to 320 °C. Collision exit, declustering, and entrance potentials were set to 37, 55, and 14 V, respectively. Collision energy was set to 31.4 for the YVSLINYLPK peptide and 29.2 for the SNFNPEFLSVLSHR peptide. Scheduled SRM acquisitions were performed with Q1 and Q3 quadrupoles

operating at unit resolution, the acquisition time windows and target scan time were set to 120 sec and 1.2 sec, respectively. The SRM transitions monitored were:

605.4++/[y8] – 947.6+; 605.4++/[y7] – 860.5+; 605.4++/[y6] – 747.4+; 605.4++/[y5] – 634.4+ for the YVSLINYLPK peptide

609.4++/[y8] – 955.6+; 609.4++/[y7] – 868.5+; 609.4++/[y6] – 755.5+; 609.4++/[y5] – 642.4+ for the labeled YVSLINYLP[13C6, 15N2]K peptide

549.6+++/[y8] – 958.6+; 549.6+++/[y7] – 811.5+; 549.6+++/[y6] – 698.4+; 549.6+++/[y5] – 611.4+ for the SNFNPEFLSVLSHR peptide

553.0+++/[y8] – 968/6+; 553.0+++/[y7] – 821.5+; 553.0+++/[y6] – 708.4+; 553.0+++/[y5] – 621.4+ for the SNFNPEFLSVLSH[13C6, 15N4]R peptide

Analyzing the 5' end of *hlgCB* with the 5'-phosphate-dependent exonuclease Terminator™

As previously described⁵², 20 µg of total RNAs from USA300, ST80, and PEN strains extracted from 8 h cultures were incubated for 1 h at 30°C with or without 2 U of Terminator™ exonuclease (Lucigen). RNAs were purified by phenol-chloroform alcohol isoamyl extraction and absolute ethanol precipitation, and analyzed by Northern blot as described in the main manuscript.

Relative-quantification by mass spectrometry

HlgC and HlgB relative quantifications were obtained as previously described¹⁶. Briefly, strains were cultured in 4 mL of CCY over night at 37°C with agitation, and then sub-cultured in 4 mL of CCY and incubated for 8 hours at 37°C with agitation. 1 mL of culture were collected, frozen, and stored at -80°C until denaturation step at 90°C for 1 hour. Then, samples were stored at -80°C until mass spectrometry preparation and analysis.

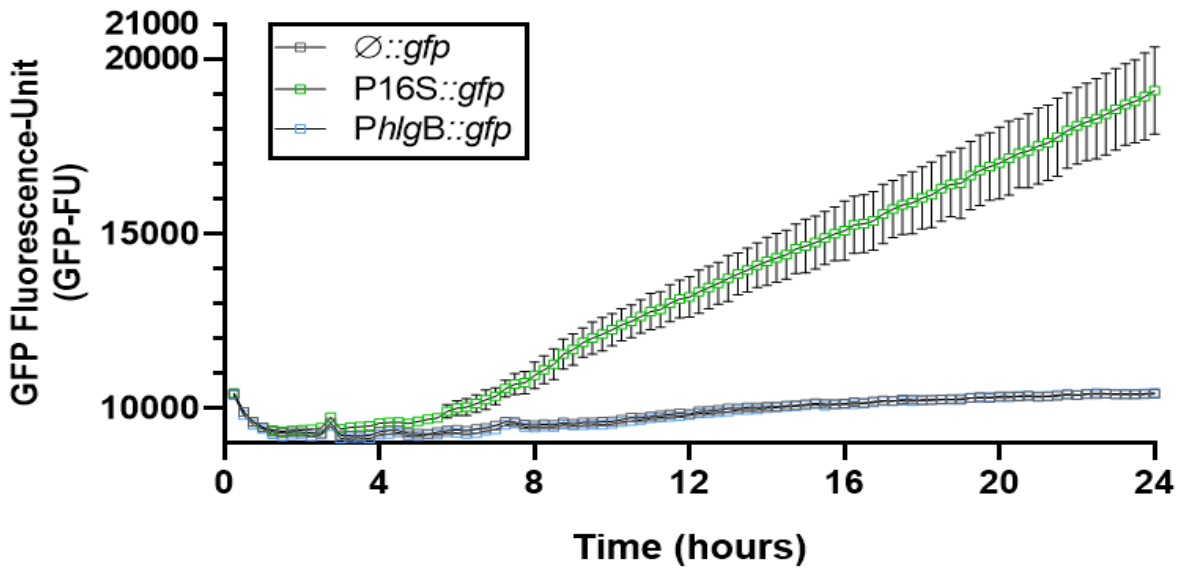


Figure S1. *hlgB* does not have its own promoter

The existence of an *hlgB*-specific promoter within the *hlgC* gene was tested using transcriptional fusions in the ST80 strain. The 926bp region upstream *hlgB* and including *hlgB* ATG was cloned into the pACL-1484 plasmid in front of the *gfp* gene (*PhlgB::gfp*). The 16S rRNA promoter was used as positive control (*P16S::gfp*) and the plasmid with no insert as a negative control ($\emptyset::gfp$). Promoter activity was measured through GFP signal quantification (GFP Fluorescence Unit – GFP-FU) overtime, during a 24h kinetic, with a 15min interval time, in CCY with chloramphenicol. Mean with standard-error from biological triplicates are represented in grey for pACL- \emptyset , in green for pACL-P16S, and in blue for pACL-*hlgB*.

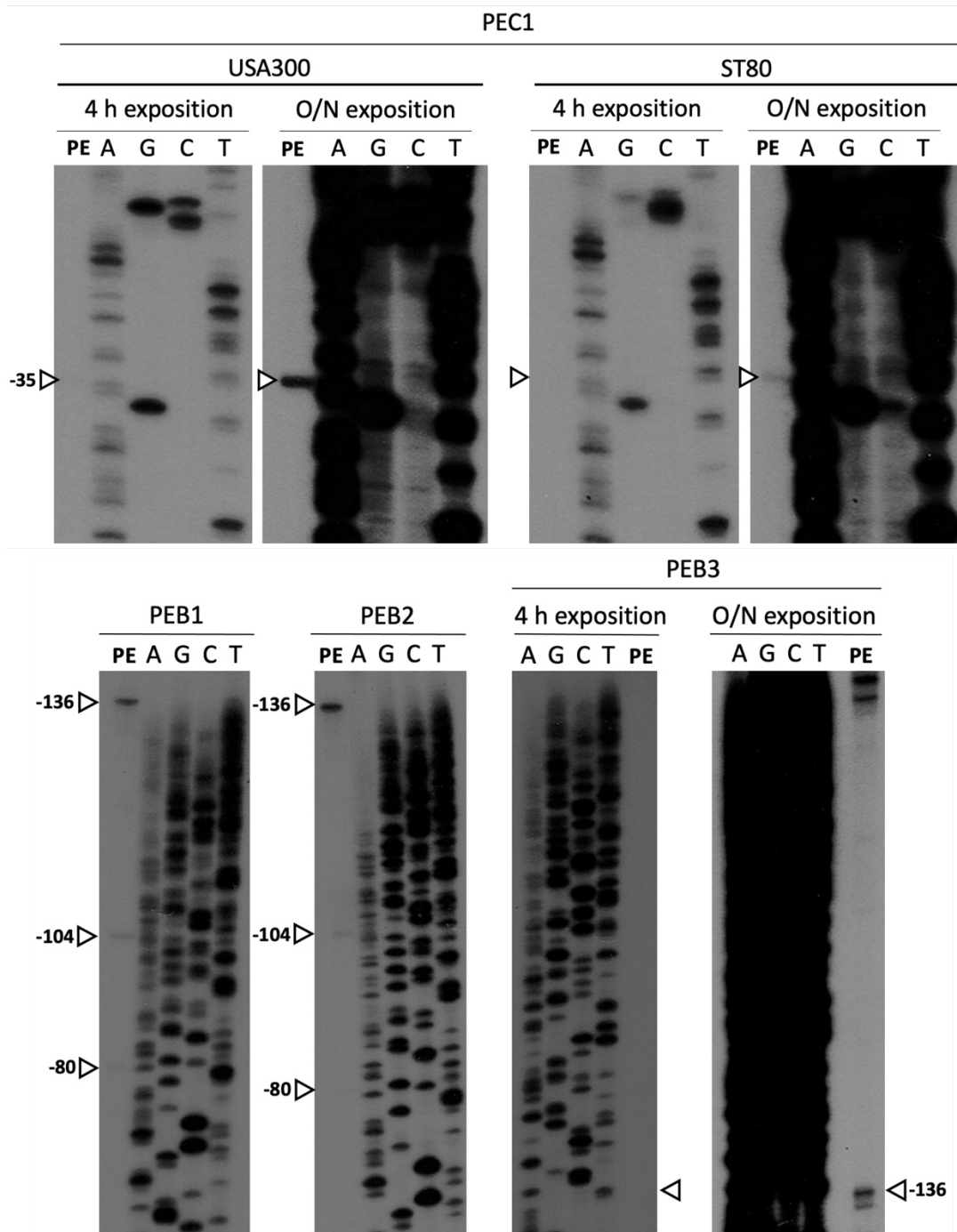


Figure S2. Primer extension assays: *hlgB* mRNA has three different +1

Primer extension assay performed on total RNA of USA300 and ST80 strains, using 5'-radiolabeled oligonucleotides complementary to *hlgC* (PEC1) and *hlgB* (PEB1, PEB2, and PEB3) sequences. Total RNAs were extracted from ST80 and USA300 strains after 8 h of growth in CCY medium. Used radiolabelled primers and exposition times (4 h and over night (O/N)) are mentioned above the gels. A, G, C, and T correspond to sequencing ladders, PE to primer extension samples, and the white arrows represent transcriptional start sites (+1) relative to *hlgC* and *hlgB* ATG positions. Data are representative of at least two independent experiments.

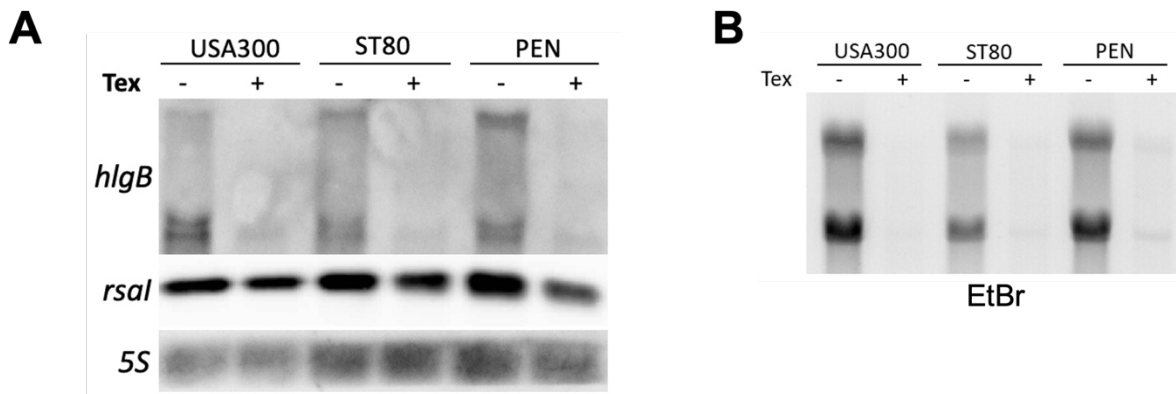


Figure S3. *hlgB* mRNA is a maturation product of the *hlgCB* transcript

Determination of the 5' end phosphorylation status of *hlgCB* and *hlgB*. (A) Twenty micrograms of total RNA extracted after 8 h of growth in CCY were treated with the Terminator™ 5'-phosphate-dependent exonuclease (\pm Tex). *hlgCB* and *hlgB* mRNAs were probed with the *hlgB* probe, *rsal* and 5S RNA were used as negative controls. (B) 16S and 23S, used as positive controls of Terminator™ 5'-phosphate-dependent exonuclease, were run on an agarose gel and stained by ethidium bromide (EtBr).

USA300	AAGAATAAAGTATCGAACCATAGTAGATACACAAATAATACAAATGAAACAATTTAACTT	60
ST80	-AGAATAAAGTATCGAACCATAGTAGATACACAAATAATACAAATGAAACAATTTAACTT	59
PEN	-AGAATAAAGTATCGAACCATAGTAGATACACAAATAATACAAATGAAACAATTTAACTT	59

USA300	GAAAGCTTAAATAAATATTATCAAGTTAATAAACAATTAATTTTTAGATGGATTCACTAA	120
ST80	GAAAGCTTAAATAAATATTCTCAAGTTAATAAACAATTAATTTTTAGATGGATTCACTAA	119
PEN	GAAAGCTTAAATAAATATTATCAAGTTAATAAACAATTAATTTTTAGATGGATTCACTAA	119

USA300	AAATCGTAAA-AAGCACAATTTGTATTTTACAAACATTAATTAATAAAGAAAGCAAGACA	179
ST80	AAATCGTAAAAAAGCACAATTTGTATTTTACAAACATTAATTAATAAAGAAAGCAAGACA	179
PEN	AAATCGTAAAAAAGCACAATTTGTATTTTACAAACATTAATTAATAAAGAAAGCAAGACA	179

USA300	TTCGTGCAATCGTTACCTTAAATTGTTTACAACGTCAACAATACCAAGTTTTATTAA	239
ST80	TTCGTGCAATCGTTACCTTAAATTGTTTACAACGTCAACAATACCAAGTTTTATTAA	239
PEN	TTCGTGCAATCGTTACCTTAAATTGTTTACAACGTCAACAATACCAAGTTTTATTAA	239

USA300	CTATATTTCTCACAAAATTAGCTTTTAGCATTCCAACAAAAAAGGTTAAATCGAACGGA	299
ST80	CTATATTTCTCACAAAATTAGCTTTTAGCATTCCAACAAAAAAGGTTAAATCGAACGGA	299
PEN	CTATATTTCTCACAAAATTAGCTTTTAGCATTCCAACAAAAAAGGTTAAATCGAACGGA	299

USA300	ATTATGGCATTTTTAACTTAATTGTAAAAAAGTTGATAATGGTCAATTGTTAATGAACA	359
ST80	ATTATGGCATTTTTAACTTAATTGTAAAAAAGTTGATAATGGTCAATTGTTAATGAACA	359
PEN	ATTATGGCATTTTTAACTTAATTGTAAAAAAGTTGATAATGGTCAATTGTTAATGAACA	359

USA300	GTTAATTATAATAACGCCCAAAATATATTATTATTTAATTAAGTTAAATAAAATTATAGA	419
ST80	GTTAATTATAATAACGTCACAAAATATATTATTATTTAATTAAGTTAAATAAAATTATAGA	419
PEN	GTTAATTATAATAACGCCCAAAATATATTATTATTTAATTAAGTTAAATAAAATTATAGA	419

USA300	AATAAAGTGAAACTT	434
ST80	AAGAAAGTGAAACTT	434
PEN	AAGAAAGTGAAACTT	434
	** *****	

Figure S4. Pairwise Sequence Alignment: only few SNPs are detected in the *hlgC* upstream region of USA300, ST80, and PEN strains

Alignment of USA300, ST80, and PEN 434 nt *hlgC* upstream sequences. Stars represent matches and blanks indicate deletion/substitution or insertion.

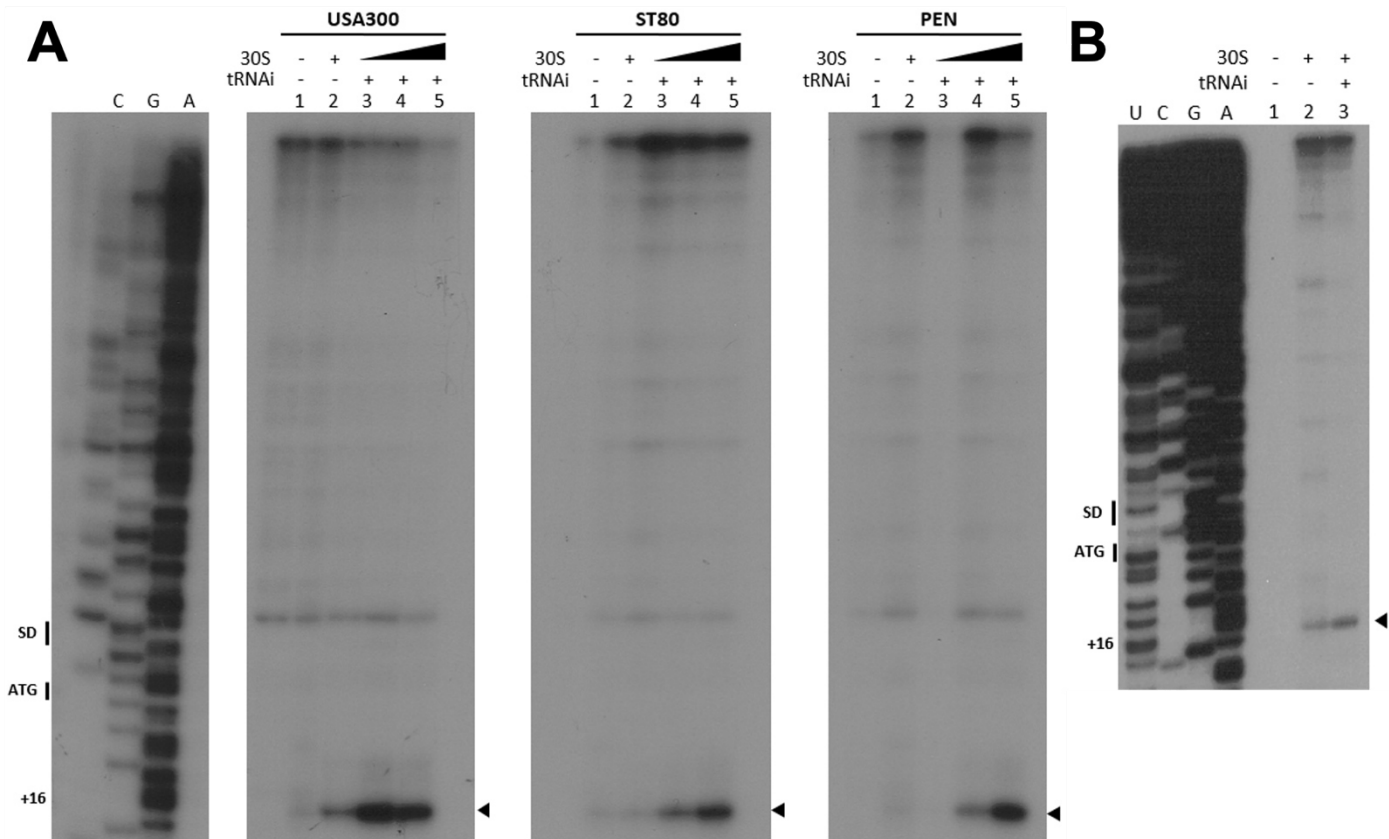


Figure S5. *hlgB* mRNA translation initiation does not require *hlgC* translation

Toe-print assays showing binding of *S. aureus* ribosomes on *hlgCB* mRNA from USA300, ST80, and PEN strains (**A**) and *hlgB* (**B**) mRNAs in *hlgB* upstream region. Lane 1: incubation control of mRNA alone; Lane 2: incubation control of mRNA with 30S subunits; Lane 3-5: formation of the ribosomal ternary complex containing mRNA (1 nM), the initiator tRNA^{fMet} (tRNAi, 1 μM), and increasing concentrations of 30S: 0.5 μM (Lane 3), 1 μM (Lane 4), and 2 μM (Lane 5). Lanes U, C, G, and A: sequencing ladders. The Shine and Dalgarno (SD) sequence, the start site of translation (ATG), and the toe-printing signal (+16) are indicated.

