



HAL
open science

Etude de Pep16, un nouveau peptide antimicrobien dans différents modèles *in vitro* et *in vivo* d'infections ostéoarticulaires à *Staphylococcus aureus*

Jean-Baptiste Mascary

► To cite this version:

Jean-Baptiste Mascary. Etude de Pep16, un nouveau peptide antimicrobien dans différents modèles *in vitro* et *in vivo* d'infections ostéoarticulaires à *Staphylococcus aureus*. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2023. Français. NNT : 2023URENB067 . tel-04501359

HAL Id: tel-04501359

<https://theses.hal.science/tel-04501359>

Submitted on 12 Mar 2024

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 DE RENNES

ECOLE DOCTORALE N° 637

Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Biologie Moléculaire et Structurale, Biochimie

Par

Jean-Baptiste MASCARY

Étude de Pep16, un nouveau peptide antimicrobien dans différents modèles *in vitro* et *in vivo* d'infections ostéoarticulaires à *Staphylococcus aureus*

Thèse présentée et soutenue à l'Université de Rennes, le jeudi 14 décembre 2023

Unité de recherche : Inserm U1230 – ARN régulateur Bactérien et Médecine (BRM)

Rapporteurs avant soutenance :

Hélène MARCHANDIN
Romain BRIANDET

Professeur d'Université-Praticien Hospitalier, Université de Montpellier
Directeur de Recherche, INRAE Micalis, Jouy-en Josas

Composition du Jury :

Présidente : Victoire DE LASTOURS

Professeur d'Université-Praticien Hospitalier, Université de Paris

Examineurs :

Gérard LINA

Professeur d'Université-Praticien Hospitalier, Université de Lyon 1

Florie DESRIAC

Maîtresse de Conférences, Université de Caen

Hélène MARCHANDIN

Professeur d'Université-Praticien Hospitalier, Université de Montpellier

Romain BRIANDET

Directeur de Recherche, INRAE Micalis

Dir. de thèse : Vincent CATTOIR

Professeur d'université-Praticien Hospitalier, Université de Rennes

Co-encadrant : Pierre ROCHETEAU

Directeur Olgram

Co-encadrante : Marie-Clémence VERDIER

Maîtresse de Conférences-Praticien Hospitalier, Université de Rennes

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma profonde gratitude aux membres du jury. Mes remerciements sincères à Hélène Marchandin et Romain Briandet pour leur analyse méticuleuse de ce manuscrit. Je remercie également Victoire De Lastours, Gérard Lina, et Florie Desriac, pour leur participation à mon jury de thèse.

Mon parcours doctoral n'aurait pas été le même sans la présence indéfectible de mes directeurs de thèse, Vincent Cattoir et Pierre Rocheteau, ainsi que de mon encadrante, Valérie Bordeaux. Valérie, ta confiance, et ton soutien inébranlable ont été des piliers pour moi. Sans toi, cette thèse n'aurait pas pris sa forme actuelle. Vincent, cette thèse à tes côtés a été un honneur. Ta disponibilité, ton expertise scientifique et ta chaleur humaine m'ont guidé et rassuré à chaque étape. Pierre, je tiens à te remercier pour ta patience et ton écoute tout au long de cette aventure qu'a été la thèse CIFRE, menée en partenariat avec l'entreprise Olgram. Je remercie également Marie-Clémence pour son encadrement, sa pédagogie et sa gentillesse.

Je souhaite également exprimer ma gratitude à Brice Felden.

Ma reconnaissance s'étend également aux collègues de chez Olgram et du laboratoire BRM U1230. Mes collègues d'Olgram, Irène, Elisabete, Alex et Maëva, ont été d'un soutien constant. Un merci spécial à mes amis du laboratoire U1230, notamment Laurence, Claire Chloé, Emeline, Simon. Un merci spécial à Claire qui apporte des gâteaux au moins une fois par mois au labo ! Du côté des plus âgés, pardon des titulaires je n'oublie pas de remercier Charlotte (merci pour les bonbons, les corrections aussi) tu es inspirante. Sveta, Noëlla, Hélène et Astrid pour leur bonne humeur, Yoann pour tes blagues. Merci à Nathalie aussi.

Merci aux cliniciens aussi, avec qui les échanges sont toujours passionnants. Malo pour les futurs coins de Bretagne que j'ai listé selon tes conseils et que je dois encore découvrir, Guillaume pour les soirées Ligue des Champions ou bar avec Mohammed et parfois Sébastien.

Maeliss, merci de m'avoir supporté pendant 3 ans, tu vas enfin pouvoir travailler maintenant !

À mes amis hors du laboratoire, merci pour votre soutien et vos encouragements continus, qui m'ont aidé à persévérer.

À Margot pour son soutien sans failles au cours des derniers mois de thèse.

Enfin, à mes parents, à qui, je dois tout, je vous remercie du fond du cœur.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	10
INTRODUCTION	15
TRAVAIL BIBLIOGRAPHIQUE	16
I. <i>Staphylococcus aureus</i>	16
1. Caractéristiques du genre <i>Staphylococcus</i>	16
1.1 Taxonomie	16
1.2 Caractéristiques morphologiques et métaboliques	16
2. Un pathogène humain majeur	18
2.1 <i>S. aureus</i> : du commensal au pathogène opportuniste	18
2.2 <i>S. aureus</i> : une bactérie multi-résistante aux antibiotiques	19
3. Les facteurs de virulence.....	20
3.1 Les multiples voies et mécanismes d'infection par <i>S. aureus</i>	20
3.2 Les mécanismes d'évasion de <i>S. aureus</i> aux défenses de l'hôte	22
3.2.1 Évitement de l'élimination par les phagocytes	25
3.2.2 Inhibition du recrutement et de l'activation des neutrophiles.....	25
3.2.3 Inhibition de la phagocytose	27
3.2.4 Inhibition de l'opsonisation.....	29
3.2.5 Inhibition des mécanismes de destruction	30
3.3 Les toxines sécrétées.....	33
3.4 Invasion tissulaire	35
3.5 Maintien de l'infection	35
3.5.1 Formation d'abcès.....	35
3.5.2 Formation de biofilm.....	37
3.6 Internalisation, persistance et distribution de l'infection	41
3.7 Les gènes de la virulence	42
3.8 Régulation de la virulence	43
II. <i>Les infections ostéoarticulaires</i>	47
1. Généralités	47

2.	Classification.....	48
2.1	Catégorisation basée sur le site anatomique	48
2.2	Classification selon la présence d'implants orthopédiques	50
2.3	Classification selon la durée d'évolution	50
3.	Épidémiologie.....	51
3.1	Données démographiques.....	51
3.2	Diversité bactérienne	52
4.	Démarche diagnostique	52
4.1	Clinique.....	52
4.2	Microbiologie.....	53
4.3	Imagerie.....	54
5.	Prise en charge	54
5.1	Intervention chirurgicale	54
5.2	Antibiothérapie.....	56
III.	Relation hôte-pathogène au cours des infections ostéoarticulaires à <i>S. aureus</i>	60
1.	Physiopathologie du tissu osseux	60
2.	Adaptation bactérienne aux infections chroniques : survie intracellulaire, biofilm et SCV 64	
2.1	Invasion intra-ostéoblastique par <i>S. aureus</i>	65
2.2	Le mode de vie en biofilm	65
2.3	La réduction métabolique : les SCV	66
3.	Modèles d'IOA <i>in vitro</i>	68
3.1	Généralités.....	68
3.2	Utilisation de la lignée cellulaire ostéoblastique MG-63	69
4.	Modèles d'IOA <i>in vivo</i>	71
4.1	Historique des modèles animaux dans l'étude des IOA.....	71
4.2	Quel est le modèle animal le plus approprié pour la procédure expérimentale ? ...	72
4.3	Les voies d'inoculation.....	73
IV.	Les peptides antimicrobiens	75
1.	Historique des antibiotiques : De la découverte aux défis contemporains.....	75
2.	Classification des antibiotiques.....	78
3.	Développement de la résistance.....	79

4.	Alternatives aux antibiotiques actuels.....	83
4.1	Identification de nouvelles classes d'antibiotiques.....	83
4.2	Inhibiteurs de la virulence	84
4.3	Bactériophages	84
4.4	Anticorps monoclonaux.....	85
4.5	Approches probiotiques	87
4.6	Vaccins	87
5.	Les peptides antimicrobiens (PAM)	88
5.1	Caractéristiques	88
5.2	Structures et classifications des PAM.....	88
5.3	Interactions des PAM avec les bactéries	91
5.4	Avantages et limites	94
6.	Pseudo-peptides dérivés de PepA1.....	96
6.1	PepA1, un peptide toxique produite par <i>S. aureus</i>	96
6.2	Dérivés de PepA1.....	97
6.2.1	Reduction de la longueur du peptide.....	97
6.2.2	Cyclisation	98
6.2.3	Introduction d'analogues	98
6.3	Pep15, Pep16, Pep18 et Pep19	99
7.	Pep16.....	100
7.1	Efficacité dans des modèle murin d'infection à SARM.....	100
7.2	Mécanismes d'action de Pep16.....	102
	TRAVAIL EXPERIMENTAL	105
	<i>Introduction et objectifs</i>	105
	<i>I. Activité in vitro de Pep16 contre des isolats cliniques de S. aureus responsable d'IOA</i> 107	
1.	Matériels et méthodes.....	107
1.1	Tests d'activité antimicrobienne	107
1.1.1	Isolats cliniques de <i>S. aureus</i> provenant d'IOA.....	107
1.1.2	Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et Concentration Minimale bactéricide (CMB) 107	
1.1.3	Courbes de bactéricidie.....	108

1.1.4	Tests d'association par la méthode des « échiquiers »	109
1.2	Activité intracellulaire de Pep16 dans des modèles cellulaires d'infection	111
1.2.1	Schéma général	111
1.2.2	Culture des ostéoblastes	112
1.2.3	Culture de macrophages	112
1.2.4	Tests d'internalisation de <i>S. aureus</i> par les cellules humaines.....	113
1.2.5	Viabilité cellulaire des ostéoblastes et des macrophages	114
1.2.6	Dosage de Pep16 dans les ostéoblastes par LC-MS/MS	114
1.3	Etude de la cinétique de formation du biofilm	116
2.	Résultats <i>in vitro</i>	118
2.1	Valeurs de CMI/CMB de Pep16 en comparaison avec celles des molécules de référence	118
2.2	Détermination de synergies du Pep16 avec des molécules de références.....	120
2.3	Courbes de bactéricidie	121
2.4	Activité intra-cellulaire de Pep16	122
2.5	Détermination de la concentration intra-ostéoblastique de Pep16.....	126
2.6	Evaluation de l'activité antibiofilm de Pep16.....	127
3.	Conclusion de la partie <i>in vitro</i>	130
II.	Activité <i>in vivo</i> de Pep16 dans un modèle murin d'arthrite septique à <i>S. aureus</i>.....	131
1.	Matériels et méthodes.....	131
1.1	Schéma général	131
1.2	Choix des isolats de <i>S. aureus</i> provenant d'IOA	133
1.3	Utilisation de <i>S. aureus</i> provenant d'IOA bioluminescent	133
1.4	Inoculum.....	135
1.5	Analyse pharmacocinétique de Pep16 après administration sous-cutanée chez la souris	135
2.	Résultats.....	137
2.1	Histopathologie de l'IOA à <i>S. aureus</i> chez la souris.....	137
2.2	Modèle murin d'arthrite septique à SASM 1334.....	139
2.2.1	Quantification des bactéries dans les organes cibles après administration IV de Pep16	139
2.2.2	Quantification des bactéries dans les organes cibles après administration SC de Pep16	141

2.3	Modèle murin d'arthrite septique à SASM 1333.....	142
2.3.1	Quantification des bactéries dans les organes cibles après administration sous-cutanée de Pep16.....	142
2.4	Modèle murin d'arthrite septique à SARM 15	143
2.4.1	Quantification des bactéries dans les organes cibles après administration sous-cutanée de Pep16.....	143
2.5	Analyse pharmacocinétique de Pep16 après administration sous-cutanée chez la souris	145
3.	Conclusion de la partie <i>in vivo</i>	146
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	147
	RERERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	199

LISTE DES ABREVIATIONS

ADAM-10 A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10

ADN Acide désoxyribonucléique

ADNe Acide désoxyribonucléique extracellulaire

Agr accessory gene regulator

AhpC Alkhydroxide reductase

AIP Auto-inducing peptide

ARN Acide Ribonucléique

ATCC American type culture collection

ATP Adénosine trphosphate

BHI Brain heart infusion

CA-MHB II Bouillon Mueller-Hinton II ajusté en cations

CC Complex clonaux

CHIPS Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus*

CHU Centre hospitalo-universitaire

CI Cell index

Clp Caseinolytic protease

CMB Concentration minimal bactéricide

CMI Concentration minimal inhibitrice

CNA Collagen-binding protein

CNR Centre national de référence

CPP Cell-penetrating peptides

CRP Protéine C réactive

CSF Colony-stimulating factor

DMEM Milieu de Eagle modifié par Dulbecco

DO Densité optique

Eap Extracellular adherence protein

ESKAPE *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter spp*

FADD Fas-associated protein with death domain

FAK Focal adhesion kinase

FIC Fractional inhibitory concentration index

FPR N-formyl peptide receptor

FnBP Fibronectin-binding protein

HPLC High performance liquid chromatography

Ica intercellular adhesion

IFN Interféron

IL Interleukine

ILK Integrin-linked kinase

IOA Infection ostéoarticulaire

IRM Imagerie par résonance magnétique

IV Intraveineux

LC-MS/MS Liquid chromatography couplé to tandem mass spectrometry

LDH Lactate déshydrogénase

LPV Leucocodine de Panton-Valentine

LTA Lipoteichoic acid

MDSC Myeloid-derived suppressor cells

MEC Matrice extracellulaire

MGE Mobile genetic elements

MOI Multiplicity of infection

MPO Myeloperoxidase

MSCRAMM Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule

NET Neutrophil extracellular traps

NLR NOD-like receptor

OMS Organisation mondiale de la santé

OPG Ostéoprotégérine

PAM Peptide antimicrobien

PAMP Pathogen-associated molecular pattern

PBP Penicillin-binding proteins

PBS Phosphate-buffered saline

PCR Polymérisation en chaîne

PFT Pore-forming toxin

PIA Polysaccharide intercellular adhesin

PLP Protéine de liaison aux pénicillines

PMA Phorbol-12-myristate-13-acetate

PNAG Poly-N-acétyl-glucosamine

PNN Polynucléaire neutrophile

PRR Pattern recognition receptor

PSGL-1 P-selectin glycoprotein ligand-1

PSM Phenol -soluble modulin

QS Quorum sensing

RANK Receptor activator for nuclear factor κ B

RANKL Receptor activator for nuclear factor κ B ligand

RCPG Récepteur couplé aux protéine G

ROS Reactive oxygen species

RPMI Roswell Park memorial institute

SaeRS *S. aureus* exoprotein expression

SaPi Staphylococcal pathogenicity islands

sarA *Staphylococcus* accessory regulator A

SARM *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

SASM *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline

SC Sous-cutanée

SCN Staphylocoques à coagulase négative

SCIN Staphylococcal complement inhibitor

SCTS Syndrome de choc toxique staphylococcique

SCV Small colony variant
SE Staphylococcal enterotoxin
SOD Superoxyde dismutase
SpA Protéine A de surface
SSL5 Staphylococcal superantigen-like protein 5
ST Sequence type
SVF Sérum de veau fœtal
TA Toxin-antitoxin
TCS two-component system
TLR Toll-like receptor
TNF Tumor necrosis factor α
TRAF Tumor necrosis factor apoptosis ligand
TRAIL Tumor necrosis factor apoptosis inducing ligand
TSB Tryptic-Soy Broth
TSST Toxic shock syndrome toxin
vWbp protéine liant le facteur de Von Willebrand
vWf Facteur de Von Willebrand
UFC Unité formant colonie

INTRODUCTION

Les infections ostéo-articulaires (IOA), caractérisées par des pathologies telles que l'arthrite septique, l'ostéomyélite aiguë et chronique, la spondylodiscite, et celles associées aux dispositifs orthopédiques, sont des enjeux majeurs en santé publique¹. Parmi celles-ci, l'arthrite septique se distingue par sa progression rapide et sa capacité à causer d'importants dommages aux articulations et au cartilage. À l'opposé, l'ostéomyélite est reconnue pour son évolution chronique et le risque accru de complications. Ces infections peuvent engendrer une incapacité permanente, imposant un poids significatif sur les systèmes de santé. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) est au cœur de cette problématique. Cet agent pathogène est impliqué de manière prépondérante dans les IOA¹. Malgré les antibiotiques conventionnels employés pour lutter contre ce micro-organisme, la montée en puissance des résistances, notamment celle des souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline (SARM), rend de plus en plus difficile leur traitement². Cette complexité est exacerbée par la capacité de *S. aureus* à envahir et persister dans les ostéoblastes³ ainsi qu'à former des biofilms⁴. Ces spécificités biologiques mettent en évidence l'urgence de découvrir et d'exploiter de nouvelles stratégies antibactériennes.

Parmi les alternatives prometteuses, les peptides antimicrobiens (PAM) attirent l'attention. Universellement exprimés à travers tous les règnes de la vie, ils régulent les populations bactériennes symbiotiques. Ces molécules présentent une activité antimicrobienne à large spectre contre les bactéries, virus et champignons. Un pseudo-peptide en particulier, le Pep16, inspiré d'une toxine bactérienne, a montré des résultats prometteurs dans des modèles murins de septicémie causée par le SARM⁵. Son administration est associée à une toxicité minimale et à une moindre probabilité d'émergence de résistance bactérienne, faisant de lui un candidat potentiel pour le développement d'un nouveau médicament antimicrobien.

Pep16 pourrait représenter une alternative de choix pour le traitement de ces infections notamment l'arthrite septique due à *S. aureus*. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes attelés à évaluer le potentiel du Pep16, tant *in vitro* qu'*in vivo*, pour l'éradication de *S. aureus* impliqué dans les IOA. Nos recherches, validées à l'aide d'un modèle murin d'arthrite septique, visent à souligner le potentiel de Pep16 comme stratégie de traitement novatrice pour les IOA.

TRAVAIL BIBLIOGRAPHIQUE

I. *Staphylococcus aureus*

1. Caractéristiques du genre *Staphylococcus*

1.1 Taxonomie

Le staphylocoque doré, scientifiquement dénommé *Staphylococcus aureus*, est classé au sein du phylum des Bacillota (anciennement Firmicutes) qui regroupe des bactéries à Gram positif caractérisées par un faible pourcentage de bases guanine et cytosine dans leur ADN. Ce phylum comprend plusieurs classes, dont les Bacilli et les Clostridia. *S. aureus* fait partie de l'ordre des Bacillales et appartient à la famille des *Staphylococcaceae*. Au sein de cette famille, le genre *Staphylococcus*⁶ est prédominant avec une cinquantaine d'espèces décrites. Parmi elles, *S. aureus* se distingue comme étant l'une des plus importantes en termes de pathologie humaine et animale. Une première classification des souches cliniques de *S. aureus* est basée sur le type *agr* (*accessory gene regulator*), avec quatre variants différents selon les allèles des gènes constituant le système Agr, qui régule divers facteurs de virulence en fonction de la densité bactérienne ('*quorum sensing*', QS)⁷. Un deuxième niveau de hiérarchisation est basé sur le '*sequence type*' (ST) qui s'appuie sur le polymorphisme de 7 gènes de ménage, les ST étant regroupés au sein de complexes clonaux (CC)⁸. Un typage plus précis est maintenant possible grâce au séquençage génomique par l'analyse des gènes du '*core genome*' (ensemble des gènes communs à toutes les souches d'une même espèce).

1.2 Caractéristiques morphologiques et métaboliques

S. aureus est une bactérie sphérique (coque), typiquement arrangée en amas irréguliers ressemblant à des grappes de raisin (**Figure 1**). La bactérie mesure généralement entre 0,5 et 1 µm de diamètre⁹. Elle se distingue par sa couleur dorée due à la production du pigment appelé staphyloxanthine². Elle est non mobile et non sporulée, ce qui la distingue d'autres bactéries à Gram positif (ex. *Bacillus*) qui peuvent former des spores en réponse au stress. L'une des caractéristiques les plus distinctives de *S. aureus* est sa capacité à produire une coagulase⁹, enzyme qui provoque la coagulation du plasma de lapin, autrefois utilisée comme

test diagnostique pour distinguer *S. aureus* des staphylocoques à coagulase négative (SCN). La paroi cellulaire de *S. aureus* est composée d'un peptidoglycane épais, caractéristique des bactéries à positif, conférant rigidité et forme à la cellule. Incrustées dans cette matrice de peptidoglycane, se trouvent des protéines de liaison à la fibronectine (FnBP) qui jouent un rôle dans la colonisation des tissus hôtes, facilitant l'attachement de la bactérie¹⁰. Par ailleurs, cette paroi est également recouverte d'un polysaccharide capsulaire qui permet à la bactérie d'échapper au système immunitaire de l'hôte en masquant les antigènes bactériens¹¹. *S. aureus* est une bactérie aérobie-anaérobie facultative, ce qui signifie qu'elle peut croître en présence ou en absence d'oxygène. Dans des conditions aérobies, elle effectue la respiration cellulaire, tandis qu'en l'absence d'oxygène, elle adopte un métabolisme fermentatif. La capacité de *S. aureus* à changer de mode métabolique lui offre un avantage adaptatif, lui permettant de coloniser divers environnements au sein de l'hôte, de la surface de la peau et des muqueuses aux tissus profonds¹².

Le métabolisme de *S. aureus* est également adapté pour lutter contre les différents acteurs du système immunitaire. Par exemple, lorsqu'elle est exposée à des concentrations élevées de peroxyde d'hydrogène, une arme utilisée par les cellules immunitaires pour tuer les bactéries, *S. aureus* peut détourner ce composé en utilisant des enzymes antioxydantes pour alimenter son propre métabolisme¹³.

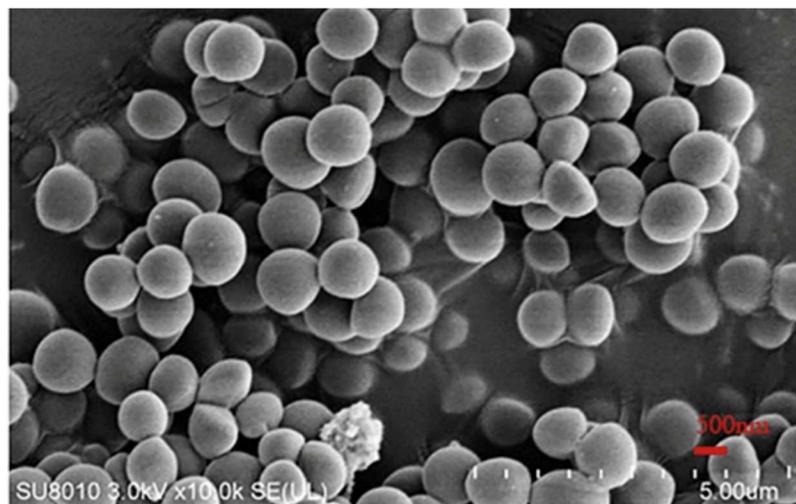


Figure 1. Structure morphologique de *S. aureus* observée par microscopie électronique à balayage (d'après Zeng et al.¹⁴).

2. Un pathogène humain majeur

2.1 *S. aureus* : du commensal au pathogène opportuniste

Bien que les staphylocoques soient ubiquitaires, présents chez de nombreux êtres vivants, ils sont principalement connus pour leur association avec l'homme. Environ 30 % des humains sont des porteurs asymptomatiques de *S. aureus*¹⁵, principalement au niveau des fosses nasales, mais aussi dans d'autres zones comme les aisselles, le périnée ou le tractus gastro-intestinal¹⁶. Cependant, la présence de cette bactérie ne se limite pas à une simple coexistence car elle a des implications majeures en matière de santé humaine. L'équilibre entre le système immunitaire et *S. aureus* est essentiel, car un dysfonctionnement peut permettre une prolifération et une dissémination dans l'organisme. Les personnes colonisées par *S. aureus* présentent un risque accru d'infections, notamment en cas d'hospitalisation, car elles sont souvent infectées par leurs propres souches de colonisation¹⁶.

S. aureus n'est pas seulement une bactérie commensale car il peut être un pathogène redoutable. Il est responsable d'une myriade d'infections (**Figure 2**), allant des infections cutanées simples, telles que les furoncles, à des infections profondes et invasives affectant des organes vitaux comme le cœur ou les poumons¹⁷. Sa capacité à causer une telle diversité d'infections s'explique en partie par sa production d'un éventail d'enzymes et de toxines, certaines d'entre elles étant responsables de maladies graves comme le syndrome du choc toxique staphylococcique (SCTS).

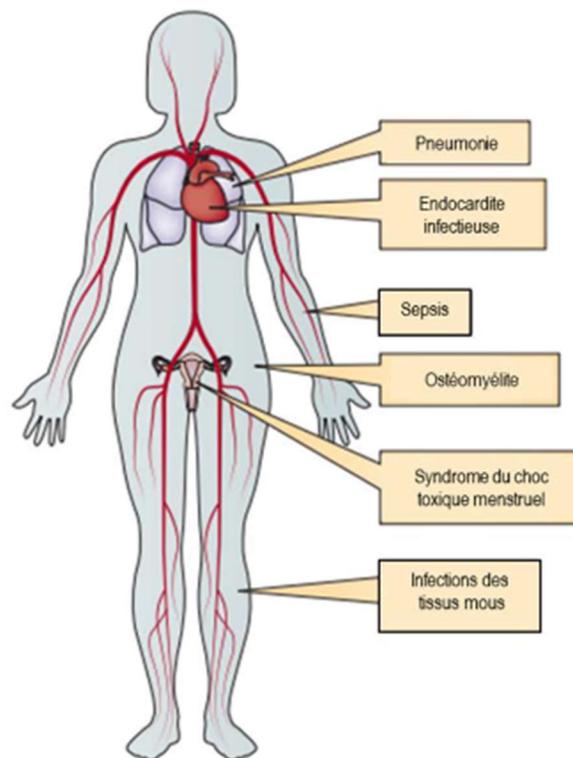


Figure 2. Aperçu des infections dues à *S. aureus* chez l'homme (adapté de Salgado- Pabón et al.¹⁷).

2.2 *S. aureus* : une bactérie multi-résistante aux antibiotiques

En matière de santé humaine, *S. aureus* est un pathogène opportuniste préoccupant. Outre les diverses infections qu'il provoque chez l'homme, certaines souches résistent aux traitements disponibles. Dans les années 1960, l'apparition de souches résistantes aux pénicillines du groupe M (SARM, pour *S. aureus* résistant à la méticilline) marqua un tournant¹⁸. Ces souches de SARM portent un gène *mecA* qui code pour la protéine PLP2a insensible à l'action des β -lactamines, tout en sachant que ces souches sont généralement co-résistantes à d'autres familles d'antibiotiques¹⁹. Cette multirésistance aux antibiotiques en fait un acteur majeur parmi les pathogènes bactériens du groupe ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter* spp.) responsables de la grande majorité des infections acquises à l'hôpital.

Compte tenu des résistances multiples aux antibiotiques qui ont émergé au fil du temps, il constitue actuellement une préoccupation cruciale en santé publique.

3. Les facteurs de virulence

Les ruptures dans la barrière cutanée ou les états d'immunodéficience favorisent la transition de la colonisation vers l'infection. La virulence de *S. aureus* découle de sa faculté à produire une grande variété de facteurs de virulence. Ces éléments jouent un rôle clé dans le processus infectieux qui comporte deux étapes : une période initiale de colonisation (sans symptômes) suivie d'une étape d'invasion, qui constitue l'infection en tant que telle.

3.1 Les multiples voies et mécanismes d'infection par *S. aureus*

L'infection systémique à *S. aureus* dépend toujours de la rupture de la couche épithéliale protectrice. Par exemple, les infections cutanées peuvent survenir à partir de légères égratignures de la peau et devenir invasives²⁰. Cependant, *S. aureus* peut également promouvoir activement la rupture épithéliale, un mécanisme principalement attribué à l'activation de la métalloprotéinase à domaine contenant la protéine 10 (ADAM10) par l' α -toxine pour cliver les molécules d'E-cadhérine²¹ (**Figure 3**). Ce mécanisme rompt les jonctions adhérentes et compromet le cytosquelette d'actine²². La contamination des dispositifs médicaux internes constitue une autre voie d'infection fréquemment observée en milieu hospitalier. Le principal mécanisme sous-jacent à cette voie d'infection est la capacité de *S. aureus* à adhérer au matériau plastique des dispositifs ainsi qu'aux molécules de la matrice qui recouvrent les dispositifs peu après leur insertion, et à former un biofilm sur le dispositif²³. La formation de biofilm est également la cause suspectée du syndrome de choc toxique staphylococcique menstruel (SCTSM), où des souches spécifiques de *S. aureus* produisant la toxine du syndrome de choc toxique-1 (TSST-1) forment des biofilms sur des tampons à haute capacité d'absorption²⁴. L'intoxication alimentaire est un cas particulier d'infection aiguë à *S. aureus* dans laquelle des aliments contaminés contenant des entérotoxines staphylococciques (SE, pour '*staphylococcal enterotoxins*') sont ingérés. Les SE provoquent des vomissements par un mécanisme encore mal compris impliquant la libération d'histamine par les mastocytes intestinaux²⁵. Les infections systémiques découlant d'infections staphylococciques aiguës sont

très rares. On ignore si une colonisation intestinale prolongée par *S. aureus* peut entraîner des infections gastro-intestinales ou même systémiques. Il est probable que la corrélation observée entre la colonisation intestinale par *S. aureus* et d'autres formes d'infection à *S. aureus* découle plutôt du rôle de l'intestin en tant que réservoir pour la diffusion de *S. aureus* vers d'autres sites de colonisation épithéliale²⁶. Enfin, *S. aureus* peut également profiter de manière opportuniste de dommages primaires causés par d'autres agents pathogènes ou conditions prédisposantes. Cela se produit, par exemple, dans les infections pulmonaires initiées par une infection virale telle que la grippe, où une surinfection par *S. aureus* est souvent la cause ultime du décès²⁷. De plus, il a été montré que *S. aureus* contribue au développement de la dermatite atopique via des toxines spécifiques, incluant la δ -toxine ou des peptides cytolytiques similaires appelés '*phenol-soluble modulins*' (PSM) qui activent les mastocytes²⁸. De plus, *S. aureus* peut compliquer les infections cutanées provoquées par d'autres agents pathogènes. Un exemple est l'exacerbation des ulcères de Buruli même après que l'agent pathogène d'origine (dans ce cas, *Mycobacterium ulcerans*) ait été éradiqué par un traitement antibiotique²⁹.

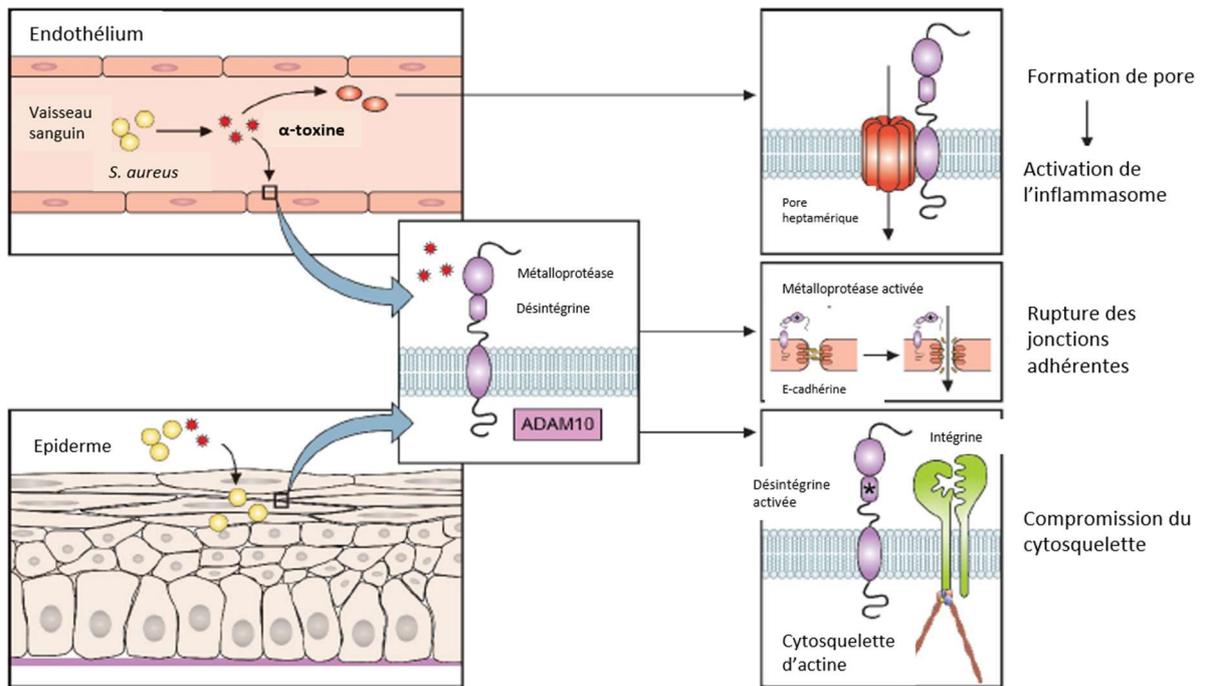


Figure 3. Rôle de la α -toxine dans l'infection par *S. aureus* (adapté de Cheung et al.³⁰). La principale toxine produite par *S. aureus*, appelée α -toxine, agit par deux mécanismes principaux. Ces deux mécanismes dépendent du récepteur ADAM10, qui possède également des domaines métalloprotéase et désintégrine. Premièrement, l' α -toxine provoque la formation de pores dans une variété de cellules cibles en formant un pore heptamérique. Deuxièmement, elle entraîne une rupture des épithéliums et des endothéliums en rompant les jonctions adhérentes et en compromettant le cytosquelette.

3.2 Les mécanismes d'évasion de *S. aureus* aux défenses de l'hôte

Après la rupture de l'épithélium et l'invasion systémique, la réussite d'une infection à staphylocoque dépend de l'efficacité d'évasion vis-à-vis des défenses de l'hôte. *S. aureus* y parvient en quittant la circulation sanguine, riche en mécanismes de défense immunitaires cellulaires et humorales, pour envahir les organes et les tissus où il forme des abcès encapsulés. Dans le cas d'infections cutanées ou pulmonaires, les abcès peuvent se former directement après la rupture de l'épithélium. Tout en restant dans le sang, *S. aureus* déploie une série impressionnante de mécanismes pour éviter son élimination. Ceux-ci vont de la production de toxines qui détruisent les phagocytes (leucocidines) à des mécanismes qui déclenchent l'apoptose des phagocytes, jusqu'à l'inhibition des facteurs du complément, en

plus de l'agglutination et de la formation de thrombus. Nous examinerons en détail les facteurs de *S. aureus* sous-jacents à ces mécanismes d'évasion immunitaire. La **Figure 4** détaille les principaux mécanismes de *S. aureus* pour échapper au système immunitaire.

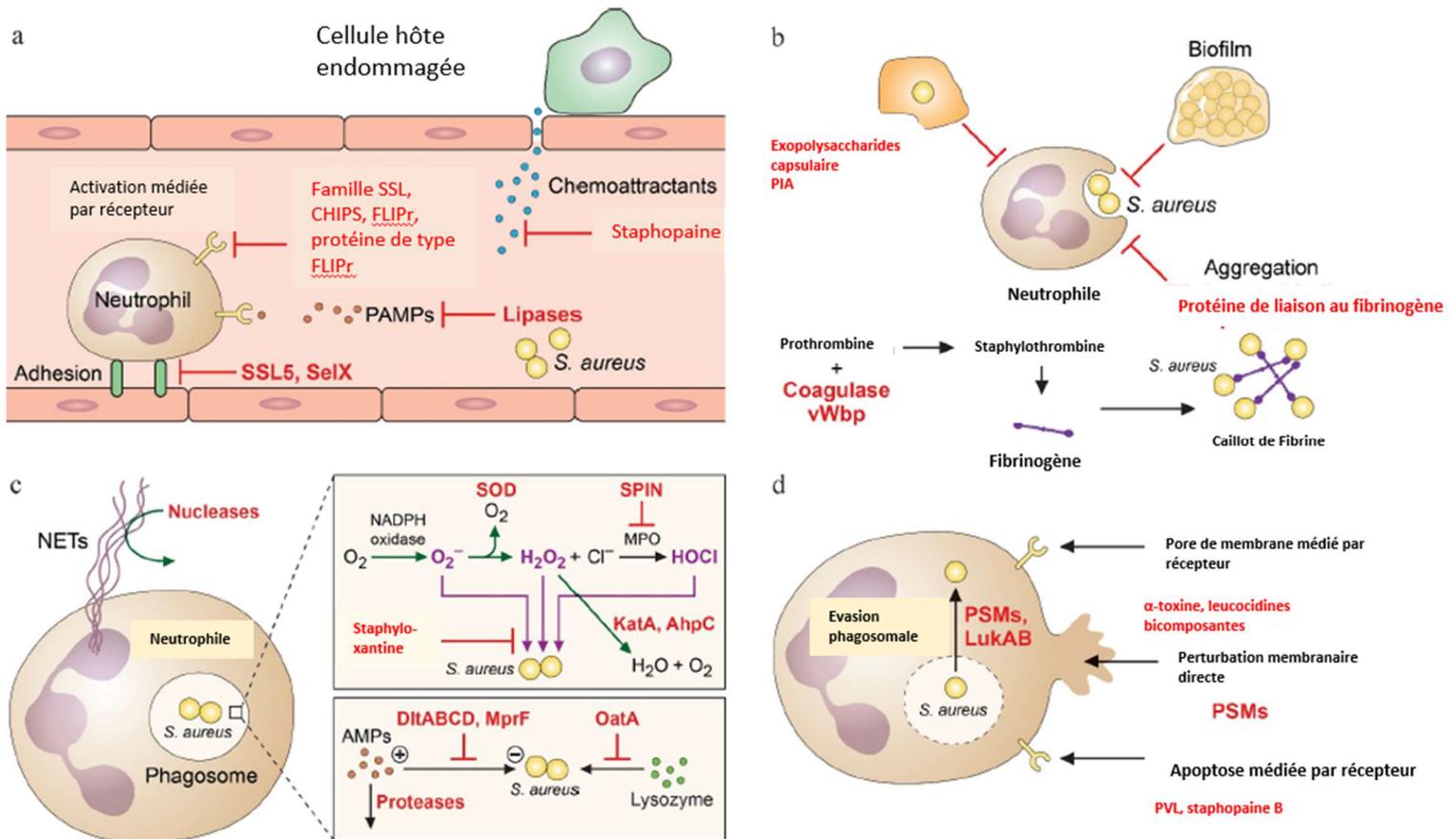


Figure 4. Mécanismes de *S. aureus* pour échapper au système immunitaire (adapté de Cheung et al.³⁰). *S. aureus* parvient à se soustraire aux défenses, principalement innées, de l'hôte grâce à divers mécanismes agissant à différents niveaux. Ces mécanismes comprennent l'inhibition de la reconnaissance immunitaire/opsonisation (a), la production d'agrégats/matrices (b), la résistance aux mécanismes bactéricides des phagosomes (c) et l'élimination directe des phagocytes et autres cellules immunitaires (d). (a) *S. aureus* sécrète de nombreuses molécules qui inhibent l'opsonisation et l'activation du complément. La bactérie réduit également l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium vasculaire, empêchant leur sortie des vaisseaux sanguins vers les tissus infectés. De plus, la lipase de *S. aureus* diminue

l'activité pro-inflammatoire des lipoprotéines associées aux PAMPs. (b) S. aureus génère des substances extracellulaires, comme la capsule ou l'exopolysaccharide PIA, qui inhibent la phagocytose. De nombreuses souches forment également des biofilms, renforçant leur résistance aux attaques des phagocytes. En outre, S. aureus libère des facteurs induisant la formation de caillots de fibrine et d'agrégats de fibrine/bactéries.(c) S. aureus parvient à contourner les mécanismes bactéricides des neutrophiles, qu'ils soient dépendants ou indépendants de l'oxygène. La superoxyde dismutase (SOD) transforme le superoxyde nocif et, conjointement avec la catalase et AhpC, convertit le peroxyde d'hydrogène en molécules inoffensives. La protéine SPIN inhibe la myéloperoxydase (MPO) qui génère l'espèce réactive de l'oxygène (ROS) la plus puissante, l'hypochlorite. Le pigment jaune staphyloxanthine protège généralement les cellules de S. aureus des ROS. L'activité des peptides antimicrobiens (PAM) est réduite par des protéases sécrétées et par la diminution du caractère anionique de la surface cellulaire bactérienne. L'activité du lysozyme est diminuée par une modification du peptidoglycane catalysée par OatA. Enfin, S. aureus produit une nucléase capable de digérer les pièges extracellulaires des neutrophiles (NET). (d) S. aureus produit plusieurs cytolytines, dont les leucocidines à deux composantes, la α -toxine et les modulines solubles dans le phénol (PSM) qui lisent directement les leucocytes. Certaines ont aussi été montrées pour favoriser l'évasion/lyse phagosomale après phagocytose. Les PSM et la α -toxine lysent également d'autres types de cellules. De plus, certaines molécules sécrétées par S. aureus peuvent déclencher une apoptose médiée par des récepteurs.

3.2.1 Évitement de l'élimination par les phagocytes

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) constituent la majorité des leucocytes circulant dans le sang, représentant environ 60 % de la population leucocytaire. Ils jouent un rôle crucial dans la régulation de l'infection à *S. aureus*, comme le démontre la susceptibilité extrême à cette infection chez les patients présentant une neutropénie³¹. De plus, des études récentes ont attribué un rôle important des cellules de Kupffer du foie dans l'infection à *S. aureus*. En effet, l'élimination de ce pathogène par ces cellules a été décrite comme un goulot d'étranglement initial clé pour le développement ultérieur de la bactériémie à *S. aureus* et l'établissement de l'infection dans d'autres organes³². La plupart des mécanismes d'évasion de *S. aureus* à l'élimination par les phagocytes ont cependant été étudiés chez les PNN. *S. aureus* échappe à l'élimination par ces cellules via plusieurs mécanismes, qui comprennent 1) l'inhibition de l'extravasation des PNN du sang vers les tissus, de leur activation et du chimiotaxisme, 2) l'inhibition de la phagocytose par agrégation des bactéries, par la formation de structures de surface protectrices et par la production de biofilm, 3) l'inhibition de l'opsonisation, 4) l'inhibition des mécanismes d'élimination des PNN, et 5) l'élimination directe des PNN par des toxines cytolytiques ou le déclenchement de l'apoptose³³. Il a été avancé que l'efficacité particulière des deux derniers mécanismes, indépendamment du succès de l'opsonisation par des anticorps et d'autres opsonines, pourrait expliquer les difficultés à trouver un vaccin efficace contre *S. aureus*, qui reste encore à découvrir³⁴.

3.2.2 Inhibition du recrutement et de l'activation des neutrophiles

À moins que les PNN n'interagissent directement avec les pathogènes dans le sang, ils doivent migrer du sang vers le site de l'infection, un processus complexe qui implique le roulement et l'adhésion des PNN à l'endothélium, leur pénétration à travers celui-ci (diapédèse) ainsi que leur activation et migration vers le pathogène selon un gradient de chimio-attractants, dans un processus appelé chimiotactisme³⁵. L'activation se produit par une stimulation primaire ("amorçage") par des cytokines spécifiques comme l'IL-8, le CSF et l'IFN- γ ou les facteurs de complément C3a et C5a³⁶. Les chimio-attractants peuvent être originaires de l'hôte, comme le leucotriène B4 ou l'IL-8, ou produits par les bactéries. Chez les bactéries à Gram positif, les activateurs/chimio-attractants des PNN comprennent la structure lipoylée N-terminale des

lipoprotéines³⁷, le peptidoglycane³⁸, les séquences CpG non méthylées dans l'ADN³⁹ et les peptides formylés, qui proviennent de la N-formylation de la méthionine pendant la synthèse protéique⁴⁰. L'acide lipotéichoïque (LTA) est également pro-inflammatoire, mais son rôle pourrait avoir été largement surestimé en raison de la contamination par des lipopeptides⁴¹. Toutes ces structures sont spécifiques aux bactéries et permettent donc au système immunitaire de reconnaître les 'envahisseurs' bactériens. Elles ont été appelées modèles moléculaires associés aux pathogènes ou *pathogen-associated molecular patterns* en anglais, (PAMP) et activent généralement les récepteurs Toll-like (TLR)⁴², qui fonctionnent en homo- ou hétérodimères. Les lipoprotéines diacylées activent TLR2/TLR6, tandis que les lipoprotéines triacylées activent TLR2/TLR1 et les séquences CpG activent TLR9. Chez *S. aureus*, les PSM (incluant la δ -toxine) constituent une grande partie de la quantité de protéines sécrétées et, étant sécrétées sans peptide signal, conservent leur partie méthionine N-formylée pro-inflammatoire⁴³. Les PSM sont également chimio-attractants pour les PNN sans N-formylation, et les formes N-formylées et non N-formylées activent principalement le récepteur des peptides formylés 2 (FPR2)⁴⁴. *S. aureus* inhibe l'extravasation, l'activation et le chimiotactisme des PNN en utilisant une multitude de facteurs et mécanismes. La protéine superantigénique-like staphylococcique 5 (SSL5) et SelX, qui se lie au ligand glycoprotéique P-sélectine-1 (PSGL-1) sur la surface des leucocytes, inhibent l'extravasation via l'inhibition de l'adhésion des neutrophiles via PSGL-1 à l'ancre P-sélectine sur les cellules endothéliales⁴⁵. SelX contribue significativement à la pathogenèse dans un modèle de pneumonie chez le lapin via l'inhibition des PNN plutôt que par son activité superantigénique⁴⁶. L'activation et le chimiotactisme sont inhibées par de nombreux membres de la famille SSL, y compris SSL3, SSL4, SSL5 et SSL10, qui se lie aux récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et aux TLR. Par exemple, SSL3 et SSL4 se lie à TLR2⁴⁷, SSL10 à CXCR4⁴⁸, et SSL5 en général aux RCPG⁴⁹. La protéine inhibitrice du chimiotactisme de *Staphylococcus* ou Chemotaxis-Inhibitory Protein of *Staphylococcus* en anglais (CHIPS) se lie et inhibe FPR1 et C5aR⁵⁰, tandis que FLIPr et FLIPr-like inhibent FPR1 et FPR2⁵¹. La protéase staphopaine et la lipase sécrétées par *S. aureus* contribuent également à l'inhibition de la chimiotactisme. La staphopaine dégrade CXCR2, inhibant ainsi la migration des PNN vers les cytokines reconnues par ce récepteur⁵². La lipase Geh a récemment été découverte pour dégrader les lipoprotéines en retirant le N-terminus lipoylé pro-inflammatoire, empêchant la reconnaissance de ces PAMP par les PNN⁵³.