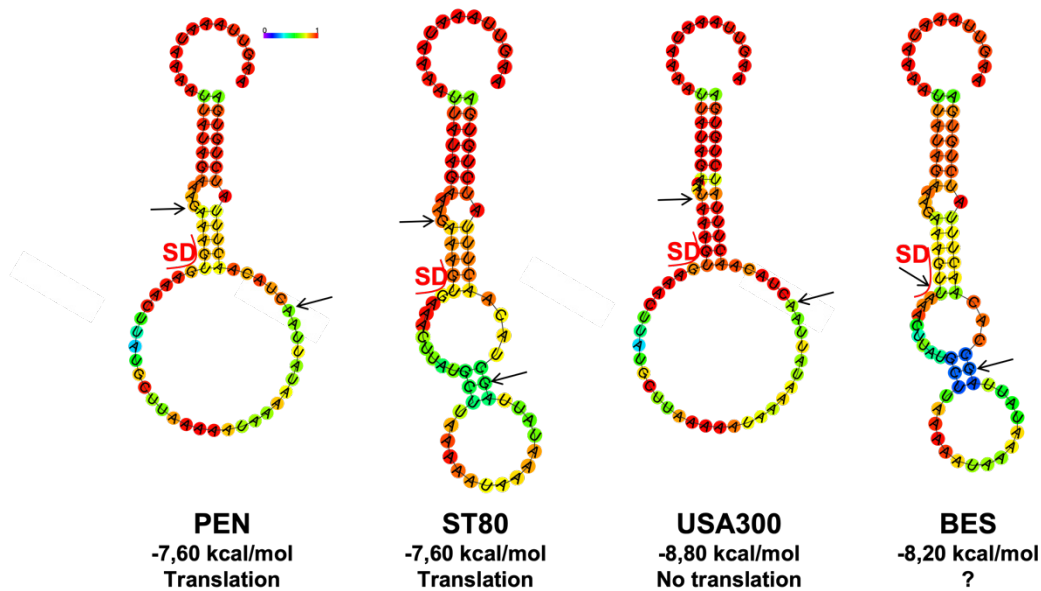


Figure S6: Secondary structure prediction of *hlgC* 5'UTR including 40 nucleotides from the coding sequence.

The prediction was done using the RNAfold web server from the Vienna RNA Websuite [70]. The nucleotides are colored by base-pairing probabilities and for the unpaired region, the color denotes the probability of being unpaired. SD is for Shine and Dalgarno sequence, and arrows denote the nucleotide changes in the four strains. The minimum free energy corresponded to the main helix. *hlgC* mRNA is translated in PEN and ST80 while translation is impaired in USA300. ? Is for unknown data.

Supplementary Table I: Relative quantities of HlgC and HlgB in PEN wild-type and mutant strains by semi-quantitative proteomic analysis.

Strains	HlgC	HlgB
PEN WT	1.5713	0.4922
PEN <Q63X	0	0.2222

Supplementary Table II: Strains and plasmids used in the study

	Descriptions	References
Bacterial strains		
<i>E. coli</i> strains		
DH5 α	Mutant <i>endA1, hsdR17, recA</i>	Lab collection
<i>S. aureus</i> strains		
RN4220	Cloning intermediate	[60]
USA300 SF8300	Community-acquired MRSA strain, <i>pvl+</i> , United States	[61]
USA300 SF8300 Δ hlg	Deletion of the hlg locus (<i>hlgA</i> and <i>hlgCB</i>)	[62]
ST80	Community-acquired MRSA strain, <i>pvl+</i> , European	[63]
ST80 Δ hlg	Deletion of the hlg locus (<i>hlgA</i> and <i>hlgCB</i>)	This study
PEN	Clinical isolate from severe community-acquired pneumonia patient, <i>pvl-</i>	[4]
PEN HlgC<Q63X	Premature stop codon in HlgC at the position 63	This study
PEN Δ hlg	Deletion of the hlg locus (<i>hlgA</i> and <i>hlgCB</i>)	This study
HG001	Derivative of 8325-4, <i>rsbU</i> restored RN1, <i>agr</i> positive	[64]
HG001 Δ rny	Deletion of <i>rny</i> (Rnase Y)	[65]
PR01	SA564RD Δ <i>pyrFE</i>	
PR01 Δ J1	Δ <i>rnjA</i> (SA0940)	[66]
PR01 Δ J2	Δ <i>rnjB</i> (SA1118)	
USA300 JE2	Community-acquired MRSA strain, <i>pvl+</i> , United States	[67]
USA300 JE2 Δ rnc	Transposon insertion in <i>rnc</i> (Rnase III) inactivating the gene	[68]
Clinical isolates from severe community-acquired pneumonia patients, <i>pvl-</i>		
BAC434	CC5-MSSA	
BAN867	CC15-MSSA	
BEL175	CC398-MSSA	
BOF419	CC45-MSSA	
BRG113	CC12-MSSA	
CHA146	CC398-MSSA	
CHO435	CC5-MSSA	
COP340	CC1-MSSA	
GRJ356	CC45-MSSA	
LAA284	CC30-MSSA	
LAC295	CC398-MSSA	
LOE344	CC398-MSSA	
MAF251	CC30-MSSA	
MAS222	CC398-MSSA	
PIA965	CC8-MSSA	
SID287	CC398-MSSA	
SUD370	CC5-MSSA	
VIS047	CC1-MRSA	
ZAF193	CC45-MSSA	
Clinical isolates from severe community-acquired pneumonia patients, <i>pvl+</i>		
ALA547	CC80-MRSA	[4]
ARR376	CC5-MRSA	
BES288	CC15-MSSA	
CAB419	CC30-MSSA	
DOM365	CC121-MSSA	
DUC355	CC30-MSSA	
ERG344	CC80-MRSA	
FAL003	CC8-MRSA	
GAJ281	CC121-MSSA	
GOH148	CC152-MSSA	
MEN612	CC1-MSSA	
MRN242	CC152-MSSA	
MSO304	CC88-MRSA	
NEJ118	CC80-MRSA	
NIA469	CC152-MSSA	
PIR088	CC121-MSSA	
QUM434	CC121-MSSA	
RIP333	CC121-MSSA	
ROJ208	CC15-MSSA	
TOM044	CC30-MSSA	
Plasmids		
<i>in vitro</i> transcription		
pUC-T7::hlgCB (U)	Plasmid used for T7 transcription of <i>hlgCB</i> from USA300 SF8300	
pUC-T7::hlgCB (S)	Plasmid used for T7 transcription of <i>hlgCB</i> from ST80	
pUC-T7::hlgCB (P)	Plasmid used for T7 transcription of <i>hlgCB</i> from PEN	
pUC-T7::hlgB	Plasmid used for T7 transcription of <i>hlgB</i>	This study
Transcriptional fusion with GFP		
pACL1484	Promoterless <i>gfpuvr</i> shuttle vector	[54]
pACL-PhlgB	The 929nt upstream and including <i>hlgB</i> start codon cloned in front of the <i>gfppuv</i> gene	
pACL-PhlgC (U)	The 434nt upstream and including <i>hlgC</i> start codon from USA300 SF8300 cloned in front of the <i>gfppuv</i> gene	
pACL-PhlgC (S)	The 434nt upstream and including <i>hlgC</i> start codon from ST80 cloned in front of the <i>gfppuv</i> gene	
pACL-PhlgC (P)	The 434nt upstream and including <i>hlgC</i> start codon from PEN cloned in front of the <i>gfppuv</i> gene	This study

pACL-P165	16S rRNA gene promoter cloned in front of the <i>gfppuv</i> gene	[55]
<u>HlgC inactivation</u>		
pCasSA-BEC	<i>S. aureus</i> base editing vector, Km ^r , Cm ^r	[49]
pCasSA-BEC- <i>hlgC</i>	pCasSA-BEC plasmid with <i>hlgC</i> spacer	This study
<u>Overexpression of hlgCB</u>		
pCN38	Shuttle vector for <i>E. coli</i> and <i>S. aureus</i>	[69]
pCN38::P3	pCN38 with P3 promoter	This study
pCN38::P3:: <i>hlgCB</i> (U)	pCN38 with P3 promoter and <i>hlgCB</i> sequence from USA300 SF8300	
pCN38::P3:: <i>hlgCB</i> (S)	pCN38 with P3 promoter and <i>hlgCB</i> sequence from ST80	
pCN38::P3:: <i>hlgCB</i> (P)	pCN38 with P3 promoter and <i>hlgCB</i> sequence from PEN	
<u>In frame deletion</u>		
pMAD	Thermosensitive origin of replication, constitutively expressed <i>bgal</i> gene	[58]
pMAD:: <i>hlg</i>	Plasmid to delete the <i>hlg</i> locus (<i>hlgA</i> and <i>hlgCB</i>)	[62]
pMAD:: <i>hlg</i> -Cm	Plasmid to delete the <i>hlg</i> locus (<i>hlgA</i> and <i>hlgCB</i>) with Chloramphenicol resistance	This study

Supplementary Table III: Oligonucleotides used in the study

Name	Sequence 5' - 3'
hlgC inactivation	
hlgC-cas9-PEN-F	GAAATATTCAATTTGATTTTGTA
hlgC-cas9-PEN-R	AAACTTACAAAATCAAATTGAATA
hlg deletion	
hlg525-SmaI	TATCCCGGGACCCTATGC
hlg2631-XhoI	ATACTCGAGTTGTAAGCGTTTTCG
hlg5916-XhoI	AAACTCGAGTAACTTATCAACGTG
hlg7578-SaII	TATGTCGACCAAAAGTTACAAGC
DIG probes	
5S-T7-R	TAATACGACTCACTATAGGGG ATTGTTCATTGCCTGGC
5S-F	GTAAGTTATTTTGTCTGGTGGCTATAGC
hlgA-T7-R	TAATACGACTCACTATAGGGG CGTTTGCTAGTAATGTCTTG
hlgA-F	CAGCAACTTTAGCAGTTGGT
hlgC-T7-R	TAATACGACTCACTATAGGGG TGGAATGGCCATCGCATAG
hlgC-F	CTGAAGACATCGGTAAAGG
hlgB-T7-R	TAATACGACTCACTATAGGGG CATAACTTTTATCTTTGATG
hlgB-F	GTCAAATCATCCGTTGCTA
RsaI-T7-R	TAATACGACTCACTATAGGGG CACGTGCTAGCCGACAAATA
RsaI-F	TAAACGGGGGAGCGATTAAA
Primer extension	
PEC1	GGATTGGCAAGAGGGGCAAG
PEB1	CAGAAAGTAATAATAATGCC
PEB2	ATTTGACTAATTTATTCATT
PEB3	GACCTCGTATTTACAGTATAG
Promoter activity	
PhlgC-EcoRI-F	GCGCGAATTCAGAATAAAGTATCGAACC
PhlgC-XbaI-R	GCGCTCTAGAGCATAAGTTTCACTTTATTTTC
PhlgB-PuvII-F-USA	GCGCCAGCTGAAGTACAACCTTTATCTGTGAG
PhlgB-PuvII-F-ST80	GCGCCAGCTGAGCTACAACCTTTATCTGTGAG
PhlgB-KpnI-R	GCGCGGTACCATCAATTCTGTCTTTACC
pALC-F	AAATACCGCATCAGGCGCCA
pALC-R	CATCACCTTCACCTCTCCA
in vitro transcription	
pUCT7-hlgC-StuI-F	TATAGGCCTAAGTTAAATAAAATTATAGAA
pUCT7-hlgB-StuI-F	TATAGGCCTAAAAGATCAACGCATTATGGC
pUCT7-hlgB-BamHI-R	TATGGATCCAAAACACGGTCGTACAATTA
Reverse transcription for toe-print	
hlgC-R	ATCGCTTCTTTACCGATGTC
hlgB-R	TAAAGTAACTTTGTCATCGAC
Overexpression of hlgCB in pCN38	
hlgCB-PstI-F	GGCCTGCAGAATTAAGTTAAATAAAATTATAG
hlgCB-BamHI-R	GGCGATCCCTAAGATAATAAATCAAAC

Restriction site sequences are underlined, the T7 promoter sequence is in bold.

III. Résultats complémentaires et perspectives

1. Autres facteurs impliqués dans la virulence des souches USA300, ST80 et PEN

Dans notre étude nous avons cherché à confirmer l'hypothèse que l'hémolysine- γ CB était impliquée dans la virulence de souches *pvl* négatives qui produisent des quantités importantes d'HlgCB. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé la souche PEN et avons confirmé avec le modèle lapin de pneumonie que sa virulence était principalement due à sa forte production d'HlgCB. Cependant la production d'HlgC à elle seule ne permet pas d'expliquer entièrement la virulence de la souche, avec une survie de 66% des lapins infectés par la souche mutante, suggérant que d'autres facteurs de virulences puissent être impliqués. En parallèle nous avons également voulu confirmer que la virulence des souches USA300 et ST80 était due à la production de PVL, ces deux souches étant *pvl* positives. Pour investiguer ces deux questions, nous avons dans un premier temps regardé par quantification absolue, en plus d'HlgCB, les quantités de PVL et d'Hla produites par ces trois souches (Figure 14) ; Hla étant un autre facteur de virulence important dans le contexte des pneumonies [85,86].

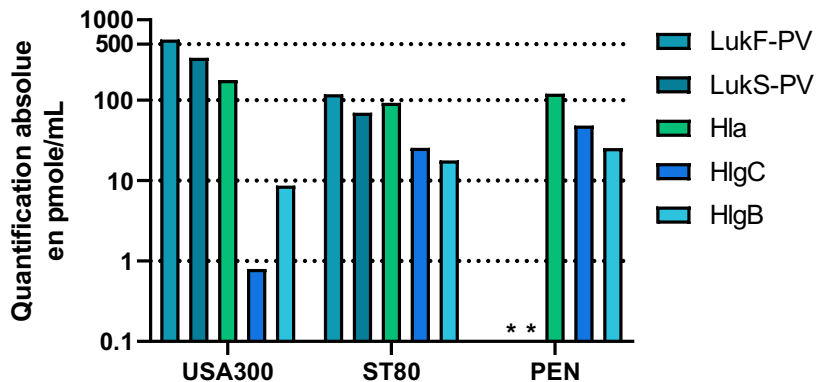


Figure 14 : Quantification absolue de la PVL, d'Hla et d'HlgCB dans les souches USA300, ST80 et PEN

Quantification absolue en pmole/mL de surnageant de LukF et LukS-PV (PVL), d'Hla et d'HlgCB par spectrométrie de masse. Les protéines ont été quantifiées à partir de surnageants collectés de culture de 8H en milieu CCY. Représentation en échelle \log_{10} , les étoiles représentent l'absence de quantification due à l'absence des gènes dans la souche.

Nous remarquons que les trois souches produisent de fortes quantités d'Hla, USA300 en tête avec 177 pmole/mL et ST80 le moins avec 92,7 pmole/mL. La souche PEN en comparaison avec ces deux souches a donc un niveau intermédiaire avec 120,9 pmole/mL. Concernant la production de PVL, nous observons une grande différence entre les souches USA300 et ST80, USA300 produisant 5 fois plus de PVL que ST80. Il est important également de remarquer ici que les quantités de LukF-PV sont en moyenne 1,7 fois supérieures à celles détectées pour

LukS-PV. Cette différence, alors que ces deux protéines sont codées en opéron, serait en grande partie due à la dégradation partielle des peptides AQUA (peptides alourdis utilisés pour la quantification absolue) utilisés lors de la quantification. Une fois ces données collectées, nous avons testé dans notre modèle lapin de pneumonie plusieurs mutants, soit déjà disponibles, soit créés pour ces expériences, dans les fonds génétiques d'USA300 et ST80 (Tableau 5). Le mutant créé contient un codon stop prématuré dans HlgC de la souche ST80, comme pour le mutant PEN utilisé dans notre étude, les mutants USA300 et ST80 déjà disponibles, ont eux été obtenus par délétion de gène par recombinaison homologue avec le plasmide pMAD, comme précédemment décrit dans notre étude.

Fond génétique	Nom des souches	Mutations	Méthode
ST80	ST80 Δpvl	Délétion <i>pvl</i>	Recombinaison homologue
	ST80 Δhla	Délétion <i>hla</i>	Recombinaison homologue
	ST80 HlgC<Q63X	Codon stop dans <i>hlgC</i>	Mutation ciblée
	ST80 $\Delta pvl\Delta hla\Delta hlg$	Délétions <i>pvl</i> , <i>hla</i> et <i>hlg</i>	Recombinaison homologue
USA300	USA300 Δpvl	Délétion <i>pvl</i>	Recombinaison homologue

Tableau 5 : Mutants testés dans le model lapin de pneumonie

Pour la souche ST80, nous avons comparé la virulence des souches simplement délétées/mutées (Δpvl , Δhla et HlgC<Q63X) ou triplement délétées ($\Delta pvl,\Delta hla,\Delta hlg$), à la souche WT (Figure 15A). La perte d'HlgC ou de la PVL n'impactent pas sa virulence, alors qu'on observe un délai dans la mortalité avec le mutant Δhla . Enfin la perte des trois toxines entraîne une perte totale de virulence, avec une survie de 100% 48h après l'infection (Figure 15A).

Pour la souche USA300, seul un mutant délété pour la PVL (Δpvl) a été testé, et pour lequel on observe une réduction significative de 50% de la mortalité comparée à la souche WT (Figure 15B). Cette réduction partielle, comme pour le mutant PEN, suggère que d'autres facteurs sont impliqués. Les résultats obtenus avec la souche ST80 et ses mutants Δhla et $\Delta pvl,\Delta hla,\Delta hlg$, nous laissent suggérer qu'Hla joue un rôle additionnel ou synergique avec

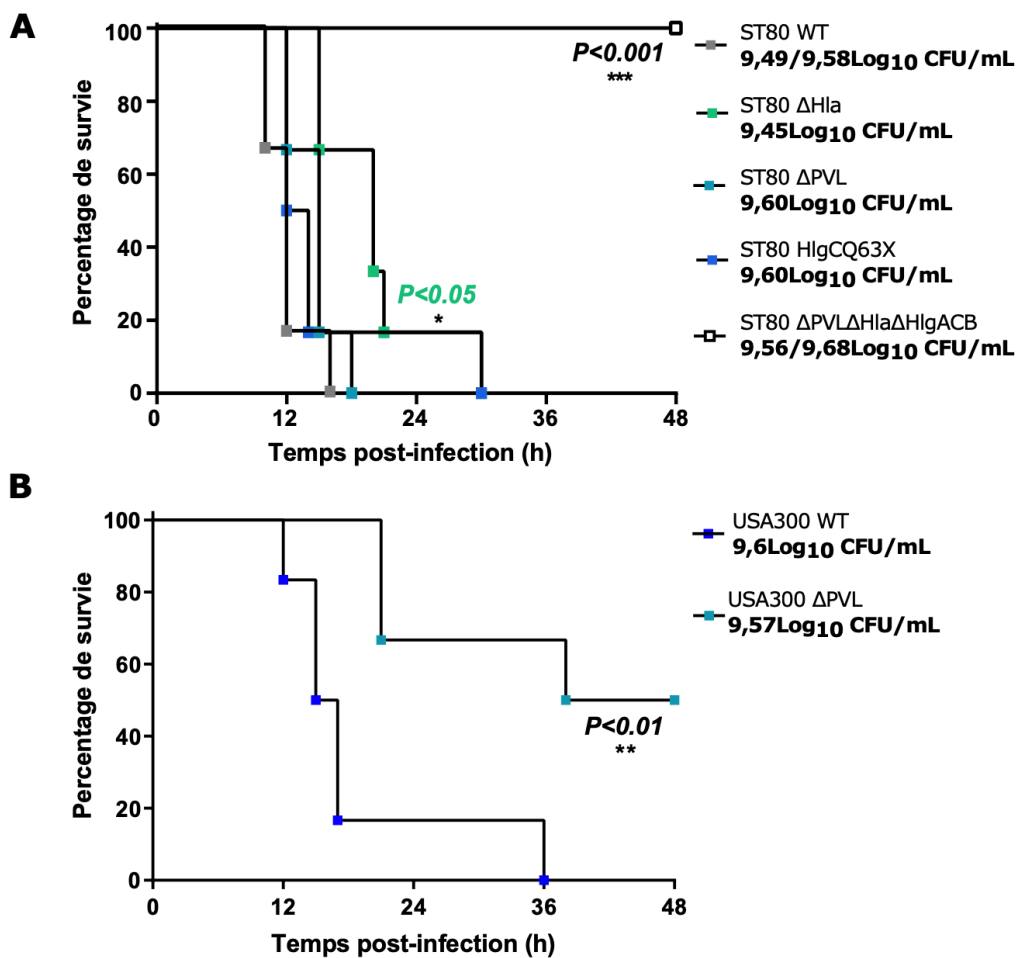


Figure 15 : Impact des toxines PVL, Hla et HlgCB dans les pneumonies chez le lapin

A. Courbe de survie Kaplan-Meier de lapin infectés par les souches ST80 WT en gris, ST80ΔHla en vert, ST80ΔPVL en bleu-vert, ST80 avec un codon stop prématuré dans HlgC en bleu (HlgC<Q63X) et ST80ΔPVLΔHlaΔHlgACB en blanc. **B.** Courbe de survie Kaplan-Meier de lapin infectés par les souches USA300 WT en bleu et USA300ΔPVL en bleu-vert. Les concentrations des inoculum utilisés sont indiqués en Log₁₀ Unité Formant des Colonies (CFU) / mL. Des tests Log-Rank (Mantel-Cox) ont été effectués pour comparer la mortalité entre les différentes souches testées ; *P < 0.05 ; **P < 0.01 ; ***P < 0.001 ; les comparaisons non significatives ne sont pas mentionnées. Pour chaque souche, 6 lapins ont été utilisés.

HlgCB et/ou la PVL. En effet, la perte d'Hla impacte la virulence de la souche ST80 alors que celle-ci produit moins d'Hla que les souches USA300 et PEN. Des doubles mutants : $\Delta pvl, \Delta hla$ pour USA300 et HlgC<Q63X, Δhla pour PEN devraient être testés pour confirmer notre hypothèse.

2. Régulation de l'expression d'*hlgCB*

Dans notre étude, nous avons mis en évidence le rôle de l'activité promotrice, de la stabilité des ARNm et de leur traductibilité sur les niveaux d'HlgCB produits. Durant ces analyses, nous avons remarqué que l'activité promotrice du promoteur *PhlgC* de la souche USA300 était plus forte dans son propre fond génétique, comparée aux deux autres. Ces résultats suggèrent la présence de régulateurs transcriptionnels exprimés uniquement ou différemment dans

ce fond génétique et reconnaissant spécifiquement cette séquence, comme aucune autre augmentation n'a été observée pour les promoteurs *PhlgC* des souches ST80 et PEN dans USA300, ni pour le promoteur *PhlgC* de la souche USA300 dans les deux autres fonds génétiques. Un moyen pour identifier les régulateurs impliqués, serait de comparer dans un premier temps les niveaux d'expression par RT-qPCR dans chaque souche des régulateurs transcriptionnels d'*hlgCB* connus (*agr*, *saeRS* et *sarA*) mais également d'autres régulateurs pour lesquels des liens dans la régulation de l'hémolysine- γ ne sont pas connus (*mgrA*, *srrAB*, *arlRS* et des facteurs sigma alternatifs) [122]. Et dans un second temps, il faudrait regarder au niveau de la séquence nucléotidique si les SNPs détectés entre les souches USA300, ST80 et PEN, impactent des séquences contenant des motifs reconnus par certains de ces facteurs, comme la Sar Box [148] ou la séquence consensus reconnu par SaeR [139].

Concernant les différences de stabilité des ARNs, nous avons surtout une forte différence pour le transcrit *hlgCB* de la souche USA300 comparé à ceux des souches ST80 et de PEN. Cette différence résulterait probablement de la non-protection du transcrit par les ribosomes au niveau d'*hlgC*, ceux-ci n'arrivant pas à se fixer en 5'-UTR. Il a déjà été montré que les transcrits non protégés par des ribosomes avaient une stabilité réduite comparée à des ARN fortement traduits [175,176]. Pour tester cette hypothèse, des expériences de ribosome profiling permettraient de comparer la densité de ribosomes entre le transcrit *hlgCB* des souches USA300 et PEN, au niveau d'*hlgC* et d'*hlgB*. Cela permettrait également de voir si l'absence de traduction d'*hlgC* dans USA300 impacte celle d'*hlgB*, avec une diminution ou non du nombre de ribosomes sur *hlgB* comparé à PEN, et donc de tester l'hypothèse d'un couplage traductionnel entre les deux gènes.

Enfin, nous avons montré qu'un seul SNP en position -13 de la région 5'-UTR dans USA300 permettait d'abolir presque totalement la production d'HlgC à partir de l'ARNm *hlgCB*. Nous avons émis l'hypothèse que cette perte de traductibilité serait due à une structure dans la partie 5'-UTR du transcrit qui empêche la fixation des ribosomes sur le RBS. Des prédictions *in silico* semblent confirmer cette hypothèse. Afin de la confirmer *in vitro* les appariements prédits et les différences de force d'interaction selon les SNPs, des expériences de SHAPE (*selective 2'-hydroxylacylation analyzed by primer extension*) peuvent être réalisées, en comparant nos trois souches d'intérêt [177].

3. *hlgB* ARNm : production et rôle

Bien que plusieurs résultats (Terminator, Primer Extension, mutant RNase Y) aient démontré que le transcrit *hlgB* est un transcrit mûré issu d'*hlgCB*, et qu'il n'y a pas de promoteur en amont d'*hlgB*, les mécanismes exacts de production de cet ARNm demeurent encore inconnus. Les différents +1 détectés suggèrent qu'il y aurait plusieurs sites de clivage, en accord avec notre hypothèse que la RNase Y ne serait pas la seule RNase responsable de la maturation. De nouveaux mutants des RNase J1 et J2 dans un fond génétique connu (USA300 ou ST80) pourraient être construits, ayant observé dans le fond génétique PR01 des profils exprimant très peu l'hémolysine- γ CB dans nos conditions. Enfin, des doubles ou triples mutants pourraient également être créés, pour confirmer l'implication d'au moins deux RNases différentes dans la maturation d'*hlgCB*.

Le rôle de ce transcrit reste également indéterminé dans nos conditions. *In vitro*, les ribosomes sont capables de s'y fixer et de le traduire pour produire HlgB. Néanmoins, les résultats de quantification absolue montrent que la majorité des souches, dont ST80 et PEN, ont tendance à avoir légèrement plus d'HlgC que d'HlgB, suggérant que le transcrit *hlgB* seul n'est pas traduit et que seul *hlgCB* l'est. Comme HlgB sert à la fois pour former HlgCB et HlgAB, il est possible que le transcrit *hlgB* ne soit traduit que dans des conditions où la toxine HlgAB est requise et non HlgCB. La toxine HlgAB permet par exemple la lyse des érythrocytes induisant la libération de fer dans le milieu [178]. Nous avons observé lors d'expériences préliminaires que l'exposition des souches USA300 et ST80 à du sang humain entraîne une forte surexpression d'*hlgA* comparé à une exposition à du milieu BHI (fold change de 80,5 pour USA300 et de 33,1 pour ST80), alors que pour *hlgB* et *hlgC* leurs surexpressions sont bien moins importantes (19,8 et 12,8 respectivement pour USA300 et 6,1 et 6,6 respectivement pour ST80) (Figure 16).

Ces expériences n'ayant été réalisées qu'une seule fois, il sera nécessaire de les reproduire, bien que des expériences similaires avaient déjà montré une forte induction de l'expression des gènes *hlg*, avec des différences similaires entre *hlgA* et *hlgCB* [134]. Ces résultats suggèrent qu'il y a une forte adaptation de la réponse induite par l'environnement perçu par *S. aureus*, et que celle-ci favorise la production spécifique d'HlgAB et non d'HlgCB. Dans ce contexte, le transcrit *hlgB* pourrait être produit et maintenu pour traduire ensuite HlgB dans

ces conditions où seul *hlgA* est exprimé en grande quantité, afin de produire et de former HlgAB. Pour tester cette hypothèse, nous pourrions réaliser les mêmes expériences mais procéder en plus à des analyses de Northern blot et de quantification absolue des protéines, en comparant la situation avant et après induction avec du sang (cible spécifique d'HlgAB) ou avec des neutrophiles (cible spécifique d'HlgCB).

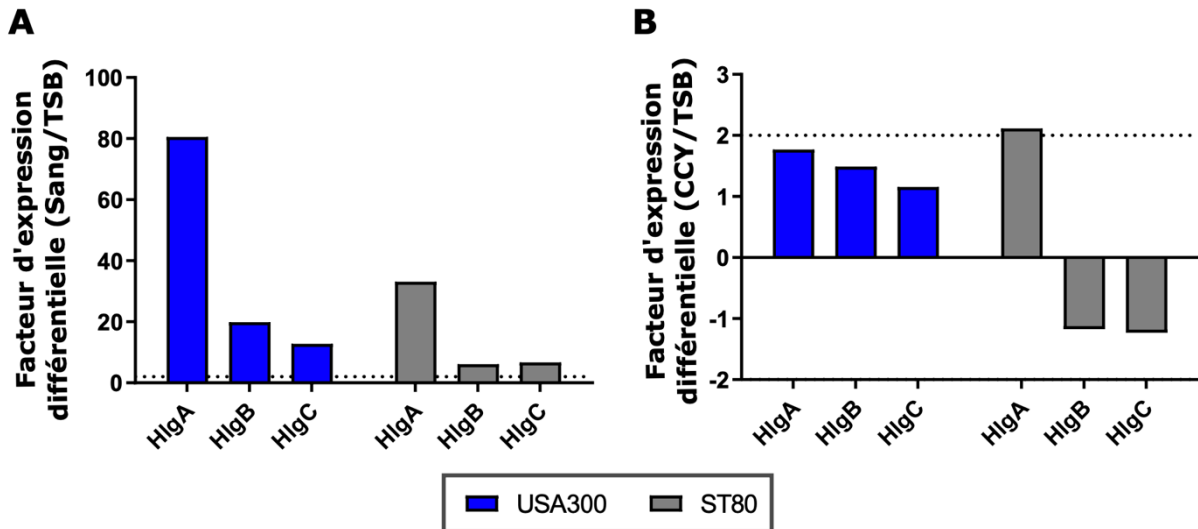


Figure 16 : L'exposition de *S. aureus* au sang induit une forte surexpression d'*hlgA*

Mesure de l'expression différentielle d'*hlgA*, *hlgC* et *hlgB* dans USA300 et ST80 après 30min d'exposition à du sang (A) ou du CCY (B) comparé à une exposition à du TSB, par RT-qPCR. Les lignes pointillées représentent le seuil d'un facteur différentiel de 2.

Axe 3 : *hlgCB*, bien plus qu'un opéron : découverte de *short hlgB (shlgB)* et *shlgB2*

I. Introduction

Le locus de l'hémolysine- γ est composé d'*hlgA* suivi de l'opéron *hlgCB* (Figure 5). Les études sur ce locus, ainsi que nos propres observations, n'ont montré à ce jour que l'existence d'un promoteur en amont d'*hlgA* permettant l'expression indépendante de celui-ci, et d'un promoteur en amont de l'opéron *hlgCB*. Cependant, une étude de transcriptomique utilisant l'approche de TSS-EMOTE (*Transcription Start Specific Exact Mapping Of Transcriptome Ends*), qui permet de déterminer les +1 de transcription des transcrits non maturés et non dégradés, a mis en évidence l'existence d'un transcrit interne à *hlgB* et plus court que les transcrits *hlgB* seuls mis en évidence dans l'Axe 2 de ce manuscrit [179]. Un tel transcrit pourrait potentiellement avoir deux rôles : (i) être traduit et produire une protéine, et/ou (ii) servir d'ARN régulateur.

Afin de confirmer l'existence de ce transcrit, et de déterminer sa ou ses fonctions, ainsi que son rôle potentiel dans la virulence de *S. aureus*, différentes approches de biologie moléculaire et de protéomique ont été réalisées.

II. Matériels et Méthodes

1. Souches bactériennes, conditions de culture et plasmides

Les souches de *S. aureus* utilisées pour cette étude sont les souches USA300 SF8300 (USA300) et ST80, précédemment décrites dans l'Axe 2 de ce manuscrit, ainsi que la souche RN4220 pour les étapes de transformation. Les bactéries ont été cultivées à 37°C avec 200 rpm d'agitation dans du milieu TSB (BD®) pour les cultures de nuit, et dans du CCY pendant 8h. Si nécessaire, du chloramphénicol a été ajouté pour atteindre une concentration finale de 10 $\mu\text{g/mL}$. La souche DH5 α d'*Escherichia coli* chimio-compétente (NEB®) a été utilisée pour des étapes de clonage, et cultivée en milieu riche S.O.C. (NEB®) à 37°C avec agitation à 200 rpm. Les plasmides utilisés et leurs caractéristiques sont listés dans le Tableau 6.

Nom du plasmide	Plasmide d'origine	Modification	Expériences
pBlun-TOPO	pBlun-TOPO	Insertion produit PCR expériences de RACE	RACE-5'
pACL::PshlgB	pACL1484	Insertion de la région promotrice <i>PshlgB</i> devant le gène <i>gfp</i>	Test d'activité promotrice en amont de <i>shlgB</i> et <i>shlgB2</i>
pACL::PshlgB2		Insertion de la région promotrice <i>PshlgB2</i> devant le gène <i>gfp</i>	
pACL::P16		Insertion de la région promotrice de l'ARNr 16S devant le gène <i>gfp</i>	
pACL::∅		Aucune	
pCN38::P3- <i>shlgB</i>	pCN38	Insertion <i>shlgB</i> sous contrôle du promoteur P3	Surexpression de <i>shlgB</i> et <i>shlgB2</i>
pCN38::P3- <i>shlgB2</i>		Insertion <i>shlgB2</i> sous contrôle du promoteur P3	
pCN38::P3-∅		Aucune	

Tableau 6 : Plasmides utilisés pour cette étude

2. Extraction d'ARN et Northern blot

Les analyses par Northern blot ont été réalisées sur les ARNs totaux collectés comme précédemment décrit dans l'Axe 2 de ce manuscrit. Les sondes utilisées sont représentées sur la Figure 17 et listées dans le Tableau 7. La réalisation des Northern blot est identique au Matériel et Méthodes de l'Axe 2.

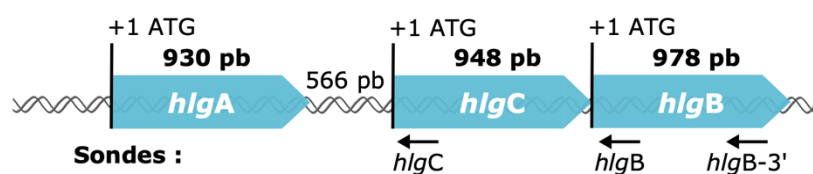


Figure 17 : Sondes utilisées pour les analyses par Northern Blot

Gène ciblé	Nom de la sonde	Début de la sonde par rapport au +1 du gène	Taille (nt)
ARNs 5S	5S		
<i>hlgC</i>	<i>hlgC</i>	+97	226
<i>hlgB</i> (en 5')	<i>hlgB</i>	+18	199
<i>hlgB</i> (en 3')	<i>hlgB-3'</i>	+758	179

Tableau 7 : Sondes utilisées pour cette étude

3. 5'- Rapid Amplification of cDNA Ends (5'- RACE)

Pour confirmer le +1 d'initiation de transcription, une 5'-RACE a été réalisée, et les oligonucléotides utilisés sont listés dans le Tableau 8. La technique de RACE repose sur l'ajout en 5' des ARN 5'-triphosphate d'un adaptateur, suivi d'une rétrotranscription (RT) spécifique à l'aide d'un oligonucléotide ciblant notre gène d'intérêt, ici *shlgB*. L'ADNc obtenu, avec en 5' l'adaptateur, permet de réaliser deux PCR consécutives dites PCR nichées, qui permettent d'augmenter les quantités d'ADN correspondant à notre transcrite d'intérêt et donc du signal recherché. Le fragment obtenu est ensuite cloné dans un plasmide afin d'être séquencé. Le +1 de notre transcrite correspond alors à la séquence située directement après celle de l'adaptateur situé en 5' (Figure 18).

Nom	Séquence	Expériences
Ctrl- <i>shlgB</i> -RACE	CTTAAAGCTACTGGGAATAT	RACE-5'
Inner- <i>shlgB</i> -RACE	CCACCAGATAAACCATTAGAG	
Outer- <i>shlgB</i> -RACE	GCTATCTCTCCATAAGGTCC	
PstI - <i>shlgB</i> -F	GGC CTGCAG TACTTTAGTACTTAAAGCTAC	Surexpression de <i>shlgB</i> et <i>shlgB2</i>
BamHI - <i>shlgB</i> -R	GGC GGATCC GAATGGCAGTACTACTAAG	
PstI - <i>shlgB2</i> -F	GGC CTGCAG AAACCTAATCTAATGAC	
<i>gyrB</i> -F	GGTGGCGACTTTGATCTAGC	Analyse par RT-qPCR
<i>gyrB</i> -R	TTATACAACGGTGGCTGTGC	
<i>hu</i> -F	TTAGCTGCAGCACGTTAC	
<i>hu</i> -R	AAAAAGAAGCTGGTTCAGCAGTAG	
<i>hlgC</i> -F	CAATCAGCCCCATCACTCGG	
<i>hlgC</i> -R	TCGCTTTGACGCCCATAAA	
<i>hlgB</i> -F	GCTGGGGAGTTGAAGCACAT	
<i>hlgB</i> -R	CAGCGTATGCACTGCTTTGT	
<i>hlgA</i> -F	AGGCAGTGGCTCATTCAACT	
<i>hlgA</i> -R	ACTTGACCATTCCGGTGTAAACG	
<i>lukF</i> -F	CTAACGGCTTGTCAGGTGGA	
<i>lukF</i> -R	CTGCCATATGGTCCCCAACC	
<i>lukS</i> -F	GCTGCAACATTGTCGTTAGGAA	
<i>lukS</i> -R	GACTACCTCAGCGCCATCAC	
<i>hla</i> -F	GTGTATGACCAATCGAAACATTTGCA	
<i>hla</i> -R	GGTAATGTTACTGGTGATGATACAGGAA	
RNAIII-F	GGAAGGAGTGATTTCAATGG	
RNAIII-R	GGGATGGCTTAATAACTCATA	
<i>psma3</i> -F	TATCAAAAAGCTTAATCGAACAATTC	
<i>psma3</i> -R	CCCCTTCAAATAAGATGTTTCATATC	

Tableau 8 : Oligonucléotides utilisés pour cette étude

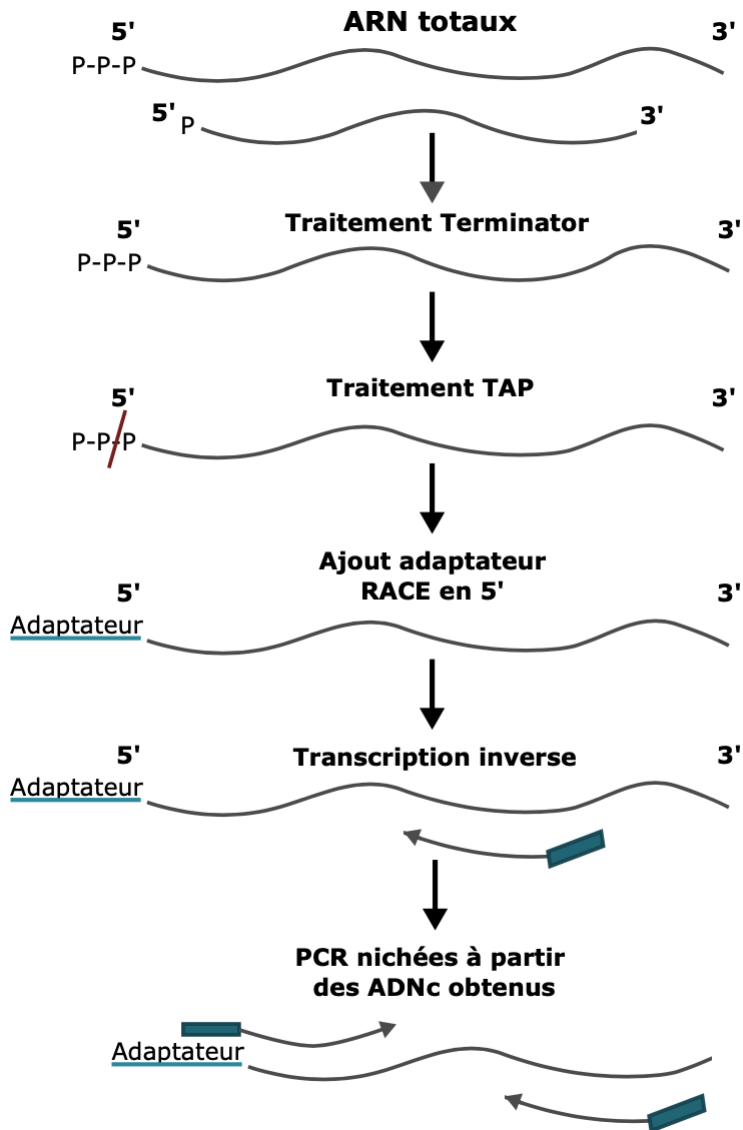


Figure 18 : Principales étapes de la RACE-5'
 La technique de RACE-5' permet de déterminer l'extrémité 5' d'un ARN. A partir des ARN totaux, un traitement avec l'exonucléase Terminator est réalisé afin de ne garder que les ARN 5' triphosphates, puis un second traitement avec l'enzyme Tobacco Acid-Pyrophosphatase (TAP) pour obtenir des ARN 5' monophosphates. L'extrémité 5' monophosphate permet l'ajout en 5' d'un adaptateur par ligation. Une étape de rétrotranscription est ensuite réalisée, avec l'oligonucléotide choisi pour étudier notre ARN d'intérêt. Une fois les ADNc obtenus, deux PCR nichées sont réalisées, utilisant des oligonucléotides dans l'adaptateur en 5' et dans notre gène d'intérêt. Les fragments de PCR ainsi obtenus sont ensuite analysés par séquençage.