3.2.3 Inhibition de la phagocytose

De nombreux microorganismes invasifs sécrètent des exopolysaccharides capsulaires pour se protéger contre la phagocytose. Nombreuses souches cliniques de *S. aureus* produisent des capsules, généralement de sérotypes 5 ou 8, ayant une structure spécifique⁵⁴. Néanmoins, la lignée USA300, principale source d'infections associées à la communauté et aux hôpitaux aux États-Unis, ne produit pas de capsule⁵⁵. Cela suggère que d'autres mécanismes d'évasion immunitaire peuvent remplacer la fonction protectrice de la capsule⁵⁶. L'adhésine intercellulaire à base de polysaccharides PIA (pour *polysaccharide intercellular adhesin*) ou PNAG (pour *poly-β-1-6-N-acetylglucosamine*) est un exopolysaccharide homopolymérique qui recouvre la surface cellulaire des staphylococques⁵⁷. La déacétylation partielle confère au PIA/PNAG une charge positive qui l'attire vers la surface bactérienne chargée négativement⁵⁸. Le PIA/PNAG est un composant majeur du biofilm staphylococcique²³. En plus de constituer une barrière anti-phagocytose, le PIA/PNAG agit selon deux mécanismes : il masque la surface cellulaire et il contribue à la matrice du biofilm⁵⁸. En plus de la formation de biofilms, surtout présents sur les dispositifs médicaux implantés, *S. aureus* utilise d'autres mécanismes d'agrégation pour échapper à la phagocytose dans le sang. En particulier, il produit des thrombus en combinant les activités combinées de la coagulase et de la protéine de liaison au facteur von Willebrand (vWbp). Ces protéines se lient à la prothrombine pour former un complexe appelé staphylothrombine⁵⁹. Ce complexe transforme alors le fibrinogène en fibrine, favorisant la formation de caillots même en l'absence du signal de lésion vasculaire normalement requis. *S. aureus* utilise ensuite des protéines de liaison au fibrinogène, comme le facteur de coagulation A (ClfA), pour adhérer aux caillots de fibrine et former des agrégats bactériens⁶⁰. Les protéines de liaison à la fibronectine FnBPA et FnBPB contribuent également à l'agrégation des plaquettes⁶¹. *S. aureus* a la capacité de libérer une variété d'enzymes et de cofacteurs dans l'espace extracellulaire (**Tableau 1**).

Tableau 1. Principales enzymes et cofacteurs sécrétées par *S. aureus* (adapté de Tam et al.⁶²).

Cofacteur/Enzyme	Gene	Fonction(s)
Coagulase	<i>coa</i>	cofacteur, active la prothrombine
VWbp	<i>vwb</i>	cofacteur, active la prothrombine
Staphylokinase	<i>sak</i>	cofacteur, active la prothrombine
Nuc	<i>nuc</i>	nucléase
Aureolysine	<i>aur</i>	métalloprotéase
ScpA	<i>scpA</i>	protéase sérine
SplA	<i>splA</i>	protéase sérine
SplB	<i>splB</i>	protéase sérine
SplC	<i>splC</i>	protéase sérine
SplD	<i>splD</i>	protéase sérine
SplE	<i>splE</i>	protéase sérine
SplF	<i>splF</i>	protéase sérine
Toxine exfoliative A	<i>eta</i>	protéase sérine
Toxine exfoliative N	<i>etb</i>	protéase sérine
Staphopaine A	<i>scpA</i>	protéase cystéine
Staphopaine B	<i>sspB</i>	protéase cystéine
Hyaluronidase	<i>hysA</i>	lyase
β -toxine	<i>hlb</i>	sphingomyelinase, ligase biofilm
PI-PLC	<i>plc</i>	phospholipase
SAL1	<i>lip1</i>	lipase
SAL2	<i>geh</i>	lipase
FAME	inconnu	détoxifie les acides gras libres

3.2.4 Inhibition de l'opsonisation

Une phagocytose efficace nécessite l'opsonisation des cibles bactériennes par des anticorps (immunoglobulines, Ig) ou le système du complément. Les Ig se lient aux pathogènes via leurs segments Fab et aux phagocytes via leurs régions Fc. L'efficacité de l'opsonisation varie selon la sous-classe des Ig, l'IgM étant la plus efficace en raison de sa structure polymérique. Outre leur rôle opsonique, les Ig activent la voie classique de la fixation du complément lorsqu'elles se trouvent sur la surface cellulaire bactérienne. *S. aureus* produit trois protéines qui perturbent le dépôt d'Ig. La plus connue est la protéine A de surface (SpA), qui crée un « manteau de camouflage » d'Ig non spécifiques à la surface de *S. aureus* par un lien non spécifique aux régions Fc des IgG³⁰. Elle se lie également à la région Fab des IgM, fonctionnant comme un superantigène pour les cellules B de l'hôte et induisant leur apoptose. De plus, elle réoriente la réponse immunitaire en stimulant la production de cellules B plasmatisques reconnaissant presque exclusivement la protéine A⁶³. La protéine Sbi, pour *S. aureus* Binder des IgG, se lie uniquement à la région Fc des IgG et également aux composants sériques tels que l'apolipoprotéine H et les facteurs du complément H et C3⁶⁴. Enfin, SSL10, une protéine avec plusieurs autres fonctions dans l'évasion immunitaire, se lie également à la région Fc des IgG, empêchant ainsi la phagocytose médiée par le récepteur des cellules de l'immunité⁶⁵.

Le rôle principal du système du complément lors de l'infection par des bactéries à Gram positif est le dépôt de C3b à la surface bactérienne pour l'opsonisation, qui se produit lorsque le facteur C3 est clivé par des convertases C3 issues de l'une des trois voies indépendantes du complément (lectine, classique, alternative)⁶⁶. D'autres facteurs, tels que le C5a formé lors de l'interaction C3-C3b, agissent comme chimio-attractants pour des cellules immunitaires supplémentaires⁶⁷. *S. aureus* produit une multitude de protéines inhibitrices du système du complément. La plus centrale et polyvalente est l'inhibiteur du complément staphylococcique ou *Staphylococcal Complement Inhibitor* (SCIN), qui inhibe les trois voies par une approche à plusieurs volets qui mène à l'inhibition des convertases C3, réduisant ainsi le dépôt de C3b et la formation du chimio-attractant C5a⁶⁸. De nombreux autres facteurs de virulence de *S. aureus*, identifiés pour d'autres rôles dans la pathogenèse, inhibent également le complément. Par exemple, la protéine Efb de liaison au fibrinogène extracellulaire se lie à C3 par son extrémité C-terminale et au fibrinogène par son extrémité N-terminale, recouvrant

ainsi les bactéries d'une couche de fibrinogène qui inhibe la reconnaissance de C3b lié à la surface⁶⁹. La protéine Ecb, homologue extracellulaire de liaison au complément, n'a pas d'activité de liaison au fibrinogène, mais inhibe la convertase C3 de la voie alternative et toutes les convertases C5⁷⁰. Plusieurs autres protéines de *S. aureus* inhibent des voies spécifiques : l'adhésine au collagène (Cna) inhibe la voie classique⁷¹, SdrE la voie alternative⁷² et la protéine d'adhérence extracellulaire (Eap) les voies lectine et classique⁷³. Enfin, SSL7 inhibe le complément de deux manières, par l'inhibition de la reconnaissance des IgA en se liant à leur région Fc ainsi qu'à C5⁷⁴. Outre ces mécanismes très spécifiques d'inhibition de l'opsonisation, cette dernière peut également être inhibée par l'activité protéolytique des protéases sécrétées par *S. aureus*. La bactérie sécrète une série de protéases à spécificité de substrat relativement faible, dont les plus importantes sont la protéase à sérine staphylococcique (protéase V8 ; SspA), la protéase à cystéine (SspB), la métalloprotéase (auréolysine ; Aur) et la staphopaine (Scp)⁷⁵. Bien que la fonction principale de ces protéases puisse consister en l'acquisition de nutriments, il est probable qu'elles détruisent également de nombreuses protéines de défense immunitaire. Ceci a spécifiquement été démontré dans le cas du complément pour l'auréolysine, qui clive C3⁵². De plus, il a été démontré que la protéase V8 était capable de cliver les Ig⁷⁶. Cependant, la contribution de ce mécanisme à la pathogenèse est en grande partie spéculative⁷⁷. Il est à noter que de nombreux facteurs inhibiteurs du complément de *S. aureus* sont spécifiques à l'Homme ; par conséquent, leur contribution à la virulence est difficile à modéliser dans les modèles d'infection murins³³.

3.2.5 Inhibition des mécanismes de destruction

Une fois que les PNN ont réussi à ingérer *S. aureus* malgré les nombreux mécanismes d'évasion de la phagocytose mis en œuvre par cette bactérie, des activités bactéricides efficaces sont déclenchées dans le phagosome des PNN. La myéloperoxydase (MPO) libérée à partir de granules primaires génère des espèces réactives de l'oxygène (ROS pour *Reactive Oxygen Species*). Des peptides antimicrobiens (PAM), comme les défensines, sont également libérés à partir de ces granules. Les granules secondaires libèrent d'autres antimicrobiens, tels que le lysozyme⁷⁸. Les mécanismes bactéricides des PNN peuvent dépendre de l'oxygène (MPO) ou non (PAM et protéines)⁷⁸. *S. aureus* a élaboré plusieurs moyens pour perturber ces deux types de mécanismes. Les mécanismes dépendant de l'oxygène sont assurés par la NADPH oxydase,

qui produit du superoxyde à partir de l'O₂. Ce superoxyde est ensuite spontanément transformé en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). La MPO convertit H₂O₂ et du chlore en acide hypochloreux (HOCl), principal effecteur des ROS⁷⁹. *S. aureus* dispose de divers mécanismes de résistance aux ROS et d'inhibition des enzymes productrices des ROS. La staphyloxanthine, un pigment doré, confère à *S. aureus* sa résistance aux ROS⁸⁰. En outre, *S. aureus* produit de la superoxyde dismutase, qui neutralise le superoxyde en H₂O₂ moins toxique⁸¹, ainsi que de la catalase (KatA) et une alkyl hydroperoxyde réductase C (AhpC), qui détoxifient le H₂O₂⁸². Par ailleurs, *S. aureus* produit une lactate déshydrogénase, induite par l'oxyde nitrique (NO), un autre ROS, qui aide à maintenir l'homéostasie redox dans le phagosome⁸³. *S. aureus* peut également inhiber la production de ROS en convertissant l'ADP et l'AMP en adénosine⁸⁴ et résiste à la toxicité du cuivre, qui contribue à la production de ROS⁸⁵. Enfin, l'inhibiteur de la peroxydase staphylococcique (SPIN) inhibe directement la MPO³³. Les défensines et autres PAM, généralement chargés positivement, agissent souvent en formant des pores dans la membrane bactérienne. *S. aureus* résiste en modifiant la charge de sa membrane et de sa paroi cellulaire⁸⁶. L'opéron *dlt* permet l'estérification des groupes hydroxyles des acides téichoïques, ce qui augmente la charge nette de la surface cellulaire⁸⁷. L'enzyme membranaire MprF est une lysyl-phosphatidylglycérol (Lys-PG) synthase et une flippase de Lys-PG qui réduit également l'attraction électrostatique des PAM⁸⁸. L'ensemble de deux composants ApsRS/GraRS régule les gènes *mprF* et *dlt* et répond à la liaison des PAM cationiques⁸⁹. Le système de transport VraFEG, contrôlé par ApsRSX/GraRSX, est également impliqué dans la transduction du signal de manière incomplètement comprise⁹⁰. Les PAM sont également sujets à la dégradation protéolytique par des protéases sécrétées par *S. aureus*, ce mécanisme est induit par le PAM chargé négativement, la dermcidine⁹¹. Parmi les nombreuses protéines antibactériennes que les PNN sécrètent dans le phagosome, le lysozyme est très efficace contre les bactéries à Gram positif. Cependant, son efficacité est limitée envers *S. aureus* en raison de l'activité enzymatique de OatA⁹². De plus, *S. aureus* détourne l'activité des protéases antimicrobiennes via la protéine d'adhérence extracellulaire Eap⁹³. Les Neutrophil Extracellular Traps (NET), un autre mécanisme non conventionnel d'élimination des pathogènes utilisé après la lyse induite par les pathogènes ("NETose")⁹⁴, sont également considérés comme contribuant à la défense de l'hôte contre *S. aureus*, bien que cela soit controversé⁹⁵. La découverte que la nucléase sécrétée par *S. aureus* protège contre la mort

induite par les NET *in vitro* et contribue à l'infection *in vivo*, suggérant un rôle possible des NET dans la lutte contre les infections à *S. aureus*⁹⁶. De plus, *S. aureus* produit une enzyme appelée AdsA qui génère de la désoxyadénosine à partir de l'ADN des NET digéré par la nucléase⁹⁷. La désoxyadénosine déclenche la mort médiée par la caspase-3 d'autres cellules immunitaires, ce qui a été montré pour éliminer les macrophages des centres d'abcès de *S. aureus*⁹⁷.

3.3 Les toxines sécrétées

Les mécanismes que *S. aureus* utilise pour échapper à l'élimination par les PNN que nous avons présentés jusqu'à présent peuvent être qualifiés de "passifs". En effet, *S. aureus* synthétise également une série de toxines qui éliminent directement les PNN et d'autres leucocytes. Ces toxines comprennent principalement l' α -toxine (Hla)⁹⁸, les leucocidines à 2 composants⁹⁹ et les PSM¹⁰⁰.

L' α -toxine est probablement la plus célèbre et également la plus importante en termes de contribution à la pathogenèse de *S. aureus* (**Figure 5**). Elle a plusieurs fonctions en plus de son rôle dans la rupture épithéliale mentionnée dans la section précédente. Notamment, l' α -toxine est un cytolysine majeure pour de nombreux types cellulaires, y compris les leucocytes⁹⁸. Il s'agit d'une protéine de 33 kDa sous sa forme mature qui s'oligomérisse en une structure heptamérique formant un pore stable à travers la membrane¹⁰¹. La formation de pore est un processus dépendant d'un récepteur, la protéine ADAM10^{21,98} (**Figure 5**). L' α -toxine déclenche une série d'événements inflammatoires dans la cellule cible en induisant l'inflammasome NLRP3, généralement à des concentrations lytiques¹⁰²; mais certains sont également observés à des concentrations sub-lytiques¹⁰³.

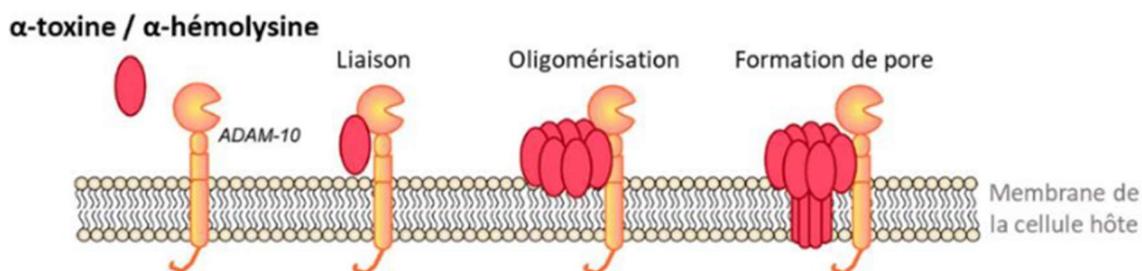


Figure 5. Formation de pores par l' α -hémolysine dans les cellules hôtes (adapté de Tam et al.⁶²).

Les leucocidines à 2 composants comprennent la leucocidine de Panton-Valentine (PVL, codée par les gènes *lukS-PV* et *lukF-PV*), LukDE, LukAB (LukGH), et les combinaisons HlgAB et HlgCB des protéines HlgA, HlgB, et HlgC (également appelée γ -toxine)⁹⁹. Toutes ces toxines nécessitent l'assemblage d'une sous-unité F et d'une sous-unité S. L'unité S reconnaît un récepteur protéique membranaire (un récepteur de chimiokine pour PVL et LukED¹⁰⁴ et un intégrine pour LukAB/GH¹⁰⁵) puis recrute l'unité F, conduisant à la dimérisation et finalement, après des changements structuraux importants, à la formation d'un pore octamérique¹⁰⁶ (Figure 6).

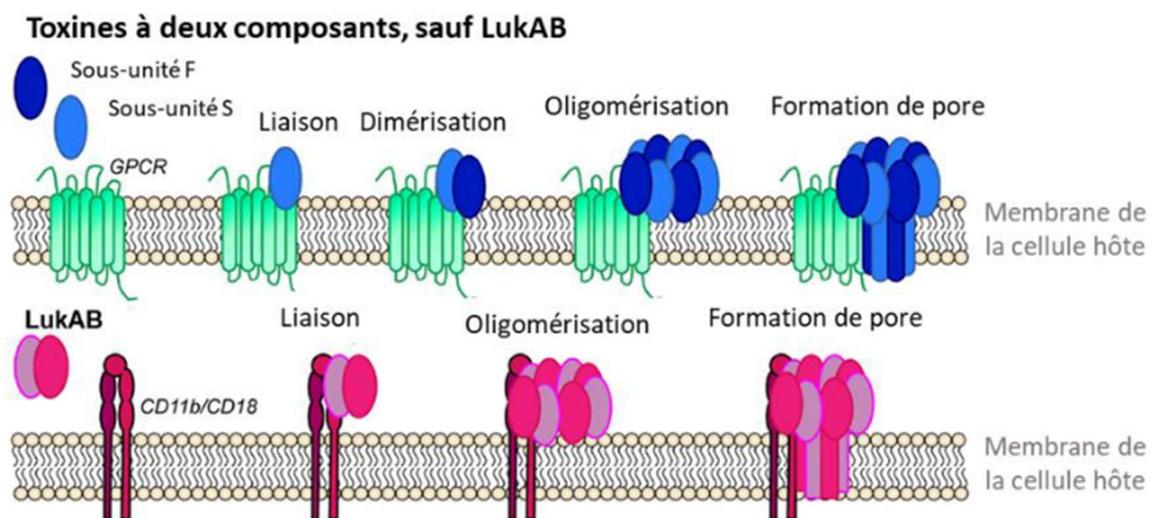


Figure 6. Formation de pores par les différentes leucocidines à deux composants (adapté de Tam et al.⁶²).

Les PSM sont une famille de peptides amphipathiques constitués d'hélices α qui comprennent la δ -toxine décrite plus haut¹⁰⁰. Les PSM de type α (~20-25 acides aminés) ont une activité cytolytique considérable contre les PNN, qui est la plus prononcée pour le peptide PSM α 3¹⁰⁷. L'activité des PSM est censée être indépendante du récepteur, entraînant une perturbation membranaire de type détergent¹⁰⁷. Une manière plus indirecte d'éliminer les PNN consiste à accélérer leur autodestruction naturelle par l'apoptose. Le déclenchement d'événements apoptotiques par les toxines de *S. aureus* a été décrit pour de nombreux types cellulaires,

comme par AdsA dans les macrophages¹⁰⁸, mais spécifiquement pour les PNN seulement dans le cas de PVL et de la protéase staphopaine B^{109,110}.

3.4 Invasion tissulaire

Dans les modèles murins d'infection systémique, les cellules de *S. aureus* parviennent rapidement (après 1 à 3 heures) aux organes, où des lésions microscopiquement identifiables apparaissent après environ 48 heures¹¹¹. La pénétration de *S. aureus* dans les organes et les tissus via la circulation sanguine nécessite non seulement une évasion immunitaire, comme mentionné précédemment, mais aussi une adhérence et d'autres processus structuraux. De nombreuses étapes sont facilitées par des protéines ancrées à la surface, qui appartiennent à la famille des MSCRAMM (pour *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*).

Ces protéines sont sécrétées par la voie de sécrétion générale et ensuite fixées au peptidoglycane par une réaction catalysée par la sortase A, qui lie la thréonine d'une structure N-terminale conservée (motif LPXTG) au groupe amino du résidu glycine terminal de la branche pentaglycine du peptidoglycane¹¹². Les MSCRAMM contiennent caractéristiquement des séquences répétitives qui leur permettent de traverser la paroi cellulaire et d'exposer des domaines de liaison aux protéines de la matrice. Parmi les nombreuses protéines MSCRAMM aux fonctions divergentes, dont certaines que nous avons déjà abordées en ce qui concerne l'évasion immunitaire, la protéine de liaison au collagène Cna et les protéines de liaison à la fibronectine FnBPA et FnBPB ont des fonctions-clés dans l'adhérence tissulaire^{113,114}.

3.5 Maintien de l'infection

3.5.1 Formation d'abcès

Une fois l'abcès formé, la prolifération bactérienne s'ensuit, accompagnée d'une infiltration massive de leucocytes. Les principaux chimio-attractants pour les leucocytes dans ce contexte sont les lipopeptides bactériens, comme démontré par un mutant du gène *lgt*, qui code pour une enzyme essentielle à la synthèse des lipoprotéines. Ce mutant a montré une prolifération bactérienne sans formation typique d'abcès¹¹⁵. L'abcès formé est caractérisé par un grand nombre de bactéries entourées par un nombre élevé de leucocytes, ceci nécessitant une

adaptation significative de la physiologie bactérienne par rapport à l'initiation de l'infection. Avant tout, les mécanismes pour échapper à l'élimination par les leucocytes, en plus de ceux déjà discutés, comprennent la formation d'un abcès encapsulé inhibant toute infiltration supplémentaire de leucocytes¹¹¹. Une étude a utilisé des mutants de protéines ancrées dans la paroi cellulaire de la souche Newman pour examiner les facteurs influençant la formation d'abcès rénaux dans un modèle murin d'infection systémique. Bien que cette souche ne produise pas ou n'exprime pas correctement certains des facteurs probablement impliqués (tels que Cna, FnBPA et FnBPB), elle a néanmoins fourni des informations cruciales sur les processus de formation d'abcès¹¹⁶. Selon cette étude, l'acquisition du fer (hème) facilitée par les protéines IsdA et IsdB est vitale au cours de la phase initiale de la formation d'abcès. L'étape suivante, celle de la maturation de l'abcès, est caractérisée par des couches de PNN nécrotiques et intacts entourant le centre de l'abcès, qui contient les cellules de *S. aureus* en prolifération. À ce stade, les coagulases Coa et vWbp produisent des caillots de fibrine pour inhiber l'infiltration des leucocytes. Un autre contributeur important était la protéine A, bien que l'on ne sache pas exactement à quelle fonction de cette protéine par rapport au phénotype observé¹¹⁶.

De plus, une forte densité bactérienne signifie que les nutriments deviennent rares. *S. aureus* produit une série de cytolysines capables de lyser les cellules et des enzymes pour digérer les macromolécules nutritives ainsi libérées. Outre les propriétés cytolytiques des leucocidines vis-à-vis des leucocytes, nous avons déjà mentionné les propriétés cytolytiques générales des PSM, qui pourraient sous-tendre la forte contribution de ces cytolysines à la formation d'abcès sous-cutanés, pulmonaires et rénaux^{107,117}. Certaines cytolysines de *S. aureus* agissent en synergie pour atteindre une hémolyse extrêmement forte. Cette activité est connue *in vitro* comme la réaction de CAMP qui se produit entre la β -toxine, une sphingomyélinase, et la δ -toxine ou d'autres PSM¹¹⁸. On suppose que la fonction principale des exoenzymes dégradatives, qui comprennent des protéases, des lipases et des nucléases, est l'acquisition de nutriments, mais aucune preuve directe n'est disponible en raison de la redondance fonctionnelle et du fait que nombre de ces enzymes ont des fonctions supplémentaires, par exemple, dans l'évasion immunitaire.

3.5.2 Formation de biofilm

Une autre méthode significative par laquelle *S. aureus* maintient une infection est la formation de biofilms²³. Ceux-ci peuvent se former sur des matériaux abiotiques présents dans des dispositifs médicaux implantés, mais également sur des surfaces tissulaires, comme les valves cardiaques en cas d'endocardite. La formation de biofilm évolue en trois étapes principales : adhésion, multiplication, détachement précoce, maturation et enfin dispersion (**Figure 7**).

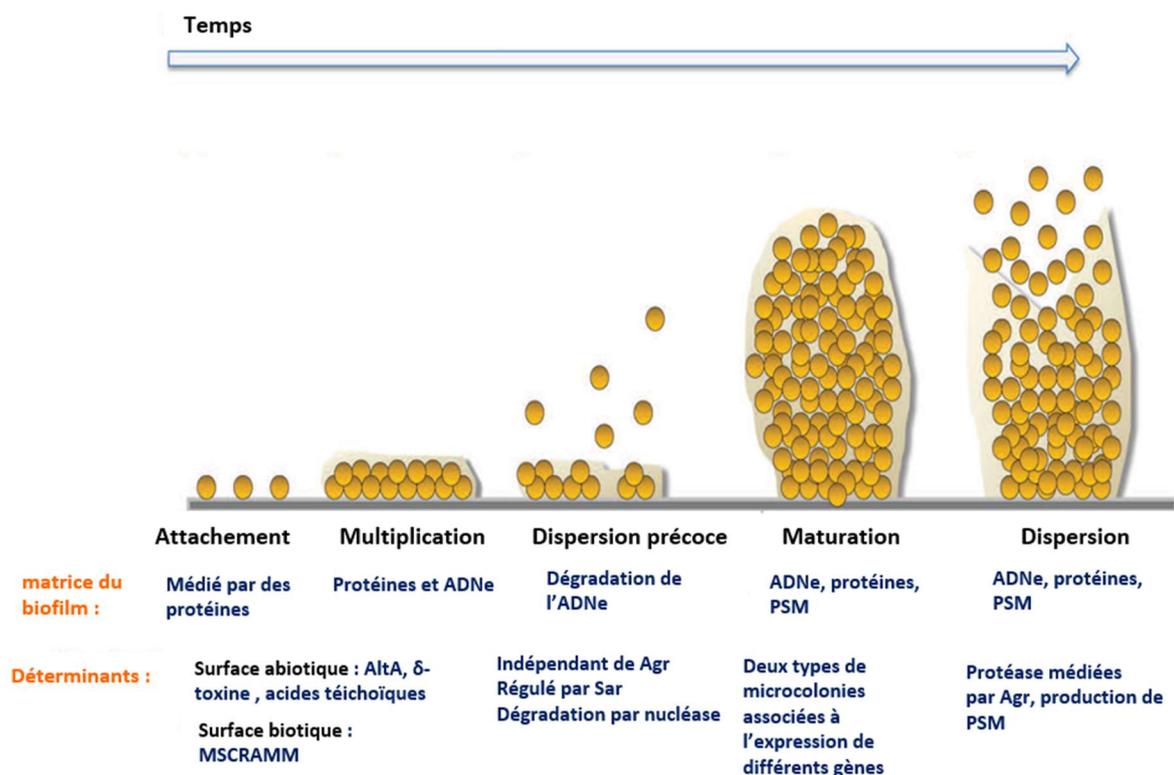


Figure 7. Les différentes étapes de formation du biofilm chez *S. aureus* (adapté de Moormeier et al.¹¹⁹).

Adhésion

L'initiation du biofilm par *S. aureus* est déclenchée par l'ancrage des bactéries en phase planctonique à un substrat abiotique ou biotique. Ces substrats peuvent être des composants de la matrice extra-cellulaire (MEC) ou des éléments membranaires cellulaires de l'hôte, tels que la fibronectine, le fibrinogène, le collagène ou des récepteurs membranaires. Cette adhérence est principalement orchestrée par des protéines de surface appartenant à la famille des MSCRAMM, qui facilitent également la liaison aux protéines absorbées sur des matériaux biomédicaux, ce qui aide à la formation du biofilm sur des implants¹¹⁹. En l'absence de molécules hôtes, *S. aureus* peut se fixer à des surfaces abiotiques comme le plastique ou le métal d'un dispositif médical, grâce à des interactions hydrophobes ou électrostatiques. Il a été démontré que l'aptitude à la fixation et à la formation du biofilm est modulée par les charges de surface de substrats tels que le polystyrène¹²⁰.

Multiplication

Après l'étape d'adhésion, les bactéries subissent se multiplient et s'agglomèrent pour constituer un agrégat bactérien. Pendant ce cycle de prolifération, les interactions intercellulaires sont cruciales pour prévenir le décollement des nouvelles cellules bactériennes et garantir ainsi la pérennité de la formation du biofilm. Initialement, ces interactions sont médiées par des protéines de surface, comprenant certaines MSCRAMM. Des études ont indiqué que l'agrégation bactérienne lors de cette phase est également liée au polysaccharide PIA³⁷. Néanmoins, l'engagement du PIA dans ce processus semble dépendre de la souche, car sa délétion dans la souche SASM UAMS-1 ou certaines souches de SARM n'entraîne pas de défaut dans le biofilm, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*¹¹⁹. Dans les cas où la formation du biofilm est indépendante de la PIA, d'autres protéines, telles que la protéine A, interviennent dans l'agrégation bactérienne. Par exemple, la protéine A, située sur la surface des bactéries, favorise l'agrégation en milieu aqueux ainsi que la croissance du biofilm dans des conditions statiques et en flux. Dans une phase ultérieure, la cohésion de la MEC du biofilm est soutenue par l'ADN extracellulaire (ADNe), découlant de la mort cellulaire et de l'activité des autolysines bactériennes, notamment Atl. La nature polyanionique de l'ADNe facilite l'assemblage des molécules constituant la MEC. En outre, la lyse bactérienne entraîne la libération de certaines protéines qui renforcent la stabilité de la MEC, telles que les PSM et l'hémolysine β . Chacune

de ces protéines est capable de s'associer à l'ADNe. La vulnérabilité des biofilms aux agents protéolytiques souligne l'importance vitale de la fraction protéique de la MEC durant cette étape initiale de la formation du biofilm¹²¹. Plus précisément, il a été démontré que les PSM s'agrègent sur la surface bactérienne pour engendrer des fibres amyloïdes. Tandis que la forme monomérique des PSM est engagée dans la lyse des cellules immunitaires et dans la dispersion du biofilm via son activité surfactante, la configuration fibrillaire serait un moyen de neutraliser ces mêmes protéines cytotoxiques¹²². Néanmoins, des travaux ont démontré que l'organisation de ces fibres amyloïdes est conditionnée par la présence de l'ADNe dans des biofilms générés *in vitro*¹²³.

Dispersion précoce

L'analyse en temps réel de la constitution du biofilm par microscopie a révélé une phase initiale de dispersion qui favorise la réorganisation du biofilm et l'établissement de micro-agrégats bactériens¹²¹. Cette étape de migration se réalise par l'intervention des nucléases sur ADNe, entraînant une décomposition partielle de la MEC. Toutefois, l'activation du gène *nuc* n'est constatée que dans un sous-ensemble spécifique de bactéries du biofilm, inhibant ainsi une décomposition complète de la MEC. Cette activation est régulée par le système de régulation à deux composants (TCS) SaeRS et est dissociée des processus en jeu lors de la dispersion ultérieure du biofilm. Cela implique une orchestration séquentielle de ces divers effecteurs au cours du développement du biofilm. Les mécanismes régissant cette synchronisation demeurent néanmoins encore indéfinis^{119,121}.

Maturation

Dans la phase de maturation, les biofilms adoptent une architecture tridimensionnelle, dotées de canaux hydriques, qui facilitent la distribution d'oxygène et de nutriments, ainsi que l'élimination des déchets¹²⁴. Cette étape implique la prolifération et l'assemblage des bactéries à partir des micro-colonies résiduelles post-dispersion, résultant en la création de structures pilaires distinctives au sein du biofilm. À ce stade, des gradients de concentration d'oxygène et de nutriments au sein de la communauté bactérienne engendrent des conditions environnementales variables, favorisant l'émergence de sous-groupes métaboliquement différents. Les bactéries situées aux extrémités supérieure (oxygénée) et inférieure (nutritive) du biofilm sont métaboliquement actives. Néanmoins, la grande majorité des cellules se trouvent en état de dormance, localisées dans un milieu anoxique¹²⁵. Cette hétérogénéité

s'étend également à l'expression protéique. Ces sous-groupes diversifiés permettent une adaptation optimale aux conditions environnementales variées et sont aussi liés à une résistance augmentée face aux agents antimicrobiens¹²⁶.

Dispersion

Dans le biofilm arrivé à maturité, des bactéries uniques ou des assemblages bactériens ont la possibilité de se désengager pour faciliter la propagation bactérienne vers d'autres sites d'implantation. Ce processus de détachement peut être induit soit par des dynamiques mécaniques liées à un écoulement liquide, soit par l'activation de protéases et de PSM. Dans le contexte de *S. aureus*, plusieurs régulateurs globaux modulent l'expression de ces agents de dispersion, y compris SarA, SigB, et SaeRS. Le plus étudié d'entre eux est le système Agr et les protéases engagées dans cette phase de dispersion incluent les protéines Aur, SspA et les staphopâines, qui ont la capacité de cataboliser des composants protéiques de la MEC, tels que FnBP, Bap et ClfB.¹¹⁹ La diffusion systémique à partir d'une infection sur biofilm *in vivo* est médiée par les PSM, qui facilitent le détachement du biofilm¹²⁷. Elle pourrait également hypothétiquement se produire via des enzymes dégradant le biofilm¹²⁸, bien que cela n'ait pas été établi *in vivo*.

Le rôle principal de la formation de biofilm pendant l'infection est de protéger les bactéries contre les phagocytes¹²⁹. Certains ont avancé que la formation de biofilm et les abcès présentent des caractéristiques similaires. Cependant, il y a certainement des différences clés. Par exemple, les biofilms ne sont généralement pas entourés de grandes couches de PNN comme le sont les abcès, ce qui est probablement dû au fait que dans les biofilms, *S. aureus* vit dans un état comparativement moins agressif¹³⁰ et ne produit ou n'élimine pas à travers la matrice du biofilm une grande quantité de molécules chimio-attractantes. De plus, il a été montré que les biofilms de *S. aureus* orientent la réponse immunitaire de l'hôte vers un état anti-inflammatoire^{129,131}.

3.6 Internalisation, persistance et distribution de l'infection

Une autre stratégie que *S. aureus* utilise pour échapper aux attaques du système immunitaire consiste à se réfugier à l'intérieur des cellules hôtes. Ce phénomène a été observé dans des phagocytes tels que les PNN et les monocytes^{132,133}, ainsi que dans une série de cellules non-phagocytaires, incluant les cellules épithéliales et endothéliales, les kératinocytes et les ostéoblastes¹³⁴. Les cellules de *S. aureus* qui persistent dans les PNN restent infectieux, et ce mécanisme d'internalisation est censé contribuer à la diffusion de *S. aureus* pendant une infection¹³². Son rôle principal est vraisemblablement la persistance pendant le passage dans le système circulatoire. L'invasion de cellules non-phagocytaires contribue à la chronicité de l'infection¹³⁴ et est en partie médiée par les FnBP¹³⁵, mais aussi d'autres facteurs tels que Eap¹³⁶. Les FnBP se lient à la fibronectine sur la surface cellulaire via un mécanisme de fermeture éclair tandem- β ¹³⁷. Après internalisation par phagocytose ou via les FnBP, *S. aureus* s'échappe du phagosome, en impliquant l'activité susmentionnée des PSM¹³⁸. Les événements qui mènent à la persistance intracellulaire contre la lyse de la cellule cible ne sont pas complètement compris. La formation de petites colonies (ou *small colony variant* en anglais, SCV), qui sont des cellules au métabolisme ralenti qui n'expriment pas de cytolysines, est probablement impliquée¹³⁹. Il est intéressant de noter que les SCV expriment de grandes quantités de FnBP, facilitant l'invasion des cellules eucaryotes voisines lors de la lyse cellulaire¹⁴⁰. Bien que la persistance dans les phagocytes puisse jouer un rôle dans la diffusion à travers la circulation sanguine, l'évasion d'un site d'infection établi, comme un abcès ou un biofilm, nécessite des mécanismes spécifiques supplémentaires. Des facteurs qui rompent un abcès et conduisent à la dissémination locale incluent la staphylokinase, une enzyme qui forme un complexe avec la plasmine, catalysant une activation supplémentaire du plasminogène, ce qui conduit finalement à une augmentation de la protéolyse et de la fibrinolyse¹⁴¹. Il convient de noter que l'activité de la staphylokinase est spécifique au plasminogène humain. Alors que l'initiation et le maintien de l'infection pendant les premiers jours sont principalement dus à une évasion efficace des défenses immunitaires innées, l'interaction de *S. aureus* avec la défense immunitaire acquise devient déterminante une fois cette branche du système immunitaire activée, après environ une à deux semaines post-infection. Il a déjà été mentionné l'importance cruciale de la protéine A à cet égard et les

nombreuses façons dont *S. aureus* interfère avec l'opsonisation. Une autre manière dont *S. aureus* interfère avec le système immunitaire adaptatif est de détourner les réponses des lymphocytes T, en particulier celles des lymphocytes T producteurs d'IL-17, dont plusieurs éléments suggèrent qu'ils jouent un rôle clé dans la défense de l'hôte contre *S. aureus*¹⁴². *S. aureus* peut induire un état de tolérance adaptative dans les lymphocytes T, par exemple via l'entérotoxine B¹⁴³, et les superantigènes, en général, peuvent réduire les réponses protectrices des lymphocytes T¹⁴⁴. De plus, l'inhibition des réponses des lymphocytes T observée pendant une infection murine à *S. aureus*¹⁴⁵ se produit via des cellules suppressives myéloïdes dérivées (MDSC), et dans une moindre mesure les lymphocytes T régulateurs (Treg)¹⁴⁶, mais on ne sait pas comment *S. aureus* induit ce mécanisme.

3.7 Les gènes de la virulence

Les facteurs de virulence de *S. aureus* sont souvent codés par des gènes du génome accessoire, distinct du génome principal, qui code principalement des fonctions d'entretien cellulaire. Ce génome accessoire inclut des éléments génétiques mobiles (ou *Mobile Genetic Elements* en anglais, MGE) tels que des plasmides, des transposons, des séquences d'insertion, des prophages et des îlots de pathogénicité, qui contiennent aussi des déterminants de résistance aux antibiotiques¹⁴⁷. La grande famille des îlots de pathogénicité staphylococciques, les SaPI (*Staphylococcal Pathogenicity Islands*), ne possède pas de machinerie de transfert comme les plasmides ou les phages, mais dépend de phages auxiliaires pour la transduction¹⁴⁸. Le génome accessoire contient également des îlots génomiques ($vSA\alpha$, $vSA\beta$, $vSA\gamma$) qui codent divers facteurs de virulence et semblent avoir une origine liée aux MGE, mais ont perdu leur capacité de transfert. Ils sont donc assez stables et suffisamment répandus pour que leur contenu puisse être considéré comme caractéristique de l'ensemble de l'espèce, bien que des sous-types spécifiques soient associés à différentes lignées¹⁴⁹. En contraste avec les MGE spécifiques à certains isolats, qui sont souvent liés à des maladies spécifiques ("toxinoses") en raison du codage des toxines responsables, telles que la TSST-1 ou les entérotoxines provoquant des intoxications alimentaires¹⁴⁸. Les plasmides et transposons contiennent généralement des gènes de résistance aux antibiotiques, tandis que les îlots de pathogénicité et les éléments prophagiques contiennent la plupart des toxines et autres déterminants de virulence de *S. aureus*¹⁵⁰. Parmi les toxines importantes codées sur les prophages, on compte

la PVL, les protéines d'évasion immunitaire CHIPS et SCIN, les toxines exfoliatives A et B ainsi que la staphylokinase et diverses entérotoxines. Il convient de noter que le gène codant pour la β -toxine (β -hémolysine), *hly*, souvent associé aux fonctions de virulence¹⁵¹, est rendu non fonctionnel chez de nombreuses souches de *S. aureus* par insertion du phage qui porte CHIPS, SCIN, et la staphylokinase¹⁵², un processus généralement appelé « conversion négative ». Des preuves suggèrent que le gène *hly* peut être "réparé" par excision du phage et est important pour la colonisation infectieuse¹⁵³. Les SaPI sont principalement connus pour les entérotoxines et la TSST. Les toxines codées sur les îlots génomiques et qui varient généralement seulement en expression entre différents isolats incluent la α -toxine, les peptides PSM, les SSL, les toxines de type lipoprotéine (LPL), la leucocidine LukDE et certaines entérotoxines^{150,154,155}. Il est intéressant de noter que l'îlot génomique *vSA β* contient également ce qui semble être un cluster de biosynthèse intact pour la production d'un lantibiotique (petit peptide ayant une activité antibiotique sur les bactéries à Gram +, en agissant sur la membrane bactérienne), mais son expression et son rôle potentiel dans l'interférence bactérienne n'ont jamais été directement démontrés¹⁵⁶. En outre, il convient de souligner que, bien que de nombreuses protéines MSCRAMM jouent des rôles clés dans la virulence et ne sont généralement pas codées par des gènes du génome accessoire, suggérant qu'ils aient des fonctions générales dans le mode de vie commensale de *S. aureus*.

3.8 Régulation de la virulence

L'expression des facteurs de la virulence de *S. aureus* est soumise à une grande variété de régulateurs. Celles-ci incluent la régulation par des facteurs régulateurs spécifiques de loci, tels que le gène *icaR* adjacent à l'opéron *ica*, qui est lui-même soumis à de nombreuses influences régulatrices¹⁵⁷, ou la protéine de détection des PSM, PmtR, qui contrôle l'opéron *pmt* exportateur de PSM¹⁵⁸. On trouve également des régulateurs globaux qui régulent une série de gènes de virulence, souvent influencés par des conditions environnementales spécifiques. Nous nous concentrerons ici sur quelques régulateurs globaux clés. Le régulateur de la virulence staphylococcique le plus étudié est Agr, qui est un système de QS augmentant l'expression de nombreuses toxines et déterminants de virulence lorsque la densité cellulaire atteint un certain seuil^{159,160}. Cette régulation est censée synchroniser l'expression des déterminants de la virulence avec l'état de l'infection, lorsqu'ils sont nécessaires pour

l'acquisition de nutriments et l'évasion immunitaire, tout en retardant leur expression lors des phases précoces de l'infection pour éviter le déclenchement de réponses immunitaires. En outre, au sein d'un phagosome, les facteurs de virulence contrôlés par Agr sont exprimés, probablement parce que l'environnement confiné active le système de QS par un mécanisme appelé « détection de diffusion »¹⁶¹. Historiquement, Agr a été décrit pour réguler majoritairement à la baisse les facteurs d'adhésion, supposés importants en début d'infection. Cependant, cette notion a été en grande partie remise en question suite à la reconnaissance de nombreuses fonctions supplémentaires des MSCRAMM et à la découverte qu'Agr ne régule pas la plupart des MSCRAMM de cette manière dans les souches cliniques¹⁶². Le contrôle le plus strict par Agr concerne les protéases sécrétées et les PSM. Les PSM sont directement contrôlés par le régulateur de réponse du système à deux composants AgrA, tandis que d'autres cibles d'Agr sont régulées de manière indirecte via l'ARN régulateur ARNIII, qui fait partie d'Agr et représente sa principale molécule effectrice intracellulaire^{163,164}. La régulation dépendante de l'ARNIII se produit dans la plupart des cas par inhibition d'une protéine répressive de liaison à l'ADN appelée Rot¹⁶⁵. Le signal de QS extracellulaire du système Agr est un peptide auto-inducteur contenant un thiolactone, modifié post-traductionnellement (AIP)¹⁶⁶. *S. aureus* a au moins quatre sous-groupes Agr qui diffèrent dans la séquence de l'AIP, son enzyme de modification AgrB et la kinase histidine membranaire AgrC, à laquelle il se lie et qui, une fois activée, déclenche la phosphorylation d'AgrA¹⁶⁷ (**Figure 8**).

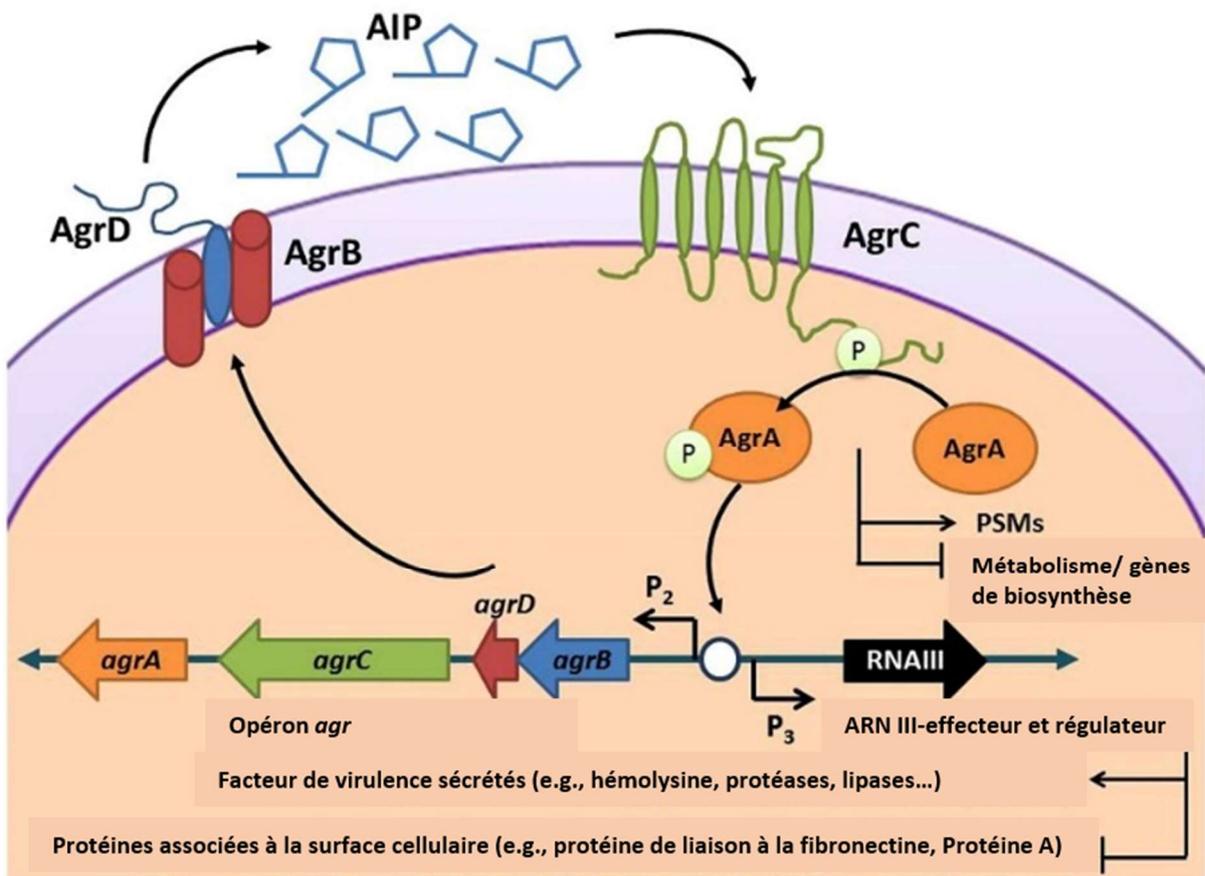


Figure 8. Le système Agr (adapté de Quave et al.¹⁶⁸).

La plupart des AIP non autochtones, y compris ceux d'autres espèces staphylococciques, sont inhibiteurs, ce qui pourrait jouer un rôle dans les interactions inter-bactériennes *in vivo*. Concernant la régulation de nombreuses toxines et autres facteurs de virulence, les mutants *agr* présentent des défauts significatifs dans de nombreux modèles d'infection animale, tels que dans l'endocardite infectieuse¹⁶⁹, les infections cutanées et des tissus mous¹⁷⁰, la pneumonie^{171,172}, l'arthrite septique¹⁷³, l'ostéomyélite¹⁷⁴ et la dermatite atopique¹⁷⁵. Des populations composées uniquement ou principalement de cellules dysfonctionnelles en Agr ont des avantages dans les infections associées aux biofilms en raison des biofilms élargis que forment les mutants *agr* et de la résistance accrue qui en résulte face aux attaques des neutrophiles¹⁷⁶. Ceci est censé expliquer la fréquence accrue des mutants *agr* isolés à partir d'infections chroniques et de bactériémies¹⁷⁷, qui proviennent généralement d'infections associées à des biofilms sur des dispositifs médicaux implantés. Il est à noter que des

mutations spontanées dans *agr* surviennent fréquemment en laboratoire, probablement en raison de l'absence de pression sélective pour l'expression des facteurs de virulence, ce qui associé à un manque d'analyse génétique approfondie - peut conduire à l'attribution erronée de fonctions régulatrices à d'autres protéines et systèmes^{178,179}.