Pour réaliser la 5'-RACE, les ARN totaux de la souche USA300 provenant de culture en CCY de 8h, ont été extraits à l'aide du kit « RNeasy Plus Mini » (Qiagen®) selon les instructions du fabricant. Afin d'éviter toutes contaminations par de l'ADN, un traitement à la Turbo DNase avec le kit « TURBO DNA-free » (Invitrogen) est appliqué, selon les recommandations du fabricant. Les ARN sont ensuite traités avec l'exonucléase Terminator (Lucigen) comme précédemment décrit dans l'Axe 2 du manuscrit, pour ne garder que les ARNs 5'-triphosphate. Une fois traités, les ARNs sont concentrés par des étapes de lavage dans du chloroforme puis de l'isopropanol, et de précipitation dans de l'éthanol absolu avant d'être finalement resuspendus dans de l'eau, comme décrit dans le protocole du kit « FirstChoice® RLM-RACE Kit » (Ambion). Les étapes suivantes ont été réalisées avec le kit « FirstChoice® RLM-RACE

Kit » en suivant les recommandations du fournisseur. Tout d'abord les ARNs traités et concentrés ont été traités avec l'enzyme Tobacco Acid-Pyrophosphatase (TAP) pour que nos ARNs deviennent 5'-monophosphate. Une fois cette étape réalisée, l'adaptateur est ligaturé en 5' des ARNs avec l'enzyme T4 RNA ligase. À partir de ces ARNs, une RT avec l'oligonucléotide RT-*shlgB* (Tableau 8) a été effectuée, suivie de la première PCR sur les ADNc obtenus, en utilisant la TaqPhusion (Thermo). Les mixes PCR utilisés ainsi que le programme PCR sont décrits dans les Tableaux 9 et 10 respectivement. Une seconde PCR est ensuite réalisée avec les produits PCR de la première PCR en utilisant les mêmes mixes et le même programme que précédemment, sauf pour la matrice utilisée, avec ici 2 µL de produit PCR au lieu de 1 µL de produit de RT, et les amorces inner au lieu des amorces outer. Les produits PCR des PCR 1 et 2 sont déposés dans un gel acrylamide et vérifiés après migration par électrophorèse. La bande correspondant à la taille attendue est prélevée, l'ADN extrait du gel puis inséré dans le plasmide pBlunt-TOPO du kit « PCR Zero Blunt™ TOPO™ » (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur. Les constructions obtenues sont clonées par transformation dans la souche d'*E. coli* DH5α, et les plasmides sont ensuite extraits puis séquencés.

	Produit RT / PCR outer	Tpx 5X	dNTP 2mM	Oligo RACE 5'	Oligo outer / inner	Oligo Ctrl	ADNg	H2O	Taq Phusion
PCR outer / inner	1 µl / 2 µl	10 µl	5 µl	2,5 µl	5 µl	/	/	26 µl	0,5 µl
Contrôle ADN	1 µl / 2 µl			/		2,5 µl	1 µl	23,5 µl	
Contrôle -	/			2,5 µl		/	/	27 µl	

Tableau 9 : Mixes PCR réalisés pour les PCR nichées de la RACE-5'

Étape cycle PCR	Temps	Température	Nombre de cycles
Pré-chauffe	/	98°C	/
Dénaturation	30s	98°C	/
Dénaturation	5s	98°C	X35
Hybridation	30s	60°C	
Élongation	30s	72°C	
Élongation finale	5min	72°C	/

Tableau 10 : Programme PCR réalisé pour les PCR nichées de la RACE-5'

4. Test de régions promotrices : fusions transcriptionnelles

Afin de tester la présence de région promotrice dans et en amont d'*hlgB*, des fusions transcriptionnelles dans le plasmide pACL1484 ont été réalisées comme décrit précédemment. Les régions testées sont décrites dans la Figure 19.

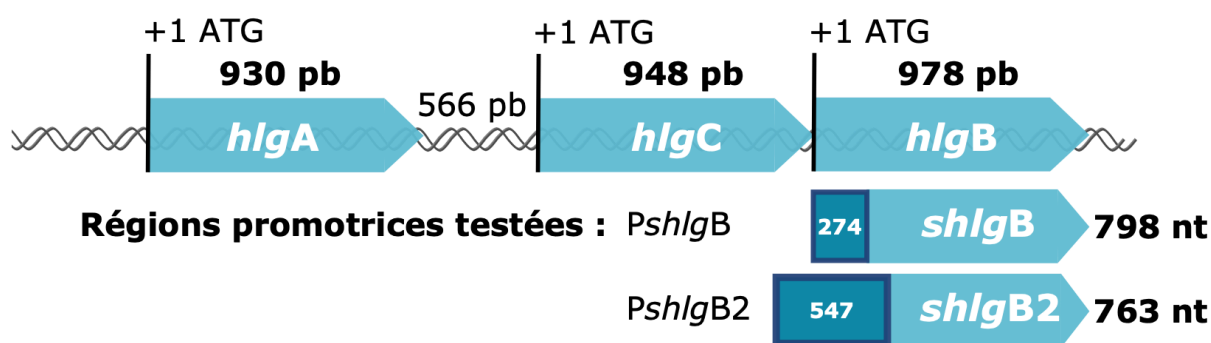


Figure 19 : Schéma des potentielles régions promotrices testées

5. Surexpression de *shlgB* et *shlgB2*

Dans le but d'étudier le rôle des transcrits *shlgB* et *shlgB2*, ces deux transcrits ont été clonés dans le plasmide pCN38, sous contrôle du promoteur P3, afin de permettre leur surexpression. La construction de ces plasmides a été réalisée comme précédemment décrit dans l'Axe 2, en utilisant les oligonucléotides listés dans le Tableau 8 et les enzymes de restriction adéquates. Les souches transformées ont été cultivées pendant 8h en CCY avec chloramphénicol, et des échantillons (culture totale, surnageant et culot bactérien) ont été collectés à 4h et 8h.

6. Extraction d'ARN et analyse RT-qPCR

Pour procéder à une analyse quantitative des ARN, des RT couplées à des PCR quantitatives (RT-qPCR) ont été réalisées.

Les ARNs ont été extraits de culots bactériens obtenus à partir de 500 μ L de culture. Après une étape de lavage avec une solution de *phosphate buffered saline* 1X (Gibco), le culot bactérien est resuspendu dans 200 μ L de solution de Tris à 10 mM et lysé enzymatiquement par ajout de 10 μ L de lysostaphine à 2,5 mg/mL et incubation pendant 1h à 4°C puis 10 min à

37°C. Les ARNs sont ensuite extraits avec le kit « RNeasy Plus Mini » (Qiagen®) puis traités avec le kit « TURBO DNA-free » (Invitrogen) comme précédemment décrit.

Après vérification par PCR d'absence de contamination par des ADN, une RT est réalisée avec le kit « Reverse Transcription System » (Promega), en utilisant les *random oligonucleotides* et un temps d'élongation de 25 min à 42°C. Les ADNc obtenus sont dilués au 1/5^{ème} et gardés à -20°C jusqu'à utilisation.

Les qPCR ont été réalisées avec l'appareil StepOnePlus Système (Applied Biosystems) et en utilisant le réactif PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems). Les gènes du locus de l'hémolysine- γ (*hlgA*, *hlgC* et *hlgB*), ainsi que plusieurs gènes de facteurs de virulence de *S. aureus* (*lukF* et *lukS-PV* (*pvl*), *hla* (hémolysine- α), l'ARNIII et *psm α 3*) ont été quantifiés en utilisant les oligonucléotides listés dans le Tableau 8. Brièvement, dans une plaque de 96 puits, 10 μ L du mixe suivant ont été déposés en dupliquât pour chaque échantillon : 5 μ L de PowerUp SYBR Green, 1 μ L de l'amorce Forward et 1 μ L de l'amorce Reverse à 5 μ M, 2 μ L d'eau et 1 μ L d'ADNc préalablement dilué. Les réactions d'amplification ont été réalisées avec le programme suivant : 2min à 95° ; puis 40 cycles avec 15s à 95°C, 15s à 60°C et 1min à 72°C ; puis 15s à 95°C suivi d'1min à 60°C, et enfin une dernière étape permettant de déterminer la *melt curve* de nos gènes. Les gènes rapporteurs *hu* et *gyrB* ont été utilisés pour normaliser les résultats obtenus (Tableau 8), et la formule $2^{\Delta\Delta CT}$ a été appliquée pour obtenir l'expression relative de nos gènes [180]. Afin de quantifier l'effet de la surexpression de nos transcrits, le rapport d'expression différentiel a été calculé en divisant l'expression relative de ces gènes d'intérêt lorsque nous avons surexprimé *shlgB* ou *shlgB2* sur notre condition contrôle P3 seul (P3-*shlgB* ou B2 / P3- \emptyset).

7. Protéomique

En plus de l'impact au niveau transcriptionnel, nous avons voulu regarder si la surexpression de ces transcrits se retrouvait également au niveau protéique. Pour ce faire, nous avons quantifié, grâce à la méthode de spectrométrie de masse développée dans l'Axe 1, les facteurs de virulence suivis en RT-qPCR (HlgA, HlgC, HlgB, LukF et LukS-PV, Hla) ou des facteurs de virulence associés (Hld pour l'ARNIII et PSM α 1 pour *psm α 3*). Les rapports de quantification différentielle ont été calculés en divisant les résultats semi-quantitatifs obtenus lorsque nous avons surexprimé *shlgB* ou *shlgB2* sur notre condition contrôle (P3-*shlgB* ou B2 / P3- \emptyset).

III. Résultats

1. Confirmation de l'existence du transcrit et de son extrémité 5'

Dans un premier temps nous avons voulu confirmer l'existence du transcrit trouvé par l'approche de TSS-EMOTE. Pour ce faire, nous avons étudié les ARNs d'USA300 et ST80 par Northern blot et en utilisant une sonde supplémentaire comparé à celles utilisées dans l'Axe 2, complémentaire de la partie 3'-UTR du gène *hlgB* (Figure 17 et 20).

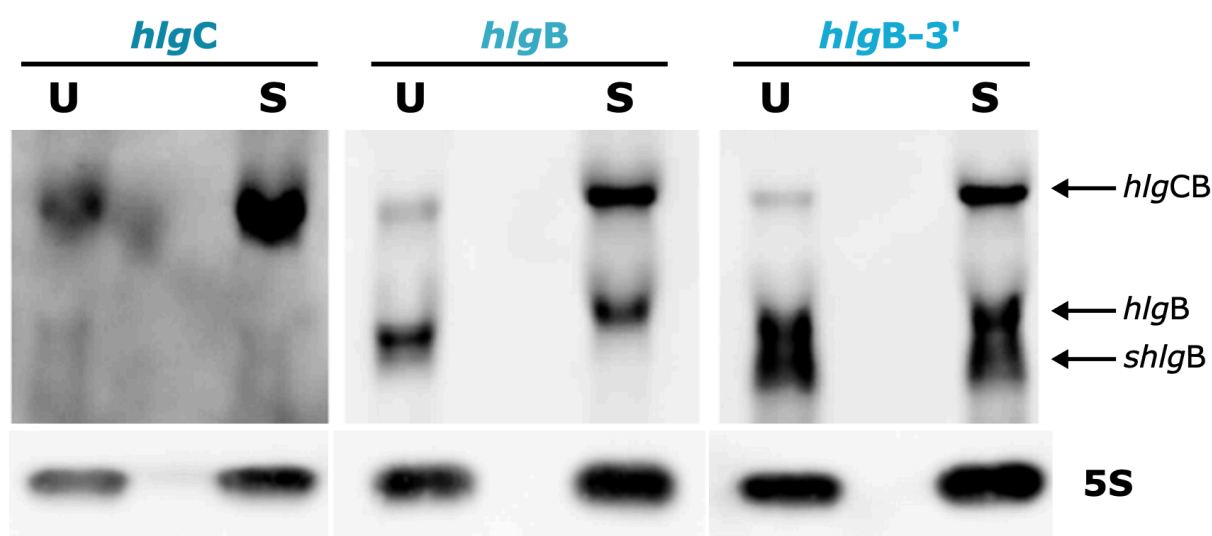


Figure 20 : Détection de *shlgB* par Northern Blot

Détection de *shlgB* dans les ARN des souches USA300 et ST80 par Northern Blot. Les ARN totaux de culture de 8H en CCY ont été analysés avec trois sondes : *hlgC*, *hlgB* et *hlgB-5'*. Les ARN détectés sont mentionnés à droite du panel. L'ARNr 5S a été utilisé comme contrôle des quantités d'ARN déposées.

Comme précédemment observé, USA300 possède peu de transcrit *hlgCB* et une quantité plus importante de transcrit *hlgB* seul, alors que ST80 exprime en comparaison plus d'*hlgCB* qu'USA300 et une quantité d'*hlgB* moindre comparée à celle d'*hlgCB*, en regardant les résultats obtenus avec les sondes *hlgC* et *hlgB* (Figure 20). Concernant les résultats obtenus avec la sonde *hlgB-3'*, celle-ci permet d'observer les transcrits *hlgCB* et *hlgB* seul comme avec la sonde *hlgB*, mais des signaux supplémentaires pour USA300 et ST80, de taille inférieure à *hlgB* seul (Figure 20). Ce signal bien qu'important par son intensité, est néanmoins sous forme de *smear* suggérant soit une dégradation du transcrit soit plusieurs transcrits de tailles légèrement différentes.

Afin de tester cette seconde hypothèse et de vérifier les résultats obtenus par l'étude du TSS-EMOTE, des expériences de RACE-5' ont été réalisées. Contrairement à l'étude de TSS-EMOTE, où les ARNs ont été extraits d'une culture en début de phase exponentielle en milieu pauvre RPMI, nous avons utilisé ici des ARNs issus de culture en milieu riche et en début de phase stationnaire. Les résultats de séquençage ont permis de déterminer un seul +1 en position +271 par rapport au codon start d'*hlgB*, et 45 nt en aval du +1 déterminé par TSS-EMOTE (Figure 21).

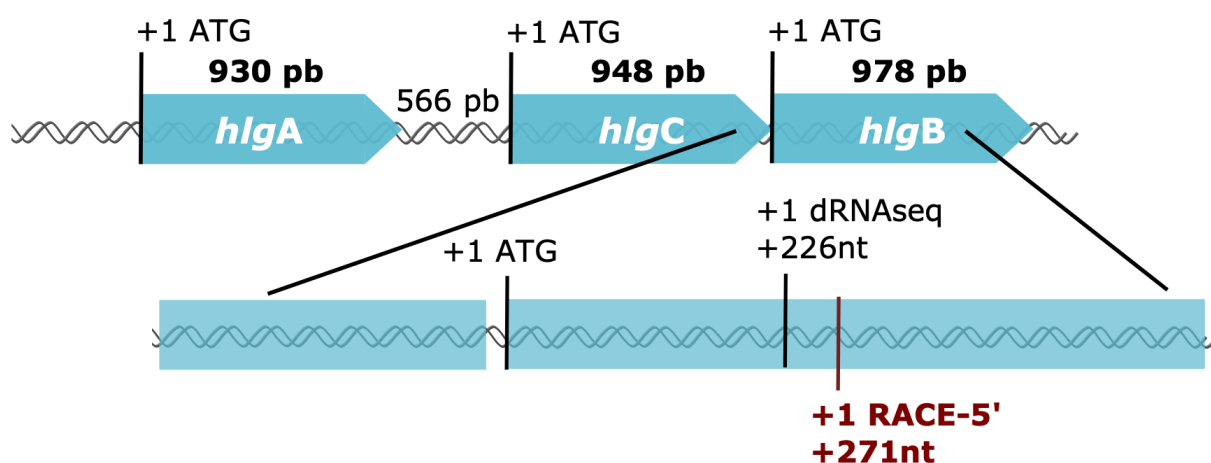


Figure 21 : Résultat des expériences de RACE-5'

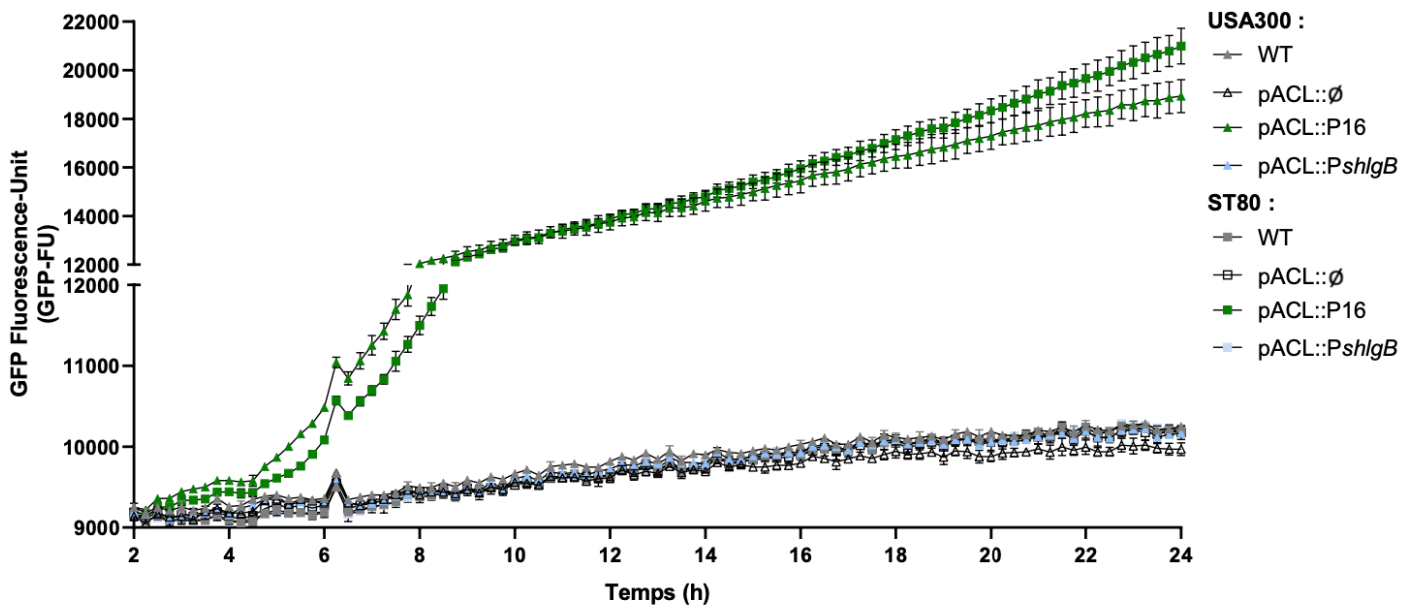
Les résultats de séquençage obtenus suite aux expériences de RACE-5' sont schématisés en bordeaux (+1 RACE-5'), ainsi que celui obtenu dans l'étude de TSS-EMOTE par Prados et *al.* 2016 (+1 dRNAseq). Cinq fragments PCR ont été séquencés pour les résultats de RACE-5' et ont tous donné le même +1.

Pour la suite des expériences nous avons donc travaillé sur les deux transcrits identifiés, nommés ici : *short hlgB* (*shlgB*) pour celui avec le +1 déterminé par TSS-EMOTE, et *short hlgB2* (*shlgB2*) pour celui déterminé avec la RACE-5'. La terminaison de ces transcrits a été supposée être la même que pour *hlgCB*.

2. Origines des transcrits : ARN *de novo* ou maturés ?

Un premier objectif a été de déterminer si ces transcrits étaient le produit d'un promoteur, comme le suggèrent les expériences de TSS-EMOTE et de 5'-RACE, ou bien s'ils sont comme *hlgB* seul, des produits de maturation du transcrit *hlgCB* ou *hlgB*. Pour vérifier ces hypothèses, nous avons à l'aide de fusions transcriptionnelles testé si les régions en amont de ces deux transcrits contiennent un promoteur (Figures 19 et 22).

A : Région promotrice *PshlgB*



B : Région promotrice *PshlgB2*

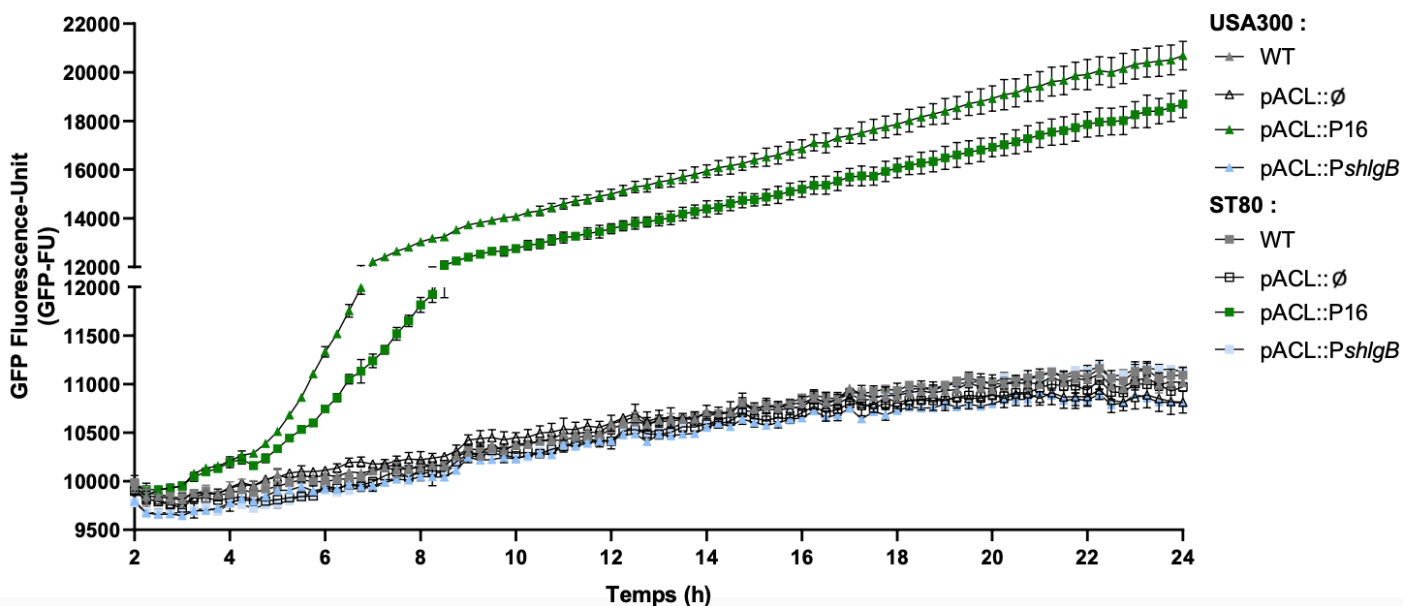


Figure 22 : Absence d'activité promotrice en amont de *shlgB* et *shlgB2*

Figure 22 : Absence d'activité promotrice en amont de *shlgB* et *shlgB2*

La présence de promoteur en amont de *shlgB* et *shlgB2* a été testée dans les souches USA300 et ST80 avec des fusions transcriptionnelles utilisant les régions *PshlgB* et *PshlgB2* en amont du gène rapporteur *gfp* dans le plasmide pACL1484. Les souches d'USA300 et ST80 ont été cultivées en plaque 96 puits, dans du CCY avec du chloramphénicol, pendant 24H, et l'intensité du signal GFP mesuré toutes les 15min. Les souches wild-type (WT) et celles transformées avec le plasmide sans région testée (pACL::Ø) ont été utilisées comme témoins négatifs, et les souches avec le plasmide contenant le promoteur de l'ARNr 16S (pACL::P16) comme témoin positif.

Comme observé dans USA300 et dans ST80, aucune différence n'est observable entre les témoins négatifs et nos régions testées (Figure 22), suggérant que les deux transcrits seraient des produits de maturation de l'opéron *hlgCB* plutôt que des transcrits *de novo*. Cependant, il n'est pas à exclure que nos conditions de cultures ne soient pas optimales pour permettre l'activation de promoteurs potentiels, et donc leur détection, notamment pour *shlgB* qui a été détecté dans des conditions très différentes.

3. Fonction de ces transcrits et leur impact dans la virulence de *S. aureus*

Le second objectif de cette étude a été de déterminer le ou les rôles potentiels de ces transcrits. Ayant comme hypothèse que l'hémolysine- γ puisse être une des cibles directes ou indirectes de ces transcrits, la création de mutant par délétion n'était pas possible, au risque de ne pas pouvoir étudier l'impact sur *hlgB*. Donc pour observer leurs fonctions, une approche par surexpression a été réalisée. Les deux transcrits ont été placés sous contrôle du promoteur P3, promoteur fort, dépendant du *quorum sensing*, et l'impact sur plusieurs facteurs de virulence a été investigué au niveau transcriptomique et protéomique.

1. *shlgB* et *shlgB2* up-régulent l'ARNIII et ses cibles

Dans un premier temps, la surexpression des transcrits a été vérifiée par Northern blot pour le temps 8h (Figure 23). On remarque que pour les deux fonds génétiques, un fort signal est obtenu dans les contextes de surexpression (P3::*shlgB* et P3::*shlgB2*) pour *shlgB* et *shlgB2*, avec un signal plus fort pour *shlgB* que pour *shlgB2*. On peut également observer qu'en

absence de surexpression (P3::∅) il y a un signal assez important pour USA300 correspondant à *shlgB/B2* contrairement à ST80 où presque aucun signal n'est détecté.

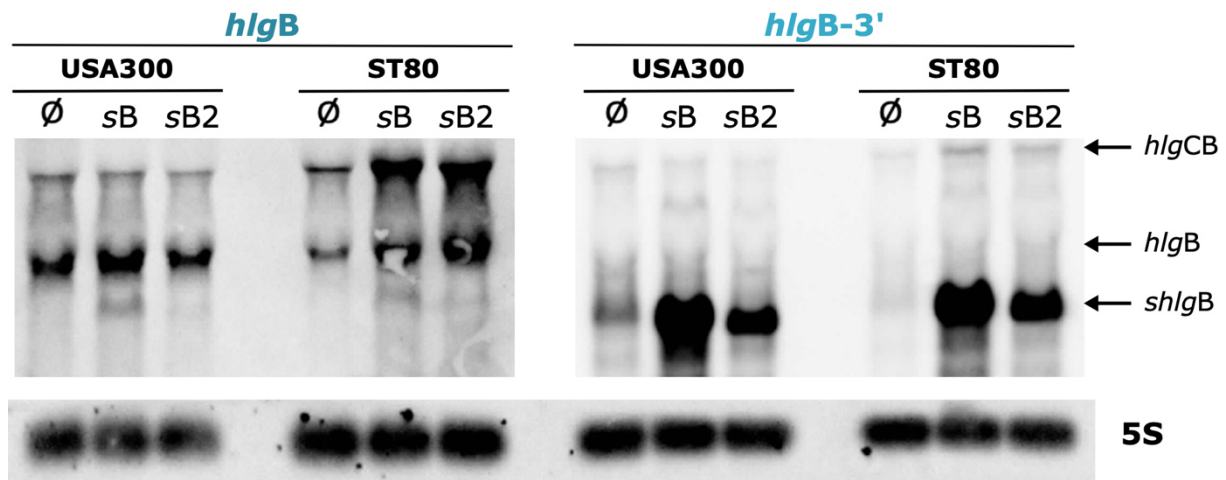


Figure 23 : Surexpression des ARN *shlgB* et *shlgB2* dans les souches USA300 et ST80

Visualisation par Northern Blot de la surexpression des ARN *shlgB* (sB) et *shlgB2* (sB2) sous le contrôle du promoteur P3 dans les souches USA300 et ST80 après 8H de culture en milieu CCY. Deux sondes ont été utilisées : la sonde *hlgB* ciblant la partie 5' d'*hlgB*, et la sonde *hlgB-3'* qui cible une région plus en aval et qui permet la détection de *shlgB* et *shlgB2*. Les souches USA300 et ST80 avec le plasmide pCN38 vide (∅) servent de contrôle négatif. L'ARNr 5S sert de contrôle de dépôt. Les ARN visualisés sont identifiés à droite du panel.

Nous avons ensuite étudié l'impact de cette surexpression sur l'expression de plusieurs facteurs de virulence : *hlgA*, *hlgC* et *hlgB*, *lukF* et *lukS-PV*, *hla*, RNAIII et *psmA3*, par quantification en RT-qPCR au temps 4h et 8h (Figure 24A et B).

Nous remarquons tout d'abord que les résultats obtenus avec la surexpression de *shlgB* sont très similaires à ceux obtenus avec *shlgB2*. Tous deux ont peu d'effet sur l'expression des gènes du locus de l'hémolysine- γ à 4h et 8h, indépendamment du fond génétique, avec des valeurs comprises en majorité entre -2 et 2 (valeurs seuils communément fixées pour parler de différences biologiquement pertinentes). On remarque également peu d'effet sur la PVL, excepté pour USA300 à 4h avec la surexpression de *shlgB* (*lukS-PV* x 3 et *lukF-PV* x 5,5). Pour *hla*, nous observons de légères surexpressions à 4h, dans USA300 avec *shlgB* (*hla* x 3,24) et dans ST80 avec *shlgB2* (*hla* x 4,66). Enfin, d'importantes surexpressions ont été mesurées pour RNAIII et *psmA3*, dans les deux fonds génétiques, pour les deux transcrits et aux deux temps, même si les surexpressions les plus importantes ont été détectées en majorité à 4h (RNAIII x 11,33 dans ST80 avec *shlgB2*, *psmA3* x 9,71 dans USA300 avec *shlgB* et x 11,59 et x 20,32 avec

shlgB2 dans USA300 et ST80 respectivement). L'ensemble de ces résultats suggère que *shlgB* et *shlgB2* auraient sensiblement le même rôle avec les mêmes cibles malgré quelques différences selon le fond génétique. De plus, leurs impacts sont plus importants à 4h qu'à 8h, bien que cette différence puisse s'expliquer en partie par une surexpression plus importante à 4h de *shlgB* et *shlgB2* qu'à 8h (Figure 24C et D).

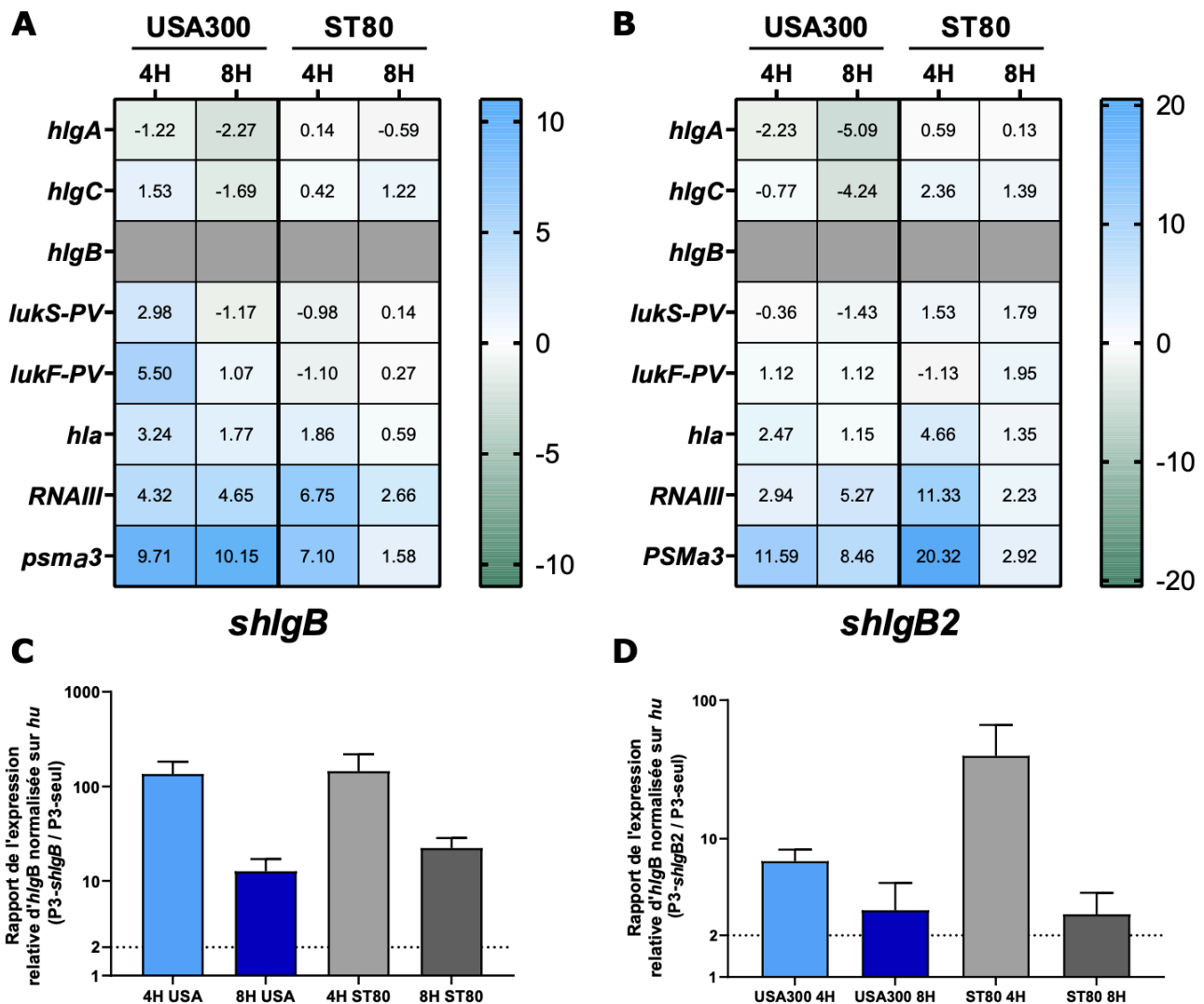


Figure 24 : Impacts de la surexpression de *shlgB* et *shlgB2* sur la virulence de *S. aureus* au niveau transcriptionnel

Mesure de l'expression différentielle de plusieurs facteurs de virulence de *S. aureus* par RT-qPCR quand *shlgB* (A) ou *shlgB2* (B) sont surexprimés, comparée à la condition contrôle (pCN38-P3:: \emptyset), à 4H et 8H de culture en milieu CCY, pour les souches USA300 et ST80. L'expression différentielle d'*hlgB* est représentée dans les panels (C) et (D), selon si *shlgB* (C) ou *shlgB2* (D) sont surexprimés. Ces expressions différentielles comprennent en plus de l'expression d'*hlgB* celles de *shlgB* et *shlgB2*. Les lignes pointillées représentent le seuil d'un facteur différentiel de 2.

2. L'impact de la surexpression de *shlgB* et *shlgB2* retrouvée au niveau protéomique

Pour confirmer les observations au niveau transcriptionnel et voir s'il y a un réel impact au niveau protéique, nous avons quantifié par spectrométrie de masse ces différentes cibles (ou facteurs de virulence connexes), et regardé les ratios surexpression/non surexpression (Figure 225).

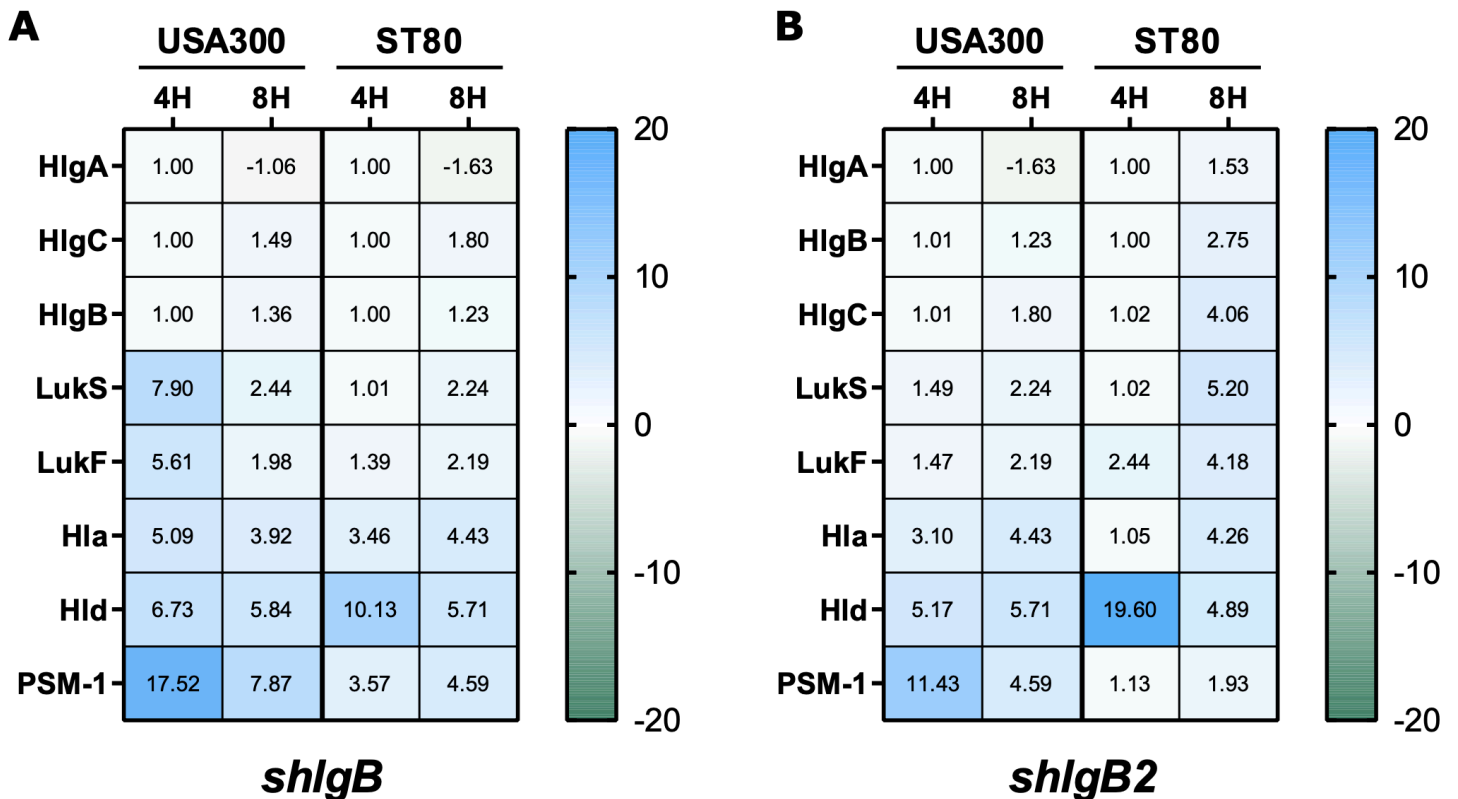


Figure 25 : Impacts de la surexpression de *shlgB* et *shlgB2* sur la virulence de *S. aureus* au niveau protéique

Mesure de l'expression différentielle de plusieurs facteurs de virulence de *S. aureus* par spectrométrie de masse ciblée quand *shlgB* (A) ou *shlgB2* (B) sont surexprimés, comparée à la condition contrôle (pCN38-P3::∅), à 4H et 8H de culture en milieu CCY, pour les souches USA300 et ST80. Un ratio de 1 indique aucune différence entre la situation où *shlgB/B2* sont surexprimés et la condition contrôle.