D'autres régulateurs globaux importants pour lesquels les signaux environnementaux inducteurs sont connus incluent Fur, sensible à une faible disponibilité en fer¹⁸⁰, et SrrAB, qui est un régulateur sensible à l'oxygène¹⁸¹. Fur ne régule pas seulement l'absorption du fer, mais aussi une série de facteurs de virulence comme des toxines et des protéines d'évasion immunitaire¹⁸²⁻¹⁸⁴. On pense que le rôle de Fur est de coordonner l'attaque du pathogène sur l'hôte, la restriction en fer signalant l'entrée dans l'organisme et le besoin conséquent de ces facteurs. En conséquence, les mutants *fur* présentent une réduction significative de la virulence dans des modèles animaux d'infection^{183,184}. SrrAB est un système à deux composants sensibles à l'oxygène qui dépend de cystéines sensibles à l'oxydation¹⁸⁵ pour favoriser la résistance au stress oxydatif¹⁸⁶. Dans des conditions anaérobies, il régule à la baisse *agr* tout en augmentant l'expression de *ica*, ce qui a pour conséquence une résistance accrue aux attaques des neutrophiles¹⁸⁷.

La famille Sar comprend plusieurs protéines courtes (~120 acides aminés) avec des séquences de liaison à l'ADN en hélice-tour-hélice¹⁸⁸. Elles sont toutes homologues au prototype SarA et sont censées former des structures d'hélice ailée monomériques ou dimériques¹⁸⁹. Les protéines de la famille Sar ont de multiples cibles de facteurs de virulence et interagissent avec de nombreux autres systèmes régulateurs¹⁸⁸. Souvent, l'impact d'un homologue Sar sur un gène de virulence donné peut être opposé à celui d'un autre. SarA est surtout connu pour son fort impact sur l'expression des protéases, qui est en partie mais pas entièrement réalisé par la régulation d'*Agr*¹⁹⁰. L'existence de multiples homologues Sar aurait pour but d'ajuster finement l'expression des facteurs de virulence en fonction de différentes conditions environnementales, à l'instar de nombreux autres régulateurs ayant un impact prononcé et divergent sur l'expression des déterminants de la virulence de *S. aureus*, tels que SaeRS¹⁹¹ et ArlRS¹⁹², les déclencheurs moléculaires ou environnementaux de nombreux régulateurs de la famille Sar ne sont pas connus¹⁸⁸. Une exception notable est MgrA, qui a des effets multiples sur la virulence¹⁹³⁻¹⁹⁶, qui contient des cystéines sensibles au redox et réagit donc à l'oxygène et aux espèces réactives de l'oxygène¹⁹⁷. MgrA est similaire à SarZ, qui fonctionne également

comme un capteur d'oxydation utilisant une détection d'oxydation à base de thiol¹⁹⁸. À l'instar de nombreuses autres bactéries, *S. aureus* dispose d'un facteur sigma alternatif appelé SigB, dont le gène est intégré dans un locus qui héberge également une série de gènes anti-facteurs sigma, censés réagir à une multitude de conditions environnementales comme la phase de croissance et le choc thermique¹⁹⁹. SigB interagit avec de nombreux autres régulateurs, tels qu'Agg et SarA, et a un impact profond sur l'expression des gènes de virulence^{200,201}. SigB permettrait d'adapter la physiologie de *S. aureus* à une infection chronique²⁰².

II. Les infections ostéoarticulaires

1. Généralités

Les infections ostéo-articulaires (IOA) se caractérisent par la pénétration et la dégradation graduelle des tissus osseux et cartilagineux par un ou plusieurs agents pathogènes. Majoritairement d'origine bactérienne, ces affections englobent diverses manifestations cliniques²⁰³⁻²⁰⁵. Le terme d'IOA inclut les arthrites infectieuses, les ostéomyélites aiguës et chroniques, les spondylodiscites ainsi que les infections liées à des dispositifs orthopédiques (infections sur implants articulaires ou matériel d'ostéosynthèse). En France, avec une fréquence de 54,6 cas pour 100 000 personnes par an, ces maladies graves sont liées à un taux de mortalité de 4,6 % et provoquent des complications fonctionnelles dans environ 40 % des cas²⁰⁶. Un nombre significatif de ces IOA survient après des interventions chirurgicales, notamment la mise en place de prothèses, entraînant une infection du site chirurgical dans 0,5 à 2 % des situations. Bien que le risque infectieux soit modéré, l'incidence est susceptible de croître en corrélation avec le nombre croissant de poses de prothèse. Effectivement, l'augmentation de l'espérance de vie dans les nations industrialisées, ainsi que les modes de vie changeants des seniors (activités sportives, voyages, etc.) et des plus jeunes (sports à risque, motocyclisme, etc.), présagent une hausse exponentielle de l'usage de dispositifs orthopédiques, et par conséquent de ce genre d'infections^{207,208}.

2. Classification

En raison de la diversité clinique des IOA, divers systèmes de catégorisation ont été suggérés, prenant en compte des critères tels que le site anatomique de l'infection, son origine, la durée de progression, et la présence ou non de dispositifs orthopédiques²⁰³⁻²⁰⁵.

2.1 Catégorisation basée sur le site anatomique

L'arthrite septique représente une atteinte infectieuse, souvent bactérienne, impactant une ou plusieurs articulations^{203,209}. Le genou est le plus souvent le site concerné, suivi par la hanche et l'épaule. Cette condition est urgente car même si l'infection initiale est confinée au liquide synovial, elle a le potentiel de s'étendre rapidement, provoquant une dégradation irréversible de l'articulation entière et un risque accru de complications fonctionnelles. L'ostéomyélite est une affection inflammatoire causée par une infection conduisant à la nécrose et à la dégradation du tissu osseux²¹⁰. Elle peut se manifester à tout âge et affecter n'importe quel os. La pathologie peut être restreinte à une section limitée de l'os ou impliquer simultanément la moelle, le cortex, le périoste ou les tissus mous adjacents. Cierny et Mader ont élaboré un système de classification pour guider le traitement de ces pathologies selon le stade anatomique et l'état physiopathologique du patient²¹¹ (**Tableau 2**). Finalement, la spondylodiscite se définit comme une infection d'un disque intervertébral et des vertèbres voisines par un agent infectieux^{204,212}. Ceci constitue une urgence à la fois diagnostique et thérapeutique, pouvant aboutir à des anomalies morphologiques comme la gibbosité, des compressions de la racine et de la moelle épinière. Le rachis lombaire est le plus couramment affecté, suivi par les vertèbres thoraciques et cervicales²¹³.

Tableau 2. Classification des ostéomyélites selon Cierny et al.²¹¹.

Stades anatomiques			
	<p>Stade 1 : ostéomyélite intramédullaire, nécrose limitée à la médullaire</p> <ul style="list-style-type: none"> • Étiologie : hématogène <p><i>Traitement : antibiotique, drainage chirurgical</i></p>		
	<p>Stade 2 : ostéomyélite superficielle, nécrose à la surface exposée</p> <ul style="list-style-type: none"> • Étiologie : infection de contiguïté <p><i>Traitement : antibiotique, débridement superficiel, couverture</i></p>		
	<p>Stade 3 : ostéomyélite localisée (séquestre cortical), nécrose bien individualisable, atteinte localisée de la corticale, instabilité osseuse avant ou après débridement</p> <ul style="list-style-type: none"> • Étiologie : traumatisme, évolution de stade 1 ou 2, iatrogène (vis, plaque) <p><i>Traitement : antibiotique, débridement, séquestrectomie immobilisation ± greffe osseuse</i></p>		
	<p>Stade 4 : ostéomyélite diffuse, atteinte circonférentielle de la corticale, instabilité osseuse avant ou après débridement</p> <ul style="list-style-type: none"> • Étiologie : traumatisme, évolution de stade 1-2 ou 3, iatrogène (clou) <p><i>Traitement : antibiotique, débridement, séquestrectomie ± greffe osseuse stabilisation (ORIF, fixateur externe [Ilizarov], amputation</i></p>		
État physiopathologique			
<p>A : Absence d'anomalie</p> <p>B : Anomalies</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="vertical-align: top; width: 50%;"> <p>Bs : généralisées</p> <ul style="list-style-type: none"> - dénutrition - insuffisance hépatique et/ou rénale - diabète - hypoxémie chronique - maladie auto-immune - néoplasie - immunodéprimé ou immunosuppresseurs - extrémité des âges de la vie - tabagisme </td> <td style="vertical-align: top; width: 50%;"> <p>B1 : localisées</p> <ul style="list-style-type: none"> - lymphœdème chronique - insuffisance veineuse - fibrose postradique - escarre - neuropathie </td> </tr> </table> <p>C : État général précaire</p>		<p>Bs : généralisées</p> <ul style="list-style-type: none"> - dénutrition - insuffisance hépatique et/ou rénale - diabète - hypoxémie chronique - maladie auto-immune - néoplasie - immunodéprimé ou immunosuppresseurs - extrémité des âges de la vie - tabagisme 	<p>B1 : localisées</p> <ul style="list-style-type: none"> - lymphœdème chronique - insuffisance veineuse - fibrose postradique - escarre - neuropathie
<p>Bs : généralisées</p> <ul style="list-style-type: none"> - dénutrition - insuffisance hépatique et/ou rénale - diabète - hypoxémie chronique - maladie auto-immune - néoplasie - immunodéprimé ou immunosuppresseurs - extrémité des âges de la vie - tabagisme 	<p>B1 : localisées</p> <ul style="list-style-type: none"> - lymphœdème chronique - insuffisance veineuse - fibrose postradique - escarre - neuropathie 		

2.2 Classification selon la présence d'implants orthopédiques

Les IOA associées à des dispositifs orthopédiques englobent des contaminations en lien avec des prothèses (principalement de la hanche, du genou ou de l'épaule) et des matériaux d'ostéosynthèse (comme des vis, clous et plaques). La présence d'implants augmente le potentiel infectieux via plusieurs mécanismes. Initialement, l'absence de microcirculation autour de l'implant réduit l'efficacité du système immunitaire et la diffusion locale d'antibiotiques. De plus, l'interaction des dispositifs étrangers avec les PNN entraîne un relâchement de peptides neutrophiles qui inhibe localement la phagocytose²¹⁴. Finalement, ces implants fournissent une surface d'adhésion pour la formation de biofilms²¹⁵. Ces facteurs contribuent significativement à réduire la quantité d'inoculum bactérien nécessaire pour initier une infection²¹⁶. Le risque de contamination sur une prothèse lors d'une bactériémie à *S. aureus* est considérable, estimé entre 30 % et 40 % selon les études, comparé à 1-2 % pour d'autres souches bactériennes²¹⁷⁻²¹⁹. Ce risque est dû à l'affinité prononcée de *S. aureus* pour le tissu osseux et les protéines matricielles qui recouvrent l'implant, notamment via ses adhésines. La vulnérabilité à l'infection persiste bien au-delà de la chirurgie initiale, et peut se manifester tout au long de la vie du patient équipé d'une prothèse.

2.3 Classification selon la durée d'évolution

Le temps d'évolution des IOA a une incidence critique sur leur gestion. Typiquement, les IOA sont classifiées comme aiguës (moins de 3 semaines entre l'exposition bactérienne et l'intervention médicale) ou chroniques (plus de 3 semaines), même si les critères temporels peuvent varier d'un auteur à l'autre^{220,221}. Les formes aiguës se manifestent par des symptômes cliniques marqués, des signes d'inflammation locale (douleur, rougeur, chaleur) et/ou systémique (fièvre, réaction inflammatoire biologique). À l'opposé, les infections chroniques évoluent généralement en sourdine, accompagnées de fistules, d'anomalies radiologiques osseuses et de séquestres osseux—des zones de tissus osseux nécrotiques résistantes à l'action des antibiotiques et du système immunitaire. De plus, ces infections chroniques sont souvent associées à la formation de biofilms, qui les protège contre les antibiotiques et le système immunitaire. Ces aspects rendent le diagnostic et le traitement des infections chroniques plus complexe. Finalement, distinguer entre une infection aiguë et

une infection chronique peut parfois s'avérer délicat à déterminer avec précision ; c'est souvent une progression de l'une vers l'autre. Il est crucial de se rappeler que le seuil temporel définissant une infection chronique sur implant reste une question encore en suspens et fait actuellement l'objet de recherches variées. Ce cadre aide à diriger le diagnostic ainsi qu'à identifier l'origine probable du micro-organisme. En effet, les infections précoces résultent généralement d'une contamination durant la chirurgie par des bactéries virulentes comme *S. aureus* ou des bacilles à Gram négatif. Les infections différées proviennent aussi souvent d'une contamination peropératoire mais par des bactéries moins agressives comme les SCN et *Cutibacterium* (anciennement *Propionibacterium*) *acnes*. Enfin, les infections tardives sont le plus souvent causées par une voie hématogène.

3. Épidémiologie

3.1 Données démographiques

Peu de recherches ont examiné l'incidence globale des IOA, la plupart des études se focalisant sur des hôpitaux particuliers dans un pays ou une région donnée. En France, tous les séjours hospitaliers sont documentés dans la base de données nationale du Programme Médicalisé des Systèmes d'Information (PMSI), ce qui permet une approximation de l'incidence globale des IOA. Une étude publiée en 2013 a analysé les données de 2008²⁰⁶. Selon cette recherche, 36 091 cas d'IOA ont été enregistrés parmi les 16 millions de séjours hospitaliers en 2008 en France, représentant une prévalence globale de 54,6/100 000 habitants. Principalement, ces cas étaient des arthrites septiques (52 %), suivies d'ostéomyélites (34 %), de spondylodiscites (10 %), et d'IOA non spécifiées (4 %). Les hommes étaient plus souvent affectés que les femmes (rapport de sexe H/F = 1,54) et l'âge moyen était de 63,1 ans. La moitié des patients avaient au moins une comorbidité, les plus communes étant le diabète, les maladies vasculaires périphériques et les infections des tissus mous. Le taux de mortalité était estimé à 4,6 %. Un tiers des cas étaient des infections sur implant, 58 % d'entre elles impliquant des prothèses articulaires. Dans ces infections, le rapport de sexe était plus équilibré, et la prévalence était plus élevée chez les individus obèses et les patients de plus de 65 ans.

3.2 Diversité bactérienne

La répartition des agents pathogènes varie selon le type d'IOA, la localisation géographique et l'âge des patients. Le genre *Staphylococcus* est le plus commun, suivi par les bacilles à Gram négatif^{206,209,213,222–224}. Selon différentes études et populations, *S. aureus* est responsable de 30 à 80 % des IOA, et de 12 à 25 % des infections sur implant. Les SCN représentent 5 à 17 % des IOA, mais 25 à 40 % des infections sur implant. Les bactéries à Gram négatif se retrouvent dans 10 à 30 % des IOA et 3 à 17 % des infections sur implant. Les streptocoques et entérocoques représentent entre 10 et 20 % des IOA et sont surtout associés à des portes d'entrée dentaire et digestive. La grande majorité des infections sont causées par un seul type de bactérie (44 à 90 % des cas). Les staphylocoques prédominent dans ce type d'infections en raison de leur présence asymptomatique sur la peau humaine. Plusieurs études ont souligné l'importance de détecter *S. aureus* et de décoloniser les patients porteurs avant une intervention orthopédique pour réduire le risque d'infections post-opératoires^{225,226}.

4. Démarche diagnostique

4.1 Clinique

Le dépistage est crucial dans la gestion des IOA, et un diagnostic effectué en temps utile peut grandement améliorer les chances de réussite du traitement. Néanmoins, le vaste éventail de symptômes et leur faible spécificité rendent le diagnostic difficile sur le plan clinique. En général, les IOA se caractérisent par de la fièvre, des douleurs couplées à une raideur locale et une limitation fonctionnelle, ainsi que des signes locaux d'inflammation^{203–205}. En cas d'implant, la formation d'une fistule à proximité et/ou un sepsis en l'absence d'une autre origine infectieuse sont indicateurs d'une infection. Dans les mois qui suivent l'implantation d'une prothèse, des anomalies dans la guérison de la plaie (sécrétion purulente, séparation ou nécrose de la plaie, inflammation cicatricielle) et des douleurs atypiques sont des éléments d'infection probable²²⁷. Les spondylodiscites sont souvent associées à des douleurs dorsales et des complications neurologiques dans environ un tiers des cas (perturbations sensorielles, faiblesse, radiculopathie)²¹². Dans certains cas, notamment pour les infections chroniques, l'absence de fièvre (qui peut concerner jusqu'à 50 % des patients) et de signes locaux d'inflammation peut compliquer le diagnostic. Il devient alors impératif de prendre en compte

d'autres indicateurs (tels que des critères biologiques ou des données d'imagerie) pour distinguer une infection d'un simple descellement mécanique ou de l'usure de l'implant.

4.2 Microbiologie

Les échantillons microbiologiques sont essentiels pour documenter la présence d'une infection et personnaliser le traitement antibiotique. Diverses directives sont en vigueur²²⁸. Les lignes directrices françaises, publiées sous l'égide du Référentiel de Microbiologie (Rémic) par la Société Française de Microbiologie et relatives aux "Infections ostéo-articulaires sur matériel", précisent que ces prélèvements, autant que possible, doivent être effectués au moins 15 jours après cessation de tout traitement antibiotique et doivent être acheminés rapidement et en conditions stériles au laboratoire²²⁹. En l'absence d'épanchement, le prétraitement des échantillons tissulaires ou de prothèse est fondé sur le broyage des prélèvements et/ou la sonication des matériels explantés. L'objectif est de libérer les bactéries incluses dans le biofilm qui adhèrent fortement au matériel. En présence de fièvre et de symptômes généraux, des hémocultures peuvent être pratiquées, fournissant un diagnostic dans 50 % des cas d'IOA aiguës. Un échantillonnage du liquide synovial offre un résultat positif dans 50 % des situations²³⁰. Les prélèvements reçus au laboratoire doivent être cultivés sur plusieurs types de milieux nutritifs solides et liquides et maintenus en culture prolongée (jusqu'à 14 jours) pour identifier des bactéries à croissance lente²³¹. Une évaluation histologique des biopsies doit également être menée pour détecter des indicateurs d'inflammation tissulaire, notamment leucocytes, plasmocytes et polynucléaires neutrophiles^{232,233}. Des techniques moléculaires (PCR universelles ou spécifiques) peuvent contribuer au diagnostic en cas de résultats de culture négatifs²³⁴.

4.3 Imagerie

Diverses techniques d'imagerie médicale sont actuellement à disposition pour faciliter le diagnostic. Une radiographie conventionnelle, à la fois simple et économique, devrait toujours être la première étape diagnostique, peu importe le type d'IOA. Sa fiabilité fluctue entre 43 et 75 % en sensibilité, et entre 75 et 83 % en spécificité, ces chiffres étant affectés par des facteurs comme l'ancienneté et la localisation de l'infection^{212,235}. L'IRM est particulièrement sensible, surtout pour un diagnostic précoce. Elle offre un aperçu de l'état des tissus mous environnants, la présence d'abcès, et les signes d'inflammation, bien qu'elle puisse être inappropriée pour certains matériaux. L'échographie est utile pour identifier un épanchement articulaire ou un abcès et peut également guider une ponction. Le CT scan fournit une analyse détaillée des composants osseux. De plus, l'imagerie fonctionnelle peut fournir des informations précieuses. En ce qui concerne les infections associées aux implants, l'efficacité des techniques d'imagerie dépend du moment de l'implantation du dispositif. Une infection précoce ou hémotogène peut réduire la précision des tests.

5. Prise en charge

La prise en charge des IOA est intrinsèquement complexe, exigeant souvent une intervention chirurgicale en complément d'un traitement antibiotique de longue durée, initialement administré par voie intraveineuse (IV). Faute d'études randomisées multicentriques avec des effectifs suffisants, les protocoles actuels s'appuient en grande partie sur les recommandations de bonnes pratiques françaises et internationales^{99,234}, fondées sur des opinions d'experts.

5.1 Intervention chirurgicale

L'opération chirurgicale a plusieurs buts : i) réduire de manière significative la charge bactérienne, condition *sine qua non* pour la réussite du traitement antibiotique ; ii) effectuer les échantillonnages microbiologiques en profondeur pour identifier le ou les agent(s) pathogène(s); et iii) éliminer les tissus osseux et mous nécrosés et/ou le dispositif implanté pour accroître les chances de réussite du traitement. Pour les cas d'ostéite chronique, une

chirurgie est impérative pour éliminer l'infection²³⁷. La création d'un environnement viable et bien vascularisé après un débridement complet (retrait des tissus nécrosés et séquestrés) est essentielle²³⁸. Lorsque du matériel d'ostéosynthèse est présent, il est généralement conseillé de le retirer complètement. La stabilisation des lésions osseuses non cicatrisées pourrait être réalisée avec un fixateur externe. Dans le cas d'une arthrite septique, l'élimination des tissus purulents est souvent nécessaire, que ce soit par aspiration ou par lavage chirurgical, habituellement par arthroscopie ou par arthrotomie si une ostéite est également présente^{238,239}. Pour les spondylodiscites, la chirurgie n'est généralement conseillée qu'en cas d'échec du traitement antibiotique, pour des raisons diagnostiques ou en présence de complications locales sévères²¹². L'objectif est alors de soulager la pression sur la moelle épinière ou de drainer les abcès épiduraux ou paravertébraux. Toutefois, en cas d'infection rachidienne liée à du matériel d'ostéosynthèse, une nouvelle intervention chirurgicale est impérative pour nettoyer ou enlever le dispositif²⁴⁰. En effet, conserver l'implant, notamment dans les infections tardives, est souvent lié à des échecs thérapeutiques. Pour les infections associées à une prothèse articulaire, une intervention chirurgicale est systématiquement requise. Pour les infections aiguës (infections postopératoires précoces, prises en charge moins de 15 jours après l'implantation, pouvant aller jusqu'à 3-4 semaines selon les recommandations), ou en cas d'infection aiguë hémotogène sans descellement, un nettoyage synovial avec conservation du matériel peut être envisagé, son succès étant lié à sa réalisation rapide²⁴¹. Les facteurs contribuant à l'échec d'une approche de traitement conservateur incluent des comorbidités telles que le diabète, l'immunodépression, et la polyarthrite rhumatoïde, ainsi que la présence d'une fistule ou l'isolement de *S. aureus*^{242,243}. Les taux d'échec pour ce type de traitement varient considérablement, s'échelonnant entre 30 % et 80 % selon diverses recherches^{242,244}.

5.2 Antibiothérapie

En matière de prise en charge médicale des IOA, une antibiothérapie prolongée, souvent administrée par voie IV initialement, est couramment employée. La sensibilité des micro-organismes aux antibiotiques ne garantit pas à elle seule le succès thérapeutique, car d'autres facteurs comme la diffusion osseuse limitée de certaines substances, la présence de biofilm, la présence de bactéries intracellulaires et la formation de SCV compromettent leur efficacité^{245,246}. En raison de la diversité des IOA et de multiples facteurs pronostiques (concernant le patient, le microorganisme, la chirurgie et le traitement antibiotique), l'optimisation de l'antibiothérapie ne repose actuellement sur aucune étude randomisée, mais plutôt sur des travaux prospectifs ou rétrospectifs, souvent descriptifs et de puissance faible, synthétisés dans de récentes méta-analyses^{247,248}. Le traitement antibiotique des IOA doit idéalement commencer en combinaison, notamment pour les infections staphylococciques, avec des médicaments qui obtiennent des niveaux plasmatiques élevés et une bonne distribution osseuse. En présence de sepsis, le traitement antibiotique est souvent initié sur une base probabiliste après des tests microbiologiques. L'administration initiale est habituellement parentérale pour une durée de 15 jours. Un passage à une administration orale peut être envisagé si des antibiotiques à forte biodisponibilité et diffusion osseuse sans intolérance digestive ni interaction médicamenteuse sont utilisables sur l'agent pathogène identifié²²¹. Si un passage oral est impossible, un cathéter central ou un dispositif implantable peut maintenir le traitement en ambulatoire²⁴⁹. Pour un traitement conservateur ou un changement en une seule étape, les antibiotiques efficaces contre les bactéries en biofilm doivent être favorisés. Dans ce contexte, la rifampicine s'est montrée efficace contre les infections staphylococciques^{250,251}, mais ne doit jamais être utilisée seule en raison du risque de développement rapide de résistances. Une association avec une molécule bactéricide bien distribuée dans l'os, comme les fluoroquinolones, est souvent recherchée²⁵². D'autres combinaisons, comme les β -lactamines (pour les souches sensibles à la méticilline), les glycopeptides, la clindamycine ou le linézolide, sont également possibles. Cependant, la rifampicine réduit les niveaux plasmatiques de la clindamycine, ce qui peut entraîner des sous-dosages²⁵³. Concernant d'autres agents pathogènes des IOA, pour les infections à streptocoques ou entérocoques, l'amoxicilline demeure l'antibiotique de choix et peut être

combinée avec la gentamicine ou la rifampicine. En cas d'infections à bactéries anaérobies, le manque de données ne permet pas de recommandations sauf pour les IOA à *C. acnes*, où l'amoxicilline, la clindamycine, la céfazoline ou la ceftriaxone peuvent être utilisées²⁵⁴. La durée du traitement est également sujet à débat, habituellement entre 6 et 12 semaines. Cependant, aucune durée optimale de traitement pour les IOA n'a été démontrée dans les deux méta-analyses susmentionnées. Pour les IOA aiguës sans implant, un traitement antibiotique unique est souvent suffisant pour éliminer l'infection²³⁷. La période de traitement recommandée varie de 4 à 6 semaines, avec une transition vers une administration orale quand c'est faisable, suivant les mêmes directives que pour les IOA avec matériel. Pour les infections causées par le SASM, l'oxacilline et la cloxacilline demeurent les options thérapeutiques de 1^{er} choix. Comme leur diffusion dans l'os est faible, environ 10 % de la concentration plasmatique, des doses élevées sont requises²⁵⁵. Pour les infections à SARM, les β -lactamines traditionnelles ne sont pas efficaces, à l'exception des nouvelles céphalosporines anti-SARM (ceftaroline et ceftobiprole). Les glycopeptides tels que la vancomycine et la téicoplanine sont alors le choix initial recommandé. Leur distribution dans l'os varie considérablement entre les études, allant de 5 à 87 % de la concentration plasmatique^{256,257}. Néanmoins, ils ne devraient pas être privilégiés sur les β -lactamines pour traiter des infections à SASM, car plusieurs études ont montré que c'était un facteur de risque d'échec thérapeutique²⁵⁸⁻²⁶⁰. La daptomycine constitue actuellement une alternative, même si elle n'est pas formellement indiquée pour traiter les IOA. Son utilisation est néanmoins soutenue par un nombre croissant de publications^{261,262}. D'autres choix de traitements alternatifs incluent le linézolide, les céphalosporines anti-SARM et la tigécycline. En ce qui concerne les autres agents bactériens causant des IOA, l'amoxicilline est le choix initial pour les infections à streptocoques, les quinolones pour celles à bactéries à Gram négatif, et les β -lactamines ou la clindamycine pour les infections à anaérobies. Le **Tableau 3** détaille les différents antibiotiques proposés pour le traitement des arthrites septiques sur articulations natives de l'adulte en fonction des principales espèces bactériennes. Malgré une gestion chirurgicale et une antibiothérapie optimale, les taux d'échec rapportés dans la littérature restent significatifs, en particulier pour les infections complexes impliquant *S. aureus*, pouvant aller de 20 à 40 % des cas.

Tableau 3. Antibiothérapie proposées pour le traitement des arthrites septiques sur articulations natives de l'adulte en fonction des principales espèces bactériennes isolées (d'après Couderc et al.²⁶³).

Espèce bactérienne	Antibiotique Intraveineux en première intention	Antibiotique per os en relais (selon antibiogramme)	Antibiotique en cas de contre-indication
SASM	cloxa- ou oxacilline ou cefazoline	Rifampicine ^c + FQ ^d ou FQ ^d + Clindamycine ^e	Avis infectiologique Choix parmi Daptomycine, Rifampicine + autres(cyclines, linézolide)
SARM	Vancomycine ou Teicoplanine	Rifampicine ^c + FQ ^d ou FQ ^d + Clindamycine ^e	
Streptocoques	Amoxicilline	Amoxicilline	Clindamycine ou FQ ^d anti-streptococcique
Entérocoques	Amoxicilline + Gentamicine ^f ou Amoxicilline + Ceftriaxone (Avis infectiologique)	Amoxicilline	Avis infectiologique
Entérobactéries du groupe 1 et 2	Cefotaxime ou Ceftriaxone	FQ ^d (si souche sensible à l'acide nalidixique)	Avis infectiologique
Entérobactéries du groupe 3 ^a	Cefepime	Avis infectiologique selon antibiogramme	Avis infectiologique
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ceftazidime + Ciprofloxacine ^b	Avis infectiologique selon antibiogramme	Avis infectiologique
Anaérobies	Amoxicilline si sensible ou Metronidazole	Clindamycine ou Amoxicilline	Avis infectiologique
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Ceftriaxone ou Cefotaxime	FQ ^d	Avis infectiologique

(a) Les entérobactéries du groupe 3 (*Enterobacter sp*, *Citrobacter freundii*, *Serratia sp*, *Morganella sp*, *Providencia sp*) ne doivent pas être traitées par une céphalosporine de 3^{ème} génération (induction de céphalosporinase rendant l'antibiotique inactif), mais par une céphalosporine de 4^{ème} génération comme le cefepime.

(b) Une bithérapie Ceftazidime + amikacine peut être utilisée les 48 premières heures (diminution de l'inoculum bactérien) en attendant l'antibiogramme définitif (Sensibilité à la ciprofloxacine).

(c) La rifampicine ne doit pas être utilisée en monothérapie.

(d) FQ : les fluoroquinolones utilisables dans le traitement de l'arthrite septique sont : ofloxacine, lévofloxacine, ciprofloxacine et moxifloxacine. Toutes ces FQ ont une activité antistaphylococcique, sur les entérobactéries et sur le gonocoque. La lévofloxacine et la moxifloxacine ont une activité antistreptococcique. La ciprofloxacine et la lévofloxacine ont une activité antipyocyanique. L'usage de la moxifloxacine doit être prudent en raison de sa toxicité cardiaque (troubles du rythme) et de sa potentielle toxicité hépatique.

(e) La monothérapie de clindamycine pourrait être proposée comme alternative (seconde intention), selon les recommandations américaines, dans les infections staphylococciques sensibles (à l'érythromycine et à la clindamycine), en particulier si résistance FQ et/ou rifampicine.

(f) La gentamicine est proposée pour une durée de 3 à 5 jours en l'absence d'endocardite associée.

III. Relation hôte-pathogène au cours des infections ostéoarticulaires à S. aureus

1. Physiopathologie du tissu osseux

Le tissu osseux est un milieu composite, non-uniforme et anisotrope. La matrice osseuse extracellulaire se compose d'une phase minérale et d'une phase organique²⁶⁴. La composante organique est principalement une matrice extracellulaire protéique, riche en fibres de collagène, qui procure à l'os sa flexibilité. La phase minérale, quant à elle, est formée de cristaux d'hydroxyapatite qui sont ancrés à la matrice organique, lui attribuant sa fermeté. Le tissu osseux est constamment en phase de réorganisation, ce qui permet le renouvellement de la structure vieillissante et la réparation des petites fractures²⁶⁵. Les structures osseuses allongées comme le radius ou le fémur possèdent une macrostructure davantage étirée en longueur qu'en largeur. Ils ont une importance cruciale en matière de mobilité et sont fréquemment utilisés comme modèle dans l'étude de la microstructure osseuse²⁶⁴. Une ossature mature typique est constituée d'une portion tubulaire, nommée diaphyse, et de deux extrémités élargies et arrondies appelées épiphyses (**Figure 9**). La diaphyse est principalement faite d'os cortical, tandis que l'épiphyse est formée d'os trabéculaire, recouvert d'une enveloppe d'os cortical²⁶⁴. L'os cortical représente la composante dense de la structure osseuse, alors que l'os trabéculaire est un tissu poreux rempli de moelle osseuse.

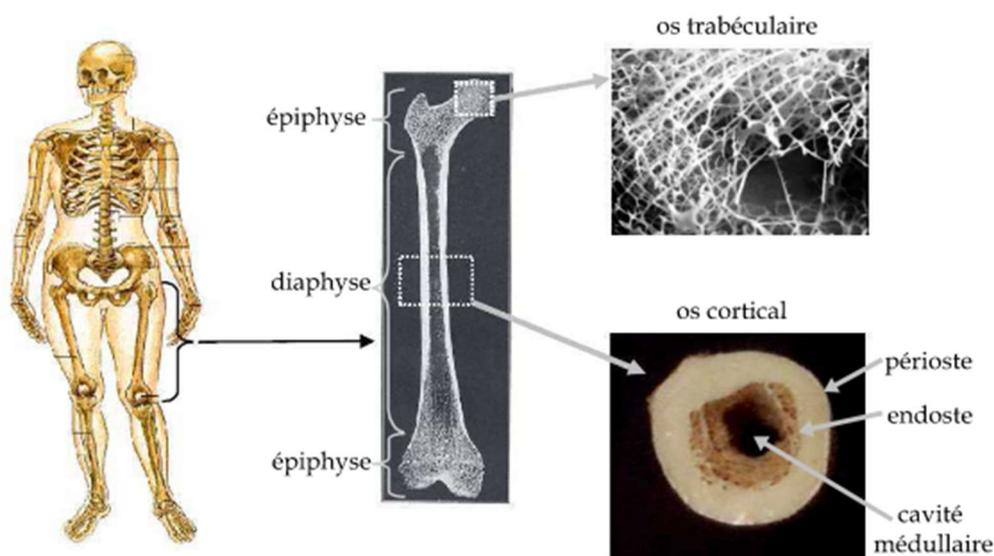


Figure 9 : Structure de l'os long : os trabéculaire et os cortical (d'après Bossy²⁶⁶).

Chez l'adulte, le renouvellement de l'os trabéculaire se fait tous les 3 à 4 ans, tandis que le taux de renouvellement de l'os cortical est d'environ une décennie²⁶⁷. Le système squelettique est donc un mécanisme dynamique, maintenu en état de flux continu grâce à l'activité de deux sortes de cellules : les ostéoblastes et les ostéoclastes. Les ostéoblastes, situés à la surface osseuse, sont responsables de la création et de la minéralisation de la matrice osseuse^{267,268}. Les ostéoclastes, en revanche, décomposent la matrice osseuse. Contrairement aux ostéoblastes, qui sont des cellules mononucléées d'origine mésenchymateuse, les ostéoclastes sont multinucléés et proviennent de la lignée myéloïde. Le processus de décomposition du tissu osseux, composé de protéines incrustées dans une matrice minéralisée, peut être divisé en deux phases : (i) la déminéralisation de la matrice, ce qui rend les composants protéiques accessibles ; et (ii) la protéolyse de ces composants protéiques. À la surface des ostéoclastes se trouvent des ATPases à protons (H^+) et des canaux chlore de type 7 (ClC7), qui permettent la libération d'acide chlorhydrique dans un espace clos, la lacune de résorption, ce qui entraîne la déminéralisation de la matrice^{265,267,269,270}. Cette déminéralisation facilite ensuite la protéolyse des éléments protéiques, principalement réalisée grâce à la production de cathepsine K, qui peut décomposer le collagène et l'ostéonectine^{271,272} (**Figure 10**). Un déséquilibre dans les taux d'activité entre les ostéoblastes et les ostéoclastes peut être à l'origine de divers troubles liés au remodelage osseux²⁷³. Par

exemple, une suractivité des ostéoclastes est impliquée dans des conditions comme l'ostéoporose, tandis qu'une activité ostéoblastique excessive peut conduire à des maladies telles que l'ostéopétrose ou l'ostéosclérose.

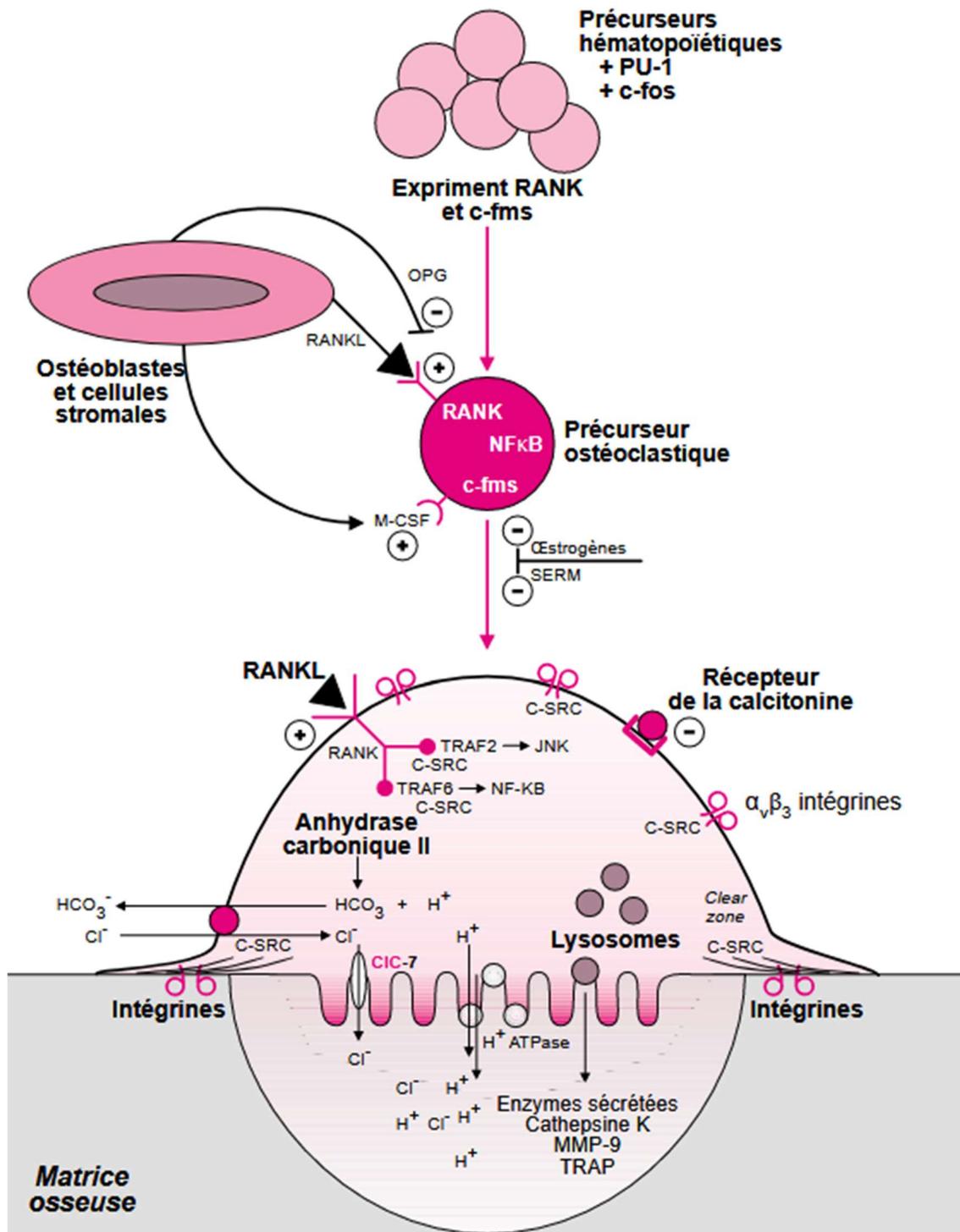


Figure 10. Caractéristiques morphologiques et fonctionnelles de l'ostéoclaste (d'après Baron²⁷⁴).

Une infection par un agent pathogène tel que *S. aureus* peut entraîner une perturbation de l'équilibre entre l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes. Ce déséquilibre est en partie modulé par les cytokines produites par les cellules en réaction à la bactérie ou à ses toxines. Les cytokines pro-inflammatoires les plus pertinentes dans ce cadre sont le TNF- α , l'interleukine 1 β (IL-1 β , la forme libérée de l'IL-1) et l'IL-6²⁷⁵. On observe une augmentation des niveaux plasmatiques de ces trois cytokines chez les patients souffrant d'infection osseuse^{276,277}. Des concentrations élevées d'IL-1 β , d'IL-6 et de TNF- α sont également détectées dans le liquide synovial des patients atteints d'arthrite infectieuse²⁷⁸. La principale source locale de ces cytokines est vraisemblablement l'infiltration des cellules immunitaires dans le tissu osseux en réponse à l'infection²⁷⁹⁻²⁸¹. L'IL-6 est également produite par les ostéoblastes en réponse à divers facteurs, y compris l'infection par *S. aureus*^{279,281}. Ces cytokines ont un impact significatif sur le remodelage osseux. Les modèles de culture cellulaire montrent que l'IL-1 et le TNF- α favorisent la prolifération des cellules précurseurs d'ostéoclastes et leur transformation en ostéoclastes matures, un processus appelé ostéoclastogénèse²⁸²⁻²⁸⁴. L'IL-1 et le TNF- α stimulent également l'activité de résorption osseuse par les ostéoclastes, en particulier en présence d'ostéoblastes²⁸⁵⁻²⁸⁷. De même, l'IL-6 accélère l'activité de résorption osseuse dans les modèles cellulaires murins^{280,288}. D'autre part, l'IL-1 et le TNF- α inhibent la transformation des cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes et suppriment la capacité de minéralisation des ostéoblastes matures, ce qui conduit à une réduction de la production et de la minéralisation de la matrice osseuse²⁸⁹. Ces observations suggèrent que les cytokines IL-1 β , TNF- α , et IL-6 ont un rôle central dans la régulation du remodelage osseux, et toute fluctuation dans leurs niveaux d'expression pourrait significativement affecter ce processus. En général, l'influence des cytokines sur l'homéostasie osseuse résulte d'un mélange d'effets favorisant et inhibant l'ostéoclastogénèse. Il est bien établi que les médiateurs pro-inflammatoires, produits localement et systématiquement en réaction à l'infection par *S. aureus*, ont principalement un effet pro-ostéoclastogénique²⁹⁰. Au-delà de leur rôle dans le déclenchement de la réponse inflammatoire, qui impacte indirectement les ostéoblastes et les ostéoclastes, *S. aureus* interagit également directement avec ces cellules. L'infection par *S. aureus* limite la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes et inhibe la capacité de formation osseuse des ostéoblastes matures^{291,292}. De plus, le contact direct entre *S. aureus*

et les ostéoclastes entraîne une activation de ces derniers²⁹⁰. Par conséquent, l'infection par *S. aureus*, en supprimant directement la fonction de minéralisation des ostéoblastes, en amplifiant l'activité de résorption des ostéoclastes et en initiant la libération de substances pro-inflammatoires, mène finalement à la dégradation du tissu osseux.

2. Adaptation bactérienne aux infections chroniques : survie intracellulaire, biofilm et SCV

Le taux d'échecs et de récurrences est plus grand dans les cas d'IOA chroniques par rapport aux ostéomyélites aiguës. En plus de facteurs liés à l'hôte tels que l'âge, un état général médiocre, ou l'existence de dispositifs implantés, il y a probablement des facteurs associés à l'adaptation du staphylocoque à l'état chronique de l'infection qui contribuent à ces complications thérapeutiques. Trois mécanismes physiopathologiques contribuent à cette adaptation bactérienne : la survie intracellulaire de *S. aureus* dans les ostéoblastes (**Figure 11**), le mode de vie sous forme de biofilm et l'apparition de variants phénotypiques à croissance réduite, les SCV.

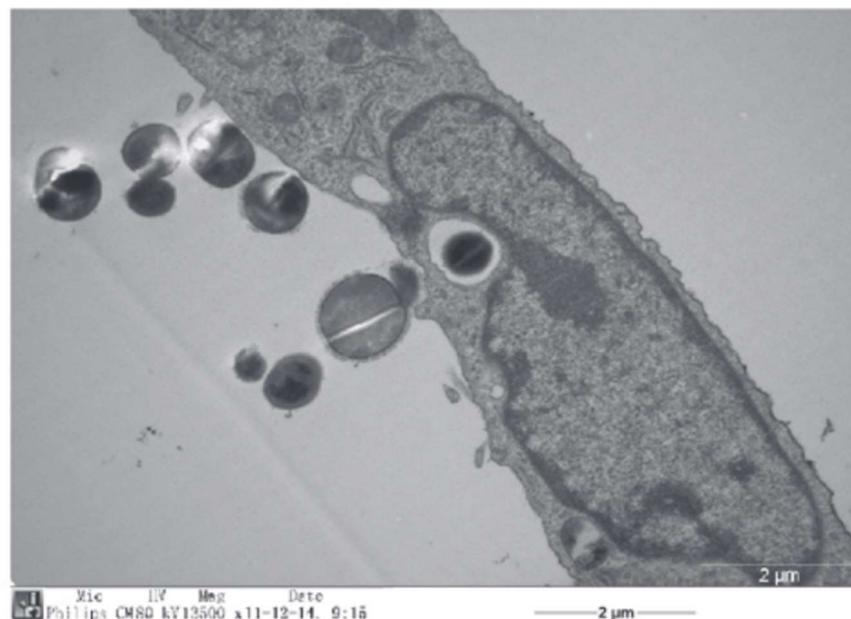


Figure 11. Internalisation de *S. aureus* par un ostéoblaste observée au microscope électronique à transmission (d'après Shi et al.²⁹³).

2.1 Invasion intra-ostéoblastique par *S. aureus*

L'infiltration et la survie intracellulaire de *S. aureus* sont bien documentées dans divers types de cellules, y compris les cellules épithéliales et endothéliales, les kératinocytes, et les ostéoblastes^{134,294–297}. Cette pénétration d'ostéoblastes a aussi été confirmée dans des modèles animaux²⁹⁸. En outre, les staphylocoques localisés dans l'espace intracellulaire des ostéoblastes peuvent déclencher une nouvelle infection²⁹⁹. Bien que les preuves actuelles soient limitées pour affirmer catégoriquement que cette invasion se produit chez l'homme durant les IOA, des arguments soutiennent cette idée, tels que l'identification, par coloration de Gram et microscopie électronique à transmission, d'ostéoblastes infectés par des bactéries à Gram positif ressemblant au genre *Staphylococcus* chez un patient avec une infection chronique et récurrente de la fibula²⁴⁶. Ainsi, l'idée d'un sanctuaire intracellulaire – selon laquelle le comportement facultativement intracellulaire de *S. aureus* offre une cachette protégée contre le système immunitaire et la plupart des antibiotiques – gagne de plus en plus de crédibilité parmi les chercheurs. Ce phénomène est également considéré comme une explication plausible pour le caractère chronique, récurrent ou indolent de certaines infections osseuses, ainsi que pour les taux élevés d'échecs en antibiothérapie³⁰⁰. Cependant, la signification clinique de la persistance intracellulaire de *S. aureus* dans le contexte des IOA n'est pas encore établie.

2.2 Le mode de vie en biofilm

Les recherches actuelles indiquent que toutes les souches de *S. aureus* récupérées d'IOA associées à des prothèses produisent des biofilms, tandis qu'environ un tiers des souches de *S. epidermidis* n'adoptent pas ce comportement²¹⁵. Comme nous l'avons vu dans la partie biofilm du manuscrit, le cycle de vie d'un biofilm commence par l'attachement des bactéries planctoniques à une surface inerte, qu'elle soit d'origine endogène, comme des fragments osseux, ou exogène, comme des implants médicaux. Les biofilms exhibent de multiples mécanismes de résilience face aux approches d'éradication, qu'elles soient mécaniques, immunitaires ou chimiques. Mécaniquement parlant, la capacité d'adhésion et la souplesse structurelle du biofilm lui permettent de résister aux forces de cisaillement, comme celles exercées lors d'un rinçage en chirurgie. D'un point de vue immunitaire, la matrice polymère

du biofilm agit comme une barrière contre les cellules phagocytaires de l'hôte ainsi que contre une gamme de molécules antimicrobiennes, y compris les anticorps, les peptides antimicrobiens et les radicaux libres. Chimiquement, vivre en biofilm rend les bactéries considérablement plus résistantes à une grande variété d'antibiotiques et d'antiseptiques³⁰¹. En conséquence, la concentration d'antibiotique nécessaire pour inhiber la croissance des bactéries en biofilm peut être jusqu'à 1000 fois supérieure à la concentration minimale inhibitrice couramment observée pour des bactéries planctoniques³⁰². De plus, la résistance aux antibiotiques telles que la vancomycine augmente avec le temps d'évolution du biofilm³⁰³. Ainsi, le mode de vie en biofilm crée un réservoir bactérien résistant face au système immunitaire et aux antibiotiques, tout en permettant également la possibilité d'une propagation bactérienne différée.

2.3 La réduction métabolique : les SCV

La persistance des infections chroniques, qu'elles résultent de la vie en biofilm ou d'une localisation intracellulaire, s'accompagne de modifications adaptatives bactériennes, notamment un métabolisme ralenti. Cette adaptation métabolique peut aboutir à l'apparition de formes phénotypiques alternatives appelées SCV. Ces variants ont été identifiés à la fois chez *S. aureus* et chez les SCN, sans être spécifiques au genre *Staphylococcus*³⁰⁴. L'émergence des SCV découle de l'adaptation bactérienne aux conditions sélectives d'une infection chronique, telles que la diminution des ressources et le stress induit par les réponses cellulaires ou immunitaires. Le phénotype SCV se montre particulièrement adapté à la survie prolongée au sein des cellules³⁰⁵. Les bactéries présentant ce phénotype réussissent à persister dans un environnement intracellulaire en limitant les réponses défensives de la cellule hôte. Elles montrent également une propension accrue à pénétrer dans de nouvelles cellules comparativement aux bactéries avec un phénotype standard. Bien que leur rôle dans la persistance des infections intracellulaires demeure sujet à débat, il pourrait être schématisé en trois phases : i) une sous-population bactérienne pénètre le milieu intracellulaire et adopte un phénotype SCV; ii) cette sous-population demeure viable et protégée de la destruction par les réponses immunitaires et les antibiotiques potentiellement utilisés ; iii) après la mort de la cellule hôte, les SCV sont relâchés et envahissent de nouvelles cellules, établissant ainsi un réservoir bactérien durable et potentiellement à l'origine d'infections récurrentes³⁰⁵. La

croissance réduite des SCV affaiblit l'efficacité des antibiotiques agissant sur la paroi cellulaire, tout comme pour les bactéries en biofilm. Les SCV montrent aussi une interruption du transport électronique à travers la membrane, réduisant la pénétration des aminosides qui dépendent d'un gradient électrochimique pour traverser la membrane bactérienne et atteindre leur cible ribosomale³⁰⁴. Les SCV posent également un défi diagnostique. Leur métabolisme lent invalide certains tests phénotypiques couramment utilisés pour l'identification des bactéries, comme les tests d'agglutination ou les tests biochimiques. Il peut aussi retarder la détection de certains indicateurs comme la coagulase libre ou la pigmentation des colonies de *S. aureus*. Ces caractéristiques augmentent le risque d'erreurs diagnostiques, les SCV pouvant être non détectés ou incorrectement identifiés comme des SCN. Les échantillons suspects de SCV, surtout dans un contexte d'infection chronique, devraient idéalement être confirmés par des méthodes non dépendantes du métabolisme, comme la PCR pour détecter des gènes spécifiques de *S. aureus* ou la spectrométrie de masse³⁰⁴. Il a été suggéré que la présence de SCV et, plus largement, d'isolats à métabolisme réduit, pourrait être un indicateur de la persistance d'une infection, notamment dans le contexte d'IOA³⁰⁴. Cette information microbiologique devient cruciale lorsque l'historique clinique de l'IOA, qui est souvent peu symptomatique, n'offre pas de moyens fiables pour établir l'ancienneté de l'infection. La persistance de l'infection est généralement associée à l'existence d'un biofilm mature et/ou d'un dépôt intracellulaire, des facteurs qui peuvent influencer les décisions thérapeutiques. Des techniques comme la spectrométrie de masse ont récemment permis l'identification d'isolats de *S. aureus* ayant un métabolisme ralenti. Une caractéristique commune à ces bactéries est la désactivation du régulateur principal des toxines, le système *agr*. L'activité de ce régulateur peut être évaluée en mesurant les niveaux d'expression de la δ -toxine, dont l'ARN messager est contrôlé par *agr*³⁰⁶. En effet, l'absence du pic lié à la δ -toxine dans les analyses de spectrométrie MALDI-ToF a été corrélée à la persistance de l'infection dans une série de cas de patients atteints d'IOA à *S. aureus*³⁰⁷.

3. Modèles d'IOA *in vitro*

3.1 Généralités

Bien que les modèles précliniques soient reconnus comme des méthodes préliminaires essentielles pour évaluer de nouveaux biomatériaux utiles en orthopédie, les réglementations de plus en plus strictes concernant l'utilisation de modèles *in vivo* ont conduit au développement de modèles *in vitro* d'infection d'ostéoblastes par *S. aureus*. Parmi ces derniers, des cellules primaires d'origine humaine et animale³⁰⁸⁻³¹¹, des lignées cellulaires immortalisées³¹², des cellules malignes^{313,314} et des cellules souches pluripotentes induites (iPS) sont employées non seulement pour tester des médicaments et des biomatériaux, mais également pour étudier la biologie osseuse. Il est vrai que les cellules primaires, directement issues de patients, imitent plus fidèlement le comportement de la niche cellulaire d'origine, se rapprochant ainsi des conditions cliniques. Cependant, au fil du temps, les chercheurs et les cliniciens ont constaté que les différences phénotypiques et souvent génotypiques de ces cellules, isolées de divers patients, compliquent l'étude de la maladie concernée et, par conséquent, la mise en place de la meilleure stratégie thérapeutique. Des progrès dans la compréhension de la biologie osseuse et, en particulier, des cellules ostéoblastiques ont été réalisés grâce à l'élaboration de lignées cellulaires ostéoblastiques stabilisées. Ces modèles sont utiles pour l'étude *in vitro* de la différenciation cellulaire, la régulation des cytokines et des hormones, la synthèse et la sécrétion de protéines matricielles, ainsi que les mécanismes moléculaires des maladies osseuses³¹⁵. Il n'existe pas de preuves montrant la supériorité d'un modèle par rapport aux autres ; par conséquent, une évaluation de leurs avantages et inconvénients respectifs, basée sur les études à réaliser, est cruciale. Les cultures primaires sont un modèle *in vitro* qui utilise des cellules directement obtenues à partir de biopsies tissulaires (~1 cm³) ou de dissections d'organes. Ces cellules ont la caractéristique unique de conserver leurs propriétés génétiques, morphologiques et fonctionnelles. Cela en fait les indicateurs les plus représentatifs du phénotype cellulaire normal et de la progression précoce de la maladie. Ils sont donc couramment utilisés comme outils *in vitro* pour des études biologiques précliniques, ainsi que pour des études toxicologiques, tout en réduisant le nombre d'animaux nécessaires lors des phases initiales des études de toxicologie préclinique, ce qui est économique.

3.2 Utilisation de la lignée cellulaire ostéoblastique MG-63

La lignée cellulaire MG-63 est extraite d'un ostéosarcome juxta-cortical diagnostiqué dans la diaphyse distale du fémur gauche d'un adolescent de 14 ans³¹³. Il a récemment été décrit que la cinétique de croissance cellulaire des cellules MG-63 était analogue à celle des cellules primaires osseuses³¹⁶. Ces cellules ont en plus la capacité de prolifération infinie typique des cellules malignes, où l'absence de contrôle intrinsèque du cycle cellulaire contribue à la progression tumorale. Des travaux ont également démontré que l'activité de la phosphatase alcaline, une enzyme caractéristique des ostéoblastes matures, était plus faible dans les cellules MG-63 que dans les cellules primaires³¹⁶. Ce résultat confirme le degré de différenciation différent des MG-63, orienté vers un phénotype plus immature, par rapport aux cellules primaires osseuses.

L'analyse de l'expression de gènes spécifiques aux ostéoblastes³¹⁶ révèle que le facteur de transcription Runx2, qui régule l'expression génique de protéines cruciales de la matrice osseuse, est plus fortement exprimé dans les cellules MG-63 que dans les cellules primaires osseuses³¹⁷. Le collagène de type I est fondamental pour la fonctionnalité des cellules ostéoblastiques³¹⁸ et est sur-exprimé dans la phase antérieure à la minéralisation de la matrice^{319,320} afin de permettre la formation de fibrilles et la maturation physiologique ultérieure de la matrice. À l'inverse, les cellules MG-63 montrent une faible expression du collagène de type I et de l'ostéocalcine³¹⁶. Par conséquent, les études publiées soulignent les restrictions de ces cellules comme modèle pour le développement phénotypique des ostéoblastes, ainsi que pour l'évaluation de la minéralisation de la matrice et les propriétés des nouveaux biomatériaux³¹⁶. Néanmoins, la lignée cellulaire MG-63 s'est avérée être un modèle *in vitro* valable pour l'étude des mécanismes d'infection bactérienne, notamment lors de l'internalisation de *S. aureus*^{307,321,322}. En 2010, des travaux ont montré que la réponse immunitaire innée contre les agents pathogènes implique l'activation d'une voie inflammatoire connue sous le nom de voie d'activation de l'inflammasome³²³. Les inflammasomes sont des complexes de signalisation multiprotéiques qui se forment après la reconnaissance de signaux de stress/pathogéniques ; parmi ceux-ci, la caspase-1 est la plus impliquée³²⁴. Stimulée par les pathogènes, la caspase-1 se lie à une molécule adaptatrice connue sous le nom de protéine speck-like associée à l'apoptose (ASC)³²⁴. Cette liaison conduit

au clivage autocatalytique de la caspase-1, et à la sécrétion des formes matures d'IL-1 et IL-18, déclenchant dans certains cas même une forme de mort cellulaire inflammatoire (pyroptose)³²⁵. Des études récentes ont montré que cela s'applique également à *S. aureus* et aux cellules MG-63³²⁶. Enfin, il a été démontré que l'internalisation, en utilisant des cellules MG-63, est une voie physiopathologique de certaines souches de SARM qui dépendent du nombre total de cellules infectées et non du nombre de cellules bactériennes qui pénètrent chaque ostéoblaste. De plus, différentes souches de *S. aureus* ont montré une persistance intracellulaire élevée dans les cellules MG-63, les rendant plus susceptibles de développer des infections chroniques et récurrentes³²⁷.

Bien que les lignées cellulaires primaires, et en particulier les cellules primaires osseuses, aient l'avantage de conserver leurs caractéristiques génétiques, morphologiques et physiologiques, elles ont également une durée de vie limitée et sont difficiles à cultiver et à maintenir en cultures continues. Les cellules MG-63, sont un modèle *in vitro* valable pour l'étude de l'internalisation et de la persistance de *S. aureus*, tant en ce qui concerne les mécanismes sous-jacents à la capacité de *S. aureus* à adhérer, envahir et persister au sein des ostéoblastes que dans la réponse cellulaire de l'hôte suite à l'infection.

4. Modèles d'IOA *in vivo*

4.1 Historique des modèles animaux dans l'étude des IOA

La littérature scientifique regorge de multiples publications sur les modèles animaux pour explorer la pathogenèse, le diagnostic et le traitement des IOA. Dans ce cadre, l'utilisation de modèles animaux est essentielle pour élaborer des thérapies préventives et curatives³²⁸. Dans certains cas, la manifestation clinique de l'IOA par voie hématogène varie considérablement entre les patients à cause de divers facteurs (ex. âge, sexe, voie d'infection, localisation anatomique et comorbidités), qui peuvent influencer les études cliniques. En revanche, les modèles animaux offrent un moyen de contrôler et d'examiner ces variables³²⁸. Entre la seconde moitié du XIX^{ème} siècle et 1970, le nombre de rapports scientifiques utilisant des animaux comme modèles d'IOA était assez limité. Toutefois, à la fin du XX^{ème} siècle, une augmentation progressive du nombre de publications centrées sur ce sujet a été observée, renforçant l'hypothèse que le développement des antibiotiques a eu un impact positif sur les études d'IOA impliquant des modèles animaux³²⁹. Les deux rapports scientifiques les plus novateurs concernant les modèles (lapins) pour l'ostéomyélite ont été réalisés par Rodet (1885) et Lexer (1894), qui ont administré du *S. aureus* par voie intraveineuse pour induire la formation d'abcès³³⁰. Plusieurs années plus tard, trois études indépendantes : Starr (1922), Haldeman (1934) et Thompson & Dubos (1938), ont constaté que suite à l'injection intraveineuse et/ou intra-osseuse de *S. aureus* chez les lapins, des lésions typiques d'ostéomyélite présentaient des similarités microscopiques avec celles observées chez les humains^{331,332}. Dans toutes ces recherches, un facteur commun a été identifié : l'injection directe de bactéries vivantes ou atténuées provoquait la mort des animaux en quelques jours après le traitement, entraînant la formation d'abcès dans différents organes et occasionnellement des lésions osseuses³²⁸. En 1941, Scheman a introduit un nouveau modèle de lapin pour l'ostéomyélite, basé sur l'injection directe de *S. aureus* et de morrhuate de sodium dans la métaphyse tibiale. Dans cette étude, les sujets expérimentaux ne sont pas morts de sepsis, et des lésions d'ostéomyélite chronique sont apparues sur le site d'injection au fil des semaines³³³.

Émanant de ces études fondamentales, généralement considérées comme l'épine dorsale de la recherche sur les modèles d'IOA utilisant des animaux, les chercheurs ont élaboré de nouveaux modèles et protocoles pour concevoir des stratégies préventives visant à comprendre les caractéristiques moléculaires spécifiques de cette condition clinique^{328,329}. Depuis le début du XX^{ème} siècle, le lapin n'a plus été le seul modèle utilisé pour étudier les IOA. D'autres espèces ont également été examinées : Hamblen (1968) et Zak (1982) ont introduit des modèles chez le rat³³⁴, Ueno (1974) a employé des modèles murins³³⁰, Deysine (1976) et Fitzgerald (1983) se sont concentrés sur des modèles canins^{335,336}, Passl (1979) a étudié l'ostéomyélite aiguë chez les cobayes³³⁷, Emslie (1983) a analysé le premier modèle aviaire (poulets) d'ostéomyélite aiguë^{338,339}, Patterson (1993) a élaboré un modèle de mini-porc pour l'ostéomyélite mandibulaire chronique³⁴⁰, et Curtis (1995) et Kaarsemaker (1997) ont travaillé respectivement sur un modèle de fracture ouverte chez la chèvre et un nouveau modèle d'ostéomyélite chronique chez le mouton³⁴¹.

4.2 Quel est le modèle animal le plus approprié pour la procédure expérimentale ?

Parler d'une espèce animale parfaite pour imiter l'IOA par voie hématogène est utopique ; néanmoins, il est faisable de spécifier une espèce idéale pour une meilleure compréhension de cette maladie. Le modèle animal hypothétique doit présenter des caractéristiques moléculaires, cellulaires, structurelles et mécaniques similaires à celles retrouvées dans l'os humain, en plus d'être facile à élever et à manipuler, économique, très tolérant aux traitements pharmacologiques (par exemple, l'administration d'antibiotiques), et d'une taille permettant des interventions chirurgicales comparables à la pratique clinique³²⁸. Chaque modèle animal présente des attributs spécifiques qui le rendent plus adapté à un objectif donné. Par exemple, une comparaison des tissus osseux corticaux fémoraux et trabéculaires lombaires entre les animaux (ex. chiens, porcs, poulets et rats) et les humains a montré que les modèles canins et porcins ont des proportions minérales similaires à celles des humains³⁴². De plus, les porcs et les chiens présentent des avantages pour affiner les procédures chirurgicales (ex. excision des abcès et implantation de prothèses/dispositifs médicaux) en raison de la taille des os longs³⁴³.

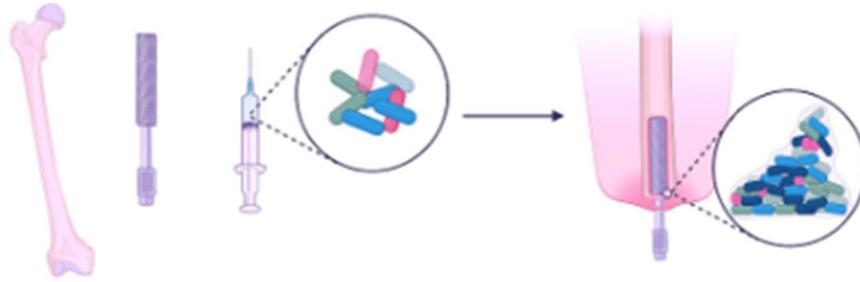
À l'inverse, la petite taille des souris, rats, lapins et poulets les rend inadéquats pour les procédures chirurgicales sur des os longs³²⁸. De plus, les os de souris, de rats et de lapins sont spécifiques pour des tests microbiologiques quantitatifs (ex. décompte cellulaire).

4.3 Les voies d'inoculation

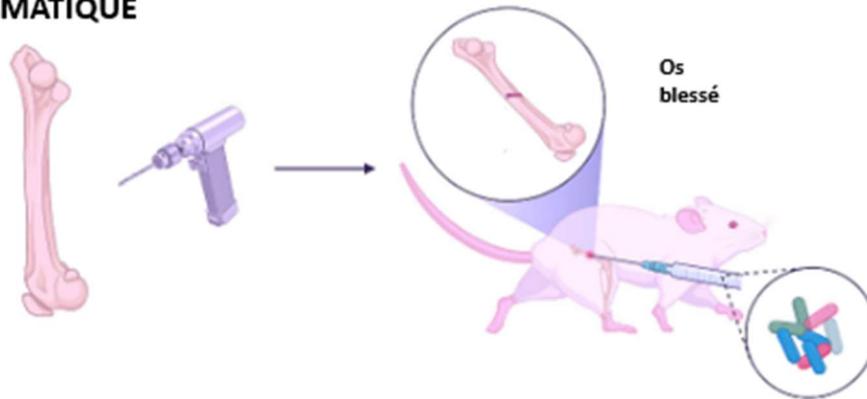
Trois voies d'inoculation ont été couramment utilisées pour les IOA expérimentales : inoculation dans la cavité osseuse, inoculation locale par le biais des artères nutritives (inoculation intra-artérielle) et inoculation systémique par injection IV^{328,329}.

Pour reproduire le développement des IOA et les modifications micro-environnementales dans le tissu osseux, il est essentiel de délivrer les agents pathogènes dans un compartiment anatomique défini sans créer de sepsis ou d'infection métastatique. Les résultats de l'injection IV sont les moins susceptibles de relever ce défi³⁴⁴. Comme l'ostéomyélite se produit souvent dans un seul os sans se propager systématiquement, la voie intra-artérielle est considérée comme la meilleure inoculation pour générer une infection prévisible et anatomiquement confinée. La méthode liée à l'implant déclenche une ostéomyélite à l'aide d'un dispositif infecté pour étudier et mettre au point des revêtements ou des implants dotés de propriétés antibactériennes (**Figure 12**). Cette approche est pratique pour des études axées sur des molécules anti-biofilm. La création d'une fracture osseuse suivie de son infection par des bactéries constitue la méthode post-traumatique. Dans ce cas, la technique aide à comprendre la manière dont les bactéries peuvent se propager dans le tissu osseux et via le système circulatoire. De plus, l'utilisation de fils de fixation externes imprégnés ou recouverts de molécules antibactériennes peut être réalisée pour mieux caractériser la durabilité des nouveaux implants. Enfin, l'injection IV de bactéries permet d'obtenir une arthrite septique suivi d'une ostéomyélite hémotogène, atteignant spontanément les os (**Figure 12**).

IMPLANT



POST-TRAUMATIQUE



HEMATOGENE

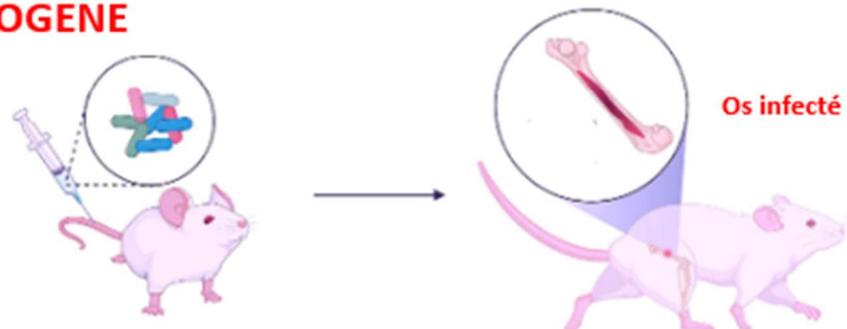


Figure 12. Induction expérimentale d'IOA chez la souris (adapté de Meroni et al.³⁴⁵).
L'injection IV des bactéries via la veine caudale de la souris permet d'obtenir une arthrite septique.

IV. Les peptides antimicrobiens

1. Historique des antibiotiques : De la découverte aux défis contemporains

L'avènement des antibiotiques marque une révolution majeure dans le domaine médical, ayant bouleversé la prise en charge des infections bactériennes et ayant sauvé d'innombrables vies depuis près d'un siècle³⁴⁶. Le voyage à travers l'histoire de ces molécules précieuses est aussi fascinant qu'instructif, éclairant notre compréhension sur les défis actuels. Bien que le XX^{ème} siècle ait vu la naissance des antibiotiques modernes, la lutte contre les infections remonte à l'antiquité. Les anciennes civilisations utilisaient des remèdes telles que les moisissures et certaines plantes pour traiter les infections. Les égyptiens, par exemple, utilisaient des cataplasmes de moisissures pour soigner des plaies infectées³⁴⁷. La découverte fortuite de la pénicilline par Alexander Fleming en 1928 est souvent considérée comme le point de départ de l'ère moderne des antibiotiques³⁴⁸. Alors qu'il étudiait *S. aureus*, Fleming a observé que les colonies bactériennes étaient détruites par une moisissure, *Penicillium notatum*. Cette découverte, bien que non exploitée immédiatement, a ouvert la voie à la production à grande échelle de la pénicilline dans les années 1940, en particulier pendant la seconde guerre mondiale où son rôle fut déterminant dans la prise en charge des blessés. Suite à la découverte de la pénicilline, les années 1940 et 1950 sont souvent désignées comme "l'âge d'or" des antibiotiques^{346,349} (**Figure 13**). Des classes variées comme les tétracyclines, les aminosides, les macrolides et les céphalosporines ont été découvertes. Ces molécules, issues soit de produits naturels, soit de (hémi)synthèses chimiques, ont considérablement élargi l'arsenal thérapeutique, offrant des options pour une multitude d'infections. Dès les années 1960, l'enthousiasme initial a été tempéré par la reconnaissance de la capacité des bactéries à développer des mécanismes de résistance³⁴⁹. L'utilisation massive, souvent inappropriée, en médecine humaine et vétérinaire, ainsi que dans l'agriculture, a favorisé la sélection de souches résistantes³⁵⁰. Cette résistance a conduit à une course continue pour développer de nouveaux antibiotiques³⁵¹. Dans les pays de l'Union Européenne (UE), les infections résistantes aux antibiotiques ont entraîné plus de 38 000 décès et impacté la vie de plus d'un million de personnes en raison de décès prématurés ou d'années vécues avec des incapacités rien qu'en 2019³⁵². L'impact économique de la résistance aux antimicrobiens est

également considérable, coûtant environ 1,1 milliard d'euros par an à l'UE en frais de santé supplémentaires³⁵². Les risques associés à une ère post-antibiotique ont incité les décideurs politiques à reconnaître cette menace pour la santé humaine et à promettre des financements supplémentaires, stimulant progressivement un regain d'intérêt pour la découverte et le développement de nouveaux antibiotiques^{353,354}. Une des recommandations clés est de stimuler la découverte de médicaments en phase précoce³⁵⁵. Étant donné le manque relatif de succès dans la mise sur le marché d'antibiotiques synthétiques efficaces³⁵⁵, le meilleur espoir pour développer une nouvelle génération de médicaments anti-infectieux est de découvrir de nouveaux produits naturels microbiens car ces composés sont inégalés en termes de diversité chimique et d'efficacité en tant qu'antibiotiques³⁴⁶.

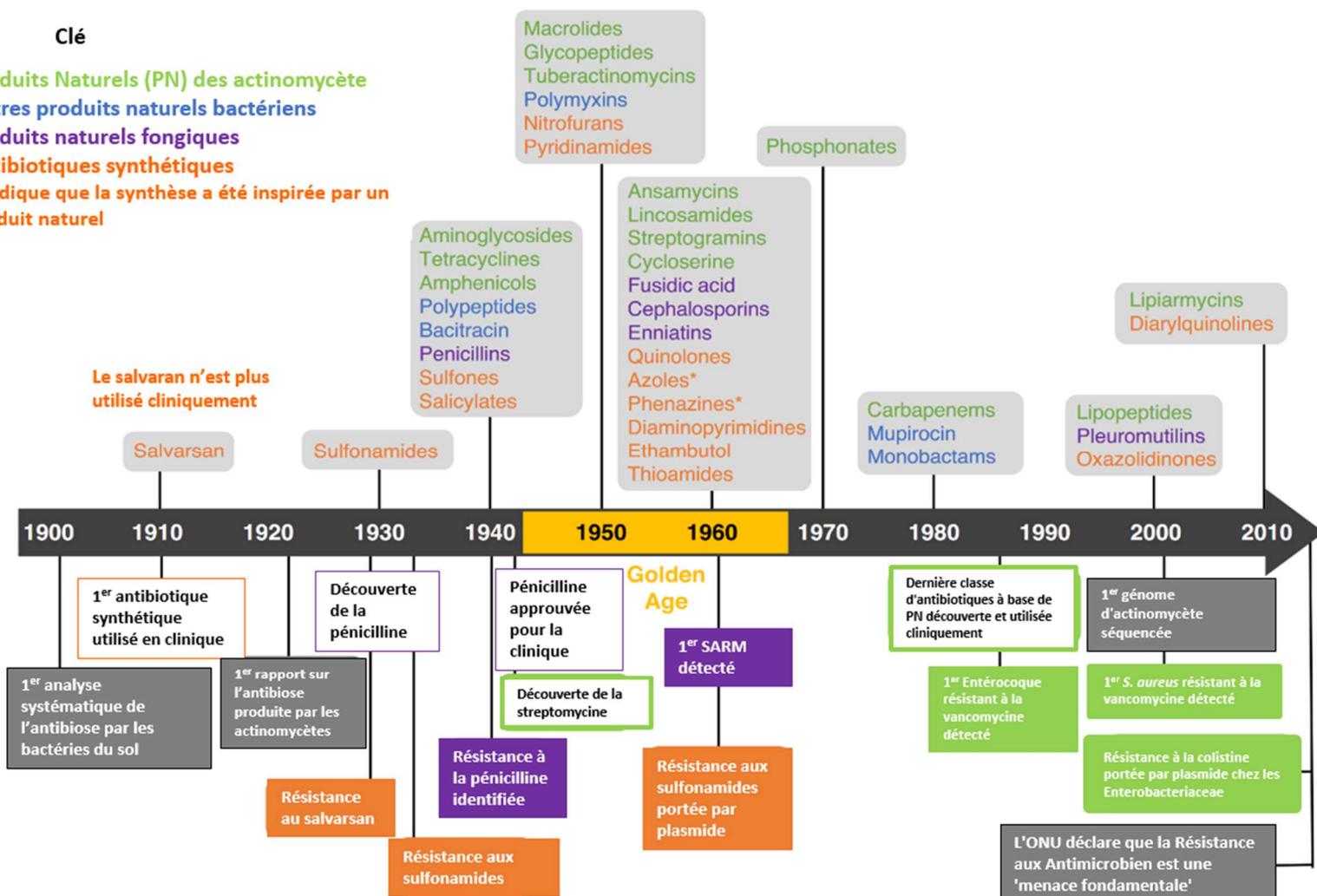


Figure 13. Chronologie de l'introduction clinique de nouvelles catégories d'antibiotiques (adapté de Hutchings et al.³⁵⁶).

2. Classification des antibiotiques

La classification des antibiotiques se base sur divers critères tels que la structure chimique, l'origine, le spectre d'activité et le mécanisme d'action³⁵⁷ :

- Les β -lactamines, comprenant 4 sous-familles (pénicillines, céphalosporines, monobactames et carbapénèmes), inhibent la synthèse du peptidoglycane en se liant aux Protéines de Liaison à la Pénicilline (PLP)
- Les macrolides et apperentés (lincosamides, strptogramines) inhibent la synthèse protéique en ciblant le ribosome bactérien
- Les tétracyclines agissent également sur le ribosome et perturbent la synthèse protéique
- Les quinolones entravent la réplication et la transcription de l'ADN en ciblant les topoisomérases de type II (ADN gyrase et topoisomérase IV)
- Les aminosides inhibent la synthèse de protéines en se liant à la sous-unité 30S du ribosome
- Les phénicolés agissent par inhibition de la synthèse protéique en se fixant à la sous-unité ribosomale 50S, au niveau de l'ARN 23S.
- Les sulfamides inhibent le métabolisme des folates.
- Les glycopeptides sont des inhibiteurs de la synthèse de la paroi en se fixant au niveau des extrémités D-Ala-D-Ala des précurseurs pentapeptidiques du peptidoglycane, et inhibant ainsi les étapes de transglycosylation et de transpeptidation
- Les oxazolidinones agissent en inhibant la synthèse protéique par inhibition de la formation du complexe d'initiation 70S de la traduction
- Les rifamycines agissent par inhibition de l'ARN polymérase bactérienne en se fixant au niveau de la sous-unité β

La **Figure 14** liste les principales classes d'antibiotiques ainsi que leurs mécanismes d'action.

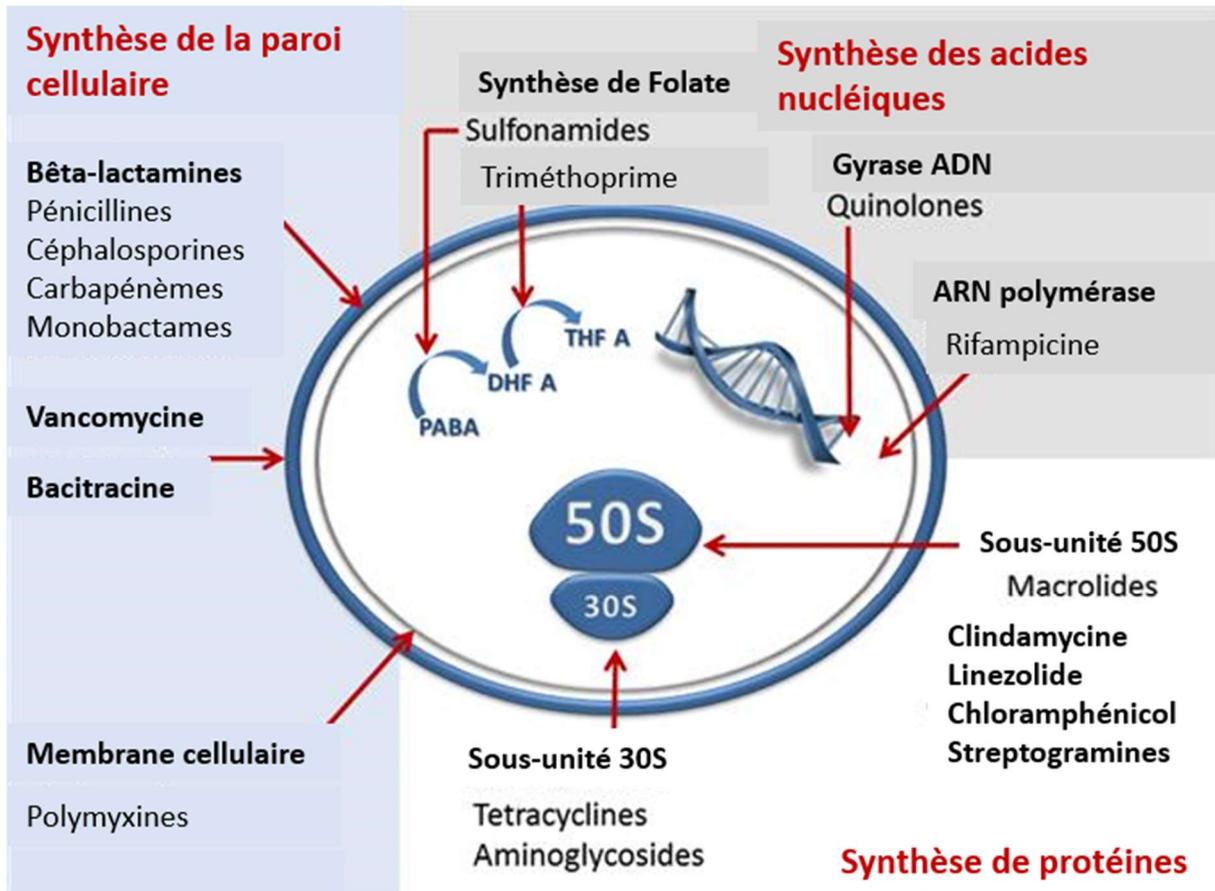


Figure 14. Mécanismes d'action des principales classes d'antibiotiques (adapté de Kapoor et al.³⁵⁷).

3. Développement de la résistance

La résistance aux antibiotiques a deux origines principales : des erreurs dans la réplication de l'ADN qui résultent en la sélection de mutants insensibles aux médicaments et qui se propagent verticalement au sein des populations bactériennes, et l'acquisition de gènes de résistance par transfert horizontal d'éléments génétiques mobiles (EGM) entre les bactéries. Le taux d'erreur de l'ADN polymérase est faible ($\sim 10^{-9}$ à 10^{-11})³⁵⁸, garantissant une copie fidèle du génome bactérien. Toutefois, compte tenu du grand nombre de bactéries au site de l'infection et de leur temps de génération relativement rapide (de quelques minutes à quelques heures), l'accumulation de mutations dans les populations bactériennes est inévitable. Lorsque ces erreurs fournissent un avantage en présence d'antibiotiques, les

mutants résistants peuvent rapidement être sélectionnés, entraînant un échec thérapeutique. Les mutations peuvent être la principale cause de résistance clinique pour certaines classes d'antibiotiques telles que les fluoroquinolones ou chez certaines espèces bactériennes (ex. *Mycobacterium tuberculosis*). Cependant, les gènes de résistance présents sur des EGM (ex. plasmides, transposons) peuvent être facilement être transférés entre bactéries et présentent le plus grand défi pour la plupart des antibiotiques³⁵⁹. Souvent, ces EGM contiennent de nombreux gènes de résistance qui protègent contre diverses classes d'antibiotiques. Le mélange d'organismes dans les milieux de soins de santé et l'environnement, offre des opportunités pour que les gènes soient échangés entre les microbes. Le résultat est un pourcentage croissant d'isolats bactériens pathogènes ayant acquis un ou plusieurs gènes de résistance, engendrant des phénotypes multi-résistants (MDR), extrêmement résistants (XDR) ou panrésistants (PDR) aux antibiotiques, qui menacent les avancées réalisées en médecine au cours des dernières décennies³⁶⁰. De plus, les organismes résistants, qui étaient auparavant principalement limités aux établissements de santé du fait d'une utilisation massive d'antibiotiques, circulent maintenant de plus en plus dans la communauté³⁶¹. En effet, Les SARM sont désormais couramment trouvés en dehors des hôpitaux.

Les trois mécanismes principaux de résistance aux antibiotiques sont :

- L'inactivation enzymatique de l'antibiotique
- La diminution d'affinité de l'antibiotique par modification de la cible
- La diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique par efflux actif et/ou défaut de perméabilité membranaire

La **Figure 15** montre les différents mécanismes de résistance aux antibiotiques.

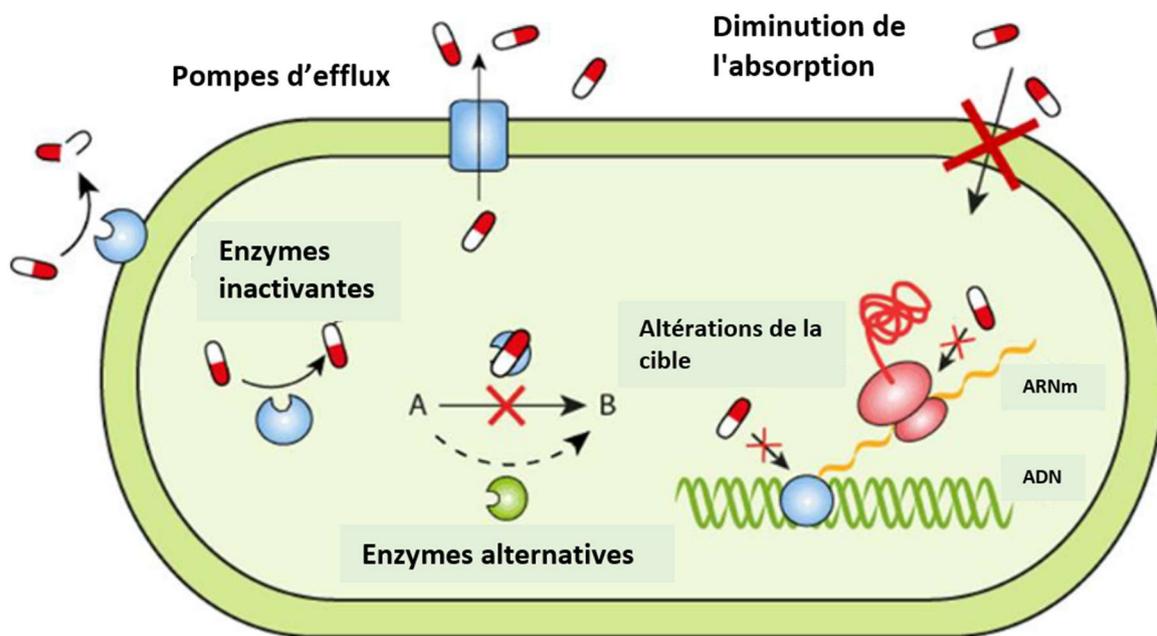


Figure 15. Les principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques (adapté de Wistrand-Yuen and al.³⁵⁹).

La **Figure 16** liste les principaux mécanismes de résistance de *S. aureus* aux antibiotiques.

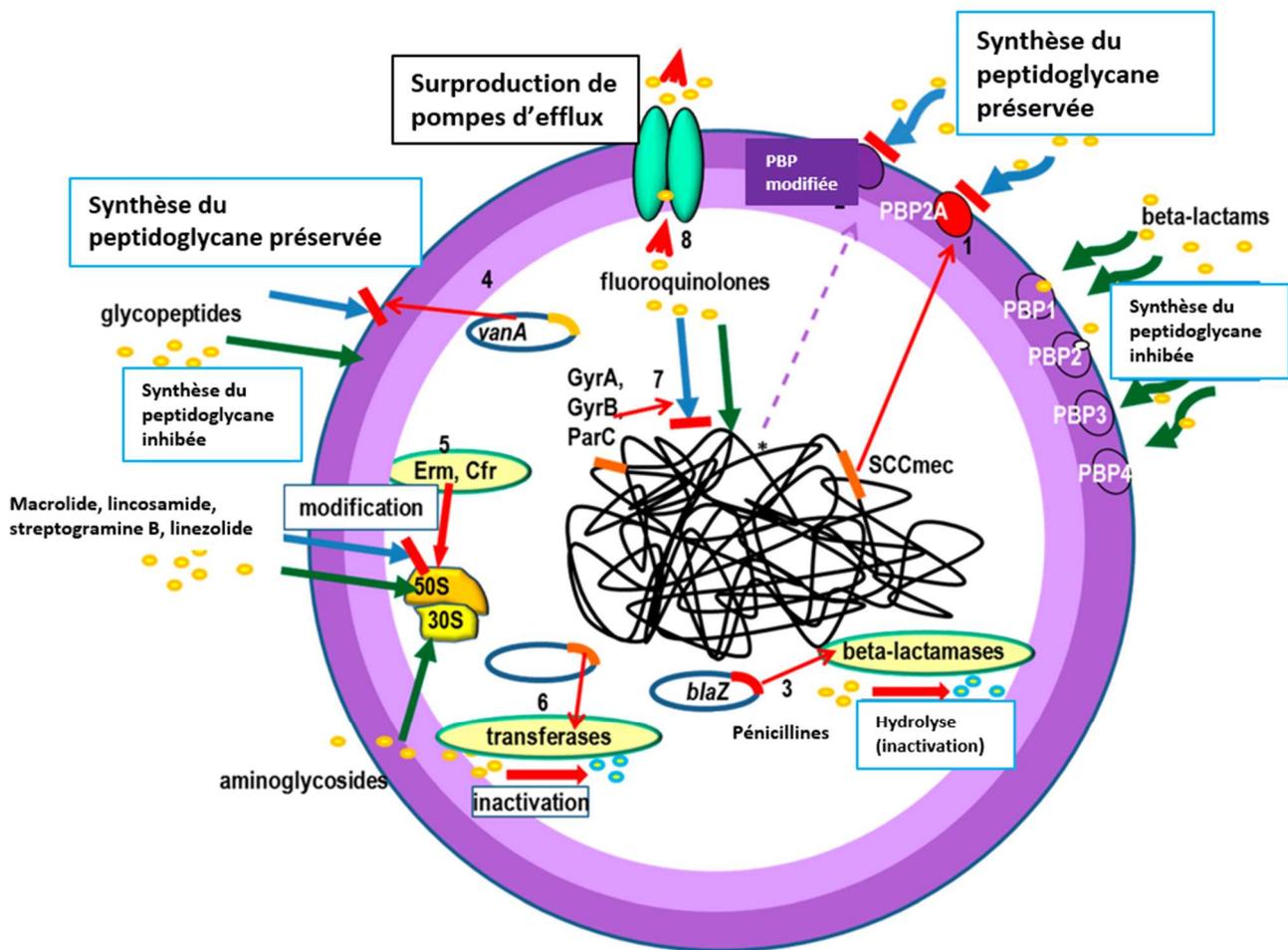


Figure 16. Les principaux mécanismes de résistance de *S. aureus* aux antibiotiques (adapté de Mlynarczył-Bonikowka et al.³⁶²). Mécanismes d'action indiqués par des flèches vertes. Résistance aux bêta-lactamines : 1. Production de la protéine de liaison à la pénicilline PBP2A, 2. Mutations dans les gènes PBP, bien que rares (Modified *S. aureus*), 3. Production de bêta-lactamases, généralement avec un spectre de substrat étroit. Résistance aux glycopeptides : 4. Opéron VanA (modification du site de liaison de l'antibiotique). Résistance au linezolide : 5. Adénylyl-N-méthyltransférase Cfr qui modifie le 23S ARNr du ribosome bactérien. Résistance aux MLS-B (macrolides, lincosamides et streptogramines B) : 5. méthylations du ribosome par l'Erm-érythromycine. Résistance aux aminoglycosides : 6. Inactivation des antibiotiques par des transférases. Résistance aux fluoroquinolones : 7. Mutations dans les gènes *gyrA* et *gyrB* (topoisomérase II) et *parC* (*griA*) et *parE* (topoisomérase IV) modifiant le site de liaison de l'antibiotique, 8. Expulsion hors de la cellule bactérienne par la pompe d'efflux.

4. Alternatives aux antibiotiques actuels

4.1 Identification de nouvelles classes d'antibiotiques

Lewis et al. ont découvert 2 nouveaux antibiotiques aux mécanismes d'action novateurs : la téixobactine, dérivé de la β -protéobactérie *Eleftheria terrae*³⁶³, et la darobactine, issue de la γ -protéobactérie *Photorhabdus khaini*³⁶⁴. De nombreuses bactéries environnementales, telles que les actinomycètes, hébergent des programmes génétiques capables de produire 20 à 40 produits naturels, et les champignons en contiennent souvent davantage. Plusieurs de ces produits sont assurément des antibiotiques. Les progrès en génomique, en exploitation de données génomiques, en biologie synthétique et en chimie analytique ouvrent des pistes et qui permettront d'exploiter la remarquable diversité chimique trouvée dans la nature. Un exemple d'une telle stratégie est l'analyse des données génomiques des actinomycètes à la recherche de signatures indiquant la production d'antibiotiques glycopeptidiques³⁶⁵. La plupart des bactéries productrices d'antibiotiques codent des mécanismes de self-défense à proximité des gènes biosynthétiques, et les glycopeptides ne font pas exception. En mettant en corrélation la résistance connue avec la biosynthèse, des génomes candidats susceptibles de produire des antibiotiques glycopeptidiques sensibles à la résistance existante ont été identifiés. En se concentrant sur les producteurs codant des gènes associés à la production de glycopeptides mais sans éléments de résistance connus, plusieurs nouveaux antibiotiques ont été identifiés. Ceux-ci avaient un mode d'action inédit : l'inhibition de la division cellulaire en bloquant l'activité des autolysines lytiques essentielles à la séparation des cellules filles. Une autre source d'antibiotiques provient des molécules synthétiques. Les avancées dans la compréhension des "règles" de la chimie physique pour les antibiotiques^{366,367} offrent la possibilité de guider la synthèse de molécules individuelles et de bibliothèques adaptées à des criblages basés sur le phénotype. Myers et al. ont publié des voies synthétiques modulaires très innovantes pour la génération de nouveaux antibiotiques de type tétracycline³⁶⁸, macrolide³⁶⁹ et lincosamide³⁷⁰ qui élargissent considérablement la diversité de ces classes de composés au-delà des contraintes de la biosynthèse naturelle. Enfin, les approches d'intelligence artificielle peuvent explorer des bibliothèques chimiques pour identifier des propriétés semblables aux antibiotiques et ainsi découvrir de nouvelles structures synthétiques à développer³⁷¹.

4.2 Inhibiteurs de la virulence

Une autre alternative vise à contrer la pathogénicité des bactéries en ciblant des facteurs de virulence spécifiques impliqués dans ce processus. Ces méthodes sont intrinsèquement à spectre étroit et, l'élimination du pathogène peut se faire par association à des antibiotiques et/ou par le système immunitaire de l'hôte. Divers facteurs de virulence sont à l'étude comme cibles potentielles pour de nouveaux agents, qui incluent les catégories suivantes :

- L'erianine perturbe la reconnaissance immunitaire de l'hôte et l'attachement dans les infections murines à *S. aureus*³⁷².
- Plusieurs inhibiteurs modulent le biofilm. Des agents comme les flavonolignanes, la streptorubine B, la cyclosporine et le valsopodar sont efficaces contre les biofilms^{373,374}.
- Des régulateurs de la virulence comme l'anéthole et le SE-1 ont été testés^{375,376}. L'inhibition des systèmes à deux composants bloque la pathogénèse de certaines bactéries, avec des résultats notables pour le savirin et le LED209^{377,378}.
- L'inhibition du QS via les lactonases est efficace contre *Pseudomonas aeruginosa*, offrant un moyen d'interférer avec d'autres systèmes³⁷⁹.

4.3 Bactériophages

Le réexamen de l'utilisation des bactériophages pour traiter les infections hautement résistantes aux médicaments suscite un intérêt croissant. Ces virus des bactéries ont été identifiés au début du XX^{ème} siècle et rapidement employés dans la lutte contre les infections. Néanmoins, les efforts initiaux ont été entravés par une méconnaissance de la spécificité des phages et par des méthodes de fabrication et de conservation inégales³⁸⁰. Avec l'avènement de la pénicilline et d'autres antibiotiques, l'utilisation des phages a été largement délaissée, bien qu'elle ait perduré dans plusieurs pays de l'ancienne Union soviétique notamment en Géorgie³⁸¹. De nos jours, l'efficacité et la spécificité des phages sont de plus en plus considérées comme des atouts. Depuis l'introduction du premier produit phagique commercial en 2006, les phages spécifiques à certaines espèces ont été largement utilisés dans l'agriculture et l'industrie alimentaire pour contrôler des pathogènes alimentaires

comme *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., et *Shigella* spp., avec plus d'une douzaine de produits sur le marché³⁸². Leur activité à spectre étroit est particulièrement utile dans l'industrie laitière, où une grande précision est nécessaire pour éliminer les pathogènes tout en préservant les bactéries lactiques³⁸². Alimenté par des études de cas humains montrant des guérisons complètes d'infections chroniques causées par des pathogènes MDR à l'aide de cocktails phagiques expérimentaux³⁸³, le traitement par phages est de plus en plus envisagé comme une alternative aux antibiotiques, ce qui a donné lieu à plus d'une douzaine d'essais cliniques en cours, principalement en phases 1 et 2. Un des défis de l'application des phages réside dans l'émergence de résistances, tout comme pour les antibiotiques. Les phages et les bactéries sont engagés dans une course aux armements depuis des milliards d'années. Des systèmes tels que les CRISPR ont vu le jour en raison de cette lutte, permettant aux bactéries de développer une immunité aux phages. L'utilisation de cocktails de phages peut neutraliser la résistance sur des échelles de temps thérapeutiques. Une autre option pour minimiser la résistance est l'utilisation directe des enzymes bactériolytiques des phages en tant que traitement biologique³⁸⁴. L'abondance et la diversité des phages dans l'environnement naturel signifient que, où que l'on trouve une bactérie donnée, il est probable qu'un phage spécifique puisse également être obtenu. Cette idée a été à l'origine de nombreuses initiatives de récupération de phages^{385,386}. Couplées à des stratégies sélectives basées sur l'évolution des phages et à des approches d'ingénierie pour promouvoir le comportement lytique, dissoudre les biofilms et même inactiver directement les gènes de résistance aux antibiotiques via le système CRISPR-Cas9³⁸⁷, les phages constituent un outil puissant pour suivre l'évolution bactérienne, permettant des mises à jour et une redondance dans la conception des cocktails phagiques.