Comme pour le niveau transcriptionnel, nous n'observons pas de changement ni selon le temps de culture, ni le fond génétique et ni selon le transcrit surexprimé pour HlgA, HlgC et HlgB. De même, aucune différence supérieure à 2 ou inférieure à -2 n'a été obtenue pour la PVL, excepté pour USA300 à 4h lorsque *shlgB* est surexprimé, comme précédemment observé en RT-qPCR, avec une augmentation d'un facteur 7,9 pour LukS et 5,6 pour LukF, et pour ST80

à 8h avec *shlgB2* avec un facteur de 5,2 pour LukS et 4,2 pour LukF, alors qu'aucune différence au niveau transcriptionnel n'avait été remarquée. Pour Hla, sauf pour ST80 au temps 4h avec *shlgB2*, dans toutes les autres conditions nous observons une augmentation d'un facteur minimum de 2,6 allant jusqu'à 5,1. Pour Hld, protéine codée au sein de l'ARNIII, on observe une surexpression minimum de 4,2 pour ST80 à 8h avec *shlgB*, des valeurs qui varient entre 5 et 7 pour USA300, mais des surexpressions très fortes à 4h avec *shlgB* et *shlgB2* pour ST80 avec des facteurs de 10,1 et 19,6 respectivement. Ces résultats, notamment pour les facteurs les plus importants pour ST80 au temps 4h, sont cohérents avec les résultats de RT-qPCR (Figure 24). Enfin, les quantifications de PSM α 1, protéine codée au sein du même opéron que PSM α 3, ont montré qu'elle est particulièrement surexprimée à 4h dans USA300 avec les deux transcrits (17,5 et 11,4 pour *shlgB* et *shlgB2* respectivement), et moins à 8h avec un facteur maximum de 7,9 avec *shlgB*. Pour ST80 on observe une légère surexpression avec *shlgB* à 4h et 8h, alors qu'aucune différence n'est détectée avec *shlgB2*. Ces résultats sont en adéquation pour USA300 mais beaucoup plus surprenants pour ST80 notamment à 4h avec *shlgB* où une très forte surexpression (un facteur de 20,32) avait été observée pour *psm α 3* en RTqPCR.

3. *shlgB* et *shlgB2* sont-ils des ARNm ?

Au-delà d'un rôle d'ARN régulateur, il n'est pas à exclure que ces transcrits puissent coder une/des protéines. Par des approches *in silico*, nous avons recherché la présence potentielle de RBS et de sites d'initiation de la traduction (*open reading frames* – ORF) (Figure 26A).

Les résultats obtenus de ces prédictions proposent les mêmes possibilités d'ORF entre *shlgB* et *shlgB2*, avec 3 ORF potentiels. Seul un de ces ORF prédits permet l'obtention d'une protéine de 128AA (ORF1), les autres prédisant des peptides de tailles inférieures ou égales à 30AA. En se focalisant sur l'ORF1, le cadre de lecture (frame) prédit utilise un cadre de lecture en position 2 pour *shlgB* et un en position 1 pour *shlgB2* (Figure 26A).

Au niveau des RBS, qui doivent se situer légèrement en amont de l'ORF pour permettre une initiation de la traduction, on retrouve ici pour chaque transcrit un RBS avec un fort potentiel d'initiation de traduction en amont de l'ORF1 (Figure 26B). Cependant, lorsqu'on regarde la séquence protéique prédite pour l'ORF1, celle-ci permet de produire une protéine

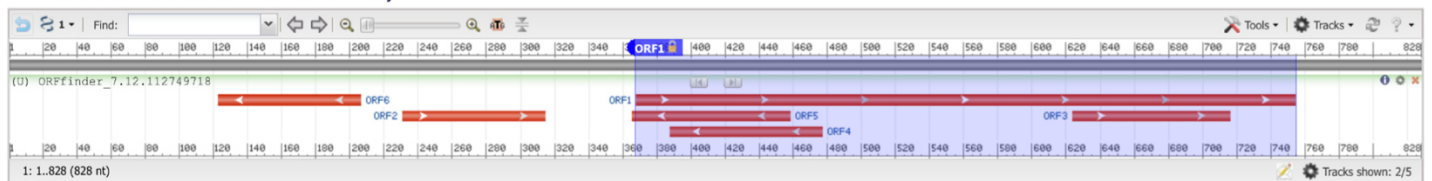
correspondant à une partie d'HlgB. Et lors des analyses de spectrométrie de masse développée dans l'Axe 1, un des peptides utilisés est retrouvé dans cette séquence commune à l'ORF1 et HlgB, et sa détection confirme qu'il n'y a qu'une copie de ce peptide pour une copie des autres peptides. Cette observation suggère que cet ORF n'est pas utilisé *in vitro*, et que *shlgB* et *shlgB2* ne sont pas traduits.

A Prédictions d'ORF :

shlgB

Sequence

ORFs found: 6 Genetic code: 1 Start codon: 'ATG' only



ORF1 (128 aa) Display ORF as... Mark

```
>lcl|ORF1
MNNWGWPGYGRDSFHPTYQNELFLAGRQSSAYAGQNFIAQHMPLLSRSNF
NPEFLSVLSHRDQGAKKSKITVYQREMDLQIRWNGFYWAGANYKNFKT
RTFKSTYIEDWENHKVLLDITKETENNK
```

Mark subset... Marked: 0 Download marked set as Protein FASTA

Label	Strand	Frame	Start	Stop	Length (nt aa)
ORF1	+	2	368	754	387 128
ORF3	+	3	624	716	93 30
ORF5	-	2	458	366	93 30
ORF4	-	1	477	388	90 29
ORF2	+	3	231	314	84 27
ORF6	-	2	206	123	84 27

Six-frame translation...

shlgB2

Sequence

ORFs found: 6 Genetic code: 1 Start codon: 'ATG' only



ORF1 (128 aa) Display ORF as... Mark

```
>lcl|ORF1
MNNWGWPGYGRDSFHPTYQNELFLAGRQSSAYAGQNFIAQHMPLLSRSNF
NPEFLSVLSHRDQGAKKSKITVYQREMDLQIRWNGFYWAGANYKNFKT
RTFKSTYIEDWENHKVLLDITKETENNK
```

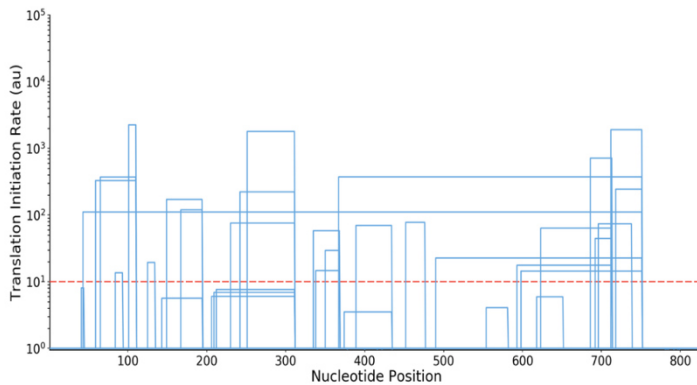
Mark subset... Marked: 0 Download marked set as Protein FASTA

Label	Strand	Frame	Start	Stop	Length (nt aa)
ORF1	+	1	322	708	387 128
ORF3	+	2	578	670	93 30
ORF5	-	2	412	320	93 30
ORF4	-	1	431	342	90 29
ORF2	+	2	185	268	84 27
ORF6	-	2	160	77	84 27

Six-frame translation...

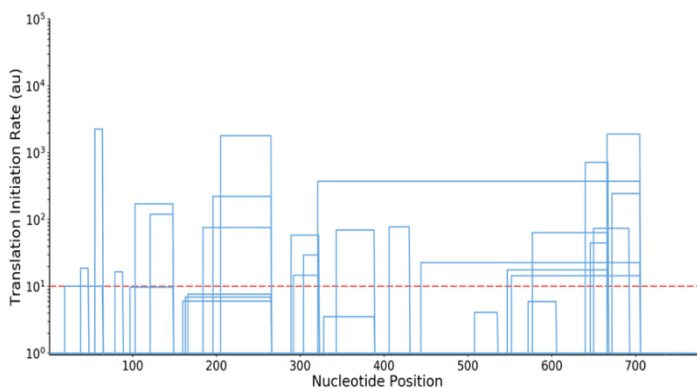
B Prédiction de cadre de lecture (Frame) :

shlgB



Start Position ↑	Frame	Translation Rate	ΔG_{total}	$\Delta G_{mRNA-rRNA}$	$\Delta G_{spacing}$	$\Delta G_{stacking}$
251	+2	1791.14	-0.83	-18.89	0.01	-0.44
335	+2	58.25	6.78	-11.55	1.52	-0.09
338	+2	14.68	9.85	-12.24	0.00	-0.35
350	+2	29.49	8.30	-4.93	0.01	-0.14
367	+1	373.80	2.65	-9.26	0.29	-0.52

shlgB2



Start Position ↑	Frame	Translation Rate	ΔG_{total}	$\Delta G_{mRNA-rRNA}$	$\Delta G_{spacing}$	$\Delta G_{stacking}$
292	+1	14.68	9.85	-12.24	0.00	-0.35
304	+1	29.49	8.30	-4.93	0.01	-0.14
321	+0	373.80	2.65	-9.26	0.29	-0.52
328	+1	3.52	13.02	-16.24	17.95	-1.42
332	+2	0.00	28.34	-14.57	26.21	-1.77

Figure 26 : Prédiction de ORF et cadre de lecture pour *shlgB* et *shlgB2*

A. Prédiction des sites d'initiation de la traduction (*open reading frames* (ORF)) pour *shlgB* et *shlgB2*, via le site ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>). Les différentes ORFs trouvés ainsi que les séquences traduites associées sont représentées en orange par rapport à la séquence de l'ARN. Un tableau référence le nom des l'ORFs, leurs cadres de lecture, ainsi que leurs sites d'initiation et de terminaison de la traduction. **B.** Prédiction des séquences permettant la fixation des ribosomes sur l'ARN (ribosome binding sites (RBS)) et des cadres de lectures associés, via le site RBS Calculator - De Novo DNA (https://salislab.net/software/predict_rbs_calculator), pour les ARN *shlgB* et *shlgB2*. Les graphiques représentent les taux de traduction estimés selon où les RBS se situent sur la séquence ainsi que la séquence traduite avec ce RBS. Les tableaux mentionnent les différents RBS obtenus, leurs positions sur la séquence, la cadre de lecture associé (frame), le taux de traduction et les énergies d'interaction entre les ARN d'intérêt et les ARNr estimées. Les RBS encadrés pour *shlgB* et *shlgB2* dans les tableaux sont les RBS qui pourraient correspondre aux ORF1s déterminés via ORFfinder.

IV. Discussion et perspectives

L'existence de transcrits supplémentaires à ceux d'*hlgCB* et d'*hlgB* seul ont été mis en évidence via différentes approches (TSS-EMOTE et Northern blot). Dans un premier temps, les analyses concernant la production de ces transcrits, *shlgB* et *shlgB2*, ont suggéré que ces

transcrits étaient de ARN *de novo* avec une extrémité 5' triphosphate, mais les expériences de fusions transcriptionnelles n'ont pas permis de détecter une activité promotrice spécifique en amont de ces gènes. Dans un second temps, l'étude de leurs rôles potentiels a montré qu'ils permettaient la surexpression de certains facteurs de virulence, quand eux-mêmes étaient surexprimés. De plus, ces transcrits ne semblent pas être traduits en protéine. L'ensemble de ces résultats, qui restent encore préliminaires, soulève encore de nombreuses questions sur l'origine de ces transcrits et leurs fonctions.

En effet, les mécanismes exacts de production de *shlgB* et *shlgB2* ne sont pas encore connus. D'un côté, les expériences de TSS-EMOTE et de 5'-RACE suggèrent que *shlgB* et *shlgB2* sont des ARN *de novo*, car détectés avec des méthodes où les ARN maturés (5'-monophosphate) sont dégradés via des enzymes spécifiques, comme l'exonucléase Terminator, et où seuls les ARN 5'-triphosphates sont encore présents. De l'autre, aucun signe d'activité promotrice en amont de ces gènes n'a été détectée. Ces deux résultats contradictoires soulèvent les questions des limites des techniques utilisées. Pour *shlgB*, les conditions de cultures étant très différentes de celles utilisées pour le TSS-EMOTE, de nouveaux essais reprenant les mêmes conditions devraient être réalisés, ces conditions étant connues pour permettre l'expression de *shlgB*. Pour *shlgB2*, il est possible que l'exonucléase Terminator n'est pas réussi à dégrader cet ARN, comme pour l'ARN 5S, du fait d'une structuration importante de l'ARN ou d'une protection de son extrémité 5' grâce à elle. Ainsi, il n'est pas à exclure que des RNases, comme pour *hlgB* seul, puissent intervenir dans la production de ces transcrits. L'utilisation de mutants de ces RNases pourrait donc être envisagée, comme ceux utilisés dans l'Axe 2 pour *hlgB*.

Concernant, les mécanismes d'action de ces transcrits sur leur capacité à induire l'expression d'autres facteurs de virulence restent à investiguer. Il est possible que ces ARN fonctionnent en tant qu'ARNs régulateurs, en interagissant soit directement avec les ARNm de leurs cibles, soit indirectement en interagissant avec des facteurs de régulation qui régulent ces cibles. Pour tester la première hypothèse, dans une étude récente, une équipe a mis au point chez *S. aureus* la technique d'*UV cross-linking ligation and sequencing of hybrids* (CLASH), qui permet d'étudier les interactions ARN-ARN [181]. Une telle approche permettrait d'étudier les interactions de *shlgB* et *shlgB2* avec d'autres ARNs et de comprendre ainsi les mécanismes

d'action sous-jacents. De plus, les résultats obtenus en protéomiques sont concordants avec ceux de RT-qPCR, suggérant que c'est au niveau transcriptionnel et/ou post-transcriptionnel que *shlgB/B2* jouent un rôle, et non au niveau traductionnel. Pour aller plus loin sur leur impact sur la virulence de *S. aureus*, des études de cytotoxicité sur différents types cellulaires peuvent être réalisées, en regardant l'impact de la surexpression de *shlgB/B2* sur la survie de *S. aureus* en milieu extracellulaire sur des cellules épithéliales, pour regarder le rôle de la surexpression induite d'Hla, et en intracellulaire avec des cellules immunitaires pour étudier la surexpression des PSMs et d'Hld.

Conclusion générale

Les infections à *Staphylococcus aureus* incluent des pathologies bénignes mais également des pathologies graves, comme les pneumonies communautaires qui sont des infections rares avec un haut taux de mortalité. Les comorbidités de l'hôte jouent un rôle important sur les risques de sévérité et de mortalité, mais ne suffisent pas à expliquer l'issue clinique. S'ajoutent à ces facteurs ceux de *S. aureus*, qui possède un grand nombre de facteurs de virulence, regroupant notamment des enzymes, des toxines et des mécanismes de résistance aux antibiotiques. Ces facteurs, appartenant au génome-cœur de la bactérie ou codés sur des éléments génétiques mobiles, participent à la virulence de manière dose-dépendante. En effet, au-delà de la présence de ces gènes dans les souches, c'est la quantité produite de ces facteurs qui impacte la sévérité, comme démontré avec l'étude d'une cohorte de souches isolées de pneumonies communautaires sévères, dans laquelle la PVL a été corrélée de façon dose-dépendante avec le décès chez l'Homme. L'étude de l'expression du virulome devient ainsi un atout pour évaluer et comparer la virulence de souches cliniques, notamment dans le milieu hospitalier, pouvant permettre à moyen et plus long terme l'adaptation et l'optimisation de la prise en charge des patients selon le pathogène identifié et caractérisé. De même, la compréhension des mécanismes qui permettent de moduler l'expression de ces facteurs peut permettre de mieux appréhender les différences entre des fonds génétiques différents et l'évolution de certains clones, ainsi qu'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques afin d'inhiber ou de déréguler l'expression de ces facteurs. Comme observé durant ces travaux avec l'hémolysine- γ CB, beaucoup de ces mécanismes dépendent des séquences nucléotidiques des gènes, mais également des régions non codantes qui les entourent, comme les promoteurs ou les régions 5'-UTR (Figure 27). Ces résultats ont également apporté de nouveaux éléments démontrant l'importance de la structure moléculaire de l'ARN dans sa stabilité et sa traductibilité. Enfin, ces travaux ont pu également démontrer la complexité qu'une organisation en apparence simple tel qu'un opéron peut contenir, notamment à l'échelle transcriptionnelle, avec la découverte de plusieurs transcrits (i.e. : *hlgB*, *shlgB* et *shlgB2*), vraisemblablement issus de la maturation d'*hlgCB* et d'*hlgB* (Figure 27). Le ou les rôles de ces transcrits restent à élucider, néanmoins, ils permettent de mettre en lumière la complexité de systèmes développés par les bactéries, adaptables selon

les conditions dans lesquelles elles évoluent. L'ensemble de ces travaux réaffirme l'intérêt d'étudier à différentes échelles (protéomique, transcriptionnelle et génomique) les facteurs de virulence de pathogène, tel que le *S. aureus*, et des corrélations / liens de causalité qu'il peut y avoir entre elles.

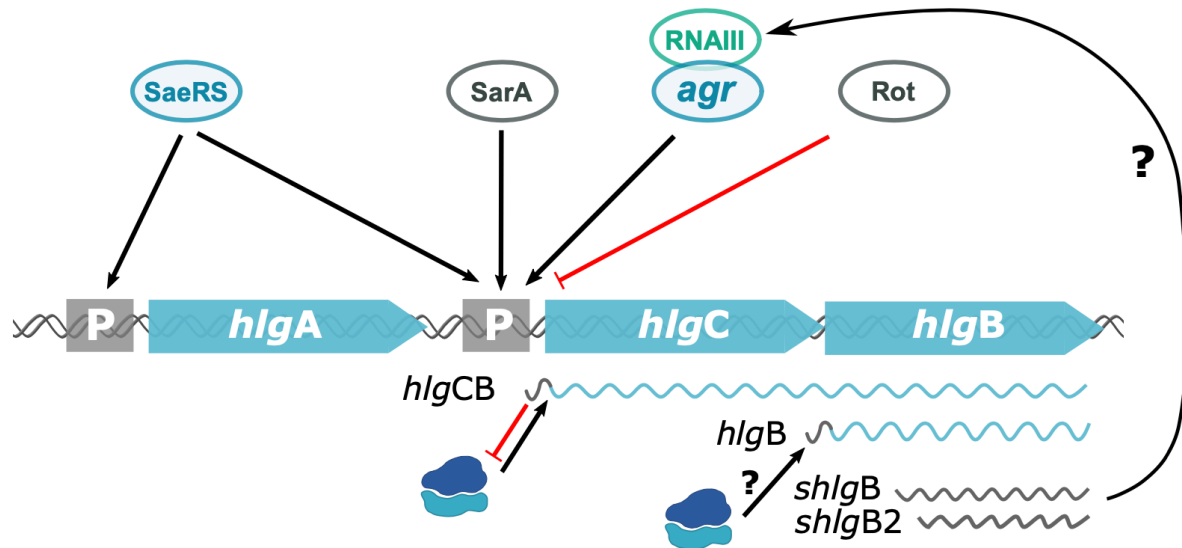


Figure 27 : Complexité de l'opéron *hlgCB* et des mécanismes sous-jacents

L'opéron *hlgCB* régulé par différents régulateurs transcriptionnels, donne naissance à de nombreux transcrits, codant (*hlgCB* et *hlgB*) et non codant (*shlgB* et *shlgB2*). La quantité de protéine produite à partir de ces transcrits dépend (i) de la quantité d'ARNm produits, elle-même dépendante de l'activité promotrice, (ii) de la stabilité du transcrit et (iii) de l'accès des ribosomes au RBS en région 5'-UTR (accès possible au RBS représenté par une flèche noire, accès au RBS non possible représenté par une barre rouge). Les transcrits non codants, *shlgB* et *shlgB2* semblent réguler l'ARNIII via un ou des mécanismes inconnus représenté par « ? ».

Références

1. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28:603–61.
2. Koulenti D, Tsigou E, Rello J. Nosocomial pneumonia in 27 ICUs in Europe: perspectives from the EU-VAP/CAP study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017;36:1999–2006.
3. Jain S, Self WH, Wunderink RG, Fakhran S, Balk R, Bramley AM, et al. Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization among U.S. Adults [Internet]. <http://dx.doi.org.gate2.inist.fr/10.1056/NEJMoa1500245>. 2015 [cited 2019 Sep 2]. Available from: <https://www-nejm-org.gate2.inist.fr/doi/10.1056/NEJMoa1500245>
4. Self WH, Wunderink RG, Williams DJ, Zhu Y, Anderson EJ, Balk RA, et al. Staphylococcus aureus Community-acquired Pneumonia: Prevalence, Clinical Characteristics, and Outcomes. *Clin Infect Dis.* 2016;63:300–9.
5. Vandenesch F, Laurent F, Tristan A. Rapport d'activité annuel 2017 CNR Staphylocoques. 2018.
6. Pivard M, Moreau K, Vandenesch F. Staphylococcus aureus Arsenal To Conquer the Lower Respiratory Tract. *mSphere.* 2021;6:e00059-21.
7. Spaan AN, Henry T, van Rooijen WJM, Perret M, Badiou C, Aerts PC, et al. The Staphylococcal Toxin Panton-Valentine Leukocidin Targets Human C5a Receptors. *Cell Host & Microbe.* 2013;13:584–94.
8. Tromp AT, Van Gent M, Abrial P, Martin A, Jansen JP, De Haas CJC, et al. Human CD45 is an F-component-specific receptor for the staphylococcal toxin Panton–Valentine leukocidin. *Nature Microbiology* [Internet]. 2018 [cited 2018 May 16]; Available from: <http://www.nature.com/articles/s41564-018-0159-x>
9. Gillet Y, Tristan A, Rasigade J-P, Saadatian-Elahi M, Bouchiat C, Bes M, et al. Prognostic factors of severe community-acquired staphylococcal pneumonia in France. *Eur Respir J.* 2021;58:2004445.
10. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet J-C, Lina G, Bes M, et al. Association between Staphylococcus aureus strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet.* 2002;359:753–9.
11. Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, Brown EL, Bes M, Benito Y, et al. Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science.* 2007;315:1130–3.
12. Gillet Y, Vanhems P, Lina G, Bes M, Vandenesch F, Floret D, et al. Factors predicting mortality in necrotizing community-acquired pneumonia caused by Staphylococcus aureus containing Panton-Valentine leukocidin. *Clin Infect Dis.* 2007;45:315–21.
13. Kitur K, Parker D, Nieto P, Ahn DS, Cohen TS, Chung S, et al. Toxin-induced necroptosis is a major mechanism of Staphylococcus aureus lung damage. *PLoS Pathog.* 2015;11:e1004820.
14. Prince A, Wang H, Kitur K, Parker D. Humanized Mice Exhibit Increased Susceptibility to Staphylococcus aureus Pneumonia. *J Infect Dis.* 2017;215:1386–95.
15. Prevost G, Couppie P, Prevost P, Gayet S, Petiau P, Cribier B, et al. Epidemiological data on Staphylococcus aureus strains producing synergohymenotropic toxins. *J Med Microbiol.* 1995;42:237–45.
16. Spaan AN, Schiepers A, Haas CJC de, Hooijdonk DDJJ van, Badiou C, Contamin H, et al.

- Differential Interaction of the Staphylococcal Toxins Panton–Valentine Leukocidin and γ -Hemolysin CB with Human C5a Receptors. *The Journal of Immunology*. 2015;195:1034–43.
17. Ogston Alex. Micrococcus Poisoning. *J Anat Physiol*. 1882;16:526–67.
 18. Cowan ST, Shaw C, Williams REOY 1954. Type Strain for *Staphylococcus aureus* Rosenbach. *Microbiology*. Microbiology Society,; 10:174–6.
 19. Kirby WMM. Extraction of a Highly Potent Penicillin Inactivator from Penicillin Resistant *Staphylococci*. *Science*. American Association for the Advancement of Science; 1944;99:452–3.
 20. Rammelkamp CH, Maxon T. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the Action of Penicillin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. SAGE Publications; 1942;51:386–9.
 21. Jevons MP. “Celbenin” - resistant *Staphylococci*. *Br Med J*. 1961;1:124–5.
 22. Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol*. Nature Publishing Group; 2009;7:629–41.
 23. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1997;40:135–6.
 24. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin--United States, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2002;51:565–7.
 25. Le Loir yves, Gautier M. *Staphylococcus Aureus* [Internet]. Editions Lavoisier TEC et DOC; 2010 [cited 2022 Jun 20]. Available from: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01454440>
 26. Stepán J, Pantůček R, Doskar J. Molecular diagnostics of clinically important *staphylococci*. *Folia Microbiol (Praha)*. 2004;49:353–86.
 27. Jarraud S, Lyon GJ, Figueiredo AM, Lina G, Gérard L, Vandenesch F, et al. Exfoliatin-producing strains define a fourth agr specificity group in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2000;182:6517–22.
 28. Monecke S, Slickers P, Ehricht R. Assignment of *Staphylococcus aureus* isolates to clonal complexes based on microarray analysis and pattern recognition. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2008;53:237–51.
 29. Deinhardt-Emmer S, Sachse S, Geraci J, Fischer C, Kwetkat A, Dawczynski K, et al. Virulence patterns of *Staphylococcus aureus* strains from nasopharyngeal colonization. *J Hosp Infect*. 2018;100:309–15.
 30. Mehraj J, Witte W, Akmatov MK, Layer F, Werner G, Krause G. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage Patterns in the Community. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2016;398:55–87.
 31. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28:603–61.
 32. Burian M, Rautenberg M, Kohler T, Fritz M, Krismer B, Unger C, et al. Temporal expression of adhesion factors and activity of global regulators during establishment of *Staphylococcus aureus* nasal colonization. *J Infect Dis*. 2010;201:1414–21.
 33. Foster TJ. Surface Proteins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Spectr*. 2019;7.
 34. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12:49–62.
 35. Hair PS, Echague CG, Sholl AM, Watkins JA, Geoghegan JA, Foster TJ, et al. Clumping Factor A Interaction with Complement Factor I Increases C3b Cleavage on the Bacterial

- Surface of *Staphylococcus aureus* and Decreases Complement-Mediated Phagocytosis. *Infection and Immunity*. American Society for Microbiology Journals; 2010;78:1717–27.
36. Hair PS, Ward MD, Semmes OJ, Foster TJ, Cunnion KM. *Staphylococcus aureus* Clumping Factor A Binds to Complement Regulator Factor I and Increases Factor I Cleavage of C3b. *J Infect Dis*. Oxford Academic; 2008;198:125–33.
37. Dziewanowska K, Patti JM, Deobald CF, Bayles KW, Trumble WR, Bohach GA. Fibronectin Binding Protein and Host Cell Tyrosine Kinase Are Required for Internalization of *Staphylococcus aureus* by Epithelial Cells. *Infect Immun*. 1999;67:4673–8.
38. Sinha B, François PP, Nüße O, Foti M, Hartford OM, Vaudaux P, et al. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin $\alpha 5\beta 1$. *Cellular Microbiology*. 1999;1:101–17.
39. Josse J, Laurent F, Diot A. Staphylococcal Adhesion and Host Cell Invasion: Fibronectin-Binding and Other Mechanisms. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8:2433.
40. van Wamel WJB, Rooijackers SHM, Ruyken M, van Kessel KPM, van Strijp JAG. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. *J Bacteriol*. 2006;188:1310–5.
41. Rooijackers SHM, Milder FJ, Bardoel BW, Ruyken M, van Strijp JAG, Gros P. Staphylococcal complement inhibitor: structure and active sites. *J Immunol*. 2007;179:2989–98.
42. Postma B, Poppelier MJ, van Galen JC, Prossnitz ER, van Strijp JAG, de Haas CJC, et al. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* binds specifically to the C5a and formylated peptide receptor. *J Immunol*. 2004;172:6994–7001.
43. 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.
44. Kaida S, Miyata T, Yoshizawa Y, Igarashi H, Iwanaga S. Nucleotide and deduced amino acid sequences of staphylocoagulase gene from *Staphylococcus aureus* strain 213. *Nucleic Acids Res*. 1989;17:8871.
45. Panizzi P, Friedrich R, Fuentes-Prior P, Richter K, Bock PE, Bode W. Fibrinogen substrate recognition by staphylocoagulase.(pro)thrombin complexes. *J Biol Chem*. 2006;281:1179–87.
46. Bjerketorp J, Nilsson M, Ljungh Å, Flock J-I, Jacobsson K, Frykberg L. A novel von Willebrand factor binding protein expressed by *Staphylococcus aureus*. *Microbiology (Reading)*. 2002;148:2037–44.
47. Rooijackers SHM, van Wamel WJB, Ruyken M, van Kessel KPM, van Strijp J a. G. Anti-opsin properties of staphylokinase. *Microbes Infect*. 2005;7:476–84.
48. Braff MH, Jones AL, Skerrett SJ, Rubens CE. *Staphylococcus aureus* exploits cathelicidin antimicrobial peptides produced during early pneumonia to promote staphylokinase-dependent fibrinolysis. *J Infect Dis*. 2007;195:1365–72.
49. Kläui AJ, Boss R, Graber HU. Characterization and Comparative Analysis of the *Staphylococcus aureus* Genomic Island vSa β : an In Silico Approach. *J Bacteriol* [Internet]. 2019 [cited 2020 Apr 15];201. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6805111/>
50. Reed SB, Wesson CA, Liou LE, Trumble WR, Schlievert PM, Bohach GA, et al. Molecular characterization of a novel *Staphylococcus aureus* serine protease operon. *Infect Immun*. 2001;69:1521–7.

51. Tam K, Torres VJ. Staphylococcus aureus Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. *Microbiol Spectr.* 2019;7.
52. Bukowski M, Wladyka B, Dubin G. Exfoliative toxins of Staphylococcus aureus. *Toxins (Basel).* 2010;2:1148–65.
53. Ibberson CB, Jones CL, Singh S, Wise MC, Hart ME, Zurawski DV, et al. Staphylococcus aureus Hyaluronidase Is a CodY-Regulated Virulence Factor. *Infect Immun.* 2014;82:4253–64.
54. Rosenstein R, Götz F. Staphylococcal lipases: biochemical and molecular characterization. *Biochimie.* 2000;82:1005–14.
55. Aarestrup FM, Larsen HD, Eriksen NHR, Elsberg CS, Jensen NE. Frequency of α - and β -haemolysin in Staphylococcus aureus of bovine and human origin. *APMIS.* 1999;107:425–30.
56. Huseby M, Shi K, Brown CK, Digre J, Mengistu F, Seo KS, et al. Structure and biological activities of beta toxin from Staphylococcus aureus. *J Bacteriol.* 2007;189:8719–26.
57. WINKLER KC, DE WAART J, GROOTSEN C, ZEGERS BJM, TELLIER NF, VERTREGT CD. Lysogenic Conversion of Staphylococci to Loss of β -Toxin. *Microbiology.* Microbiology Society,; 1965;39:321–33.
58. Salgado-Pabón W, Herrera A, Vu BG, Stach CS, Merriman JA, Spaulding AR, et al. Staphylococcus aureus β -toxin production is common in strains with the β -toxin gene inactivated by bacteriophage. *J Infect Dis.* 2014;210:784–92.
59. Tang J, Zhou R, Shi X, Kang M, Wang H, Chen H. Two thermostable nucleases coexisted in Staphylococcus aureus: evidence from mutagenesis and in vitro expression. *FEMS Microbiol Lett.* 2008;284:176–83.
60. Thammavongsa V, Missiakas DM, Schneewind O. Staphylococcus aureus degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death. *Science.* 2013;342:863–6.
61. Berends ETM, Horswill AR, Haste NM, Monestier M, Nizet V, von Köckritz-Blickwede M. Nuclease expression by Staphylococcus aureus facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *J Innate Immun.* 2010;2:576–86.
62. Kusch H, Engelmann S. Secrets of the secretome in Staphylococcus aureus. *International Journal of Medical Microbiology.* 2014;304:133–41.
63. Spaulding AR, Salgado-Pabón W, Kohler PL, Horswill AR, Leung DYM, Schlievert PM. Staphylococcal and Streptococcal Superantigen Exotoxins. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26:422–47.
64. Baker MD, Acharya KR. Superantigens: structure-function relationships. *Int J Med Microbiol.* 2004;293:529–37.
65. Kulhankova K, King J, Salgado-Pabón W. Staphylococcal toxic shock syndrome: superantigen-mediated enhancement of endotoxin shock and adaptive immune suppression. *Immunol Res.* 2014;59:182–7.
66. Wilson GJ, Seo KS, Cartwright RA, Connelley T, Chuang-Smith ON, Merriman JA, et al. A Novel Core Genome-Encoded Superantigen Contributes to Lethality of Community-Associated MRSA Necrotizing Pneumonia. *PLoS Pathog.* 2011;7:e1002271.
67. McCarthy AJ, Lindsay JA. Staphylococcus aureus innate immune evasion is lineage-specific: a bioinformatics study. *Infect Genet Evol.* 2013;19:7–14.
68. Hennekinne J-A, De Buyser M-L, Dragacci S. Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36:815–36.
69. McCormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annu Rev Microbiol.* 2001;55:77–104.
70. Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, Bach T-HL, Queck SY, Li M, et al. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat*

- Med. Nature Publishing Group; 2007;13:1510–4.
71. Verdon J, Girardin N, Lacombe C, Berjeaud J-M, Héchard Y. delta-hemolysin, an update on a membrane-interacting peptide. *Peptides*. 2009;30:817–23.
72. Peschel A, Otto M. Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11:667–73.
73. Periasamy S, Joo H-S, Duong AC, Bach T-HL, Tan VY, Chatterjee SS, et al. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:1281–6.
74. Surewaard BGJ, de Haas CJC, Vervoort F, Rigby KM, DeLeo FR, Otto M, et al. Staphylococcal alpha-phenol soluble modulins contribute to neutrophil lysis after phagocytosis. *Cell Microbiol*. 2013;15:1427–37.
75. Rasigade J-P, Trouillet-Assant S, Ferry T, Diep BA, Sapin A, Lhoste Y, et al. PSMs of hypervirulent *Staphylococcus aureus* act as intracellular toxins that kill infected osteoblasts. *PLoS ONE*. 2013;8:e63176.
76. Surewaard BGJ, Nijland R, Spaan AN, Kruijtz JAW, Haas CJC de, Strijp JAG van. Inactivation of Staphylococcal Phenol Soluble Modulins by Serum Lipoprotein Particles. *PLOS Pathogens*. Public Library of Science; 2012;8:e1002606.
77. Cheung GYC, Duong AC, Otto M. Direct and synergistic hemolysis caused by *Staphylococcus* phenol-soluble modulins: implications for diagnosis and pathogenesis. *Microbes Infect*. 2012;14:380–6.
78. Hoven G von, Qin Q, Neukirch C, Husmann M, Hellmann N. *Staphylococcus aureus* α -toxin: small pore, large consequences. *Biological Chemistry*. De Gruyter; 2019;400:1261–76.
79. Song L, Hobaugh MR, Shustak C, Cheley S, Bayley H, Gouaux JE. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science*. 1996;274:1859–66.
80. Wilke GA, Bubeck Wardenburg J. Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:13473–8.
81. Popov LM, Marceau CD, Starkl PM, Lumb JH, Shah J, Guerrero D, et al. The adherens junctions control susceptibility to *Staphylococcus aureus* α -toxin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112:14337–42.
82. F G, F R, U S, M M, B P, R S, et al. Human endothelial cell activation and mediator release in response to the bacterial exotoxins *Escherichia coli* hemolysin and staphylococcal alpha-toxin. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* [Internet]. *J Immunol*; 1997 [cited 2022 Jun 20];159. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9257856/>
83. Cooper LZ, Madoff MA, Weinstein L. Heat stability and species range of purified staphylococcal alpha-toxin. *J Bacteriol*. 1966;91:1686–92.
84. Gouaux JE, Braha O, Hobaugh MR, Song L, Cheley S, Shustak C, et al. Subunit stoichiometry of staphylococcal alpha-hemolysin in crystals and on membranes: a heptameric transmembrane pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 1994;91:12828–31.
85. Hook JL, Islam MN, Parker D, Prince AS, Bhattacharya S, Bhattacharya J. Disruption of staphylococcal aggregation protects against lethal lung injury. *J Clin Invest*. 2018;128:1074–86.
86. Inoshima I, Inoshima N, Wilke G, Powers M, Frank K, Wang Y, et al. A *Staphylococcus aureus* Pore-Forming Toxin Subverts the Activity of ADAM10 to Cause Lethal Infection. *Nat Med*. 2011;17:1310–4.