4.4 Anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux représentent le secteur le plus dynamique de l'industrie pharmaceutique, avec plus de 100 anticorps monoclonaux approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) et des centaines d'autres en développement clinique^{388,389}. Depuis la première identification d'un anticorps monoclonal issu d'hybridomes murins en 1979, des avancées technologiques ont rationalisé leur découverte, incluant l'utilisation de souris

transgéniques conçues pour produire directement des anticorps monoclonaux entièrement humains³⁹⁰. Les thérapies basées sur les anticorps monoclonaux rencontrent des défis similaires à ceux du développement d'antibiotiques. Par exemple, certains cancers peuvent être intrinsèquement résistants à cause de mutations préexistantes ou acquérir une résistance secondaire pour diverses raisons, y compris la mutation ou la régulation à la baisse de l'antigène ciblé³⁹¹. Pour combattre la résistance, les stratégies ont évolué vers des combinaisons thérapeutiques. Parmi les approches les plus innovantes et productives figurent les anticorps conjugués à des médicaments et les anticorps bispécifiques. Les anticorps conjugués à des médicaments consistent en un anticorps monoclonal lié via un lien labile à un médicament cytotoxique, généralement actif sur l'ADN ou les microtubules³⁹². Une fois liés à une cellule cible, les anticorps conjugués à des médicaments sont internalisés et leur charge cytotoxique est libérée, provoquant la mort cellulaire. Onze anticorps conjugués à des médicaments ont actuellement reçu l'approbation de la FDA, avec des dizaines d'autres en développement³⁸⁹. Les anticorps bispécifiques sont constitués d'un anticorps monoclonal avec une double spécificité, chaque bras étant dirigé contre un antigène différent³⁹³. Des anticorps bispécifiques comme le catumaxomab et le blinatumomab ont été employés dans une stratégie ingénieuse pour recruter des lymphocytes T vers les cellules tumorales, orchestrant leur élimination. De bien des manières, les bactéries sont des cibles idéales pour la technologie des anticorps monoclonaux. Contrairement au cancer, la plupart des antigènes bactériens sont distincts de la biologie humaine, permettant de nombreux candidats potentiels pour les anticorps monoclonaux ou les bispécifiques. Néanmoins, il n'existe que trois anticorps monoclonaux antimicrobiens approuvés, deux bloquant la virulence du *Bacillus anthracis*, l'agent causal du charbon (raxibacumab et obiltoximab) et un ciblant *Clostridioides difficile* (bezlotoxumab), réduisant la fréquence de récurrences^{394,395}. Malgré l'utilité avérée de ces thérapies, peu d'anticorps monoclonaux antimicrobiens sont en phase avancée d'essais cliniques (en phase 3, il existe 2 molécules dirigées contre *S. aureus* : suvratoxumab et tosatoxumab). Parmi les obstacles à l'arrivée de ces anticorps monoclonaux antimicrobiens en clinique figurent l'identification spécifique du ou des pathogènes à l'origine de l'infection ; le ciblage d'un antigène qui est conservé, exprimé et accessible pendant l'infection.

4.5 Approches probiotiques

La perturbation du microbiome intestinal (dysbiose), principalement due à des antibiotiques à large spectre, ouvre la porte à des pathogènes comme *C. difficile*. Pour rétablir un microbiote sain, diverses méthodes ont été explorées pour soit remplacer, soit compléter, soit modifier les microbes intestinaux. Ces tactiques ont été testées dans des études visant à réduire la colonisation par des pathogènes dans les hôpitaux ou chez les nourrissons prématurés, les données combinées indiquant que les probiotiques sont bénéfiques³⁹⁶. La modification la plus radicale du microbiote intestinal, la transplantation de microbiote fécal, consiste en un remplacement avec des contenus microbiens d'un donneur sain. Cette méthode a montré son efficacité importante pour le traitement des infections à *C. difficile*³⁹⁷, mais a aussi été associée à des décès dus au transfert imprévu de pathogènes dans des échantillons complexes de microbiote fécal³⁹⁸. Afin de réduire ce risque, l'attention se porte sur l'administration de probiotiques plus spécifiques pour compléter le microbiote intestinal³⁹⁹. L'efficacité future de ces probiotiques reste à déterminer, en partie à cause de la nécessité de grandes tailles d'échantillon pour tenir compte de faibles taux d'incidence, comme c'est le cas pour les infections à *C. difficile*⁴⁰⁰. Certaines données suggèrent que les probiotiques administrés après un traitement antibiotique pourraient en fait exacerber la résistance aux antimicrobiens⁴⁰¹.

4.6 Vaccins

Contrairement aux antibiotiques, les vaccins ne favorisent pas aisément la résistance. En diminuant les taux d'infection et de propagation de la maladie, ils peuvent entraver la diffusion des résistances en évitant les infections et, par conséquent, l'usage d'antibiotiques⁴⁰². Le déploiement du vaccin contre *Haemophilus influenzae* a été corrélé à une réduction de la production de β -lactamase⁴⁰³, et les taux d'infection à pneumocoque chez les nourrissons et les adultes plus âgés associés à la résistance aux antibiotiques ont diminué avec l'utilisation de vaccins conjugués aux polysaccharides ciblant 13 sérotypes⁴⁰⁴. Ces cas fournissent un précédent significatif pour le recours aux vaccins comme mesure complémentaire pour répondre à la crise de l'antibiorésistance. Plusieurs candidats vaccinaux ciblant des bactéries pathogènes sont en diverses phases d'essais cliniques⁴⁰⁵. Les plus avancés sont les vaccins

pour la prévention de l'infection à *C. difficile* et les vaccins antipneumococciques qui ciblent 20 sérotypes, d'autres étant orientés vers *Shigella*, *E. coli*, *Salmonella* et *S. aureus*. Un vaccin efficace pour la prévention et le traitement de la tuberculose, une maladie qui tue plus de 1,6 million de personnes par an, reste insaisissable, mais plusieurs candidats sont à l'étude⁴⁰⁶. Une stratégie complémentaire pour aborder l'utilisation et la résistance aux antibiotiques consiste en l'utilisation accrue de vaccins antiviraux, en particulier pour des virus tels que la grippe et le virus respiratoire syncytial, qui se manifestent par des infections des voies respiratoires pouvant être diagnostiquées à tort comme bactériennes ou favorisant des infections bactériennes secondaires et l'utilisation d'antibiotiques⁴⁰⁵. L'avènement des vaccins à base d'ARNm et leur développement et déploiement rapides lors de la pandémie du COVID-19 révèlent la puissance de cette nouvelle technologie qui, en principe, peut être mobilisée pour cibler à la fois des agents viraux et bactériens³⁵¹. L'avenir du contrôle des infections intégrera sans doute de nombreuses stratégies vaccinales.

5. Les peptides antimicrobiens (PAM)

5.1 Caractéristiques

Les PAM constituent un élément clé du système immunitaire de divers organismes comprenant les bactéries, les champignons, les plantes⁴⁰⁷, les mammifères⁴⁰⁸ et les insectes⁴⁰⁹. Ils se caractérisent par leur aptitude à interagir avec des bactéries, soit en limitant leur prolifération, soit en induisant leur lyse, et sont souvent perçus comme l'une des premières lignes de défense immunitaire.

5.2 Structures et classifications des PAM

La diversité remarquable des séquences des PAM connus a motivé leur compilation dans plusieurs bases de données, basées sur différentes caractéristiques. Bien que la classification selon leur source ou leur spécificité ciblée soit utile pour comprendre leurs mécanismes, des bases de données à spectre plus large sont également pertinentes. L'Antimicrobial Peptide

Database 3 (APD3) est un exemple notable, recensant la plupart des PAM naturels publiés à ce jour⁴¹⁰. Sa dernière mise à jour en janvier 2023 a élevé son total à 3569 peptides. Malgré leur hétérogénéité structurelle, une tendance se dégage : 88 % des peptides répertoriés sont cationiques, 6 % neutres et 6 % anioniques. Ces chiffres concernent principalement des peptides naturels, qui ne représentent qu'une fraction de PAM existants dans la nature. Cependant, actuellement, il n'existe pas de base de données universellement acceptée par tous pour les PAM. Outre cette tendance à la charge positive, les PAM contiennent aussi une proportion considérable d'acides aminés hydrophobes. Les propriétés physico-chimiques seules ne suffisent pas pour une classification complète. La structure secondaire est souvent utilisée comme critère de tri. Tous les PAM rapportés dans la littérature contiennent au moins une région en hélice α ou en feuillet β , soulignant leur nature partiellement amphiphile⁴¹¹. Trois principales classes sont couramment identifiées au sein des PAM en fonction de leur structure (**Figure 17**). En premier lieu, on trouve les PAM en hélice α linéaire, qui sont probablement les plus communément documentés dans la littérature scientifique^{412,413}. Cette catégorie inclut divers sous-groupes tels que les magainines, les cécropines et les mélittines. Ensuite, les peptides enrichis en un ou plusieurs acides aminés spécifiques, tels que les peptides riches en arginine et tryptophane⁴¹⁴, comme l'indolicidine, ou encore ceux abondants en proline⁴¹⁵ particulièrement observés chez les abeilles⁴¹⁶. Une troisième catégorie regroupe les peptides en épingle à cheveux feuillet β « hairpin » possédant Enfin les peptides riches en cystéine représentent une classe distincte, du fait que cet acide aminé favorise la formation de ponts disulfure, stabilisant leur conformation tridimensionnelle. Au sein de cette classe, une sous-distinction peut être faite entre ceux avec un ou deux pont disulfure (peptide en épingle à cheveux β « hairpin ») et ceux en possédant 3 et plus. Ce critère basé sur la structure est actuellement le plus applicable pour la classification, étant donné le grand nombre de peptides dont les structures restent non résolues. En outre, la présence de modifications post-traductionnelles accentue cette diversité⁴¹⁷. Une autre classification parmi les PAM peut aussi être effectuée en fonction de leur voie de synthèse, qu'elle soit ribosomique ou non⁴¹⁸. Les peptides non ribosomiques sont généralement produits par des complexes enzymatiques au sein de bactéries ou de levures et contiennent souvent des acides aminés non protéinogènes. Inversement, les PAM ribosomiques contiennent principalement des acides aminés naturels, bien qu'ils puissent être sujets à des

modifications post-traductionnelles. Au-delà de ces aspects structuraux, il est également pertinent pour des applications spécifiques de continuer à compiler des peptides ayant des propriétés ou des mécanismes communs dans des bases de données spécialisées, afin de faciliter leur étude⁴¹⁹. La nécessité d'une classification détaillée est d'ailleurs complétée par l'importance cruciale de comprendre leurs mécanismes d'action.

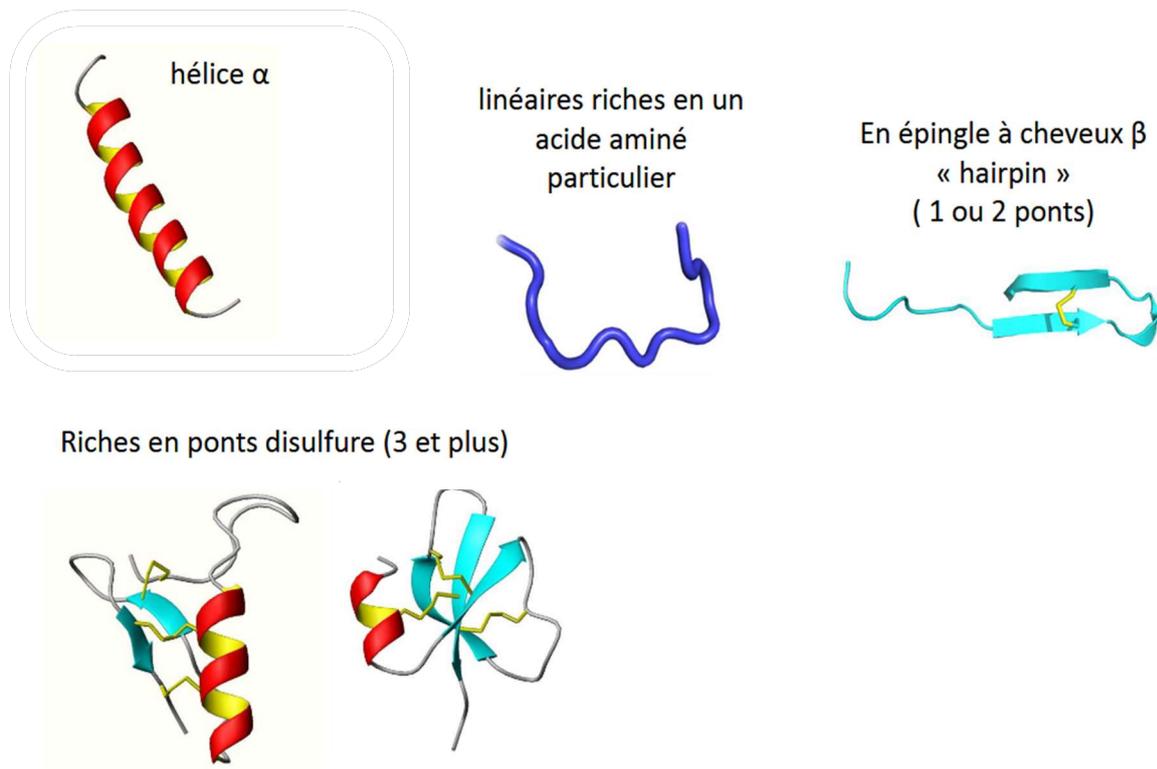


Figure 17. Les principales classes structurales des PAM (d'après London⁴²⁰).

5.3 Interactions des PAM avec les bactéries

Il existe trois principales modalités par lesquelles les PAM agissent sur les bactéries. Ces modalités peuvent être catégorisés comme membranaires, intracellulaires, ou en induisant des mécanismes de résistance chez les bactéries. En raison de la nature anionique de la membrane bactérienne, les PAM cationiques exercent principalement une activité inhibitrice ou lytique via une interaction électrostatique avec la membrane. De plus, la présence de résidus hydrophobes aide à leur intégration dans la membrane. Néanmoins, la simple présence de résidus cationiques et hydrophobes est nécessaire mais pas suffisante pour ces processus. Par exemple, la disposition des charges positives sur la structure en hélice α peut moduler leur activité antimicrobienne⁴²¹. La **Figure 18** schématise les divers mécanismes susceptibles de suivre l'interaction initiale des peptides avec la membrane cytoplasmique bactérienne. Les mécanismes de perturbation membranaire impliquent généralement la formation de pores ou de micelles, parmi d'autres voies conduisant à l'inhibition bactérienne. Il est important de souligner que pour réaliser une inhibition ou une lyse bactérienne efficace, une synergie entre différents peptides est souvent nécessaire. Dans le contexte de la formation de micelles, par exemple, il a été démontré qu'un seuil minimum de concentration en peptides est requis pour solubiliser les membranes⁴²², voire pour les recouvrir complètement⁴²³. L'accumulation de peptides sur la membrane peut également entraîner son amincissement, provoquant ainsi la fuite de métabolites depuis le cytoplasme bactérien. D'un point de vue évolutif, cette tendance à la synergie pourrait résulter de mutations transformant des peptides à caractère amyloïde en peptides antimicrobiens, via l'acquisition de charges positives⁴²⁴. Toutefois, la majorité des recherches sur ces mécanismes sont réalisés *in vitro*, laissant des incertitudes sur leur applicabilité *in vivo*⁴²⁵. Un autre aspect significatif des interactions membranaires des PAM concerne leur capacité à cibler des composants spécifiques à la surface bactérienne. Par exemple, certains PAM, tels que la nisine, se lient spécifiquement au lipide II, un précurseur de la synthèse du peptidoglycane⁴²⁶. Cette liaison inhibe la division cellulaire, entravant ainsi la prolifération bactérienne. D'autres cibles potentielles incluent des lipides anioniques impliqués dans la division cellulaire⁴²⁷, conduisant souvent à des cellules bactériennes anormalement grandes ou de morphologies atypiques⁴²⁸. Ainsi, l'interaction des PAM avec les membranes bactériennes conduit généralement soit à la

lyse de la bactérie visée, soit à une perturbation de ses systèmes moléculaires internes, inhibant ainsi sa prolifération. Cependant, la propension des PAM à interagir avec les membranes, bien qu'importante, n'est pas le seul critère permettant de qualifier un peptide comme antimicrobien⁴²⁹.

L'autre grande catégorie d'action antimicrobienne des PAM nécessite une cible intracellulaire⁴³⁰. Une telle action nécessite également une interaction initiale, bien que transitoire, avec les membranes bactériennes. Ce mécanisme de franchissement membranaire peut impliquer des transporteurs spécifiques, tels que des protéines membranaires bactériennes⁴³¹. Une fois dans le cytoplasme, l'effet des PAM peut être varié. Par exemple, en se fixant aux ribosomes, certains PAM inhibent le processus de traduction génétique. Une autre voie majeure est la perturbation du cycle de division cellulaire, par exemple en interférant avec les précurseurs de la synthèse membranaire. Le résultat final est souvent des cellules déformées incapables de se multiplier^{432,433}. En outre, la présence de PAM peut provoquer des mécanismes de résistance bactérienne. Ces réponses adaptatives peuvent être déclenchées soit par l'activation de récepteurs spécifiques, soit plus généralement en réponse aux dommages membranaires⁴³⁴. Les bactéries peuvent adopter plusieurs stratégies, telles que la modification de la membrane par neutralisation ou la création de "zones anioniques" pour piéger les PAM⁴³⁵. Ce piège peut également être déployé par la sécrétion de protéines ou de polysaccharides extracellulaires. La sécrétion de protéases pour dégrader les PAM est aussi une option. Enfin, des mécanismes d'efflux peuvent être mis en œuvre pour éliminer les peptides.

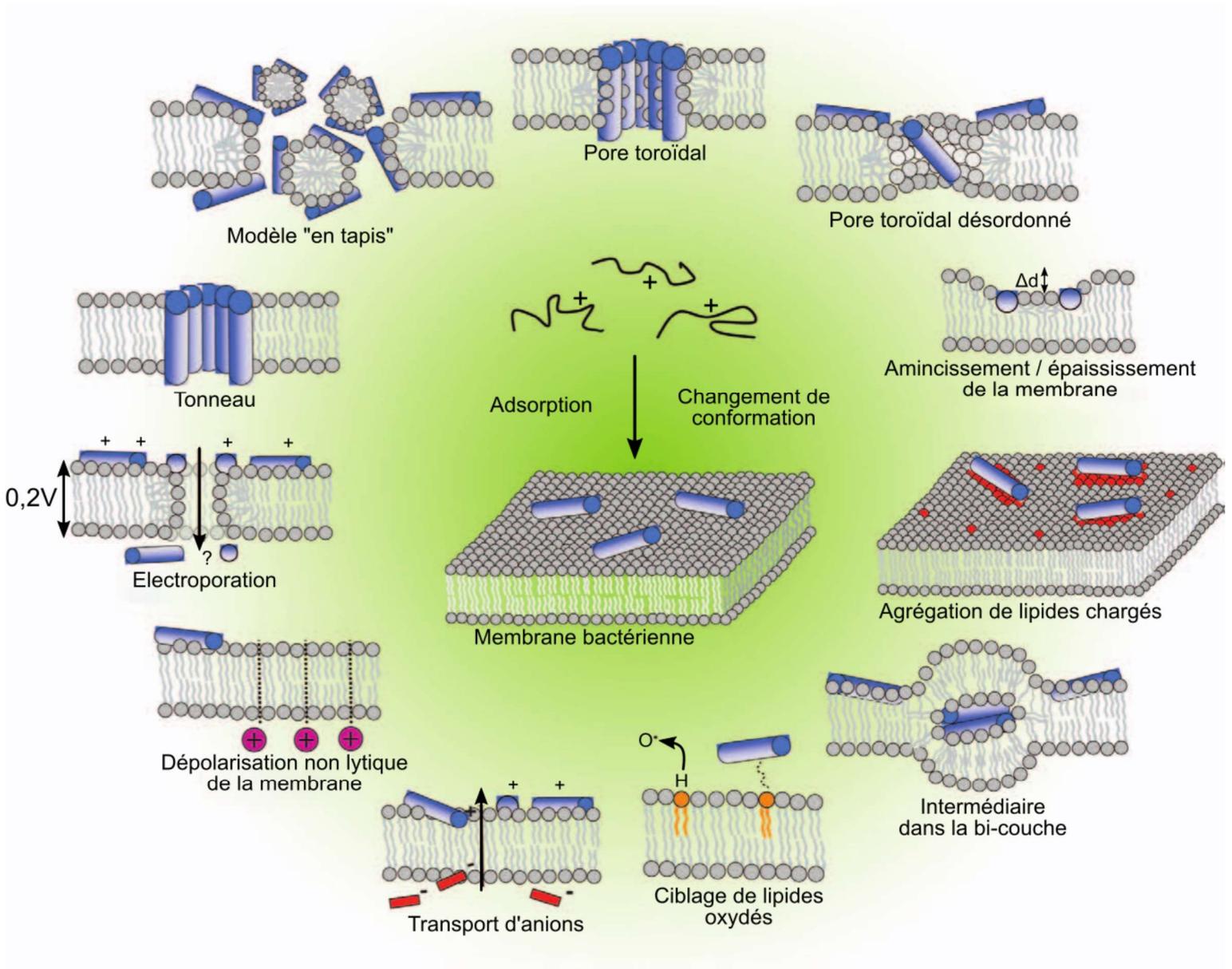


Figure 18. Mode d'action des PAM sur les membranes bactériennes (d'après Nguyen et al.⁴³⁶).

5.4 Avantages et limites

Les PAM offrent un large éventail d'interactions avec les organismes bactériens, la plupart entraînant une inhibition de la prolifération bactérienne ou une lyse cellulaire. L'accroissement des souches bactériennes multirésistantes, coïncide avec une diminution significative dans l'identification de nouveaux antibiotiques⁴³⁷. Cette situation rend les PAM particulièrement attrayants pour la conception de nouvelles entités antibactériennes afin de contrer cette tendance⁴³⁸. Leur potentiel découle également de la pratique historique d'exploiter des sources naturelles pour la découverte d'antibiotiques⁴³⁹.

Le développement de nouveaux agents antibiotiques s'oriente principalement vers l'optimisation de la structure peptidique, par la découverte de nouvelles séquences ou l'amélioration de celles existantes. Outre l'isolement de PAM à partir d'organismes vivants, l'analyse de bases de données existantes constitue une autre voie pour l'identification de nouvelles séquences actives⁴²⁹. Des algorithmes computationnels, peuvent être employés pour détecter des motifs récurrents parmi les PAM déjà caractérisés⁴⁴⁰⁻⁴⁴². Des approches fondées sur des principes physicochimiques sont également possibles⁴⁴³. Pour les PAM identifiés comme ayant un potentiel élevé, plusieurs méthodes d'optimisation peuvent être appliquées⁴⁴⁴. L'une des approches les plus directes implique des mutations ciblées, afin de maintenir les propriétés physicochimiques tout en améliorant potentiellement l'efficacité antibactérienne via des conformations tridimensionnelles plus favorables. Cette étape peut être réalisée par la synthèse de séquences aléatoires basées sur le peptide d'origine⁴⁴⁵. L'importance relative des résidus d'acides aminés peut aussi être évaluée par des substitutions systématiques par de l'alanine⁴⁴⁶ permettant d'identifier des résidus « non-essentiels »

L'émergence d'une résistance aux PAM est généralement considérée comme improbable, en raison de leur mode d'action lytique envers les bactéries⁴⁴⁷. Néanmoins, même si les premières inquiétudes sur cette forme de résistance ont vu le jour au début des années 2000, les études actuelles qui l'évaluent demeurent insuffisantes⁴⁴⁸. La seule affirmation sûre à ce jour est que les bactéries peuvent effectivement élaborer des mécanismes de résistance aux PAM^{435,449}. Cependant, l'apparition de résistance aux seuls PAM semble moins probable que

pour les antibiotiques traditionnels⁴⁵⁰. En outre, les PAM qui ciblent les membranes ne déclenchent pas les mécanismes de réparation de l'ADN des bactéries, réduisant ainsi leur capacité à développer une résistance⁴⁵¹. Diverses stratégies, comme l'utilisation de « cocktails » de PAM, ont également été proposées pour minimiser le risque d'émergence de résistance⁴⁵². Outre la question de la résistance, plusieurs autres défis entravent le développement des PAM en tant qu'antibiotiques. Parmi eux figurent le coût élevé de synthèse, le risque de toxicité pour les cellules hôtes, et une stabilité *in vivo* potentiellement réduite due aux protéases. Toutefois, ces obstacles ne sont pas insurmontables. La biosynthèse apparaît comme une voie prometteuse pour réduire les coûts de production⁴⁵³. Les séquences peptidiques peuvent être optimisées pour minimiser les interactions non spécifiques⁴⁵⁴. En ce qui concerne la stabilité, la cyclisation et l'encapsulation des PAM peuvent protéger contre la dégradation enzymatique précoce⁴⁵⁵⁻⁴⁵⁷. Cependant, en dépit de ces perspectives prometteuses, seulement 11 peptides avaient été approuvés par la FDA au début de l'année 2018⁴⁵⁸. À l'exception de l'enfurvitide, un inhibiteur de fusion du VIH-1, tous nécessitent des modifications post-traductionnelles. Une vingtaine d'autres sont actuellement en phases cliniques de développement⁴⁵⁹.

6. Pseudo-peptides dérivés de PepA1

6.1 PepA1, un peptide toxique produite par *S. aureus*

PepA1 est un peptide linéaire toxique produit par *S. aureus* à partir d'un système toxine-antitoxine de type I dont la synthèse est inhibée par un ARN antisens durant la croissance bactérienne (**Figure 19**). Lorsqu'il est exprimé, PepA1 s'accumule dans les membranes de *S. aureus* et les détruit⁴⁶⁰. L'équipe U1230 s'est interrogée quant à l'activité antibactérienne de ce peptide lorsqu'il est administré de manière exogène. Le PepA1 synthétisé avait une activité contre les bactéries à Gram positif (*S. aureus*) et à Gram négatif (*E. coli*), avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 8 μM pour chaque type de bactérie⁴⁶¹. Cependant, une hémolyse des érythrocytes humains avait également été observée à la concentration égale à la CMI⁴⁶¹.

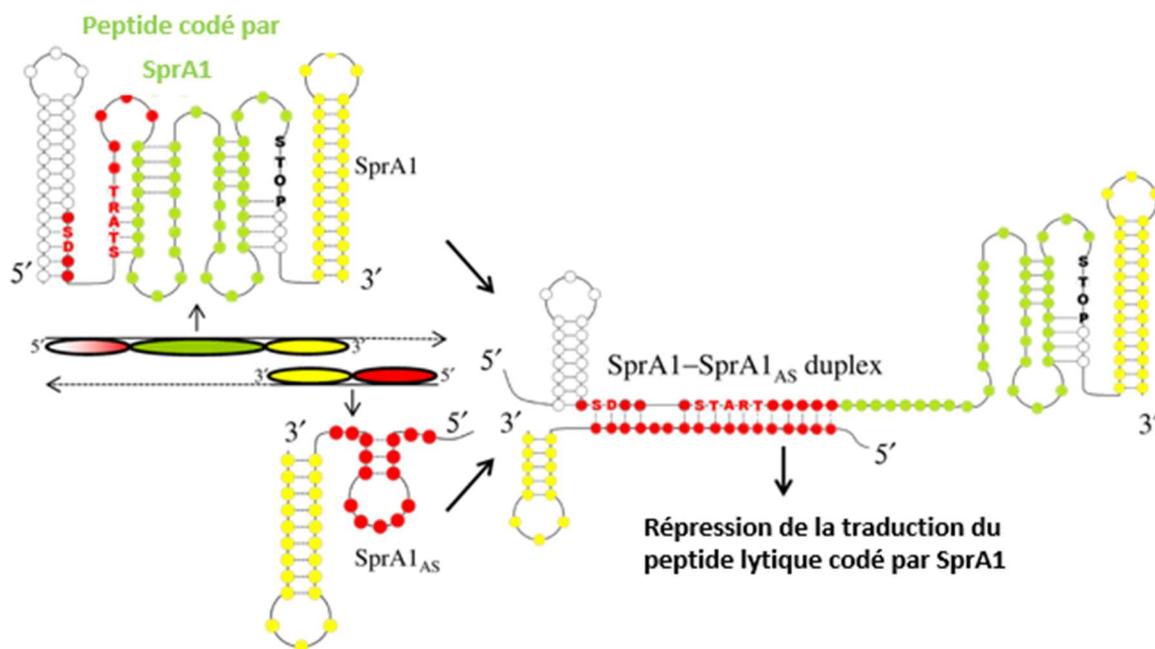


Figure 19. Modèle toxine-antitoxine de type I de régulation négative de la traduction interne de l'ARN SprA1(PepA1) en trans par le SprA1AS codé en cis (d'après Sayed et al.⁴⁶⁰).

6.2 Dérivés de PepA1

Des travaux d'ingénierie peptidique, en collaboration avec l'équipe de Michèle Baudy-Floc'h ont permis d'atténuer l'activité hémolytique de la toxine et d'optimiser sa stabilité et son activité antimicrobienne (**Tableau 4**).

Tableau 4. Activité antibactérienne contre les bactéries à Gram négatif et à Gram positif, et toxicité envers les érythrocytes humains de PepA1 et d'une série de pseudo-peptides courts, linéaires, cycliques ou pseudo-peptides hybrides dérivés de PepA1 (d'après Solecki et al.⁴⁶¹).

Peptides	Sequences	Human Cells	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
		H ₅₀ (μM)	MIC (μM)	TI H ₅₀ /MIC	MIC (μM)	TI H ₅₀ /MIC
PepA1	H-MLIFVHIIAPVISGCAIAFFS YWLSRRNTK-NH ₂	70	8	9	8	9
Pep N-ter	H-MLIFVHIIAPVISGC-NH ₂	ND	ND		ND	ND
Pep C-ter	H-AIAFFSYWLSRRNTK-NH ₂	420	150	3	75	6
Pep1	H-FFSYWLSRRNTK-NH ₂	ND	160		80	
Pep2	H-FFSYWLSRRTK-NH ₂	ND	170		80	
Pep3	H-FFSWLSRRTK-NH ₂	ND	190		95	
Pep4	H-FFWLSRRTK-NH ₂	ND	200		100	
Pep5	H-FFWLSRRTK-NH ₂	ND	460		230	
Pep6	c(FFWLSRRTK)	5	50	0.1	25	0.2
Pep7	c(FFWSRRTK)	14	30	0.5	13	1
Pep8	c(FFWRRTK)	160	9	18	4	40
Pep9	H-FFWLRR-aza-β ³ Hyt-K-NH ₂	ND	100		100	
Pep10	c(FFWLRR-aza-β ³ Hyt-K)	150	25	6	13	12
Pep11	c(FFWRR-aza-β ³ Hyt-K)	840	7	120	3	280
Control	Nisin	ND	9		5	

6.2.1 Réduction de la longueur du peptide

Pour réduire l'activité hémolytique de PepA1 (H-MLIFVHIIAPVISGCAIAFFSYWLSRRNTK-NH₂), son domaine hydrophobe en N-terminal a été retiré tandis que la région amphiphile en C-terminal a été conservée (H-AIAFFSYWLSRRNTK-NH₂). L'hydrophobicité a été réduite par la suppression des résidus AIA à partir du N-terminal de Pep C-ter (Pep1). Ensuite, les acides aminés de Pep1 ont été progressivement éliminés pour déterminer leur rôle dans l'activité et la toxicité. Les résidus hydrophiles ont été retirés, en commençant par l'asparagine (Pep2), la tyrosine (Pep3) et la sérine (Pep4). Pep1 à Pep4 ont des activités

antimicrobiennes similaires. Les modifications suivantes sont basées sur l'influence de la longueur du peptide sur l'activité antimicrobienne⁴⁶² et la présence d'un minimum de deux résidus hydrophiles positifs et deux groupes hydrophobes⁴⁶³. Pep4 (H-FFWLSRRTK-NH2) et Pep5 (H-FFWLSRTK-NH2) ont montré l'importance de conserver deux arginines : Pep4 présente la séquence la plus courte conservant une activité antibactérienne avec une faible activité hémolytique.

6.2.2 Cyclisation

La prochaine étape pour améliorer l'activité antibactérienne des peptides consistait à augmenter leur stabilité structurelle : la première solution était la cyclisation. Il est bien connu que la cyclisation stabilise les peptides bioactifs, augmentant leur résistance aux protéases tout en conservant leurs activités antibactériennes⁴⁵⁷. Pep4 a été cyclisé pour former Pep6 (c(FFWLSRRTK)) : l'activité antibactérienne de Pep6 contre *S. aureus* et *E. coli* a été multipliée par 10 par rapport à Pep5, malheureusement accompagnée d'hémolyse. Pep7 (c(FFWSRRTK)) est un peptide plus court et manque d'un résidu de leucine, ce qui a légèrement réduit l'hémolyse, tandis que l'activité antibactérienne a été multipliée par 2. Pep8 (c(FFWRRTK)) manque d'un résidu de sérine, étant 10 fois moins hémolytique et 3 fois plus antibactérien que Pep7. L'heptapeptide cyclique Pep8 semblait être le peptide le plus actif avec tous les acides aminés naturels. Ceci peut être dû aux contraintes spatiales des résidus, qui diffèrent entre les peptides linéaires et cycliques.

6.2.3 Introduction d'analogues

Des travaux antérieurs sur les pseudo-peptides antimicrobiens au sein de l'équipe ont montré que l'incorporation de acides aminés non naturels augmentait l'activité antibactérienne des AMP⁴⁶⁴. Les premières tentatives d'introduction d'aza-b3-aa ont été réalisées à partir de Pep4 : la thréonine a été remplacée par un analogue, une aza-b3-homohydroxythréonine (Pep9, H-FFWLRR-aza-b3Hyt-K-NH2). Par rapport à Pep4, le pseudo-peptide Pep9 présentait une CMI deux fois plus faible contre *S. aureus*, mais une activité similaire contre *E. coli*. De façon intéressante, Pep9 n'était pas hémolytique. Pep 9 a été cyclisé pour former le peptide Pep10 (c(FFWLRR-aza-b3Hyt-K)), qui possède des CMI 4 à 7 fois plus basses montrant que la cyclisation améliorait les activités antibactériennes des hexapeptides⁴⁶⁵. Pour réduire les

propriétés hémolytiques de Pep10, sa leucine a été retirée pour diminuer l'hydrophobicité : Pep11 est 6 fois moins hémolytique et possède une activité antibactérienne 4 fois plus élevée. Les résultats avec Pep 11 ont servi de base pour établir les critères principaux : peptide cyclique, 7 résidus. Pep11 possède un motif de séquence naturelle originale FFWRR, qui est présent de manière discontinue dans la séquence native de PepA1. L'incorporation progressive des aza-B3-aa suivants a pris en compte les travaux antérieurs : le remplacement du tryptophane par du naphthyle, puis par une phénylalanine. Le remplacement de l'analogue HYT par l'analogue valine a permis de réduire légèrement la toxicité (Pep15 ; Pep 16).

6.3 Pep15, Pep16, Pep18 et Pep19

Pep15, Pep16 et Pep19 ont montré une plus grande efficacité bactéricide que Pep18⁵, constitué uniquement d'acides aminés naturels (**Figure 20**).

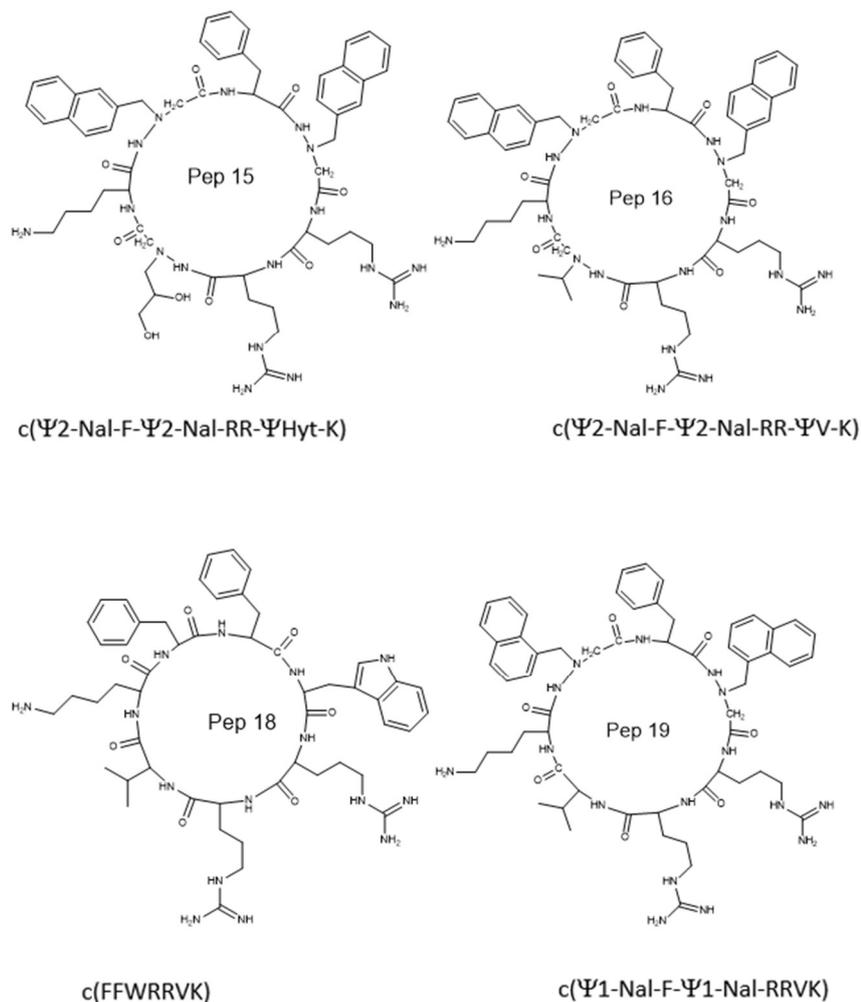


Figure 20. Structures et séquences de Pep15, Pep16, Pep18 et Pep19.

7. Pep16

7.1 Efficacité dans des modèle murin d'infection à SARM

La capacité de Pep16 à traiter les infections à SARM a été examinée dans des modèles de sepsis chez la souris, ainsi que des modèles d'abcès cutané. Dans un modèle de sepsis sévère, Pep16 a protégé les animaux infectés, tandis que la vancomycine s'est révélée moins efficace à une dose équivalente⁵. De plus, Pep16 a également été efficace dans un modèle d'infection cutanée due à SARM. Il a réduit le volume des abcès et la charge bactérienne (**Figure 21**). L'équipe a montré que l'émergence de résistance au Pep16 chez le SARM en modèles murins était minime⁵. En ce qui concerne la toxicité, les concentrations bactéricides de Pep16 étaient bien inférieures aux concentrations toxiques pour les cellules rénales humaines ou les érythrocytes. D'autres tests ont confirmé la faible toxicité de Pep16 sur divers modèles, y compris les embryons de poisson-zèbre et les souris.

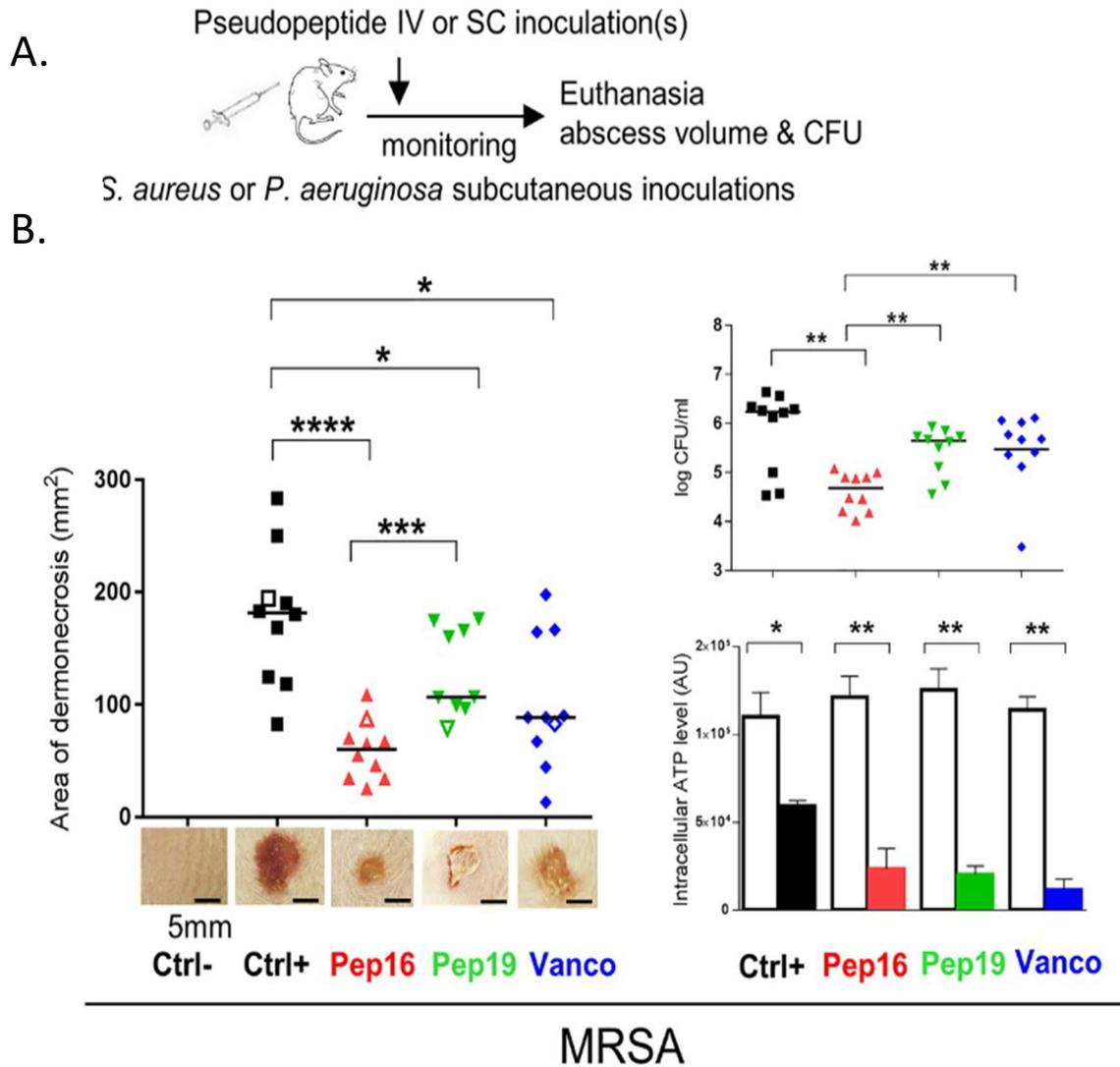


Figure 21. (A) Aperçu des expériences d'infection cutanée chez la souris infectée avec *S. aureus*. (B) Traitement des abcès cutanés dus au SARM chez la souris en utilisant Pep16, Pep19 ou la vancomycine (d'après Nicolas et al.⁵). Les souris ont été infectées par environ 2×10^9 SARM et ont reçu un traitement par voie intraveineuse 24 heures après l'infection avec une solution saline (noir) ou avec $1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ de Pep16 (rouge), Pep19 (vert) ou vancomycine (bleu). La taille des lésions et le nombre de UFC par abcès, représentés par des points individuels, ont été déterminés 6 jours après l'infection (10 souris par condition). Les photos des abcès sous le graphique correspondent à chaque valeur expérimentale représentée sur le graphique par des symboles vides. Les niveaux d'ATP intracellulaire de *S. aureus* en croissance "normale" (histogrammes vides) par rapport aux SCV (histogrammes colorés remplis) prélevés des abcès cutanés des souris sont montrés dans les panneaux inférieurs.

7.2 Mécanismes d'action de Pep16

Des études de microscopie ont montré que *S. aureus* traitée par Pep16 présentait des déstabilisations membranaires, des expansions internes et une « érosion » de la paroi cellulaire. Des analyses similaires sur des bactéries à Gram négatif ont également montré des déformations membranaires et cytoplasmiques (**Figure 22**). Des tests ont confirmé que les membranes de *S. aureus* étaient perturbées par Pep16. Ce pseudo-peptide agit en déstabilisant les membranes bactériennes mais son mécanisme d'action précis n'est pas connu, ni ses cibles moléculaires.

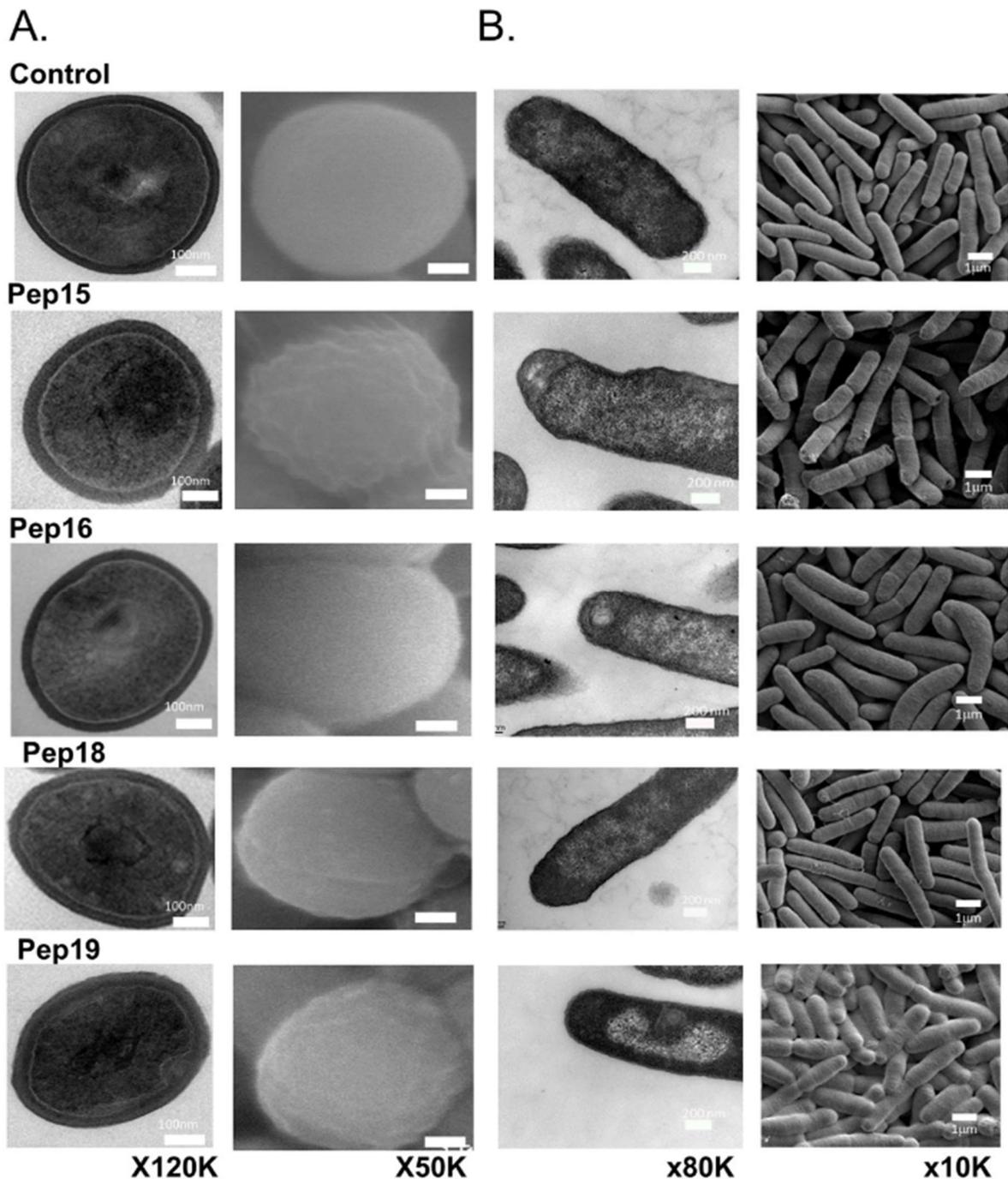


Figure 22. Effets des pseudo-peptides sur les bactéries à gram négatif et positif (d'après Nicolas et al.⁵). Modifications de la paroi cellulaire et de la membrane de *S. aureus* Newman (A) et *E. coli* K12 (B), comme le montrent les micrographies de microscopie électronique à transmission (à gauche) et de microscopie électronique à balayage (à droite) typiques et représentatives après un traitement de 2 heures à 37°C avec Pep15, Pep16, Pep18 ou Pep19 à leurs CMI. Les bactéries non traitées restent inchangées, et les parois cellulaire et membranes demeurent intactes.

TRAVAIL EXPERIMENTAL

Introduction et objectifs

Comme indiqué dans la revue bibliographique, le genre *Staphylococcus* est la principale cause d'IOA. Ces infections posent des défis majeurs en matière de traitement. Traditionnellement, elles nécessitent une intervention chirurgicale lourde, pouvant altérer considérablement la qualité de vie du patient, et un traitement antibiotique associé à de nombreux effets secondaires. Malgré cette prise en charge médico-chirurgicale, le taux d'échec thérapeutique demeure élevé, entraînant des infections récidivantes et des complications graves. La difficulté croissante de traiter les IOA provient non seulement de la capacité de *S. aureus* à envahir et persister au sein des cellules phagocytaires professionnelles et non professionnelles (telles que les ostéoblastes)³, mais aussi de sa capacité à former des biofilms⁴. Ces complexités amplifient les défis du traitement²⁶³. Par conséquent, il est urgent d'explorer de nouvelles stratégies antibactériennes efficaces simultanément contre les formes intracellulaires et celles associées aux biofilms. Le Pep16 est un pseudo-peptide, inspiré d'une toxine bactérienne⁴⁶⁶, qui a déjà montré des résultats prometteurs dans des modèles murins de sepsis causés par des SARM, avec une réduction significative des taux de mortalité⁴⁶⁷. Même si son mécanisme d'action n'est pas connu, il semble principalement altérer l'intégrité des membranes cellulaires bactériennes, entraînant une bactériolyse subséquente⁴⁶⁷. De plus, l'administration du Pep16 a été associée à une toxicité minimale et à une probabilité réduite d'émergence de résistance bactérienne, ce qui en fait un candidat prometteur pour le développement de nouveaux médicaments antimicrobiens⁴⁶⁷.

Les objectifs de cette thèse sont :

- (i) De comparer l'activité antimicrobienne de Pep16 à celle d'antibiotiques utilisés en clinique contre les IOA.
- (ii) De déterminer l'activité intracellulaire de Pep16 dans des modèles d'infection utilisant des cellules phagocytaires professionnelles (les macrophages) et non phagocytaires (les ostéoblastes)
- (iii) De décrire l'impact de Pep16 sur la formation et le maintien de biofilm bactérien

- (iv) D'évaluer l'activité l'efficacité *in vivo* du Pep16 dans un modèle de souris souffrant d'arthrite septique.

Cette étude vise donc à s'intéresser au potentiel de Pep16 comme stratégie thérapeutique innovante dans le traitement des IOA.

I. *Activité in vitro de Pep16 contre des isolats cliniques de S. aureus responsable d'IOA*

1. Matériels et méthodes

1.1 Tests d'activité antimicrobienne

1.1.1 Isolats cliniques de *S. aureus* provenant d'IOA

Les travaux ont été effectués sur une collection de 7 isolats cliniques de *S. aureus* obtenus à partir de prélèvements ostéoarticulaires de patients souffrant d'IOA, incluant 2 souches de SARM (14 et 15) et 5 souches de SASM (1333, 1334, 16, 17, 18). Ces isolats cliniques ont été obtenus du Service de Bactériologie-Hygiène Hospitalière du CHU de Rennes. La souche de référence *S. aureus* ATCC 29213 (SASM) a été utilisée comme témoin pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens.

1.1.2 Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et Concentration Minimale bactéricide (CMB)

Les inocula standardisés et les dilutions progressives des antibactériens ont été réalisés sur les recommandations de l'EUCAST pour les tests de sensibilité aux antibiotiques⁴⁶⁸. Un volume de 50 µL de la plus forte concentration d'antibiotique (multipliée par 2) a été distribué dans les puits de la colonne 1 d'une microplaque de 96 puits à fond rond. Le milieu bouillon Mueller-Hinton II ajusté en cations a été utilisé pour les CMI et CMB (CA-MHB II, Becton Dickinson Difco). Un volume de 50 µL de CA-MHB II a été distribué dans les colonnes 2 à 12. Une dilution sériée de 2 en 2 a ensuite été réalisée, à l'aide d'une pipette multicanaux du puits 1 au puits 11, le puits 12 correspondant au témoin positif (contient selon du milieu et la suspension bactérienne). Une suspension bactérienne à 0,5 MacFarland, ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL) a été préparée à partir de colonies bactériennes isolées sur gélose. Cette suspension a ensuite été diluée au 1/100^{ème} en bouillon CA-MHB II afin de constituer l'inoculum bactérien initial (environ 10^6 UFC/mL). Chaque puit d'une ligne a étéensemencé avec 50 µL de la suspension bactérienne puis les plaques ont été incubées à 37°C pendant 24 h dans un volume total dans chaque puit de 100 µL sauf pour le puit 2 qui correspond au témoin négatif (contenant le CA-MHB II et la dernière dilution du Pep16 ou antibiotiques de référence). La CMI de chaque

souche était alors déterminée par le 1^{er} puits correspondant à la plus petite concentration d'antibiotique pour laquelle il n'y a pas de croissance bactérienne visible à l'œil nu.

Une fois la CMI déterminée, chaque puit ayant une absence de croissance a été étalé sur gélose BHI : 50 µL par puit. Après une incubation de 24H, la CMB correspond à la concentration minimale où le nombre de colonies est inférieur à la limite théorique pour laquelle 99,9% des bactéries ont été éliminées. $(\text{Inoculum initial}) / (2 \times 1000 \times 20)$. L'inoculum initial a été déterminé pour chaque suspension bactérienne via un dénombrement : 10 µL du puit 12 ont été dilués dans 90 µL de CA-MHB II. Des dilutions en cascade jusqu'à 10^{-4} étaient effectuées et 10 µL de chaque dilution étaitensemencée sur gélose et incubée 24h à 35°C. La formule pour calculer l'inoculum de départ était la suivante : $(100 \times [\text{nb en }^{-4}] + 10 \times [\text{nb en }^{-3}] + [\text{nb en }^{-2}]) \times 10^4 / 3$. Chaque essai a été réalisé au moins en triplicata

1.1.3 Courbes de bactéricidie

Après avoir été décongelées sur milieu gélosé au bouillon infusion cœur-cervelle (BHI, Oxoid), les souches 1333, 1334, 14 et 15 ont été cultivées une nuit en CA-MHB II. Cette culture a ensuite été diluée dans du CA-MHB II pur afin d'obtenir une suspension étalonnée à 0,5 MacFarland, puis diluée au 1/5 dans du CA-MHB II afin d'obtenir une suspension de 2×10^7 UFC/mL. Un millilitre de cette suspension a été inoculé dans 20 mL de solution d'antibiotique (concentration bactérienne finale attendue de 10^6 UFC/mL). Les solutions d'antibiotiques ont été préparées à partir de solutions de concentrations 20 fois supérieures aux concentrations finales. Les suspensions ont été incubées à 37°C jusqu'à 24 heures sur un agitateur rotatif à 150 rotations par minute. L'activité bactéricide du Pep16 a été déterminée par dénombrement après 3, 6, 8, 11 et 24 heures d'inoculation à 37°C. Ensuite, 100 µL de la suspension pure et des dilutions successives (10^{-1} à 10^{-10}) de cette suspension réalisée en NaCl 0,9 % ont été ensemencés sur des géloses BHI. Le dénombrement des bactéries survivantes a été effectué après 24 h d'incubation à 37°C, et rapporté à un nombre d'UFC/mL en tenant compte des dilutions effectuées et du volume ensemencé. Après conversion à l'échelle logarithmique, une courbe de bactéricidie a été réalisée pour chacune de ces 4 souches.

1.1.4 Tests d'association par la méthode des « échiquiers »

En microbiologie clinique, les associations d'antibiotiques peuvent être classées en 4 catégories d'interactions⁴⁶⁹ :

- Indifférence, où l'efficacité d'un antibiotique reste inchangée par la présence de l'autre.
- Addition, où l'impact global est équivalent à la somme des effets individuels des deux antibiotiques à des concentrations identiques.
- Synergie, où le résultat combiné dépasse significativement la somme des effets individuels à des concentrations comparables⁴⁷⁰.
- Antagonisme, où le résultat combiné est moins efficace que la somme des effets individuels à des concentrations comparables⁴⁷⁰.

Pour étudier ces interactions au laboratoire, une technique classiquement utilisée est le tableau d'échiquier (ou checkerboard), effectué généralement en milieu liquide plutôt que sur gélose. Elle nécessite la modulation des concentrations de deux antibiotiques dans la culture bactérienne. Le but est de déterminer la CMI pour chaque antibiotique individuel et pour leur combinaison, en explorant une large gamme de couples de concentrations (**Figure 23**). Brièvement, deux composés antimicrobiens ont été dilués en série de manière perpendiculaire, correspondant à un gradient de concentrations combinées. Après les dilutions en série, chaque puits contient 75 µL de solution antimicrobienne. La solution bactérienne préparée ($\sim 10^6$ UFC/mL) a été ajoutée en volume égal (75 µL) à chaque puit. Les puits témoins négatifs ont été remplis avec 150 µL de CA-MHB II uniquement. Les puits témoins positifs ont été préparés sans composé antimicrobien (150 µL)⁴⁷¹. La plaque a ensuite été incubée à 37 °C pendant 18 h.

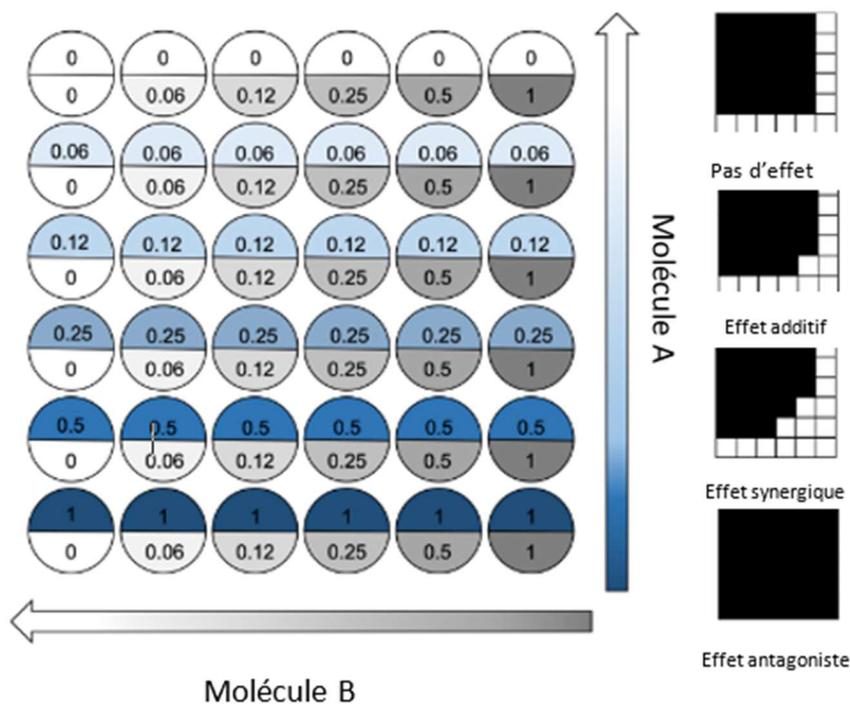


Figure 23. Disposition de la plaque en échiquier pour l'étude de la synergie de deux molécules utilisées en combinaison. Les valeurs des puits représentent des multiples de CMI (adapté de Browne et al.⁴⁷²). Les flèches de concentration de molécules représentent des concentrations décroissantes à mesure que la couleur s'estompe jusqu'à zéro.

Le résultat est exprimé en indice de Concentration Inhibitrice Fractionnaire (FIC pour Fractional Inhibition Concentration en anglais), qui est la somme des FIC individuelles pour chaque composant. Cet indice est calculé selon la formule suivante :

$$\text{FIC} = \text{FIC A} + \text{FIC B}$$

FIC A = CMI de A en association avec B / CMI A seule.

FIC B = CMI de B en association avec A / CMI B seule

Si l'indice FIC est inférieur à 0,5, la combinaison est considérée comme synergique, additive si l'indice est compris entre 0,5 et 1, indifférente entre 1 et 4, et antagoniste si elle est supérieure à 4. Les tests de synergie en échiquier ont été réalisés par la méthode de microdilution en milieu CA-MHB II. Les concentrations de Pep16 et de différents antibactériens variaient de 1 à 64 mg/L et 0,03 à 32 mg/L, respectivement. Le FIC était calculé en additionnant les différents indices de Pep16 et des molécules testées.

1.2 Activité intracellulaire de Pep16 dans des modèles cellulaires d'infection

1.2.1 Schéma général

Dans ce travail, nous avons utilisé deux modèles cellulaires d'infection. Le premier utilise des ostéoblastes humains et est adapté de la littérature afin de tester l'activité de Pep16 sur des souches de SARM et de SASM internalisées dans ces cellules osseuses^{307,472-474}. La **Figure 24** offre une vue synthétique de ce modèle⁴⁷⁵.

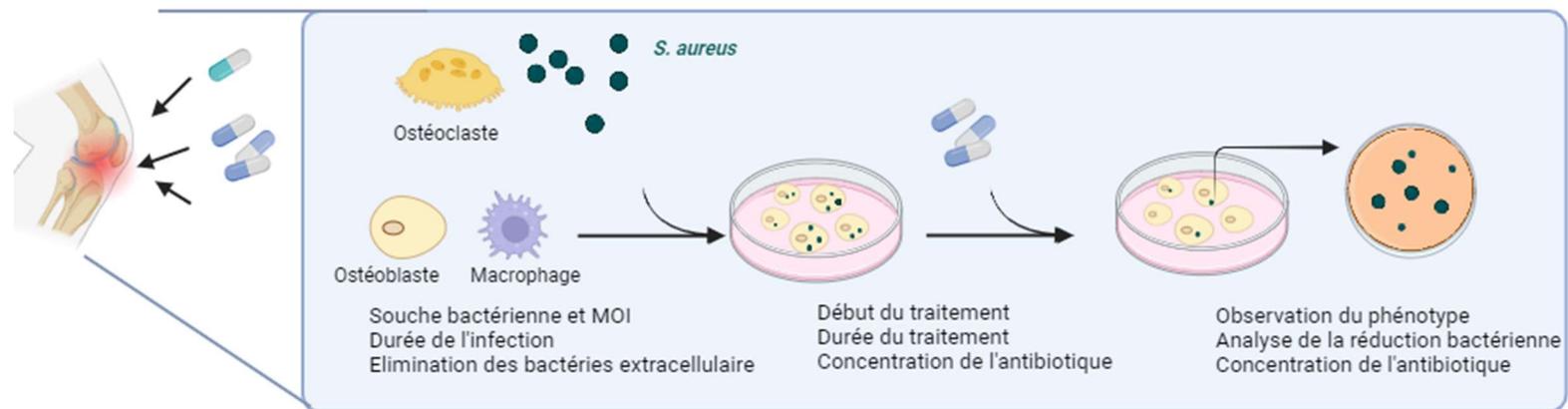


Figure 14. Aperçu de la méthodologie des tests d'infection intracellulaire (adapté de Zelmer et al.⁴⁷⁶).

1.2.2 Culture des ostéoblastes

Des ostéoblastes humains de la lignée MG63 (CRL-1427, LGC Standard, États-Unis), originaires d'un ostéosarcome, ont été utilisés. Les solutions et milieux de culture cellulaires ont été acquis chez Gibco (Paisley, Royaume-Uni). Ces cellules MG63 ont été cultivées dans des flasques de 75 cm² (T75, BD Falcon, Le Pont de Claix, France) à 37°C et sous 5 % de CO₂, dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) enrichi de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), ainsi que 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine. En phase d'infection, ce milieu complet a été employé sans agents antibiotiques. Les cellules ont été entretenues par passage hebdomadaire et ont été utilisées entre le 2^{ème} et 20^{ème} passage post-décongélation. Avant les phases infectieuses, les ostéoblastes ont été placés dans des plaques à 24 puits (Falcon, Le Pont de Claix, France), à une densité de 50 000 cellules par puits dans 1 mL de milieu complet avec antibiotiques, et ont été cultivées pendant 48 heures jusqu'à obtenir environ 80 % de confluence.

1.2.3 Culture de macrophages

Des macrophages humains de la lignée monocyttaire humaine THP-1 (ATCC, Rockville États-Unis), originaires d'une leucémie monocyttaire aiguë, ont été utilisés. Les solutions et milieux de culture cellulaires ont été acquis chez Gibco (Paisley, Royaume-Uni). Ces cellules THP-1 ont été cultivées dans des flasques de 75 cm² (T75, BD Falcon, Le Pont de Claix, France) à 37°C et sous 5 % de CO₂, dans du milieu Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) enrichi de 10 % de SVF. En phase d'infection, ce milieu complet a été employé sans agents antibiotiques. Les cellules ont été entretenues par passage hebdomadaire et ont été utilisées entre le 2^{ème} et 30^{ème} passage post-décongélation. Avant les phases infectieuses, les monocytes ont été placés dans des plaques à 6 puits (Falcon, Le Pont de Claix, France), à une densité de 500 000 cellules par puits dans 1 mL de milieu complet sans antibiotiques, avec du phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) à 1 mg/L afin de les différencier en macrophages⁴⁷⁶ et ont été cultivées pendant 72 heures jusqu'à environ 80 % de confluence.

1.2.4 Tests d'internalisation de *S. aureus* par les cellules humaines

Avant chaque test, les souches ont été décongelées,ensemencées sur des géloses BHI et incubées pendant 18 heures à 37°C. A partir de colonies isolées, une culture dans 10 mL du bouillon Tryptone-Soja (TSB, Oxoid, France) a été préparée et incubée pendant 18 heures à 37°C pendant 18 heures. Ensuite, un aliquot de 100 µL de cette culture a été transféré dans 10 mL de TSB et incubé à 37°C durant 2 heures pour obtenir des bactéries en phase de croissance exponentielle. Le dénombrement bactérien a ensuite été déterminé par spectrophotométrie en mesurant la densité optique à 600 nm (DO₆₀₀). Les suspensions bactériennes ont été ensuite normalisées à une multiplicité d'infection (MOI) de 50 bactéries/cellule et ajoutées aux puits de culture d'ostéoblastes. Pour les macrophages, la MOI était de 10. Après une co-incubation de 2 heures à 37°C pour permettre l'adhésion et l'internalisation bactériennes dans les ostéoblastes ou les macrophages, les cellules ont été lavées deux fois avec de la solution saline tamponnée (PBS, Eurobio Scientific). Ensuite, les cellules humaines infectées ont été incubées pendant 1 heure dans un milieu de croissance supplémenté avec 100 mg/L de gentamicine (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) afin d'éliminer les bactéries extracellulaires. Les cellules infectées ont été incubées avec les bactéries pendant 3 heures (pour les ostéoblastes) ou 24 heures (pour les macrophages) à 37°C dans du DMEM pour les ostéoblastes ou du RPMI pour les macrophages contenant diverses concentrations de l'antibiotique à tester sans SVF. A noter que la gentamicine (à la même concentration de 100 mg/L) est continuellement présente dans le milieu de culture pour tuer rapidement les bactéries libérées lors de la lyse cellulaire, les empêchant ainsi de réinfecter de nouvelles cellules hôtes. Le nombre de bactéries intracellulaires a été déterminé à partir des lysats cellulaires, obtenus par choc osmotique avec de l'eau stérile (incubation dans 1 mL d'eau stérile pendant 10 minutes), après comptage sur géloses BHI.

1.2.5 Viabilité cellulaire des ostéoblastes et des macrophages

Un test colorimétrique basé sur la réduction enzymatique du MTT (ou le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium) en MTT formazan a été utilisé pour déterminer la viabilité de : (i) cellules non infectées après exposition aux antimicrobiens à différentes concentrations afin de déterminer la cytotoxicité potentielle des molécules testées ; et (ii) cellules infectées avec ou sans traitement. Une solution MTT (SigmaAldrich) à 0,5 mg/mL a été ajoutée au milieu des cellules eucaryotes sans SVF. Après lavage avec du PBS et une incubation de 30 minutes à 37°C, les cristaux de formazan formés, traduisant des cellules métaboliquement viables, ont été dissous dans du DMSO. L'absorbance à 540 nm, lue à l'aide d'un lecteur de microplaque BioTek Synergy 2, a été utilisé pour la viabilité cellulaire.

1.2.6 Dosage de Pep16 dans les ostéoblastes par LC-MS/MS

Le dosage par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) est une technique avancée de quantification des analytes, notamment dans le domaine biomédical. Cette méthode repose sur l'utilisation d'un triple quadripôle comme analyseur de masse, ce qui permet d'obtenir des mesures très spécifiques et sensibles. Le triple quadripôle est en réalité une séquence de trois quadripôles : le premier quadripôle sert à filtrer les ions de l'échantillon, le deuxième sert de collisionneur où les ions présélectionnés sont fragmentés, et le troisième quadripôle est utilisé pour analyser les fragments (**Figure 25**). Ce processus est particulièrement utile pour l'approche de Selected Reaction Monitoring (SRM)⁴⁷⁷, une méthode qui permet de surveiller spécifiquement une réaction de fragmentation pour un ion donné. En d'autres termes, le SRM permet de cibler spécifiquement l'ion d'intérêt et sa réaction de fragmentation, fournissant ainsi des données quantitatives hautement spécifiques et sensibles. Grâce à la précision de la LC-MS/MS et l'utilisation du SRM, il est possible de quantifier avec exactitude de très faibles concentrations d'analytes dans des échantillons complexes⁴⁷⁸.

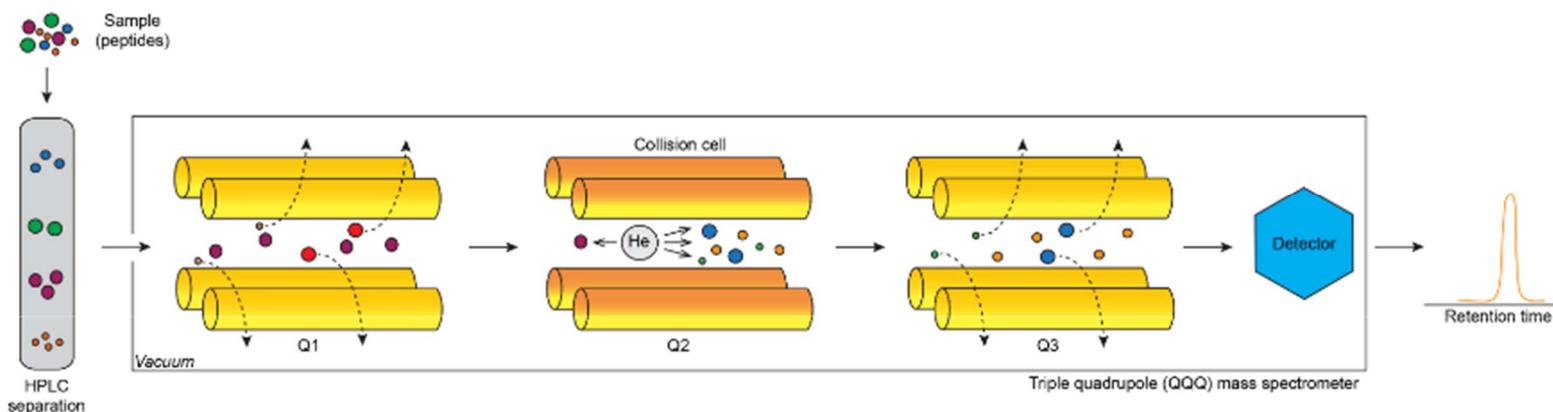


Figure 25. Principe de la SRM pour la quantification ciblée des peptides par spectrométrie de masse (d'après Skalnikova et al.⁴⁷⁸). Les peptides de l'échantillon sont séparés par HPLC en phase inverse et élués à des temps de rétention spécifiques. Les peptides ionisés sont analysés par un spectromètre de masse triple quadripôle (QQQ). Dans le quadripôle Q1, un peptide particulier avec une valeur m/z prédéfinie est sélectionné (ion précurseur, couleur pourpre) et transmis à Q2, tandis que les autres ions sont filtrés (flèches en pointillés). Dans Q2, la fragmentation de l'ion précurseur sélectionné se produit, en raison de collisions avec des molécules de gaz inerte (hélium - couleur grise). Les ions fragmentés originels sont filtrés par Q3 (flèches en pointillés) et seul l'ion fragment avec une valeur m/z prédéfinie (couleur jaune) est transmis au détecteur, où l'intensité de l'ion fragment est enregistrée. Comme une paire prédéfinie d'ion précurseur et d'ion fragment avec une m/z particulière (transition) est mesurée, la méthode SRM est très spécifique.

Les concentrations de Pep16 dans les ostéoblastes non infectés ont été mesurées après 3 heures d'incubation. Des échantillons de 100 μL ont été prélevés dans des tubes Eppendorf à faible liaison aux protéines (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Les tubes ont ensuite été centrifugés pendant 5 minutes à 8 000 tours/minutes et le surnageant a été récupéré puis stocké à -80°C . Les dosages ont ensuite été effectués par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-MS/MS). Pour préparer les échantillons à l'analyse, 30 μL d'analyte ont été ajoutés à une solution de 30 μL contenant de la daptomycine servant d'étalon interne, 30 μL d'une solution eau/méthanol (v/v 50/50) et 90 μL de solution d'acétonitrile à 2 % de ZnSO_4 . Le mélange a ensuite été centrifugé pendant 10 minutes à 10 000 tours/minutes. Par la suite, 100 μL du surnageant ont été transférés dans des flacons contenant 900 μL d'une solution eau/méthanol (50/50, v/v) et 2 μL ont été injectés dans le système chromatographique. Une colonne HYPERSIL GOLD™ C18 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) a été utilisée pour séparer le Pep16 de l'échantillon. La phase mobile est constituée d'une phase (A) composée d'eau avec 0,1 % d'acide formique et d'une phase (B) constituée d'acétonitrile avec 0,1 % d'acide formique. La colonne est maintenue à 40°C . Le gradient démarrait à 10 % (B) et se terminait à 90 % (B) en 7 minutes. Le système

chromatographique est couplé à un spectromètre de masse triple quadrupôle Xevo TQ-XS® (Waters, Milford, MA, USA). La méthode a une plage de concentrations de fixation allant de 1 à 120 mg/L.

1.3 Etude de la cinétique de formation du biofilm

Comme évoqué dans la section bibliographique, les biofilms sont des assemblages de microorganismes ancrés dans une matrice qu'elles sécrètent elles-mêmes. Cette matrice, riche en macromolécules comme l'ADN, les protéines et les polysaccharides, affiche une perméabilité particulièrement sélective vis-à-vis des nutriments et des agents antimicrobiens⁴⁷⁹. Une difficulté réside dans le fait que de nombreuses méthodes de recherche actuelles sur les biofilms se limitent à fournir des données à un moment précis, négligeant ainsi des aspects essentiels de la dynamique de leur croissance⁴⁸⁰. L'une des méthodes courantes est la coloration au cristal violet (CV), qui cible les structures chargées négativement dans le biofilm, incluant les bactéries et la matrice environnante. Toutefois, cette technique présente des limitations comme la toxicité, la liaison non spécifique et les variations dans les résultats⁴⁸¹. Une autre méthode, la coloration à l'eau safranine⁴⁸², bien qu'étant une alternative moins toxique, possède des propres contraintes similaires au CV. Certains ont également tenté de mesurer l'activité métabolique des biofilms à l'aide d'indicateurs redox, mais cette approche est compliquée du fait que différents microorganismes réagissent différemment aux colorants⁴⁸³. D'autres techniques font appel à des colorants qui ciblent spécifiquement des éléments du biofilm ou utilisent des marqueurs génétiques⁴⁸⁴. Les méthodes traditionnelles de quantification de la masse des biofilms tendent à produire des résultats avec de larges variations, posant des problèmes de reproductibilité, notamment à cause des manipulations. C'est dans ce contexte que l'émergence de méthodes permettant un suivi en temps réel de la croissance des biofilms, sans nécessité de marquage ou de manipulation, est considérée comme une avancée majeure par rapport aux techniques de coloration classiques. Pour évaluer la croissance des biofilms en temps réel, nous avons employé le dispositif xCELLigence RTCA SP (Agilent), conformément aux directives fournies par le fabricant (ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA)⁴⁸⁵ et comme décrit précédemment⁴⁸⁶. Dans ce système, la croissance du biofilm de *S. aureus* s'est fait dans un milieu TSB supplémenté avec 1% de glucose (TSB-glucose). Les cultures de nuit de *S. aureus* ont été

diluées avec le milieu de croissance TSB-glucose et 100 µL de ces suspensions bactériennes, atteignant une densité optique à 600 nm (DO_{600}) de 0,1 ont été ajoutés dans les puits de plaques E-Plate 16 puits (E 16) non réutilisables (ACEA Biosciences) pour la mesure de l'impédance à l'aide du protocole standard fourni par le logiciel. L'impédance de fond a été mesurée avec 100 µL TSB-glucose sans bactéries. La croissance du biofilm a ensuite été mesurée toutes les 10 minutes à 37°C pendant 24 heures à 72 heures. La capacité de formation du biofilm au cours du temps était quantifiée via l'impédance cellule-capteur et exprimée en une unité arbitraire appelée indice cellulaire (CI). Le CI à chaque point temporel était défini comme $(Z_n - Z_b)/15$ où Z_n est l'impédance cellule-capteur du puits lorsqu'il contient des cellules et Z_b est l'impédance de fond avec uniquement le milieu de croissance. La capacité de formation du biofilm des bactéries en présence ou non d'antibiotiques était monitorée pendant 24 à 72 heures, sous forme de valeurs CI, qui étaient corrélées à la masse totale du biofilm⁴⁸⁶.

Pour le traitement des biofilms matures, des antibiotiques à une concentration d'au moins 20 fois la CMI ont été testés. En bref, 100 µL de suspension bactérienne ($DO_{600}=0,1$) ont été utilisés, et les biofilms ont été cultivés pendant 24 heures. À ce moment-là, 10 µL de l'antibiotique correspondant ont été ajoutés, atteignant les concentrations finales souhaitées. La capacité d'inhibition/éradication du biofilm par les antibiotiques a ensuite été quantifiée toutes les 10 minutes pendant 24 heures supplémentaires. Pour évaluer l'efficacité des antibiotiques à inhiber la formation du biofilm et à éradiquer un biofilm mature, le Pep16 et la lévofloxacine ont été testés. Pour l'analyse des données, les valeurs CI pour chaque puits ont été normalisées par l'impédance du témoin négatif, et la moyenne des deux réplicats a été calculée pour tracer les graphiques CI.

2. Résultats *in vitro*

2.1 Valeurs de CMI/CMB de Pep16 en comparaison avec celles des molécules de référence

Nous avons évalué l'activité *in vitro* de Pep16 en la comparant à celle des antibiotiques utilisés en clinique pour le traitement des IOA dues à *S. aureus*. Les CMI et les rapports CMB/CMI de Pep16 et des antibiotiques comparateurs pour les souches étudiées de *S. aureus* sont présentés dans le **Tableau 5**. La CMI de Pep16 était de 8 mg/L pour toutes les souches testées, soit 16 fois plus élevée par rapport aux CMI de la vancomycine (0,5 mg/L pour toutes les souches), 32 fois plus élevée par rapport à la daptomycine (0,25 mg/L pour toutes les souches) et entre 8 et 32 fois plus élevée que les CMI de la téicoplanine (0,25 à 1 mg/L selon les souches). Cependant, le rapport CMB/CMI pour Pep16 était de 2 dans tous les cas démontrant une activité bactéricide (rapport ≤ 4) de Pep16, comme pour les comparateurs.

Tableau 5. Activité *in vitro* de Pep16 et d'antibiotiques utilisés en clinique contre les 7 isolats cliniques de *S. aureus* responsables d'arthrite septique

Isolats de <i>S. aureus</i>	Origine	Pep16		Vancomycine		Daptomycine		Lévofoxacine		Ciprofloxacine		Téicoplanine	
		CMI(mg/L)	CMB/CMI	CMI(mg/L)	CMB/CMI	CMI(mg/L)	CMB/CMI	CMI(mg/L)	CMB/CMI	CMI(mg/L)	CMB/CMI	CMI(mg/L)	CMB/CMI
SARM	14 Isolat clinique	8	2	0,5	1	0,25	2	4	1	8	1	0,5	2
	15 Isolat clinique	8	2	0,5	1	0,25	2	0,5	1	2	1	0,5	2
	16 Isolat clinique	8	2	0,5	1	0,25	2	0,25	1	0,25	1	0,25	2
	17 Isolat clinique	8	2	0,5	1	0,25	2	0,25	1	0,25	1	0,5	2
SASM	18 Isolat clinique	8	2	0,5	1	0,25	2	0,25	1	0,25	1	1	2
	1333 Isolat clinique	8	2	0,5	1	0,25	2	0,5	1	0,25	1	0,5	2
	1334 Isolat clinique	8	2	0,5	1	0,25	2	0,5	1	0,25	1	0,25	2

CMI : concentration minimale inhibitrice ; *CMB* : concentration minimale bactéricide ; Les concentrations sont données en mg/L. *SARM* : *S. aureus* résistant à la méticilline. *SASM* : *S. aureus* sensible à la méticilline. *ATCC* : American Type Culture Center. Les données sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

2.2 Détermination de synergies du Pep16 avec des molécules de références

La synergie *in vitro* entre Pep16 et différentes molécules et a été examinée grâce à des tests de synergie en échiquier, en utilisant chaque antibiotique séparément et en combinaison. La méthode des « échiquiers » nous a permis de tester plusieurs antibiotiques (vancomycine, daptomycine, lévofloxacine, téicoplanine) en association avec le Pep16 sur différentes souches cliniques de *S. aureus* (2 SASM et 2 SARM) et la souche ATCC 29213 allant de deux fois la CMI à plusieurs dilutions inférieures à la CMI. Les valeurs de l'indice FIC ont été calculées en prenant en compte les combinaisons les plus faibles d'antibiotiques classiques et de Pep16 où il n'y avait pas de croissance visible. Les valeurs de l'indice FIC étaient supérieures à 0,5 pour tous les antibiotiques testés avec le Pep16 indiquant une absence de synergie avec toutes les molécules testées.

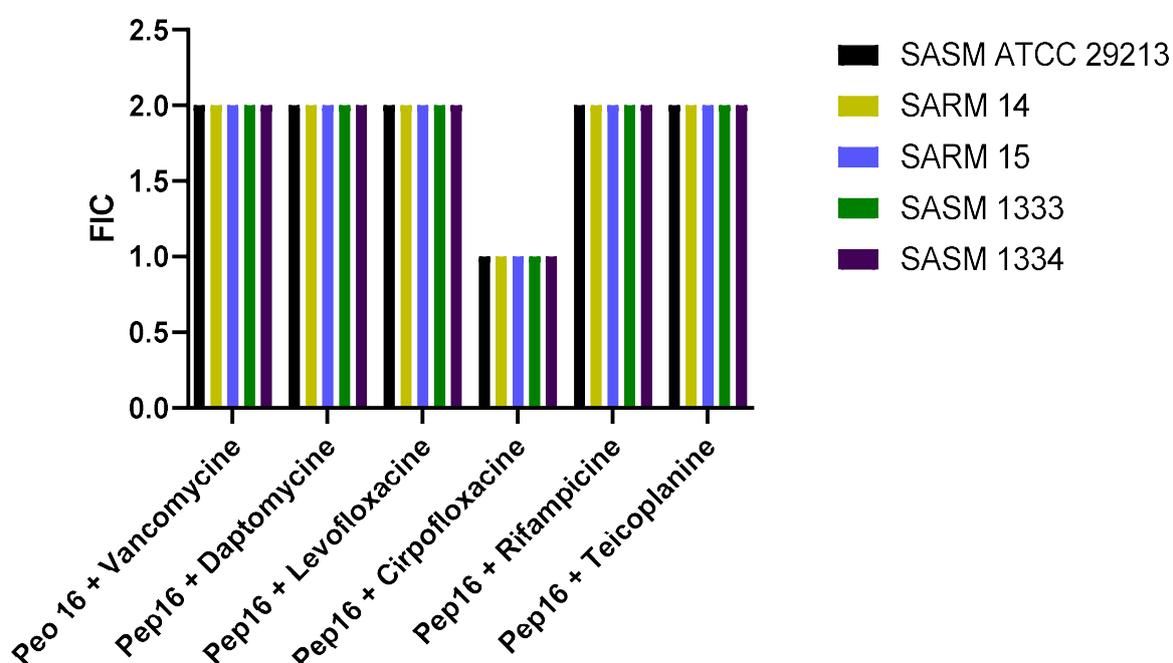


Figure 26. Valeurs de FIC pour les combinaisons de Pep16 avec des molécules antimicrobiennes contre différents isolats de *S. aureus* responsable d'arthrite septique.

2.3 Courbes de bactéricidie

Les activités bactéricides de Pep16 à différentes concentrations ($10 \times$ CMI, $20 \times$ CMI) sur plusieurs souches de *S. aureus* (SARM 14 et 15, SASM 1333 et 1334) ont été évaluées par l'établissement de courbes de bactéricidie (**Figure 27**). Les données montrent que la molécule Pep16 possède une activité bactéricide contre les souches de *S. aureus* provenant d'IOA. Cette activité est dose-dépendante : pour les souches SASM, l'effet est observé dans les **Figures 27A** et **27B**, tandis que pour les souches SARM, l'efficacité est notable à une concentration de 10 fois la CMI (80 mg/L), comme illustré dans les **Figures 27C** et **27D**. À cette concentration, les souches SARM 14 et 15 sont éliminées après 8 heures. En comparaison, les souches SASM 1333 et 1334 montrent une réduction de 3 log CFU/mL après le même laps de temps. À une concentration de 20 fois la CMI de Pep16 (160 mg/mL), toutes les cellules de *S. aureus* sont éliminées après 24 heures. Ces observations confirment l'efficacité bactéricide de Pep16 contre des souches cliniques planctoniques de *S. aureus*.

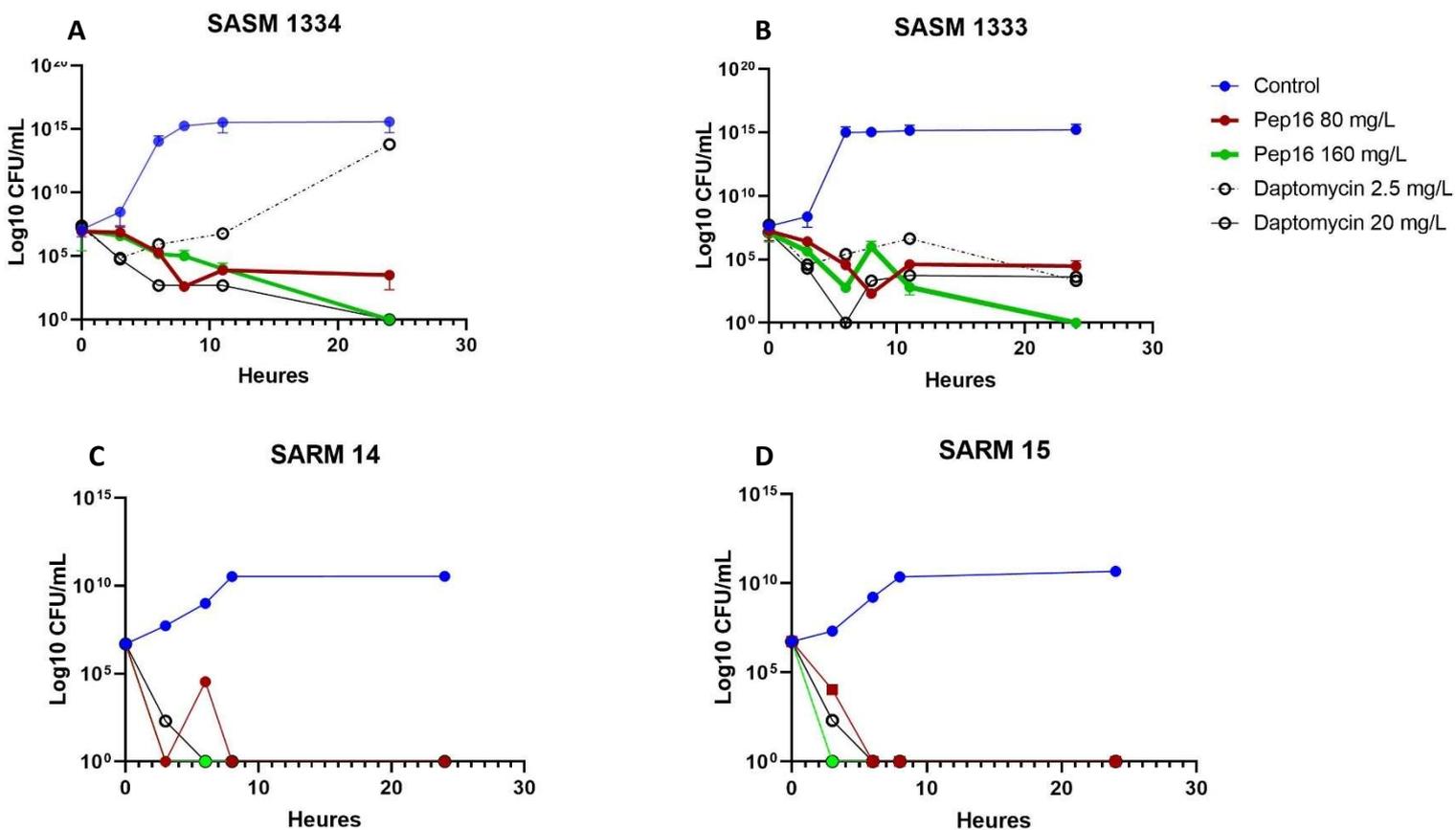


Figure 27. Courbes de bactéricidie sur les souches de SASM 1333 et 1334 (A,B) et de SARM 14 et 15 (C,D) en présence de différentes concentrations de Pep16 et de daptomycine. Les données sont présentées comme des valeurs moyennes \pm écarts-types (SD).

2.4 Activité intra-cellulaire de Pep16

Les activités intracellulaires du Pep16 et de la lévofloxacine ont été évaluées à l'aide du modèle cellulaire d'infection d'ostéoblastes. Les résultats obtenus avec deux souches de SARM (14 et 15) et deux souches de SASM (1333 et 1334) isolées d'IOA sont présentés dans la **Figure 28**. Après traitement à deux fois la CMI, le Pep16 et la lévofloxacine ont réduit significativement la charge bactérienne des quatre souches de *S. aureus* par rapport aux cellules non traitées. En effet, le Pep16 a entraîné une diminution de 46,5 % ($\pm 7,8$ %) de l'inoculum intracellulaire pour le SARM 14 (**Figure 28A**) et de 86,6 % ($\pm 3,9$ %) pour le SARM 15 (**Figure 28B**) par rapport aux cellules non traitées. Concernant les souches de SASM, le Pep16 était également actif contre les bactéries intracellulaires, avec une réduction de 63,3 % ($\pm 4,2$ %) pour la souche 1333 (**Figure 28C**) et de 62,3 % ($\pm 8,9$ %) pour la souche 1334 (**Figure 28D**). Alors qu'aucune différence significative entre la lévofloxacine et le Pep16 n'a été observée pour les SARM, la lévofloxacine était quant à elle significativement plus efficace sur les SASM, avec une réduction estimée à -81,7 % ($\pm 7,3$ %) pour la souche 1333 et -86,7 % (± 9 %) pour la souche 1334. Il est important de mentionner que ni le Pep16, ni la lévofloxacine n'ont montré de cytotoxicité sur les ostéoblastes non infectés à une concentration équivalente à deux fois la CMI suite à une incubation de 3 heures. La viabilité cellulaire était maintenue à plus de 80%.