87. Karauzum H, Venkatasubramaniam A, Adhikari RP, Kort T, Holtsberg FW, Mukherjee I, et al. IBT-V02: A Multicomponent Toxoid Vaccine Protects Against Primary and Secondary Skin Infections Caused by *Staphylococcus aureus*. *Front Immunol*. 2021;12:624310.
88. Castleman MJ, Pokhrel S, Triplett KD, Kusewitt DF, Elmore BO, Joyner JA, et al. Innate Sex Bias of *Staphylococcus aureus* Skin Infection Is Driven by α -Hemolysin. *J Immunol*. 2018;200:657–68.
89. Dunman PM, Murphy E, Haney S, Palacios D, Tucker-Kellogg G, Wu S, et al. Transcription Profiling-Based Identification of *Staphylococcus aureus* Genes Regulated by the *agr* and/or *sarA* Loci. *Journal of Bacteriology*. 2001;183:7341–53.
90. Tegmark K, Morfeldt E, Arvidson S. Regulation of *agr*-dependent virulence genes in *Staphylococcus aureus* by RNAIII from coagulase-negative staphylococci. *J Bacteriol*. 1998;180:3181–6.
91. Jin Y, Li M, Shang Y, Liu L, Shen X, Lv Z, et al. Sub-Inhibitory Concentrations of Mupirocin Strongly Inhibit Alpha-Toxin Production in High-Level Mupirocin-Resistant MRSA by Down-Regulating *agr*, *saeRS*, and *sarA*. *Front Microbiol*. 2018;9:993.
92. Alonzo F, Torres VJ. The Bicomponent Pore-Forming Leucocidins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2014;78:199–230.
93. von Eiff C, Friedrich AW, Peters G, Becker K. Prevalence of genes encoding for members of the staphylococcal leukotoxin family among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2004;49:157–62.
94. Yamashita D, Sugawara T, Takeshita M, Kaneko J, Kamio Y, Tanaka I, et al. Molecular basis of transmembrane beta-barrel formation of staphylococcal pore-forming toxins. *Nat Commun*. 2014;5:4897.
95. DuMont AL, Yoong P, Liu X, Day CJ, Chumblor NM, James DBA, et al. Identification of a Crucial Residue Required for *Staphylococcus aureus* LukAB Cytotoxicity and Receptor Recognition. *Infection and Immunity. American Society for Microbiology*; 2014;82:1268–76.
96. Yanai M, Rocha MA, Matolek AZ, Chintalacharuvu A, Taira Y, Chintalacharuvu K, et al. Separately or Combined, LukG/LukH Is Functionally Unique Compared to Other Staphylococcal Bicomponent Leukotoxins. *PLOS ONE. Public Library of Science*; 2014;9:e89308.
97. Staali L, Monteil H, Colin DA. The Staphylococcal Pore-forming Leukotoxins Open Ca²⁺ Channels in the Membrane of Human Polymorphonuclear Neutrophils. *J Membrane Biol*. 1998;162:209–16.
98. Perret M, Badiou C, Lina G, Burbaud S, Benito Y, Bes M, et al. Cross-talk between *Staphylococcus aureus* leukocidins-intoxicated macrophages and lung epithelial cells triggers chemokine secretion in an inflammasome-dependent manner. *Cell Microbiol*. 2012;14:1019–36.
99. Spaan AN, Vrieling M, Wallet P, Badiou C, Reyes-Robles T, Ohneck EA, et al. The staphylococcal toxins γ -haemolysin AB and CB differentially target phagocytes by employing specific chemokine receptors. *Nature Communications*. 2014;5:5438.
100. Holzinger D, Geldon L, Mysore V, Nippe N, Taxman DJ, Duncan JA, et al. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin induces an inflammatory response in human phagocytes via the NLRP3 inflammasome. *J Leukoc Biol*. 2012;92:1069–81.
101. Melehani JH, James DBA, DuMont AL, Torres VJ, Duncan JA. *Staphylococcus aureus* Leukocidin A/B (LukAB) Kills Human Monocytes via Host NLRP3 and ASC when Extracellular, but Not Intracellular. *PLOS Pathogens*. 2015;11:e1004970.
102. Spaan AN, van Strijp JAG, Torres VJ. Leukocidins: staphylococcal bi-component pore-

- forming toxins find their receptors. *Nat Rev Microbiol.* 2017;15:435–47.
103. Raymond J, Bergeret M. [Resistance to antibiotics of *Staphylococcus aureus* responsible of osteoarticular infections]. *Arch Pediatr.* 2007;14 Suppl 2:S97–101.
104. Demos M, McLeod MP, Nouri K. Recurrent furunculosis: a review of the literature. *Br J Dermatol.* 2012;167:725–32.
105. Löffler B, Hussain M, Grundmeier M, Brück M, Holzinger D, Varga G, et al. *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS Pathog.* 2010;6:e1000715.
106. Diep BA, Afasizheva A, Le HN, Kajikawa O, Matute-Bello G, Tkaczyk C, et al. Effects of Linezolid on Suppressing In Vivo Production of Staphylococcal Toxins and Improving Survival Outcomes in a Rabbit Model of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Necrotizing Pneumonia. *J Infect Dis.* 2013;208:75–82.
107. Diep BA, Le VTM, Badiou C, Le HN, Pinheiro MG, Duong AH, et al. IVIG-mediated protection against necrotizing pneumonia caused by MRSA. *Sci Transl Med.* 2016;8:357ra124.
108. Alonzo F, Kozhaya L, Rawlings SA, Reyes-Robles T, DuMont AL, Myszka DG, et al. CCR5 is a receptor for *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED. *Nature.* 2013;493:51–5.
109. Reyes-Robles T, Alonzo F, Kozhaya L, Lacy DB, Unutmaz D, Torres VJ. *Staphylococcus aureus* Leukotoxin ED Targets The Chemokine Receptors CXCR1 and CXCR2 to Kill Leukocytes and Promote Infection. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2013 [cited 2020 Apr 6];14. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3876884/>
110. Gravet A, Colin D a., Keller D, Giradot R, Monteil H, Prévost G. Characterization of a novel structural member, LukE-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family. *FEBS Letters.* 1998;436:202–8.
111. Alonzo F, Benson MA, Chen J, Novick RP, Shopsin B, Torres VJ. *Staphylococcus aureus* leukocidin ED contributes to systemic infection by targeting neutrophils and promoting bacterial growth in vivo. *Mol Microbiol.* 2012;83:423–35.
112. Reyes-Robles T, Lubkin A, Alonzo F, Lacy DB, Torres VJ. Exploiting dominant-negative toxins to combat *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *EMBO Rep.* 2016;17:428–40.
113. Dumont AL, Nygaard TK, Watkins RL, Smith A, Kozhaya L, Kreiswirth BN, et al. Characterization of a new cytotoxin that contributes to *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Mol Microbiol.* 2011;79:814–25.
114. Malachowa N, Kobayashi SD, Braughton KR, Whitney AR, Parnell MJ, Gardner DJ, et al. *Staphylococcus aureus* Leukotoxin GH Promotes Inflammation. *The Journal of Infectious Diseases.* 2012;206:1185–93.
115. DuMont AL, Yoong P, Surewaard BGJ, Benson MA, Nijland R, van Strijp JAG, et al. *Staphylococcus aureus* elaborates leukocidin AB to mediate escape from within human neutrophils. *Infect Immun.* 2013;81:1830–41.
116. Thomsen IP, DuMont AL, James DBA, Yoong P, Saville BR, Soper N, et al. Children with Invasive *Staphylococcus aureus* Disease Exhibit a Potently Neutralizing Antibody Response to the Cytotoxin LukAB. *Infection and Immunity. American Society for Microbiology;* 2014;82:1234–42.
117. Cooney J, Kienle Z, Foster TJ, O’Toole PW. The gamma-hemolysin locus of *Staphylococcus aureus* comprises three linked genes, two of which are identical to the genes for the F and S components of leukocidin. *Infect Immun.* 1993;61:768–71.
118. Bronesky D, Wu Z, Marzi S, Walter P, Geissmann T, Moreau K, et al. *Staphylococcus aureus* RNAIII and Its Regulon Link Quorum Sensing, Stress Responses, Metabolic

- Adaptation, and Regulation of Virulence Gene Expression. *Annu Rev Microbiol.* 2016;70:299–316.
119. Wang B, Muir TW. Regulation of Virulence in *Staphylococcus aureus*: Molecular Mechanisms and Remaining Puzzles. *Cell Chem Biol.* 2016;23:214–24.
 120. Desgranges E, Marzi S, Moreau K, Romby P, Caldelari I. Noncoding RNA. *Microbiology Spectrum. American Society for Microbiology;* 2019;7:7.2.35.
 121. Bleul L, Francois P, Wolz C. Two-Component Systems of *S. aureus*: Signaling and Sensing Mechanisms. *Genes (Basel).* 2021;13:34.
 122. Jenul C, Horswill AR. Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. *Microbiol Spectr.* 2019;7.
 123. Barrientos L, Mercier N, Lalaouna D, Caldelari I. Assembling the Current Pieces: The Puzzle of RNA-Mediated Regulation in *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol.* 2021;12:706690.
 124. Smith ML, Price SA. Staphylócoceus γ Haemolysin. *Journal of Pathology and Bacteriology.* 1938;47:379–93.
 125. Taylor AG, Bernheimer AW. Further Characterization of Staphylococcal Gamma-Hemolysin. *Infection and Immunity. American Society for Microbiology;* 1974;10:54–9.
 126. Cooney J, Mulvey M, Arbuthnott JP, Foster TJ. Molecular Cloning and Genetic Analysis of the Determinant for Gamma-Lysin, a Two-component Toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology.* 1988;134:2179–88.
 127. Rahman A, Izaki K, Kamio Y. Gamma-hemolysin genes in the same family with lukF and lukS genes in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1993;57:1234–6.
 128. Prevost G, Couppie P, Prevost P, Gayet S, Petiau P, Cribier B, et al. Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. *Journal of Medical Microbiology. Microbiology Society,;* 42:237–45.
 129. Prévost G, Cribier B, Couppié P, Petiau P, Supersac G, Finck-Barbançon V, et al. Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect Immun.* 1995;63:4121–9.
 130. Yoong P, Torres VJ. The effects of *Staphylococcus aureus* leukotoxins on the host: cell lysis and beyond. *Curr Opin Microbiol.* 2013;16:63–9.
 131. Yamashita K, Kawai Y, Tanaka Y, Hirano N, Kaneko J, Tomita N, et al. Crystal structure of the octameric pore of staphylococcal γ -hemolysin reveals the β -barrel pore formation mechanism by two components. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:17314–9.
 132. Bronner S, Stoessel P, Gravet A, Monteil H, Prévost G. Variable Expressions of *Staphylococcus aureus* Bicomponent Leucotoxins Semiquantified by Competitive Reverse Transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:3931–8.
 133. Lasa I, Toledo-Arana A, Dobin A, Villanueva M, Mozos IR de los, Vergara-Irigaray M, et al. Genome-wide antisense transcription drives mRNA processing in bacteria. *PNAS.* 2011;201113521.
 134. Malachowa N, Whitney AR, Kobayashi SD, Sturdevant DE, Kennedy AD, Braughton KR, et al. Global Changes in *Staphylococcus aureus* Gene Expression in Human Blood. *PLOS ONE.* 2011;6:e18617.
 135. Saïd-Salim B, Dunman PM, McAleese FM, Macapagal D, Murphy E, McNamara PJ, et al. Global Regulation of *Staphylococcus aureus* Genes by Rot. *Journal of Bacteriology. American Society for Microbiology Journals;* 2003;185:610–9.

136. Zurek OW, Nygaard TK, Watkins RL, Pallister KB, Torres VJ, Horswill AR, et al. The Role of Innate Immunity in Promoting SaeR/S-Mediated Virulence in *Staphylococcus aureus*. *J Innate Immun*. 2014;6:21–30.
137. Venkatasubramaniam A, Kanipakala T, Ganjbaksh N, Mehr R, Mukherjee I, Krishnan S, et al. A Critical Role for HlgA in *Staphylococcus aureus* Pathogenesis Revealed by A Switch in the SaeRS Two-Component Regulatory System. *Toxins*. 2018;10:377.
138. Liu Q, Yeo W-S, Bae T. The SaeRS Two-Component System of *Staphylococcus aureus*. *Genes (Basel)*. 2016;7:1–20.
139. Nygaard TK, Pallister KB, Ruzevich P, Griffith S, Vuong C, Voyich JM. SaeR binds a consensus sequence within virulence gene promoters to advance USA300 pathogenesis. *J Infect Dis*. 2010;201:241–54.
140. Sun F, Li C, Jeong D, Sohn C, He C, Bae T. In the *Staphylococcus aureus* Two-Component System sae, the Response Regulator SaeR Binds to a Direct Repeat Sequence and DNA Binding Requires Phosphorylation by the Sensor Kinase SaeS. *J Bacteriol*. 2010;192:2111–27.
141. Liang X, Yu C, Sun J, Liu H, Landwehr C, Holmes D, et al. Inactivation of a two-component signal transduction system, SaeRS, eliminates adherence and attenuates virulence of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 2006;74:4655–65.
142. Flack CE, Zurek OW, Meishery DD, Pallister KB, Malone CL, Horswill AR, et al. Differential regulation of staphylococcal virulence by the sensor kinase SaeS in response to neutrophil-derived stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:E2037–45.
143. Date SV, Modrusan Z, Lawrence M, Morisaki JH, Toy K, Shah IM, et al. Global Gene Expression of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 During Human and Mouse Infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 2014;209:1542–50.
144. Yamazaki K, Kato F, Kamio Y, Kaneko J. Expression of γ -hemolysin regulated by sae in *Staphylococcus aureus* strain Smith 5R. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;259:174–80.
145. Didier J-P, Cozzone AJ, Duclos B. Phosphorylation of the virulence regulator SarA modulates its ability to bind DNA in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*. 2010;306:30–6.
146. Reyes D, Andrey DO, Monod A, Kelley WL, Zhang G, Cheung AL. Coordinated regulation by AgrA, SarA, and SarR to control agr expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2011;193:6020–31.
147. Roberts C, Anderson KL, Murphy E, Projan SJ, Mounts W, Hurlburt B, et al. Characterizing the effect of the *Staphylococcus aureus* virulence factor regulator, SarA, on log-phase mRNA half-lives. *J Bacteriol*. 2006;188:2593–603.
148. Morrison JM, Anderson KL, Beenken KE, Smeltzer MS, Dunman PM. The Staphylococcal Accessory Regulator, SarA, is an RNA-Binding Protein that Modulates the mRNA Turnover Properties of Late-Exponential and Stationary Phase *Staphylococcus aureus* Cells. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2:26.
149. Torres VJ, Attia AS, Mason WJ, Hood MI, Corbin BD, Beasley FC, et al. *Staphylococcus aureus* Fur Regulates the Expression of Virulence Factors That Contribute to the Pathogenesis of Pneumonia. *Infection and Immunity*. 2010;78:1618–28.
150. Loughman JA, Fritz SA, Storch GA, Hunstad DA. Virulence gene expression in human community-acquired *Staphylococcus aureus* infection. *J Infect Dis*. 2009;199:294–301.
151. Voyich JM, Broughton KR, Sturdevant DE, Whitney AR, Saïd-Salim B, Porcella SF, et al. Insights into Mechanisms Used by *Staphylococcus aureus* to Avoid Destruction by Human Neutrophils. *The Journal of Immunology*. American Association of Immunologists; 2005;175:3907–19.

152. Nariya H, Nishiyama A, Kamio Y. Identification of the minimum segment in which the threonine246 residue is a potential phosphorylated site by protein kinase A for the LukS-specific function of staphylococcal leukocidin. *FEBS Letters*. 1997;415:96–100.
153. Nishiyama A, Nariya H, Kamio Y. Phosphorylation of LukS by protein kinase A is crucial for the LukS-specific function of the staphylococcal leukocidin on human polymorphonuclear leukocytes. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1998;62:1834–8.
154. Siqueira JA, Speeg-Schatz C, Freitas FIS, Sahel J, Monteil H, Prévost GY 1997. Channel-Forming Leucotoxins from *Staphylococcus Aureus* cause Severe Inflammatory Reactions in a Rabbit Eye Model. *Journal of Medical Microbiology*. Microbiology Society,; 46:486–94.
155. Supersac G, Piémont Y, Kubina M, Prévost G, Foster TJ. Assessment of the role of gamma-toxin in experimental endophthalmitis using a hlg-deficient mutant of *Staphylococcus aureus*. *Microb Pathog*. 1998;24:241–51.
156. Lubkin A, Lee WL, Alonzo F, Wang C, Aligo J, Keller M, et al. *Staphylococcus aureus* Leukocidins Target Endothelial DARC to Cause Lethality in Mice. *Cell Host Microbe*. 2019;25:463-470.e9.
157. Vardakas KZ, Matthaiou DK, Falagas ME. Incidence, characteristics and outcomes of patients with severe community acquired-MRSA pneumonia. *European Respiratory Journal*. European Respiratory Society; 2009;34:1148–58.
158. Jean S-S, Chang Y-C, Lin W-C, Lee W-S, Hsueh P-R, Hsu C-W. Epidemiology, Treatment, and Prevention of Nosocomial Bacterial Pneumonia. *J Clin Med* [Internet]. 2020 [cited 2020 Apr 23];9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7019939/>
159. Lynch JP. Hospital-acquired pneumonia: risk factors, microbiology, and treatment. *Chest*. 2001;119:373S-384S.
160. Vlaeminck J, Raafat D, Surmann K, Timbermont L, Normann N, Sellman B, et al. Exploring Virulence Factors and Alternative Therapies against *Staphylococcus aureus* Pneumonia. *Toxins (Basel)*. 2020;12:721.
161. Khokhlova OE, Hung W-C, Wan T-W, Iwao Y, Takano T, Higuchi W, et al. Healthcare- and Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Fatal Pneumonia with Pediatric Deaths in Krasnoyarsk, Siberian Russia: Unique MRSA's Multiple Virulence Factors, Genome, and Stepwise Evolution. *PLoS ONE*. 2015;10:e0128017.
162. Sharma-Kuinkel BK, Ahn SH, Rude TH, Zhang Y, Tong SYC, Ruffin F, et al. Presence of Genes Encoding Pantan-Valentine Leukocidin Is Not the Primary Determinant of Outcome in Patients with Hospital-Acquired Pneumonia Due to *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2012;50:848–56.
163. Lanks CW, Musani AI, Hsia DW. Community-acquired Pneumonia and Hospital-acquired Pneumonia. *Medical Clinics of North America*. 2019;103:487–501.
164. Torres A, Ewig S, Lode H, Carlet J, For The European HAP working group. Defining, treating and preventing hospital acquired pneumonia: European perspective. *Intensive Care Med*. 2009;35:9–29.
165. Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, Bruining HA, White J, Nicolas-Chanoin MH, et al. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA*. 1995;274:639–44.
166. de Miguel-Díez J, López-de-Andrés A, Hernández-Barrera V, Jiménez-Trujillo I, Méndez-Bailón M, de Miguel-Yanes JM, et al. Impact of COPD on outcomes in hospitalized patients with community-acquired pneumonia: Analysis of the Spanish national hospital discharge database (2004-2013). *Eur J Intern Med*. 2017;43:69–76.

167. Walden AP, Clarke GM, McKechnie S, Hutton P, Gordon AC, Rello J, et al. Patients with community acquired pneumonia admitted to European intensive care units: an epidemiological survey of the GenOSept cohort. *Crit Care* [Internet]. 2014 [cited 2020 May 5];18. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4056764/>
168. Dalponte R de S, Heluany GCV, Michels M, Madeira K, Prado C de E. Surgical treatment of necrotizing pneumonia in children: a 10-year assessment. *Rev Col Bras Cir*. 2020;47:e20202374.
169. Nicolaou EV, Bartlett AH. Necrotizing Pneumonia. *Pediatr Ann*. 2017;46:e65–8.
170. Gallien S, Duriez E, Domon B. Selected reaction monitoring applied to proteomics. *J Mass Spectrom*. 2011;46:298–312.
171. Shi T, Song E, Nie S, Rodland KD, Liu T, Qian W-J, et al. Advances in targeted proteomics and applications to biomedical research. *Proteomics*. 2016;16:2160–82.
172. Ebhardt HA, Root A, Sander C, Aebersold R. Applications of targeted proteomics in systems biology and translational medicine. *Proteomics*. 2015;15:3193–208.
173. Brun V, Dupuis A, Adrait A, Marcellin M, Thomas D, Court M, et al. Isotope-labeled protein standards: toward absolute quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2007;6:2139–49.
174. Rouha H, Weber S, Janesch P, Maierhofer B, Gross K, Dolezilkoval I, et al. Disarming *Staphylococcus aureus* from destroying human cells by simultaneously neutralizing six cytotoxins with two human monoclonal antibodies. *Virulence*. 2018;9:231–47.
175. Deana A, Belasco JG. Lost in translation: the influence of ribosomes on bacterial mRNA decay. *Genes Dev*. 2005;19:2526–33.
176. Yarchuk O, Jacques N, Guillerez J, Dreyfus M. Interdependence of translation, transcription and mRNA degradation in the *lacZ* gene. *J Mol Biol*. 1992;226:581–96.
177. Deigan KE, Li TW, Mathews DH, Weeks KM. Accurate SHAPE-directed RNA structure determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 2009;106:97–102.
178. Ratner AJ. *S. aureus* Toxins Join the DARC Side. *Cell Host Microbe*. 2015;18:272–4.
179. Prados J, Linder P, Redder P. TSS-EMOTE, a refined protocol for a more complete and less biased global mapping of transcription start sites in bacterial pathogens. *BMC Genomics*. 2016;17:849.
180. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*. 2001;25:402–8.
181. Mediati DG, Wong JL, Gao W, McKellar S, Pang CNI, Wu S, et al. RNase III-CLASH of multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* reveals a regulatory mRNA 3'UTR required for intermediate vancomycin resistance. *Nat Commun*. 2022;13:3558.