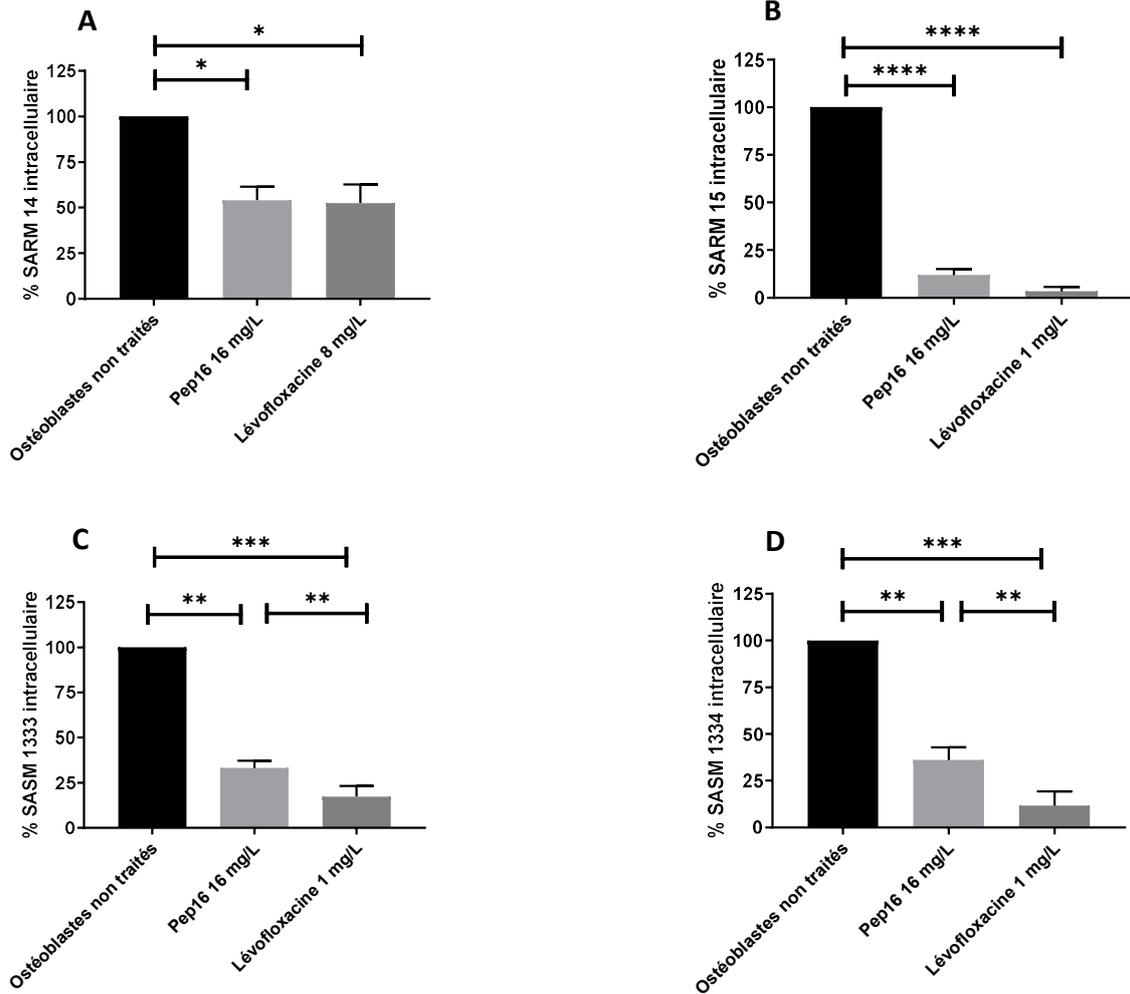


Figure 28. Activité intracellulaire de Pep16 et de la lévofloxacine sur *S. aureus* en modèle ostéoblastique. Après 3 heures d'infection avec les souches de SARM 14 (A) et 15 (B) ou de SASM 1333 (C) et 1334 (D). Les cellules MG-63 ont été traitées avec Pep16 ou lévofloxacine à 2 x CMI pendant 3 heures. Les données représentent la moyenne \pm écart-type de trois expériences indépendantes. Les comptages des UFC intracellulaires ont été normalisés sur des cellules non traitées (histogramme noir) et les différences entre les cellules traitées et non traitées, ainsi qu'entre les différentes molécules, ont été évaluées à l'aide du test U de Mann-Whitney * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

L'activité intracellulaire du Pep16 et de la lévofloxacine a aussi été déterminée en utilisant le modèle cellulaire d'infection de macrophages. Les résultats obtenus avec deux souches de SARM (14 et 15) et deux souches de SASM (1333 et 1334) issues d'IOA sont présentés dans la **Figure 29**. Après un traitement à deux fois la CMI, par rapport aux cellules non traitées, le Pep16 et la lévofloxacine ont pu réduire significativement l'inoculum des quatre souches de *S. aureus*. En effet, le Pep16 a significativement réduit l'inoculum intracellulaire avec une diminution de 83 % ($\pm 1,8$ %) pour le SARM 14 (**Figure 29A**) et de 91,9 % ($\pm 2,2$ %) pour le SARM 15 (**Figure 29B**) par rapport aux cellules non traitées. Pour les souches de SASM, le Pep16 était également actif contre les bactéries intracellulaires, avec une diminution significative de 90,1 % ($\pm 2,6$ %) pour la souche 1333 (**Figure 29C**) et de 90,1 % ($\pm 8,0$ %) pour la souche 1334 (**Figure 29D**). Aucune différence significative n'a été observée entre la lévofloxacine et le Pep16 concernant la réduction des *S. aureus* intracellulaires que ce soit pour les SARM ou les SASM (**Figure 29**). A noter que ni le Pep16, ni la lévofloxacine n'ont montré de cytotoxicité sur les macrophages non infectés à une concentration équivalente à deux fois la CMI suite à une incubation de 24 heures. La viabilité cellulaire était maintenue à plus de 80%.

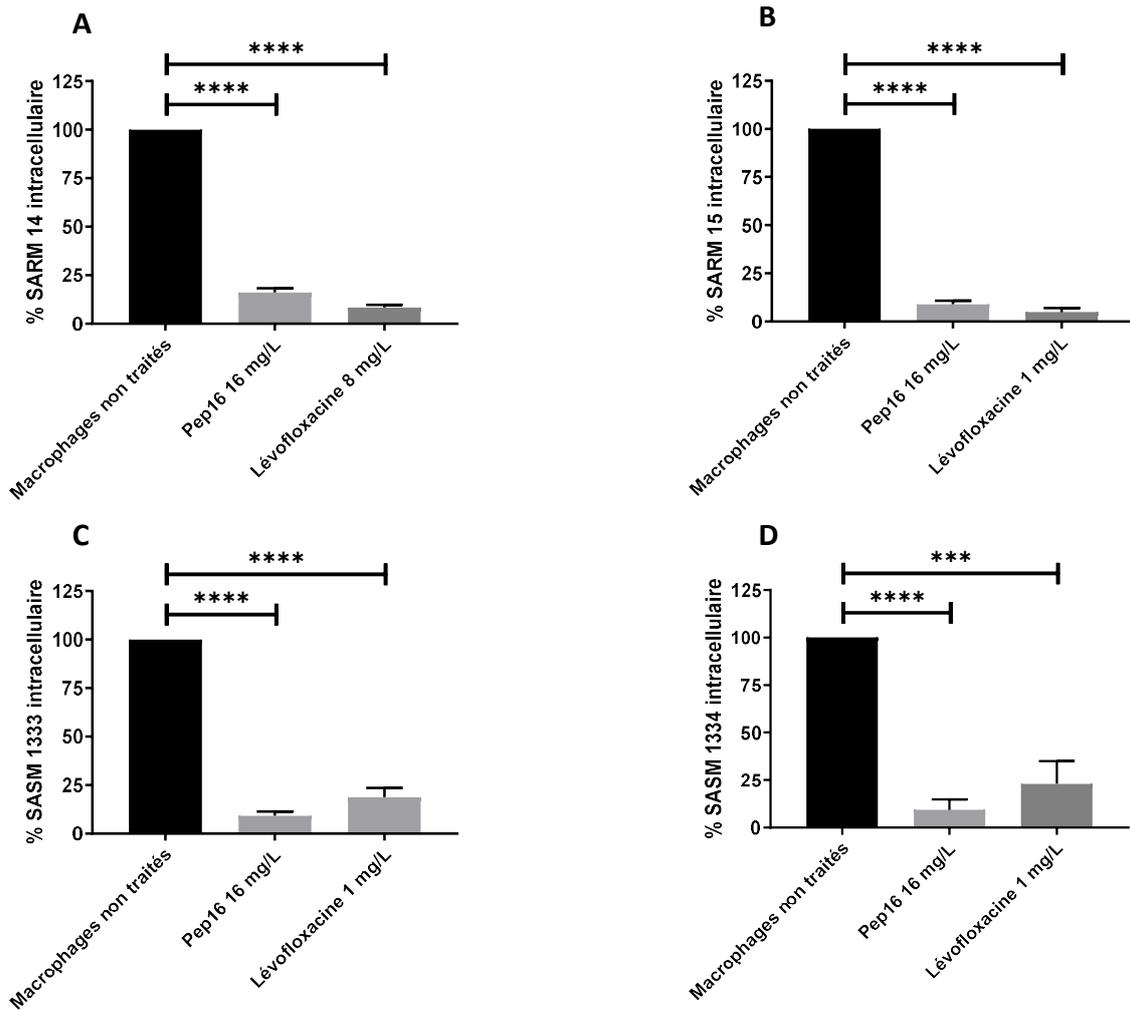


Figure 29. Activité intracellulaire du Pep16 et de la lévofloxacine sur *S. aureus* en modèle macrophagique. Après 3 heures d'infection avec les souches de SARM 14 (A) et 15 (B) ou de SASM 1333 (C) et 1334 (D) les cellules THP-1 ont été traitées avec le Pep16 ou la lévofloxacine à 2 x CMI pendant 24 heures. Les données représentent la moyenne \pm l'écart-type de trois expériences indépendantes réalisées. Les dénombrements des UFC intracellulaires ont été normalisés sur des cellules non traitées (histogramme noir) et les différences entre les cellules traitées et non traitées, ainsi qu'entre les différentes molécules, ont été évaluées en utilisant le test U de Mann-Whitney *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

2.5 Détermination de la concentration intra-ostéoblastique de Pep16

La **Figure 30** illustre les concentrations de Pep16 déterminées par LC MS/MS à la fois en milieu extra-ostéoblastique et intra-ostéoblastique ainsi que la concentration dans un échantillon-témoin contenant théoriquement 16 mg/L de Pep16. Dans l'échantillon-témoin, une concentration de 16 mg/L a été observée, ce qui concorde avec la concentration préétablie, validant ainsi l'approche de dosage. En milieu extra-ostéoblastique, la concentration moyenne de Pep16 était de 4,8 mg/L, tandis qu'en milieu intra-ostéoblastique, elle atteignait une moyenne de 13 mg/L. Ces données confirment la présence significative de Pep16 dans les ostéoblastes, dépassant la CMI des souches étudiées.

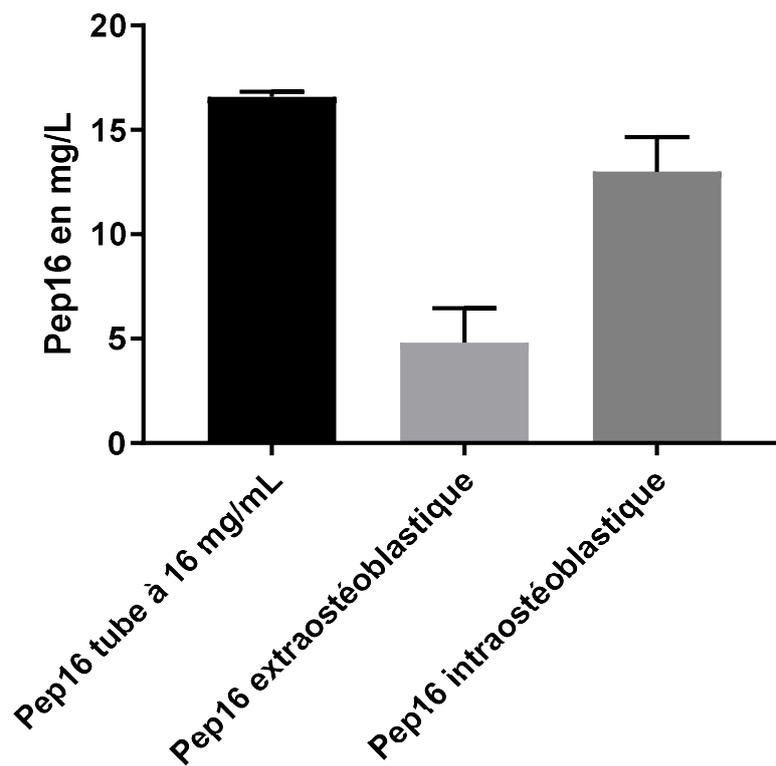


Figure 30. Concentrations extra-ostéoblastique et intra-ostéoblastique de Pep16 déterminées par LC MS/MS.

2.6 Evaluation de l'activité antibiofilm de Pep16

La **Figure 31** représente la dynamique de croissance du biofilm de différentes SARM et SAMS d'études lorsqu'elles sont cultivées dans des E-Plate de 16 puits, est mesurée par impédance toutes les 10 minutes pendant 48 heures. Nous avons constaté que les 4 souches étudiées avaient la capacité à former du biofilm de manière similaire de 0 à 48 heures. Une phase d'adhésion a été observée (de 0 à 2 heures) suivie d'une phase de croissance (de 2 à 40 heures). A partir du temps 0 et jusqu'à 40 heures, les valeurs de CI ont augmentées passant de 0 à 0.4 traduisant la croissance des biofilms bactériens. Un plateau a été atteint, avec un CI d'environ 0.4, pour toutes les souches à partir de 40 heures.

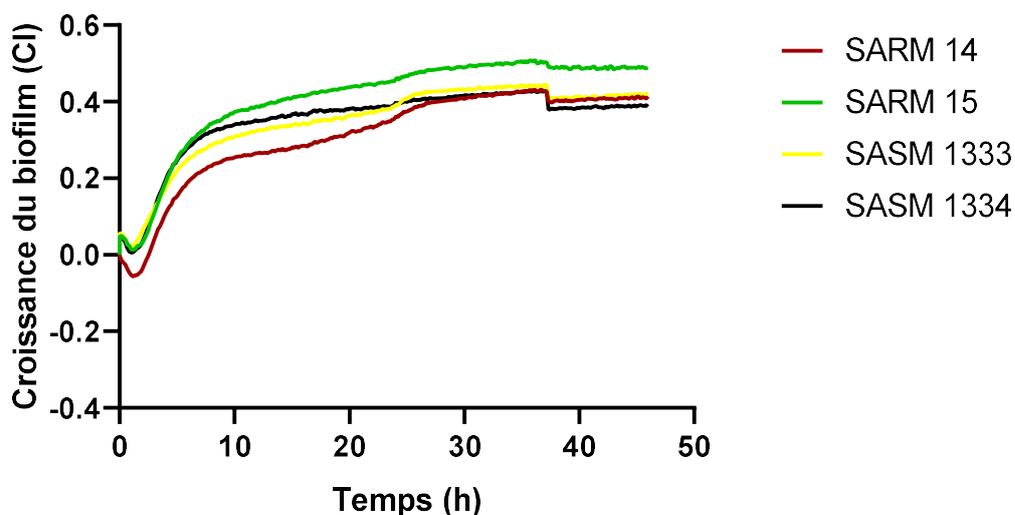


Figure 31. Capacité de formation de biofilm de quatre isolats cliniques de *S. aureus* quantifiée par des mesures basées sur l'impédance (xCELLigence). Les graphiques montrent les estimations de la masse totale de biofilm telle que mesurée à 37°C en utilisant des mesures basées sur l'impédance.

La **Figure 32** résume l'action du Pep16 sur la formation de biofilm des souches étudiées. Lors de l'ajout simultané du Pep16 à 2 mg/L et des bactéries au fond des puits des E-Plates, nous avons observé une diminution des CI au cours du temps. Ceci traduit une absence de formation de biofilms pour toutes les souches étudiées. Lorsque les bactéries ont été incubées avec de l'eau stérile, nous avons observé une augmentation du CI puis un plateau, comme l'illustre la **Figure 31**, traduisant la formation de biofilm.

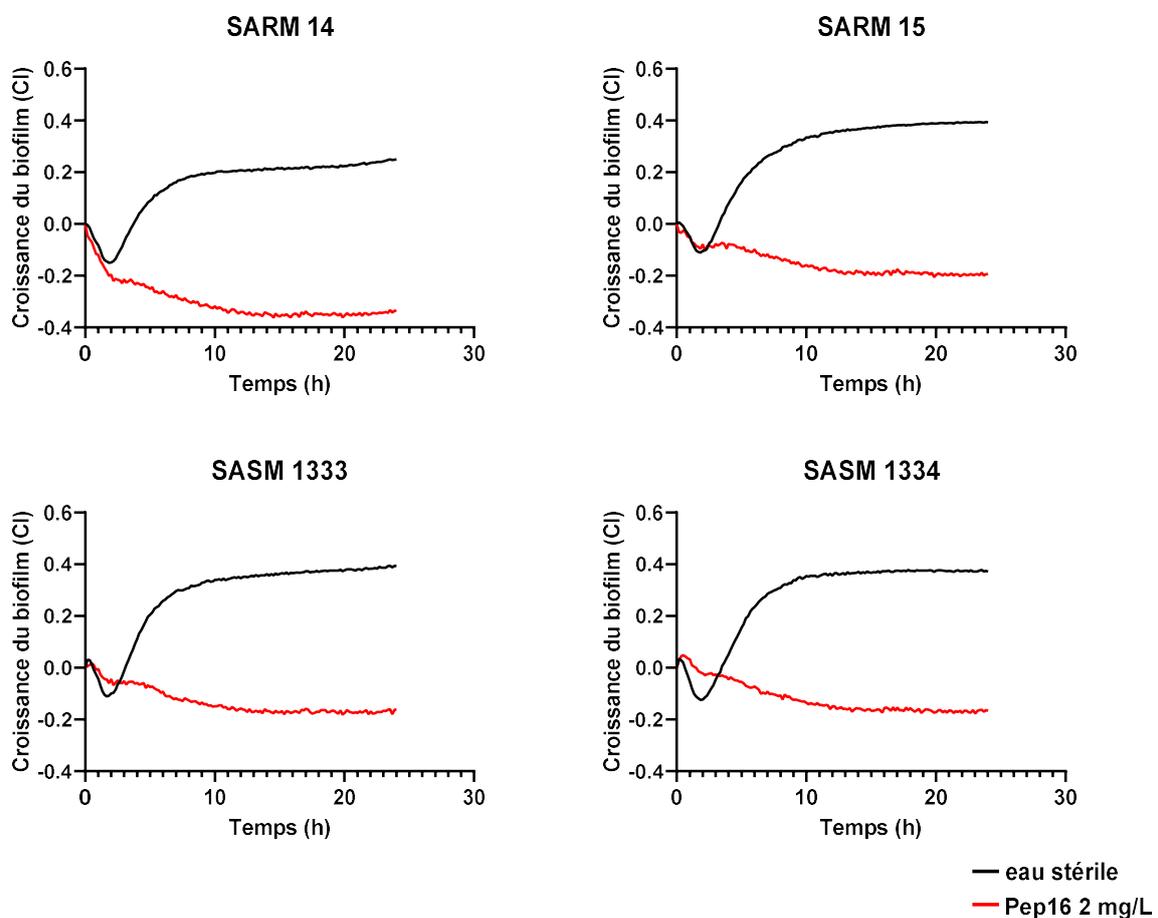


Figure 32. Effet de Pep16 sur la formation de biofilm de 4 isolats cliniques de *S. aureus*. Les graphiques représentent les estimations de la masse totale de biofilm telle que mesurée à 37°C en utilisant des mesures basées sur l'impédance. Les lignes noires indiquent les témoins non traités. Chaque ligne représente la moyenne de trois réplicats biologiques. Pep16 a été ajoutés au début de l'expérience en même temps que l'inoculum bactérien à 2 mg/L. Les écarts types ne sont pas montrés pour plus de clarté.

Ensuite, nous avons évalué l'activité du Pep16 et de la lévofloxacine contre des biofilms matures des souches de notre étude (**Figure 33**). En utilisant des concentrations de 160 µg/L pour le Pep16 (soit 20 x CMI) et de 80 µg/L pour la lévofloxacine (soit 20 x CMI), nous avons observé des différences significatives entre les deux antibiotiques. Le Pep16, à 20 fois sa CMI, a montré une diminution marquée de l'impédance, avec l'indice CI chutant de 0,4 à -0,2, indiquant une perturbation de la structure du biofilm. Cela suggérerait que le Pep16 a la capacité de pénétrer et d'agir sur un biofilm mature. À l'inverse, la lévofloxacine, l'autre agent testé, n'a montré aucun effet mesurable sur le biofilm, sans réduction évidente de l'impédance

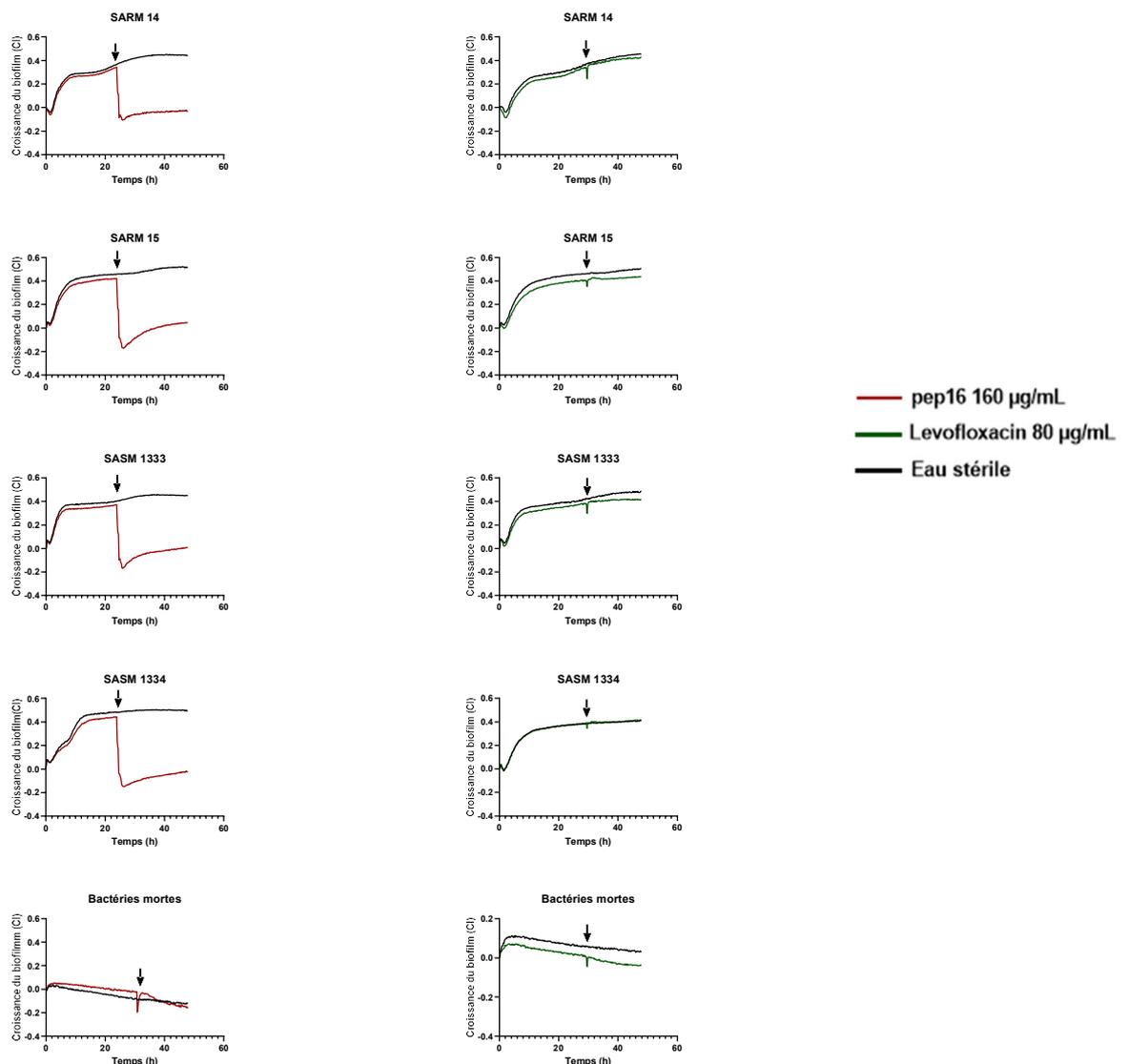


Figure 33. Effet de Pep16 et de la lévofloxacine sur les biofilms matures de SARM et SASM (24 heures après l'inoculation). Après l'ajout des antibiotiques, la croissance du biofilm a été observée pendant 24 heures supplémentaires. Les lignes noires représentent les témoins sans

antibiotiques, tandis que les flèches noires indiquent le moment où les antibiotiques ont été ajoutés. Chaque ligne représente la moyenne de deux réplicats.

3. Conclusion de la partie *in vitro*

L'étude a démontré que le Pep16 a une activité similaire (avec des CMI et CMB identiques) sur les souches de *S. aureus* provenant d'IOA, indépendamment de leur résistance à la méticilline. Toutefois, ces CMI sont plus élevées que celles des antibiotiques utilisés en clinique dans ce type d'infection. Pep16 a également montré une action bactéricide sur l'ensemble des souches examinées. Aucune synergie de Pep16 avec les antibiotiques évalués n'a été identifiée lors des tests *in vitro*. De façon très intéressante, Pep16 a montré une excellente activité sur les bactéries intracellulaires dans deux modèles cellulaires d'infection (ostéoblastes et macrophages). La présence intracellulaire de Pep16 a été corroborée par des analyses quantitatives dans les ostéoblastes. Ceci souligne son potentiel en tant que traitement alternatif antimicrobien sur des souches de *S. aureus* responsables d'IOA, bien que des concentrations plus importantes soient nécessaires pour égaler l'efficacité des traitements habituels. Enfin, l'action du Pep16 sur la formation de biofilm et face aux biofilms matures de certaines souches d'études a été testée. A $\frac{1}{4}$ des CMI (2 mg/L) des souches étudiées Pep16 a inhibé la formation de biofilm. A une concentration 20 fois supérieure aux CMI des souches étudiées (160 mg/L), le Pep16 a induit une baisse conséquente de l'impédance, avec l'indice CI passant de 0,4 à -0,2, ce qui traduirait une déstructuration importante du biofilm. Ceci indiquerait la capacité du Pep16 à infiltrer et influencer un biofilm établi. En revanche, la lévofloxacine n'a pas démontré d'effet notable sur le biofilm, avec une impédance qui est restée stable. Toutefois il faut rester prudent sur l'interprétation de ces résultats concernant le biofilm mesuré par l'impédance, en effet la chute rapide de l'impédance observée au moment de l'ajout du peptide est brutale ce qui traduirait une désintégration très rapide du biofilm dès l'ajout du Pep16.

II. *Activité in vivo de Pep16 dans un modèle murin d'arthrite septique à S. aureus*

1. Matériels et méthodes

1.1 Schéma général

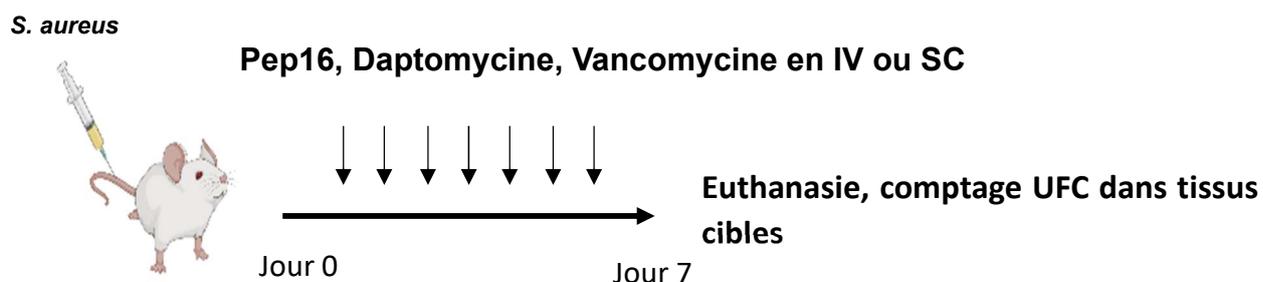


Figure 34. Aperçu de l'expérience d'arthrite septique chez la souris

Pour le modèle d'arthrite septique, nous avons utilisé des souris SWISS femelles, âgées de 11 à 13 semaines et pesant environ 30 grammes, obtenues de Janvier Labs. Les expériences ont été menées dans le laboratoire animalier ARCHE (Biosit, Université de Rennes). Tous les protocoles expérimentaux ont été approuvés par le ministère chargé de la recherche (APAFIS #4508-201603111554125_v5). Les animaux étaient logés dans des cages réglementaires avec un accès libre à la nourriture et à l'eau. Les souris ont été inoculées par voie intraveineuse avec 200 μ L d'une suspension bactérienne (NaCl 0,9 %) de souches cliniques de *S. aureus* responsables d'IOA. 3 heures après l'inoculation, elles ont reçu, quotidiennement et jusqu'au jour 7, des administrations sous-cutanées (SC) ou intraveineuses (IV) de Pep16, de daptomycine, de vancomycine ou bien une association de Pep16 avec la vancomycine. Des souris infectées servant de contrôles ont également été injectées en IV ou SC avec de la solution saline. Au septième jour post-inoculation, les articulations des membres inférieurs, ainsi que les reins et la rate, ont été prélevés pour détermination des UFC à partir de dilutions en série des échantillons tissulaires broyés. Les charges bactériennes observées dans les reins et les rates ont servi d'indicateurs de la progression de l'infection systémique.

Les critères étudiés pour l'arthrite septique à *S. aureus* étaient les suivants :

- Critères cliniques : Mesure quotidienne du poids des animaux, effectuée avant et après inoculation jusqu'à la fin de l'étude ; observation régulière de l'état du pelage, des yeux, ainsi que du comportement des animaux après l'inoculation ; ce suivi s'étendant jusqu'à la conclusion de l'expérimentation.
- Critères bactériologiques : Échantillonnage des articulations des membres inférieurs, des reins et de la rate des animaux. Les prélèvements broyés ont été soumis à différentes dilutions, puis ensemencés sur des géloses BHI. Les colonies bactériennes ont été comptabilisées après une période d'incubation de 24 heures.
- Analyse anatomopathologique : Suite à l'euthanasie des animaux infectés, les articulations des membres inférieurs ont été amputées. Les tissus prélevés ont ensuite été fixés dans une solution de formol à 10%. Des inclusions en paraffine ont été effectuées sur ces tissus. Des examens microscopiques après coloration Gram ont été utilisés pour identifier la présence de germes. Un immunomarquage spécifique à *S. aureus* a aussi été effectué. Les échantillons ont également été colorés avec de l'HES (hématine éosine safran) et analysés, en partenariat avec un anatomopathologiste (H2P2, Biosit, Université de Rennes), pour détecter d'éventuels signes d'inflammation ou d'infection.

Les différents traitements, effectués 3 heures après l'inoculation et chaque jour jusqu'à la fin de l'expérience, ont été administrés comme suit :

- Groupe de monothérapie Pep16 : Les souris ont reçu une injection SC de Pep16 à une dose de 10 mg/kg ou une injection en IV à une dose de 1,5 mg/kg (dose maximale supportée par l'animal en IV).
- Groupe de monothérapie vancomycine : Les souris ont reçu une injection SC de vancomycine à une dose de 100 mg/kg.
- Groupe de monothérapie daptomycine : Les souris ont été traitées avec une dose de daptomycine de 1 mg/kg ou 10 mg/kg, également administrée par voie SC.

- Groupe de bithérapie Pep16 et vancomycine : Ce groupe a reçu une administration IV combinée de Pep16 à 10 mg/kg et de vancomycine à 50 mg/kg.

Chaque traitement a été effectué selon un protocole expérimental prédéfini et les effets de ces différents schémas thérapeutiques ont été évalués en utilisant des méthodes bactériologiques, notamment par la quantification des UFC provenant d'organes et tissus-cibles pour suivre l'efficacité des traitements. Ce protocole nous a permis de comparer l'efficacité de différentes stratégies thérapeutiques dans un modèle murin d'IOA à *S. aureus*.

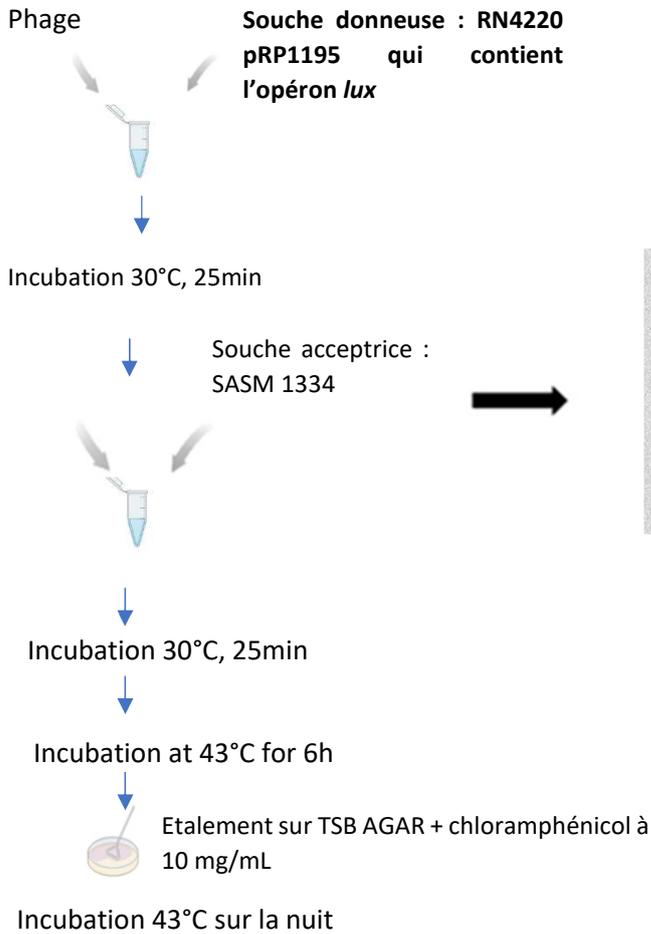
1.2 Choix des isolats de *S. aureus* provenant d'IOA

Dans le cadre de notre étude chez l'animal, nous avons employé 3 souches bactériennes distinctes de *S. aureus*, toutes isolées d'arthrites septiques humaines. Parmi elles, deux étaient des souches de SASM (1333 et 1334) et une était une souche de SARM (15).

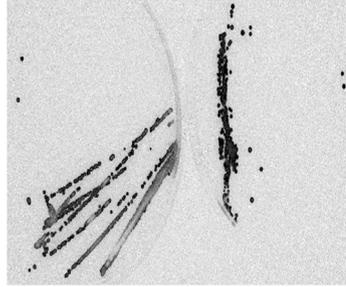
1.3 Utilisation de *S. aureus* provenant d'IOA bioluminescent

Dans le cadre de notre étude, nous avons modifié génétiquement la souche SASM 1334 pour lui conférer une propriété bioluminescente en utilisant la technique de la transduction phagique. Le matériel génétique responsable de cette bioluminescence provient du plasmide pRP1195 de la souche donneuse RN4420, qui possède l'opéron *lux*. Avec l'aide du phage Phi80, ce plasmide a été transduit dans la souche clinique 1334. Il a ensuite été incorporé dans son chromosome suite à un changement de température en présence de 10 mg/L de chloramphénicol. La localisation précise de cette intégration chromosomique a été validée par PCR (**Figure 35**). La stabilité de cette modification a été vérifiée en cultivant la souche modifiée en culture liquide pendant 48 heures sans antibiotiques. Les colonies issues de ces cultures étaient toutes bioluminescentes, attestant de la pérennité de l'opéron *lux* intégré. Ainsi, la souche 1334 est devenue traçable lors de nos expériences ultérieures grâce à cette bioluminescence spécifique. La **Figure 35** illustre la méthodologie de transduction phagique employée pour générer la variante bioluminescente de la souche de SASM 1334.

Protocole de transduction phagique



Vérification de la luminescence des colonies



Vérification PCR de l'intégration chromosomique de l'opéron *lux*



Figure 35. Schéma de la transduction phagique et confirmation de la bioluminescence de la souche de SASM 1334 par vérification de la luminescence des colonies et confirmation PCR.

1.4 Inoculum

La préparation de l'inoculum pour *S. aureus* dans notre étude incluait les étapes suivantes : une colonie isolée de *S. aureus* a été prélevée sur une gélose et mise en culture dans 10 mL de BHI pour une période de 16 heures. Une étape de préculture de 2 heures a été ensuite effectuée avant de procéder à une centrifugation pendant 15 minutes à 3500 tours par minute. Le culot récupéré a été lavé deux fois avec du sérum physiologique en recentrifugeant à chaque fois pendant 10 minutes à 3500 tours par minute. Après les lavages, 10 mL de sérum physiologique ont été ajoutés et le mélange a été homogénéisé en utilisant un vortex. Cet inoculum final, dont la concentration est comprise entre 10^7 et 2×10^8 UFC/mL, a ensuite été contrôlé en termes de densité optique et par numération de colonies sur géloses BHI après 24 heures d'incubation à 37°C sur plusieurs dilutions de l'inoculum préparé.

1.5 Analyse pharmacocinétique de Pep16 après administration sous-cutanée chez la souris

Les concentrations de Pep16 ont été déterminées dans le plasma de souris non infectées à 0,5, 1, 3, 6, 12, 15 et 24 heures après l'injection SC de Pep16. Des échantillons de sang de 40 à 300 μ L ont été collectés dans des tubes Eppendorf Protein LoBind (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) par ponction intracardiaque. Les tubes ont ensuite été centrifugés pendant 5 minutes à 8000 tours par minute, et le surnageant plasmatique a été récupéré et stocké à -80°C. Les dosages ont ensuite été effectués par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Les échantillons ont été préparés pour analyse en ajoutant 30 μ L d'analyte à 30 μ L d'étalon interne, 30 μ L d'une solution eau/méthanol (v/v 50/50), et 90 μ L d'une solution d'acétonitrile à 2% de ZnSO₄. La daptomycine a été utilisée comme témoin interne. Le mélange a ensuite été centrifugé pendant 10 minutes à 10 000 tours par minute. Puis, 100 μ L du surnageant ont été transférés dans des flacons contenant 900 μ L de solution eau/méthanol (50/50, v/v), et 2 μ L ont ensuite été injectés dans le système chromatographique. Une colonne HYPERSIL GOLD™ C18 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) a été utilisée pour effectuer la séparation chromatographique du Pep16 de l'échantillon. La phase mobile utilisée était constituée d'eau avec 0,1% d'acide formique (A) et d'acétonitrile avec 0,1% d'acide formique (B). Cette colonne

a été maintenue à 40°C. Le gradient a commencé avec 10% (B) et a terminé avec 90% (B) pendant 7 minutes. Le système de chromatographie était couplé à un spectromètre de masse triple-quadropôle Xevo TQ-XS® (Waters, Milford, MA, USA). La gamme de concentration de la méthode allait de 1 à 120 µg/mL.

2. Résultats

2.1 Histopathologie de l'IOA à *S. aureus* chez la souris

Les **Figures 36A** et **36B** illustrent une infiltration de *S. aureus* au niveau de l'articulation chez l'animal. La coloration de GRAM, met en évidence les *S. aureus* disposés en arrangements typiques de grappes. Cette observation est davantage corroborée par l'immunomarquage ciblant spécifiquement *S. aureus*, comme présenté dans la **Figure 36C**.

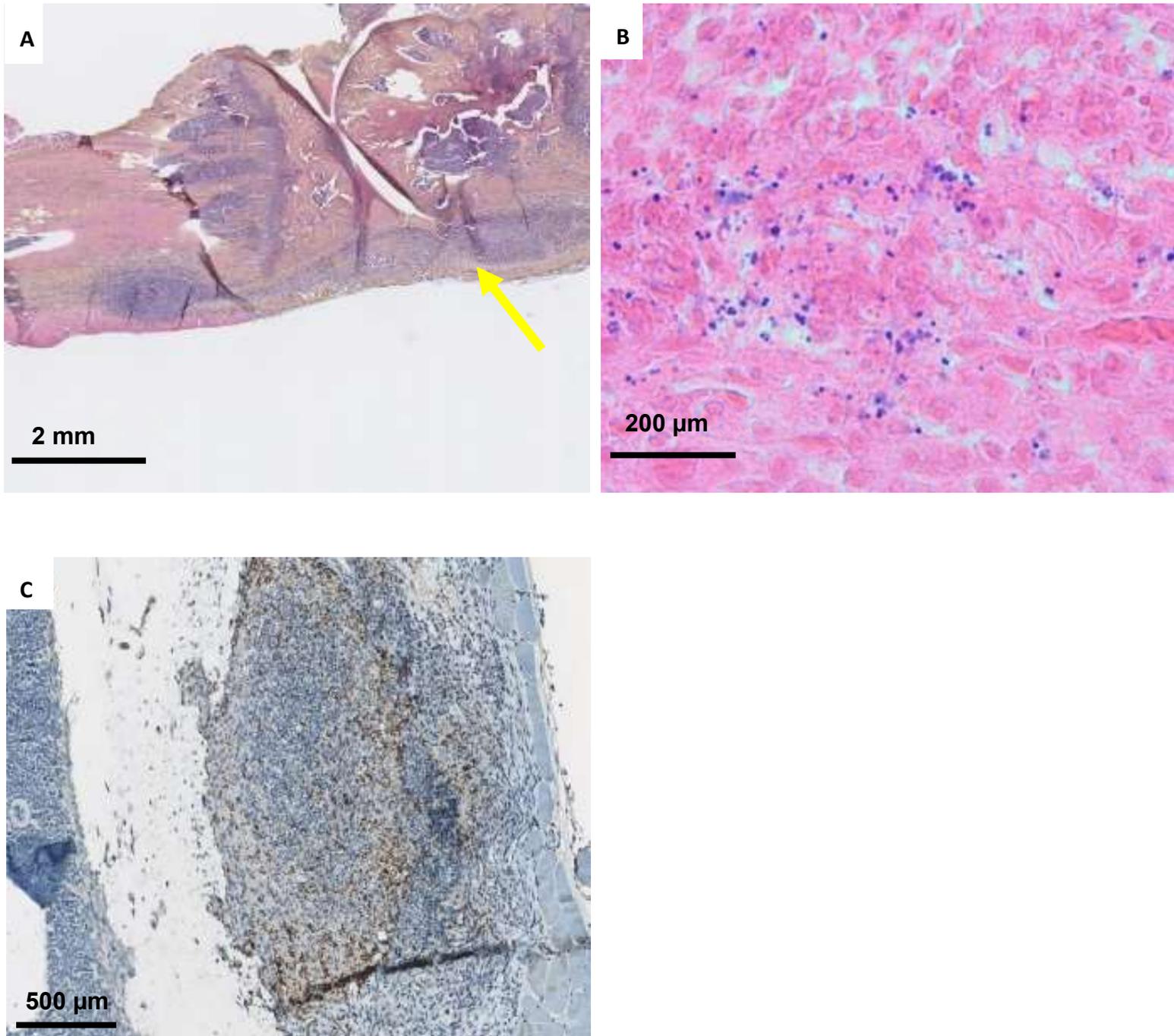


Figure 36. Observation histopathologique d'IOA à *S. aureus* chez la souris. (A) Coloration Hémalun-Eosiné-Safran de l'articulation de souris infectées avec infiltration bactérienne (flèche jaune). (B) Coloration de GRAM de *S. aureus* au sein de l'infiltrat articulaire. (C) Immunomarquage de *S. aureus* au niveau de l'infiltrat articulaire.

Afin d'assurer un suivi dynamique et continu de la progression de l'infection *in vivo*, nous avons employé la souche 1334 bioluminescente de *S. aureus*. Les signaux bioluminescents ont été observés au niveau des articulations du genou dès 24 heures post-infection, et ont perduré jusqu'à la fin de notre intervalle d'étude de 7 jours, comme démontré sur la **Figure 37**. Ces évaluations histopathologiques, associées avec la détection des bactéries bioluminescentes au niveau articulaire, ont confirmé l'existence d'une arthrite septique induite par *S. aureus*. Ceci a confirmé la validité de notre modèle murin d'infection.

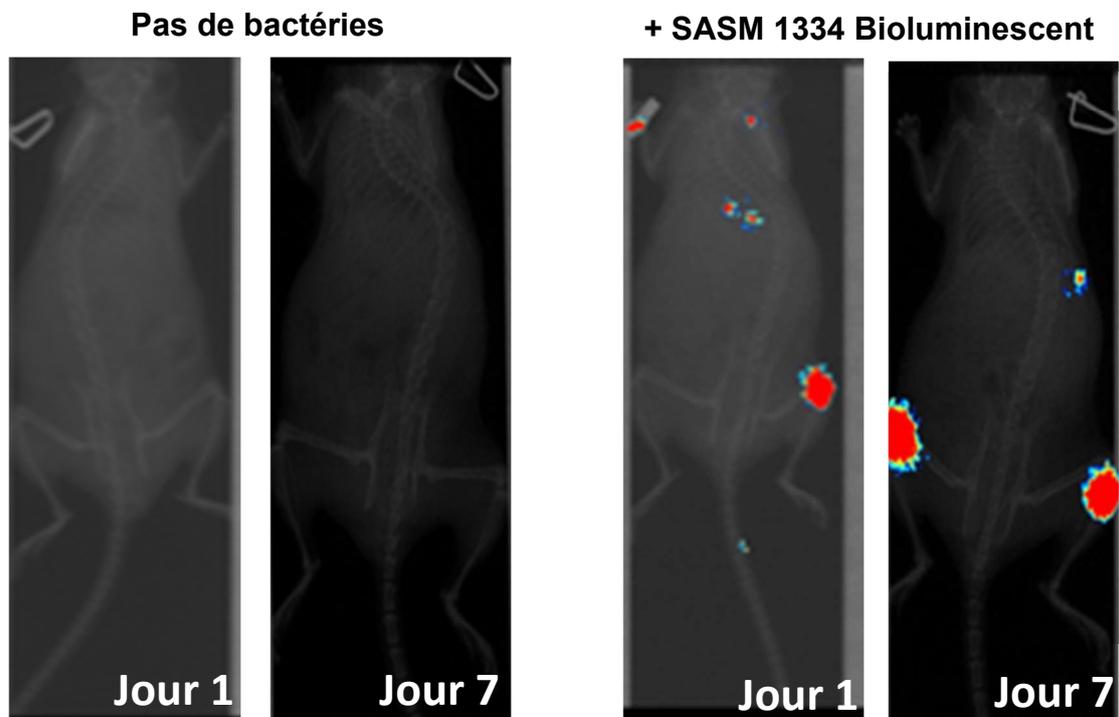


Figure 37. Accumulation des bactéries bioluminescentes au niveau articulaire chez les souris infectées avec la souche 1334 bioluminescente.

2.2 Modèle murin d'arthrite septique à SASM 1334

2.2.1 Quantification des bactéries dans les organes cibles après administration IV de Pep16

Suite à la mise en place du modèle d'arthrite induite par *S. aureus*, nous avons entrepris d'évaluer la capacité du Pep16 à réduire la concentration bactérienne intra-articulaire au cours d'une arthrite septique aiguë. Des souris Swiss ont été inoculées par voie IV avec la souche clinique de SASM 1334. 3 heures post-infection, elles ont été traitées soit avec du Pep16 (1,5 mg/kg), de la vancomycine (100 mg/kg), une combinaison de Pep16 (1,5 mg/kg) et de vancomycine (50 mg/kg), ou une solution saline. Cette administration a été répétée quotidiennement jusqu'à la fin de l'étude. Au jour 7 post-infection, les articulations, les reins et la rate ont été prélevés et les UFC déterminées à partir de dilutions en série des tissus broyés. La charge bactérienne dans les reins et la rate a servi d'indicateur pour la progression systémique de la maladie. Suite à l'administration IV de Pep16 (1,5 mg/kg, correspondant à la dose maximale supportée par l'animal en IV), nous n'avons observé aucune réduction significative du nombre d'UFC au niveau des articulations des genoux, ni dans d'autres organes prélevés, en comparaison avec le groupe témoin (**Figure 38**). Cependant, l'utilisation de la vancomycine a induit une réduction notable des UFC dans chaque organe analysé. La combinaison de Pep16 et vancomycine n'a pas présenté d'avantage significatif en termes d'UFC comparativement à l'usage de la vancomycine en monothérapie. Ces observations nous ont conduit à reconsidérer le mode d'administration, nous orientant vers une administration SC pour augmenter la dose de Pep16 administrée à l'animal.

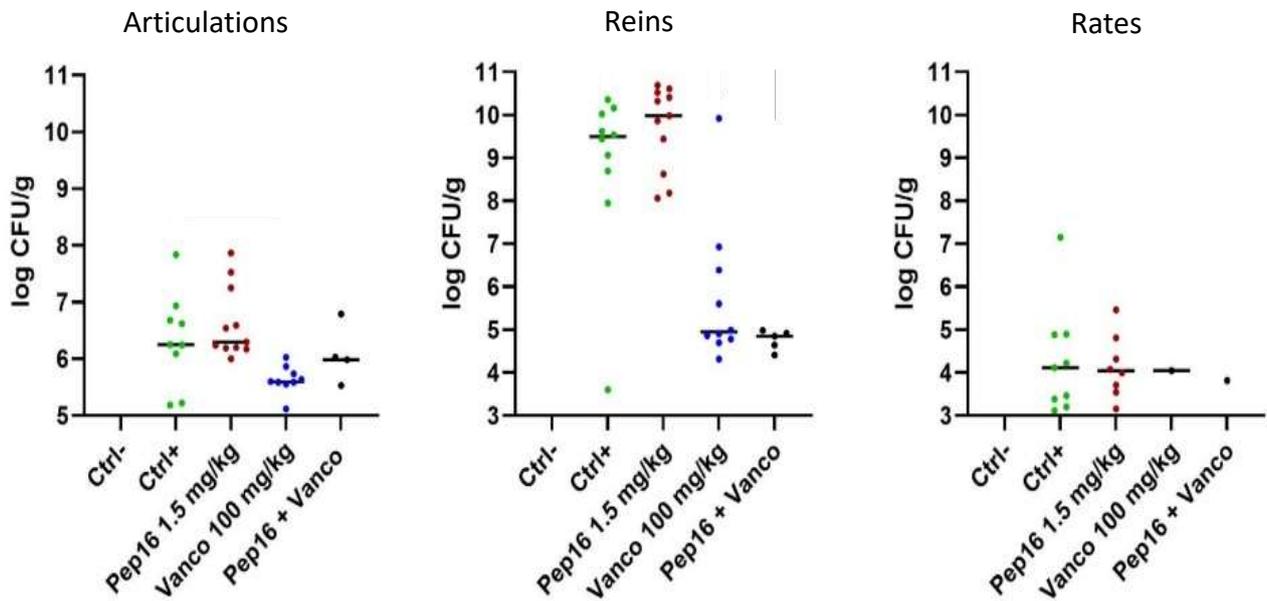


Figure 38. Traitement des arthrites septique dues à SASM 1334 chez la souris en utilisant le Pep16, la vancomycine ou le Pep16 en association avec la vancomycine. Quantification bactérienne exprimée en log UFC/g de bactéries au niveau des articulations des genoux, des reins et de la rate chez les souris infectées par la souche SASM 1334 après 7 jours. Les souris ont été inoculées avec 1×10^8 UFC de SASM 1334. 3 heures après l'infection, elles ont été traitées soit avec 1,5 mg/kg de Pep16, 100 mg/kg de vancomycine, ou 1,5 mg/kg de Pep16 en association avec 50 mg/kg de vancomycine, ou elles ont reçu une solution saline comme témoin non traité (Ctrl+). Les traitements ont été administrés par voie intraveineuse et ont continué quotidiennement jusqu'au jour 7. Chaque point représente le décompte des UFC d'un animal individuel, la ligne horizontale noire indique les valeurs médianes.

2.2.2 Quantification des bactéries dans les organes cibles après administration SC de Pep16

Lorsque les souris ont été traitées avec Pep16, par voie SC, une réduction significative des UFC, soit une réduction d'environ 10 fois de la charge bactérienne, a été observée 7 jours après l'infection dans les articulations des genoux, comparativement aux souris non traitées, mais pas dans les autres organes prélevés (**Figure 39**). Pour les traitements à la vancomycine, une réduction significative des UFC a été observée dans tous les organes prélevés, par rapport aux souris témoins. Après les traitements avec la daptomycine aucune diminution significative de la charge bactérienne dans les organes prélevés n'a été observée en comparaison avec les souris infectées non traitées.

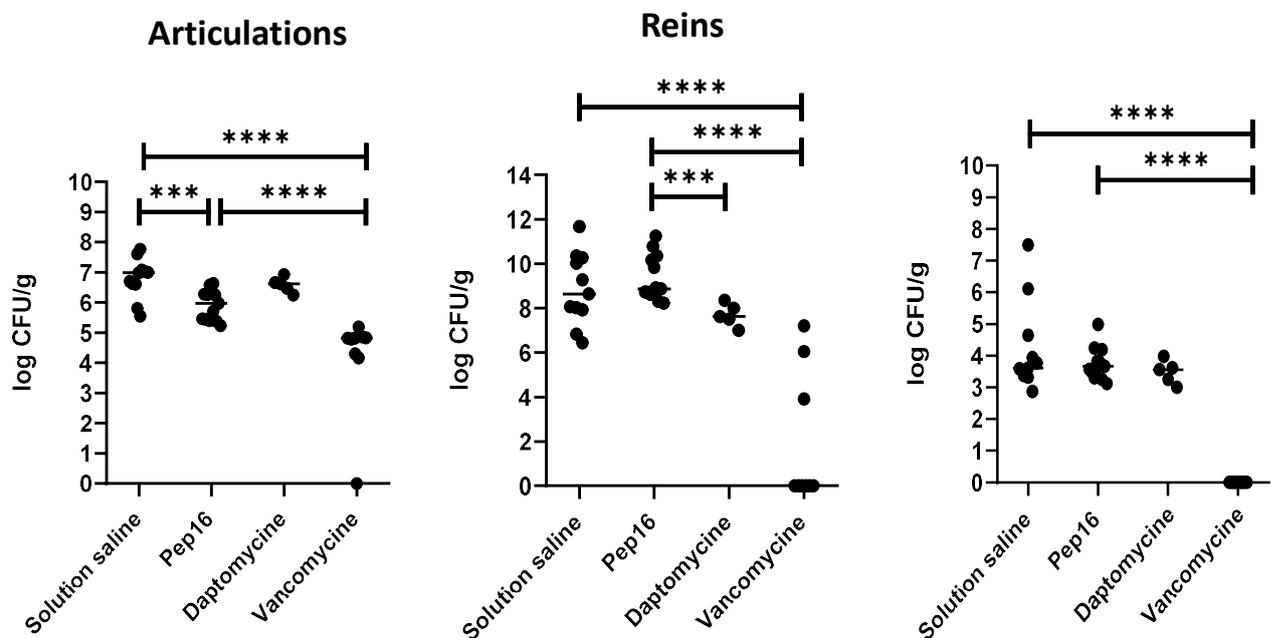


Figure 39. Traitement des arthrites septique dues à SASM 1334 chez la souris en utilisant le Pep16, la daptomycine ou la vancomycine. Quantification bactérienne exprimée en log UFC/g de bactéries au niveau des articulations des genoux, des reins et de la rate chez les souris infectées par la souche SASM 1334 après 7 jours. Les souris ont été inoculées avec 1×10^8 UFC de SASM 1334. 3 heures après l'infection, elles ont été traitées soit avec 10 mg/kg de Pep16, 1 mg/kg de daptomycine, 100 mg/kg de vancomycine, ou elles ont reçu une solution saline comme témoin non traité. Les traitements ont été administrés par voie sous-cutanée et ont continué quotidiennement jusqu'au jour 7. Chaque point représente le décompte des UFC d'un animal individuel, la ligne horizontale noire indique les valeurs médianes. Les logUFC/g par articulation du genou, représentés par des points individuels, ont été déterminés 7 jours après l'infection. 3 à 5 souris par condition. L'expérience a été réalisée trois fois pour les conditions Pep16 et solution saline ; deux fois pour la condition vancomycine et une fois pour la condition daptomycine. Les évaluations statistiques ont été effectuées à l'aide du test de Mann-Whitney U. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.**

2.3 Modèle murin d'arthrite septique à SASM 1333

2.3.1 Quantification des bactéries dans les organes cibles après administration sous-cutanée de Pep16

Des souris ont été inoculées avec la souche clinique de SASM 1333 par voie IV. Avec le traitement au Pep16 (10 mg/kg en SC), il n'a été observé aucune diminution notable des UFC au niveau des articulations comparativement au groupe témoin (**Figure 40**). Cependant une diminution significative des bactéries dans la rate a été observé après un traitement avec le Pep16 comparativement aux souris non traitées. Le traitement par daptomycine a conduit à une baisse significative des UFC dans l'ensemble des organes étudiés, en comparaison avec le groupe non traité. Ces observations contrastent avec celles obtenues pour la souche 1334, où un traitement par Pep16 avait entraîné une réduction de la charge bactérienne au niveau des articulations.

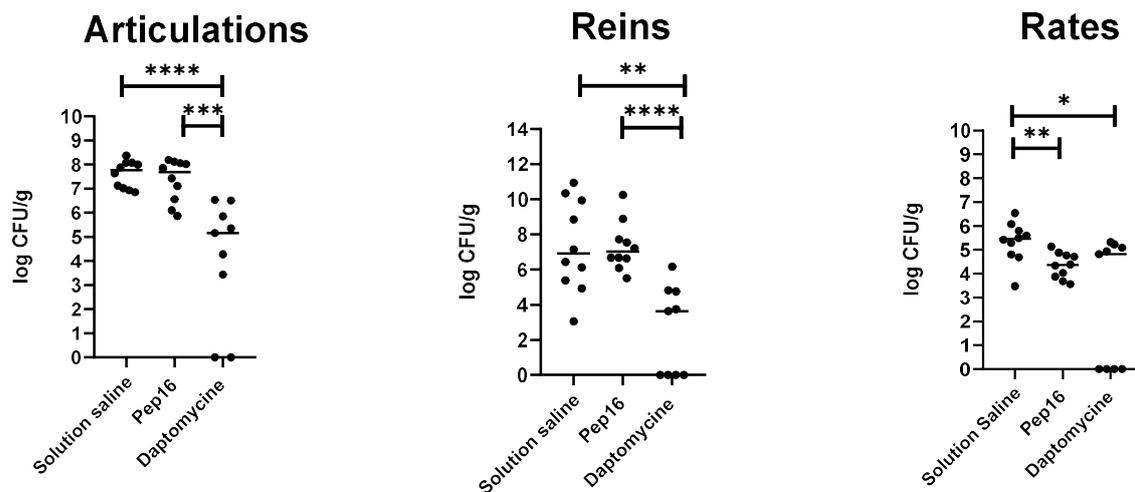


Figure 40. Traitement des arthrites septique dues à SASM 1333 chez la souris en utilisant Pep16, ou la daptomycine. Quantification bactérienne exprimée en log UFC/g de bactéries au niveau des articulations du genou, des reins et des rates chez les souris infectées par SASM 1333 après 7 jours. Les souris ont été inoculées avec 1×10^7 UFC de SASM 1333. 3 heures après l'infection, elles ont été traitées soit avec 10 mg/kg de Pep16, 10 mg/kg de daptomycine, ou une solution saline comme témoin non traité. Les traitements ont été administrés par voie sous-cutanée et ont continué quotidiennement jusqu'au jour 7. Chaque point représente le décompte des UFC d'un animal individuel, la ligne horizontale noire indique les valeurs médianes. 4 à 5 souris par condition. L'expérience a été réalisée deux fois pour toutes les conditions.

2.4 Modèle murin d'arthrite septique à SARM 15

2.4.1 Quantification des bactéries dans les organes cibles après administration sous-cutanée de Pep16

Les souris ont été inoculées par voie IV avec la souche clinique SARM 15. 3 heures après l'inoculation, elles ont reçu, quotidiennement et jusqu'à la conclusion de l'étude, des traitements SC avec soit le Pep16 (10 mg/kg, 30mg/kg), la daptomycine (10 mg/kg), ou une solution saline témoin. Au 7^{ème} jour post-inoculation, les articulations, ont été prélevées pour détermination des UFC à partir de dilutions en série des échantillons tissulaires broyés. Après les différents traitements au Pep16 (10 ou 30 mg/kg), il n'a été observé aucune diminution notable des UFC au niveau des articulations comparativement au groupe témoin (**Figure 41**). Ces observations contrastent avec celles obtenues pour la souche 1334, où un traitement avec le Pep16 à une dose de 10 mg/kg avait entraîné une réduction significative de la charge bactérienne au niveau des articulations.

Articulations

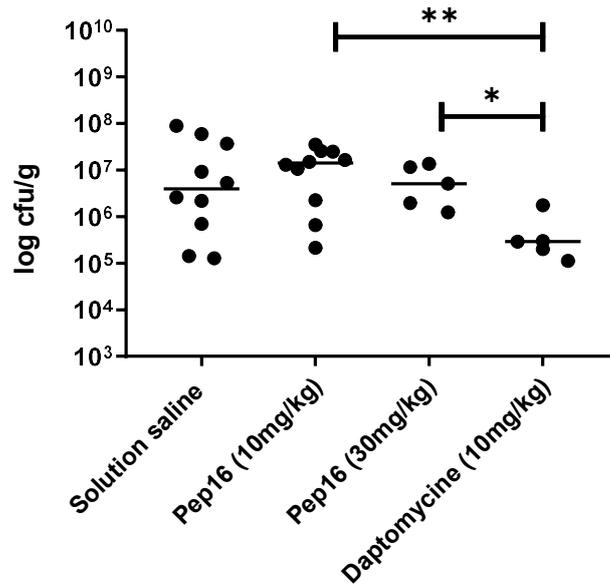


Figure 41. Traitement des arthrites septique dues à SARM 15 chez la souris en utilisant Pep16 ou la daptomycine. Quantification bactérienne exprimée en log UFC/g de bactéries au niveau des articulations des genoux chez les souris infectées par SARM 15 après 7 jours. Les souris ont été inoculées avec environ 1×10^7 UFC de SARM 15. Trois heures après l'infection, elles ont été traitées soit avec 10 mg/kg ou 30 mg/kg de Pep16, 10 mg/kg de daptomycine, ou une solution saline comme condition témoin non traité. Les traitements ont été administrés par voie sous-cutanée et ont continué quotidiennement jusqu'au jour 7. Chaque point représente le décompte des UFC d'un animal individuel, la ligne horizontale noire indique les valeurs médianes. 5 souris par condition. L'expérience a été réalisée deux fois pour les conditions Pep16 (10 mg/kg) et solution saline ; et une fois pour la condition daptomycine (10 mg/kg) et Pep16 (30 mg/kg).

2.5 Analyse pharmacocinétique de Pep16 après administration sous-cutanée chez la souris

Conformément à l'étude publiée précédemment⁴⁸⁷, nos analyses pharmacocinétiques de Pep16 après une administration SC de 10 mg/kg ont montré une augmentation lente des concentrations plasmatiques (**Figure 42**). On observe une lente augmentation des concentrations plasmatiques jusqu'à 12 heures, avec une valeur de C_{max} à 5,6 mg/L. Cependant le C_{max} mesurée est en dessous des CMI des souches étudiées pour le Pep16. Des analyses pharmacocinétiques supplémentaires et d'étude de la liaison du Pep16 aux protéines doivent être menées afin de valider ces premiers résultats de pharmacocinétique de Pep16 dans le plasma des souris.

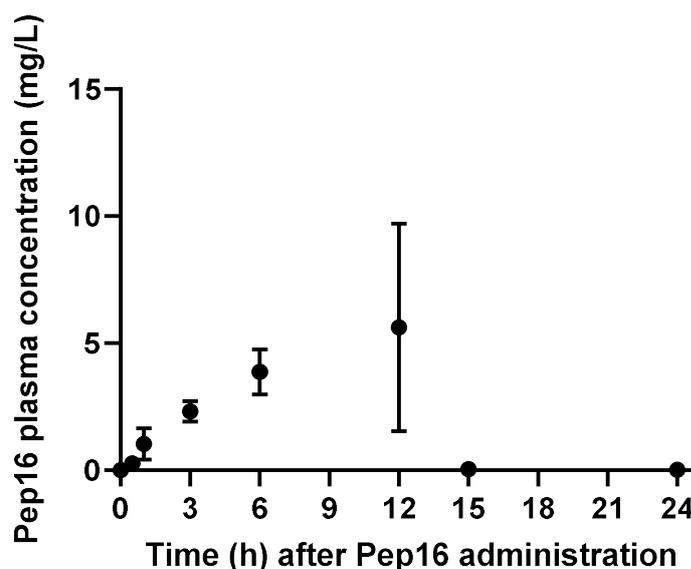


Figure 42. Concentration de Pep16 dans le plasma de souris après une administration sous-cutanée unique de 10 mg/kg. Les points représentent la moyenne \pm SEM de trois réplicats. SEM, erreur standard de la moyenne. ESM, erreur standard de la moyenne.

3. Conclusion de la partie *in vivo*

Suite à l'inoculation IV de diverses souches cliniques de *S. aureus* provenant d'IOA chez les souris, plusieurs expérimentations animales ont été menées afin d'évaluer l'efficacité *in vivo* antibactérienne du Pep16. L'administration IV de Pep16 n'a pas significativement réduit la charge bactérienne dans les articulations des genoux ou des autres organes par rapport au groupe témoin. Toutefois, lorsque Pep16 a été administré par voie SC, une réduction notable des UFC a été observée pour la souche 1334 dans les articulations des genoux, mais cette efficacité n'a pas été reproduite pour les 2 autres souches testées (SASM 1333 et SARM 15). Si la vancomycine a toujours montré des résultats constants quant à la réduction de la charge bactérienne, des variations selon certaines souches ont été observés avec la daptomycine. En ce qui concerne le profil pharmacocinétique du Pep16, une administration SC a révélé une augmentation lente de la concentration plasmatique, avec une C_{max} atteinte à 12 h. Cependant, la C_{max} mesuré était en-dessous des valeurs de CMI du Pep16 pour les souches étudiées. Si toutes ces observations suggèrent que Pep16 peut effectivement avoir une activité antibactérienne contre certaines souches de *S. aureus*, son efficacité peut varier selon la méthode d'administration et le fond génétique.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le traitement des IOA causées par *S. aureus* nécessite des solutions innovantes, d'où l'intérêt grandissant pour des agents comme le Pep16, un nouveau pseudo-peptide inspiré d'une toxine bactérienne⁴⁶⁷. Face à la menace croissante des souches résistantes telles que le SARM, la quête d'alternatives efficaces est urgente. Notre étude a examiné l'activité antibactérienne et antibiofilm de Pep16 : (i) contre différentes souches cliniques de SARM et SASM provenant d'IOA, (ii) dans des modèles d'infections de cellules humaines à *S. aureus*, et (iii) dans un modèle murin d'arthrite septique à *S. aureus*.

Les résultats démontrent que le Pep16 présente des CMI identiques pour toutes les souches testées. Cette constance est particulièrement intéressante, car elle suggère que le Pep16 pourrait être efficace contre une variété de souches, indépendamment de leur profil de résistance aux autres antibiotiques. Cependant, les CMI du Pep16 se révèlent supérieures à celles des antibiotiques couramment utilisés dans ce type de pathologies, suscitant des questions quant à sa concentration optimale pour obtenir une activité antimicrobienne efficace en clinique. Sa capacité bactéricide est incontestable, offrant une efficacité contre toutes les souches testées. Toutefois, l'absence de synergie entre le Pep16 et les antibiotiques testés pourrait orienter vers son utilisation en monothérapie.

Un atout majeur du Pep16 réside dans sa capacité à cibler les bactéries intracellulaires, notamment dans des modèles d'infections d'ostéoblastes et de macrophages. Cette particularité est essentielle car, durant une IOA, *S. aureus* a la faculté de s'internaliser dans des ostéoblastes, cellules osseuses non-phagocytaires, lui permettant d'échapper à l'effet des antibiotiques. L'efficacité de Pep16 contre les bactéries intracellulaires pourrait donc offrir un avantage significatif dans la prise en charge des IOA. Cependant, l'adaptation phénotypique de *S. aureus* en small colony variants (SCV), n'a pas été pris en compte lors de notre étude. Les SCV sont connus pour leur persistance intracellulaire et pourraient être une cause majeure d'échec du traitement antibiotique. Cette formation de SCV pourrait également influencer la susceptibilité aux antibiotiques et complexifier davantage le choix thérapeutique^{475,488}. Ainsi, il est crucial que les futurs traitements, y compris le Pep16 ou ceux basés sur le Pep16, soient évalués par rapport à leur capacité à cibler efficacement ces SCV. Il est important de noter

que, les variations méthodologiques entre les études *in vitro* d'infections des cellules humaines par *S. aureus* posent des défis, notamment quant à la comparaison des résultats et leur interprétation. La diversité des types cellulaires, des souches bactériennes, des durées d'infection et de traitement, ainsi que des concentrations d'antibiotiques utilisées dans différentes études, crée en effet des disparités dans les résultats⁴⁷⁵. Un point-clé est le choix du modèle cellulaire. Beaucoup d'études utilisent des macrophages, qui diffèrent des ostéoblastes dans leur interaction avec *S. aureus*⁴⁷⁵. En effet, les macrophages, étant des phagocytes professionnels, abritent un nombre nettement plus élevé de *S. aureus* par rapport aux ostéoblastes. Les ostéocytes, semblent eux être un modèle cellulaire pertinent pour étudier l'ostéomyélite, notamment en raison de leur localisation, de leur longévité et de leur capacité à servir de réservoir pour *S. aureus*. Le dosage de Pep16 dans les ostéoblastes a permis de confirmer sa présence dans les cellules humaines. Toutefois une accumulation d'antibiotiques dans les cellules humaines n'est pas toujours synonyme d'efficacité. Par exemple, certaines études montrent que bien que l'oritavancine (un lipoglycopeptide utilisé contre les SARM) était accumulé à 148 % dans les cellules humaines, son efficacité intracellulaire était similaire à celle de la moxifloxacin (fluoroquinolone) qui n'était accumulée qu'à 7,6 %⁴⁸⁹. Cette observation indique que l'efficacité intracellulaire d'un antibiotique ne dépend pas simplement de sa concentration ou de son activité extracellulaire. Les mécanismes intracellulaires, tels que la colocalisation de l'antibiotique et des bactéries, le métabolisme de la cellule hôte et les mécanismes adaptatifs des bactéries, jouent un rôle clé. La littérature fournit une perspective précieuse sur les antibiotiques potentiellement efficaces et inefficaces contre *S. aureus* dans le contexte d'IOA. La rifampicine, l'oritavancine, le linézolide, la moxifloxacin et l'oxacilline semblent être les plus impactants⁴⁷⁵. D'autres, comme la doxycycline et l'omadacycline, bien que prometteurs, n'ont pas encore été testés de façon adéquate. Outre l'évaluation de nouveaux antibiotiques, l'amélioration de l'efficacité intracellulaire des médicaments peut également être réalisée grâce à des systèmes de délivrance intelligents, tels que les nanoparticules⁴⁹⁰, les exosomes⁴⁹¹, ou couplés à des composés permettant de manipuler le pH intracellulaire⁴⁹². Cela pourrait potentiellement augmenter la concentration effective de l'antibiotique au site d'infection et améliorer l'efficacité globale du traitement.

La technologie XCELLigence d'impédancemétrie nous a permis l'étude de l'activité du Pep16 contre les biofilms formés par des souches de *S. aureus* responsable d'IOA. Les premiers résultats sont prometteurs même si leurs interprétations sont à nuancer. À une concentration sous-inhibitrice de 2 mg/L (soit un quart de la CMI des souches d'études), le Pep16 inhiberait complètement la formation de biofilms pour toutes les souches étudiées. Cela indiquerait non seulement la capacité du Pep16 à prévenir la formation de biofilms, mais également son potentiel d'efficacité à faible concentration. Les premiers résultats sur biofilms matures suggèrent que Pep16 pourrait perturber la structure des biofilms, indiquant une possible pénétration et une action après la formation du biofilm. Toutefois, il convient de nuancer ces résultats. En particulier, la dynamique observée, où l'impédance chute brusquement après l'ajout du peptide, suscite des interrogations. Est-il réaliste de supposer que le biofilm puisse se désintégrer aussi rapidement suite à l'introduction du peptide ? Basé sur de nombreuses expériences antérieures avec des biofilms, une telle rapidité d'action semble improbable. Il est également important de mentionner une caractéristique spécifique de Pep16 : dans un milieu de culture riche, la molécule précipite à des concentrations élevées, formant un précipité blanchâtre. Ce précipité prend plusieurs heures pour se dissoudre, même sous agitation. Étant donné que ces expériences ont été réalisées sans agitation et dans des petits volumes, pouvant favoriser l'apparition de ce précipité, et expliquer ces résultats. Bien que notre étude s'aligne avec la littérature existante sur la dynamique de formation de biofilm via l'impédance (utilisation E-Plate et technologie xCELLigence RTCA) et les défis associés à son éradication⁴⁸⁶ nous tenons à rester prudent quant à l'interprétation de ces résultats. L'avantage de la technologie et de l'équipement xCELLigence RTCA est de permettre une surveillance en temps réel et de fournir une compréhension approfondie des étapes de croissance du biofilm. À l'inverse les méthodes traditionnelles de quantification et de surveillance de biofilms présentent des lacunes, bien que couramment utilisées, car elles fournissent des informations uniquement en point final, sans détails sur la dynamique de la formation de biofilm au cours du temps⁴⁹³. Nos observations concernant la lévofloxacine concordent également avec les résultats présents dans la littérature. Malgré son efficacité contre les bactéries en phase planctonique, la lévofloxacine, comme de nombreux autres antibiotiques, ne semble pas perturber de manière significative les biofilms matures^{486,494}. Ceci renforce la notion que les biofilms sont notablement résistants aux antibiotiques

conventionnels, d'où la nécessité d'explorer de nouvelles molécules comme le Pep16. Il est également intéressant de noter que certains antibiotiques, même à des concentrations sous-inhibitrices, peuvent induire la formation de biofilm plutôt que son inhibition, ce qui ne serait pas le cas du Pep16. Cette observation souligne la complexité de l'étude des biofilms et la prudence nécessaire lors de la sélection des stratégies thérapeutiques. L'induction de la formation de biofilm par un traitement antibiotique serait problématique, voire dangereuse, car elle pourrait découler sur des phénomènes de rechutes, difficiles à traiter⁴⁹⁵.

Concernant les expérimentations *in vivo* sur modèle murin, nous avons opté pour un modèle d'arthrite septique à *S. aureus*, cette pathologie étant considérée comme la maladie articulaire la plus agressive et dévastatrice⁴⁹⁶. En effet, pour les patients atteints de cette infection, même après avoir reçu un traitement immédiat, les dommages articulaires causés par l'arthrite septique sont souvent irréversibles, conduisant à une dysfonction articulaire permanente pour près de la moitié des patients⁴⁹⁶. De plus, l'émergence de SARM a sérieusement compliqué les options de traitement disponibles⁴⁹⁷. Des stratégies préventives et de nouveaux traitements contre l'arthrite septique sont donc nécessaires. Malgré les résultats prometteurs de Pep16 *in vitro*, les études *in vivo* sur modèle murin d'arthrite septique à *S. aureus* montrent une variation de l'efficacité de Pep16 en fonction de la méthode d'administration et de la souche bactérienne. Chez les souris infectées avec le SASM 1334, l'administration SC de Pep16 (10 mg/kg) a montré une diminution significative des UFC dans les articulations des genoux mais pas dans les autres organes tandis que l'administration IV n'a pas montré de réduction significative des UFC dans les articulations des genoux ou les autres organes. Par contre, nous n'avons pas observé d'effet du Pep16 au niveau de la charge bactérienne articulaire dans les modèles murins inoculés avec les souches de SASM 1333 et de SARM 15. Ces variations pourraient être dues aux différentes interactions que ces trois souches peuvent avoir une fois dans la souris. En effet, l'issue de l'arthrite septique à *S. aureus* est déterminée par l'interaction entre la bactérie et l'hôte⁴⁹⁸. Une élimination immunitaire innée efficace a pour conséquence une charge bactérienne réduite, diminuant par la même la probabilité d'entrée bactérienne dans les articulations. Le rôle de l'immunité adaptative dans l'arthrite septique est quant à lui moins clair⁴⁹⁸. Du côté bactérien, certaines protéines de surface de *S. aureus*, telle que les lipoprotéines et le peptidoglycane, jouent un rôle dans l'invasion articulaire⁴⁹⁸. Une fois que les bactéries atteignent la cavité articulaire, ces protéines entraînent une forte réponse

immunitaire qui se traduit par une production importante de cytokines pro-inflammatoires⁴⁹⁸. La destruction osseuse dans l'arthrite septique est étroitement liée à l'activation et à la différenciation des monocytes en macrophages. Les futures stratégies thérapeutiques contre l'arthrite septique pourraient donc être une thérapie combinée d'antibiotiques et de traitement anti-activation des monocytes⁴⁹⁸.

Après avoir administré Pep16 par voie cutanée à une dose de 10 mg/kg chez les souris, une augmentation régulière de la concentration plasmatique de Pep16 a été observée, atteignant un pic à 12 heures. Cependant, le profil pharmacocinétique n'a pas atteint les concentrations dépassant les CMI nécessaires pour inhiber les souches étudiées. Ce résultat pourrait être expliqué par différents des facteurs tels que le métabolisme, la distribution ou la liaison potentielle du Pep16 à d'autres protéines plasmatiques. En effet, le corps de la souris pourrait rapidement métaboliser le Pep16, diminuant sa présence dans le sang. De plus, sa distribution dans l'organisme pourrait varier, se concentrant dans certains tissus. Enfin, le Pep16 pourrait se lier à d'autres protéines plasmatiques, réduisant sa disponibilité. Des études préliminaires ont montré que Pep16 se liait fortement aux protéines du plasma. D'autres investigations au niveau transcriptionnelles et protéomiques sont en cours afin de déterminer le mécanisme exact d'action de Pep16.

Aujourd'hui, les principales stratégies utilisées contre les IOA staphylococciques sont de deux sortes : (i) l'utilisation d'antibiotiques pour éliminer les bactéries infectieuses, (ii) l'intervention chirurgicale pour retirer les tissus endommagés, les infiltrats inflammatoires et drainer les abcès⁴⁹⁹. Un traitement de soutien peut également intervenir pour maintenir l'homéostasie en cas de dysfonctionnement de l'articulation. Les mesures de prévention de la maladie se concentrent principalement sur le contrôle de la propagation des souches résistantes. Cependant, force est de constater une stagnation notable dans le développement de nouveaux traitements, en particulier pour l'arthrite septique. Les traitements actuels sont les mêmes que ceux utilisés il y a 30 ans⁴⁹⁸. De nouveaux traitements combinés expérimentaux ont été proposés. Ils ont notamment pour but d'atténuer la réponse immunitaire et réduire le risque de destruction articulaire en proposant aux patients, une combinaison d'antibiotiques et de thérapies immunomodulatrices (telles les anti-inflammatoires non stéroïdiens⁵⁰⁰, les corticostéroïdes⁵⁰¹ et les inhibiteurs du TNF⁵⁰²). Bien que des effets positifs aient été observés chez les patients, il n'existe pas encore suffisamment de preuves pour adopter en routine de

tels traitements combinés⁴⁹⁸. Il existe en effet des préoccupations quant aux dangers potentiels de ces thérapies, en particulier face à la résistance aux antibiotiques. C'est notamment pour cela que l'interaction entre les composants bactériens et les facteurs de l'hôte est cruciale pour comprendre et développer de nouvelles thérapies⁴⁹⁸. Par exemple, l'interaction entre le vWbp (protéine liant le facteur de von Willebrand) bactérien et le vWf (facteur de von Willebrand) humain semble être centrale pour l'invasivité spécifique à l'articulation de *S. aureus*⁴⁹⁸. Des stratégies thérapeutiques bloquant cette interaction pourraient être judicieuses à développer. De plus, malgré des tentatives, le développement d'un vaccin notamment basé sur la génération d'anticorps opsonisants afin de lutter contre l'arthrite septique a échoué à plusieurs reprises⁵⁰³. Alors que le besoin de stratégies thérapeutiques innovantes, efficaces et ciblées est crucial dans la lutte contre cette infection, une compréhension approfondie de l'interaction entre la bactérie et son hôte s'avère essentielle pour mener ces recherches.

L'ère actuelle de la résistance aux antibiotiques et les échecs thérapeutiques qui en découlent ont mis en évidence le besoin urgent de nouvelles alternatives thérapeutiques, notamment pour traiter les IOA dues à *S. aureus*. Le Pep16, en tant que nouvel agent antimicrobien, est apparu comme une alternative potentielle, suscitant un vif intérêt scientifique^{467,487}. Les données *in vitro* générées au cours de ce travail sont indéniablement prometteuses, démontrant une activité antimicrobienne de Pep16 contre différentes souches de *S. aureus*, indépendamment de leur profil de résistance aux antibiotiques existants. Ce trait, est d'une importance cruciale à l'heure où la résistance croisée aux antibiotiques se répand. De plus, sa propriété bactéricide et sa capacité à cibler les bactéries intracellulaires, y compris dans les environnements protégés tels que les ostéoblastes et les macrophages, soulignent son potentiel en tant qu'alternative thérapeutique aux traitements antibiotiques classiques. La capacité du Pep16 à cibler efficacement ces bactéries intracellulaires pourrait donc jouer un rôle déterminant dans la gestion future des IOA. Un autre avantage du Pep16 serait sa capacité antibiofilm. Nos premiers résultats souligneraient un rôle du Pep16 non seulement dans l'inhibition de la formation de biofilms, mais aussi dans la perturbation des biofilms établis. Cependant, les résultats *in vivo* mettent en évidence la complexité du passage de la recherche en laboratoire à l'application clinique. Les variations observées dans l'efficacité du Pep16, en fonction de la méthode d'administration et de la souche bactérienne, suggèrent que son profil

pharmacocinétique-pharmacodynamique (PK/PD) nécessite une étude approfondie. La translation réussie de toute thérapie du banc d'essai au chevet du patient nécessite non seulement une efficacité confirmée mais aussi un profil d'innocuité et de tolérance optimal. Les perspectives futures devraient se concentrer sur plusieurs domaines clés. Tout d'abord, la compréhension approfondie du mécanisme d'action du Pep16, en particulier sa capacité à cibler les bactéries intracellulaires est essentielle. Deuxièmement, des études de PK/PD plus approfondies aideraient à identifier les schémas posologiques optimaux, maximisant ainsi son efficacité tout en minimisant les effets secondaires potentiels. En outre, les recherches devraient également se pencher sur la potentialité des combinaisons thérapeutiques, notamment en évaluant le Pep16 en tandem avec d'autres agents antimicrobiens ou avec des approches visant à moduler la réponse immunitaire.

Enfin la mise au point de systèmes de délivrance innovants du Pep16 au site d'infection, tels que les nanoparticules ou les exosomes, pourrait également jouer un rôle crucial dans l'amélioration clinique d'IOA à *S. aureus*, tout en réduisant les éventuels effets toxiques. En conclusion, Pep16 émerge comme une option thérapeutique prometteuse dans la lutte contre les IOA induites par *S. aureus*. Cependant, le chemin de la découverte à la mise en œuvre clinique est semé d'obstacles et nécessite une investigation encore plus approfondie.

PUBLICATIONS

Intracellular activity and in vivo efficacy in a mouse model of septic arthritis of the novel pseudopeptide Pep16 against *Staphylococcus aureus* clinical isolates

Running title: Intracellular activity and in vivo efficacy of Pep16 against *S. aureus*

Jean-Baptiste MASCARY^{1,2}, Valérie BORDEAU¹, Irène NICOLAS,² Marie-Clémence VERDIER,³
Pierre ROCHETEAU², Vincent CATTOIR^{4,5*}

¹ *Université de Rennes, Inserm U1230, Rennes, France.*

² *Olgram, Bréhan, France.*

³ *CHU de Rennes, Service de Pharmacologie, Rennes, France.*

⁴ *CHU de Rennes, Service de Bactériologie-Hygiène hospitalière, Rennes, France.*

⁵ *CNR de la Résistance aux Antibiotiques (laboratoire associé 'Entérocoques'), Rennes, France.*

***Correspondance:** Prof. Vincent CATTOIR, CHU de Rennes, Service de Bactériologie-Hygiène hospitalière, 2 rue Henri Le Guilloux, 35033 Rennes Cedex, France. +33-2-99-28-98-28, Fax: +33-2-99-28-41-59, E-mail: vincent.cattoir@chu-rennes.fr.

Word count: Synopsis: 250 words; Text = 3,274 words; 1 Table; 4 Figures; 26 References.

Keywords: Antimicrobial peptide; AMP; pseudopeptide; *S. aureus*; bone and joint infection; BJI.

SYNOPSIS

Objectives: This study aimed at assessing the therapeutic potential of a novel antimicrobial pseudopeptide, Pep16, both *in vitro* and *in vivo* for the treatment of septic arthritis caused by *Staphylococcus aureus*.

Methods: Seven clinical isolates of *S. aureus* (incl. 2 MRSA and 5 MSSA) collected were studied. MICs of Pep16 and comparators (vancomycin, teicoplanin, daptomycin and levofloxacin) were determined through the broth microdilution method. The intracellular activity of Pep16 and levofloxacin was assessed in two models of infection using non-professional (osteoblasts MG-63) or professional (macrophages THP-1) phagocytic cells. A mouse model of septic arthritis was used to evaluate the *in vivo* efficacy of Pep16 and vancomycin. A preliminary pharmacokinetic (PK) analysis was performed by measuring plasma concentrations using LC-MS/MS following a single subcutaneous injection of Pep16 (10 mg/kg).

Results: MICs of Pep16 were consistently at 8 mg/L for all clinical isolates of *S. aureus* (2-to-32-fold higher to those of comparators) while MBC/MIC ratios confirmed its bactericidal activity. Both Pep16 and levofloxacin (when used at 2 x MIC) significantly reduced the bacterial load of all tested isolates (2 MSSA and 2 MRSA) within both osteoblasts and macrophages. In MSSA-infected mice, Pep16 demonstrated a significant (ca. 10-fold) reduction on bacterial loads in knee joints. PK analysis following a single subcutaneous administration of Pep16 revealed a gradual increase in plasma concentrations reaching a peak of 5.6 mg/L at 12 hours.

Conclusions: Pep16 is a promising option for the treatment of septic arthritis due to *S. aureus*, particularly owing to its robust intracellular activity.

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus remains a problematic pathogen implicated in a spectrum of bone and joint infections (BJIs) which encompass septic arthritis, acute and chronic osteomyelitis, spondylodiscitis, as well as infections related to orthopedic devices, including those affecting joint implants and osteosynthesis materials.¹⁻³ Septic arthritis, in particular, stands out due to its rapid progression and the extensive damage it inflicts on joints and cartilage. In contrast, osteomyelitis is marked by its chronic nature and an increased risk of complications. Collectively, BJIs can lead to long-lasting disability and place a substantial burden on healthcare systems.⁴

Although traditional antibiotics have been employed in the fight against *S. aureus*, the emergence of antibiotic resistance, particularly with the widespread prevalence of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains, presents a substantial challenge to achieving effective treatment outcomes.⁵ The growing complexity of treating BJIs arises not only from *S. aureus*'s ability to invade and persist within professional (e.g. macrophages) and non-professional phagocytic cells (e.g. osteoblasts)⁶ but also from its capacity to form biofilms.⁷ These intricacies significantly compound the challenges of treatment.⁸⁻¹² Consequently, there is an urgent need to explore innovative antibacterial strategies that can effectively address both intracellular and biofilm-associated forms of *S. aureus*.

Among the emerging alternatives, antimicrobial peptides (AMPs) have become promising therapeutic options due to their established ability to modulate symbiotic bacterial populations.¹³ These small peptides are ubiquitous across all domains of life and play an integral role in an organism's immune system.¹⁴ They typically possess broad-spectrum antimicrobial activity against bacteria, viruses, and fungi.¹⁵ Recent advancements have led to

the engineering of pseudomimetic AMPs derived from a toxin naturally produced by *S. aureus*.¹⁶ These pseudopeptides exhibit bactericidal properties against a range of multidrug-resistant Gram-negative and Gram-positive pathogens, including MRSA.¹⁷ While their exact mechanism of action remains unclear, they appear to primarily disrupt bacterial cell membranes integrity, leading to bacteriolysis.¹⁷ One such peptide of considerable interest is Pep16, which has exhibited promising outcomes in murine sepsis models induced by MRSA, resulting in a substantial reduction in mortality rates over a 48-hour timeframe.¹⁷ Importantly, the administration of Pep16 has shown minimal toxicity and a reduced likelihood of bacterial resistance emergence, positioning it as a favorable candidate for antimicrobial drug development.¹⁷ Given the significant burden posed by BJIs, particularly septic arthritis caused by *S. aureus*, we explored the potential of Pep16 as a viable treatment option for these infections.

In this study, we aimed to assess the efficacy of Pep16, both *in vitro* and *in vivo*, for the eradication of *S. aureus* involved in BJIs. Firstly, we evaluated the *in vitro* activity of Pep16, either alone and or in combination with other agents, in comparison to commonly used antibiotics for the treatment of BJIs. Secondly, we determined the intracellular activity of Pep16 using two relevant cell-based infection models involving osteoblasts and macrophages. Finally, we conducted an assessment of the *in vivo* efficacy of Pep16 using a mouse model of septic arthritis. Through these comprehensive evaluations, we sought to shed light on the potential of Pep16 as an effective solution for combatting *S. aureus* infections in the realm of BJIs.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and antimicrobial susceptibility testing

A total of 7 clinical isolates of *S. aureus* obtained from patients suffering from septic arthritis were studied, including 2 MRSA and 5 MSSA *S. aureus* strains, as detailed in Table 1. Additionally, the MSSA reference strain ATCC 29213 was used as control for antimicrobial susceptibility testing.

Antimicrobial susceptibility testing (AST) was conducted through the disk diffusion method, following the guidelines outlined by CA-SFM/EUCAST (www.sfm-microbiologie.org). MIC and MBC values of Pep16, which was synthesized by Olgram, France, as well as for vancomycin, teicoplanin, daptomycin, and levofloxacin, were determined using the broth microdilution reference method. Interpretation of results was carried out in accordance with the 2020 EUCAST criteria.

The presence of *in vitro* synergy between Pep16 and clinically-relevant antibiotics was assessed through checkerboard synergy assay. Combinations of Pep16 and various antibiotics (vancomycin, teicoplanin, daptomycin, levofloxacin, or rifampicin) were tested at concentrations ranging from 1-64 and 0.03-32 mg/L, respectively. The fractional inhibitory concentration (FIC) index was calculated by summing the FICs (representing the MIC of drug A in combination with drug B over the MIC of Drug A alone) of Pep16 and the respective antibiotic. Synergy was defined as a FIC index < 0.5.

Cellular-based models of infection

The osteoblast infection model was conducted using MG-63 (CRL-1427) osteoblastic cells, following previously published procedures.²² Briefly, MG-63 cells were cultured at 37°C in a 5% CO₂ environment and passaged weekly for up to 20 weeks using the Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 25 mM HEPES, 2

mM L-glutamine, with or without antibiotics (100 U/mL penicillin plus 100 µg/mL streptomycin). For the assays, MG-63 cells were seeded in 24-well plates until reaching 70-80% confluence. Bacterial cell suspensions grown overnight in brain-heart infusion (BHI) broth were prepared and adjusted to a Multiplicity of Infection (MOI) of 50, and then introduced to the osteoblasts. After a 2-hour co-incubation to facilitate bacterial adhesion, MG-63 cells were rinsed and treated with 100 µg/mL of gentamicin for 1 hour to eliminate extracellular bacterial cells. Infected osteoblasts were subsequently exposed to Pep16 or levofloxacin (at 2-fold the MIC) for 3 hours in the absence of FBS. Finally, intracellular bacterial cells were quantified in cellular lysates (following osmotic shock) by plating them onto BHI agar.

The macrophage infection model was performed using the THP-1 human monocytic cell line (ATCC, Rockville, USA). In brief, cells were cultured in the Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium supplemented with 10% FBS in T75 flasks at 37°C and 5% CO₂, and were maintained through weekly transfers within passages 2 to 20. For the assays, THP-1 cells were seeded in 12-well plates and differentiated into macrophages with phorbol myristate acetate (PMA) for 72 hours until they reached approximately 80% confluence. Bacterial suspensions, grown overnight in BHI, were prepared and adjusted to a MOI of 10, and then introduced to the macrophages. After a 2-hour co-incubation to facilitate bacterial adherence, the cells were washed and treated with 100 µg/mL of gentamicin for 1 hour. Infected macrophages were subsequently exposed to Pep16 or levofloxacin (at 2-fold the MIC) for 24 hours in the absence of FBS. Finally, intracellular bacterial cells were enumerated from cellular lysates (following osmotic shock) by plating them onto BHI agar.

In both models, the viability was assessed using the MTT assay to determine the potential cytotoxicity of antimicrobials on untreated and infected/treated cells. Briefly, an MTT solution (0.5 mg/mL) was added to the cell medium without FBS. After washing with PBS and a 30-minute incubation at 37°C, the formazan crystals formed were dissolved in DMSO. Absorbance values at 540 nm were measured using a BioTek Synergy 2 microplate reader.

Mouse model of septic arthritis

A mouse model of septic arthritis was employed to assess the *in vivo* effectiveness of Pep16 in comparison to vancomycin, following previously described procedures²³. Female Swiss mice, obtained from Janvier Labs and aged between 11 to 13 weeks with an approximate weight of 34 grams, were used. The experiments were conducted in the ARCHE animal facility (Biosit) in Rennes. Mice were intravenously inoculated with 200 µL of a 0.9% NaCl solution containing approximately 10⁸ CFU of the 1334 strain (MSSA). Three hours after inoculation, infected mice received a subcutaneous dose of either a saline solution (0.9% NaCl), Pep16 (10 mg/kg) or vancomycin (100 mg/kg). These treatments were administered daily for a duration of 7 days. Each experimental group included a minimum of five mice and the experiments were repeated twice for the vancomycin group and three times for the 0.9% NaCl and Pep16 groups. The mice were monitored on a daily basis, and on the 7th day, they were humanely euthanized using CO₂. Subsequently, knee joints, spleen and kidneys were excised, weighed and homogenized in 0.9% NaCl using a Polytron PT 3100D homogenizer (Kinematica, Switzerland). Bacterial loads were determined by plating serial dilutions onto BHI agar and expressed as log CFU/g.

Pep16 pharmacokinetic analysis

Following subcutaneous injection of Pep16, plasma concentrations were assessed at various time points including 0, 0.5, 1, 3, 6, 12, 15 and 24 hours in non-infected mice. Blood samples

were collected, subjected to centrifugation and the resulting plasma was stored at -80°C. Quantification was carried out utilizing a previously described liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method.²⁴ The chromatographic separation was performed using a HYPERSIL GOLD™ C18 column, and a dedicated gradient method. The system was connected to a Xevo TQ-XS® mass spectrometer, and the methodology was validated for concentrations between 1 to 120 mg/L.

Statistical methods

For continuous variables, means and their standard derivations (SD) were presented and compared using the Mann-Whitney U-test. Proportions were compared using a Fisher's exact or Chi-square tests, when appropriate. Statistical analyses were conducted using Prism software v9.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). A p value <0.05 was considered statistically significant.

Ethical statement

All experimental protocols were approved by the Adaptive Therapeutics Animal Care and Use Committee (APAFiS #4508-201603111554125_v5). The animals were housed in compliant cages and provided with free access to food and water.

Results

In vitro activity of Pep16

Through disk diffusion, we identified that out of the seven clinical isolates tested, two were MRSA (1814 and 1815) while the remaining five were MSSA (1333, 1334, 1816, 1817 and 1818) (Table 1). One MRSA isolate displayed ciprofloxacin resistant, while the other MRSA isolate exhibited resistance to gentamicin (KTG phenotype) and erythromycin (inducible MLS_B phenotype) but remained susceptible to fluoroquinolones. Among the five MSSA isolates, four displayed susceptibility to multiple antibiotics, with one (1817) exhibited a resistance trait (inducible MLS_B phenotype).

Subsequently, we assessed the *in vitro* activity of Pep16, comparing it to commonly used antibiotics for treating BJIs caused by *S. aureus*. This assessment involved determining both MIC and MBC values. Notably, the MICs of Pep16 for all *S. aureus* isolates were consistently 8 mg/L. In contrast, the MICs for vancomycin, teicoplanin, daptomycin and levofloxacin were found to be 0.5, 0.25-1 and 0.25 and 0.25-4 mg/L, respectively (Table 1). Although Pep16 exhibited MICs 2-to-32-fold higher than those of the comparator antibiotics, the MBC/MIC ratios indicated bactericidal activity, with ratios consistently at or below 4 for all strains (Table 1). Furthermore, we employed checkerboard synergy assay to explore combinations of Pep16 with various clinically-relevant antibiotics (vancomycin, teicoplanin, daptomycin, levofloxacin or rifampicin). Unfortunately, this analysis did not reveal any instances of synergy (Figure S1).

Intracellular activity of Pep16

We assessed the potential intracellular activity of Pep16 using two cellular infection models, one involving non-professional phagocytic cells (osteoblasts) and the other using professional phagocytic cells (macrophages), comparing the results to those of levofloxacin.

In the acute model of osteoblast infection, we observed that both Pep16 and levofloxacin (administered at 2 x MIC) significantly reduced the bacterial load of all four tested *S. aureus* isolates (2 MSSA and 2 MRSA) three hours after treatment, in comparison to untreated cells (Figure 1). Pep16 notably decreased the intracellular inoculum of both MRSA and MSSA, with reductions ranging from 46.5% to 86.6% for MRSA isolates and approximately 63% for MSSA isolates (Figure 1). Although levofloxacin appeared to be significantly more effective than Pep16 against MSSA isolates, no significant differences were observed between these compounds against intracellular MRSA (Figure 1). Importantly, it is worth noting that we did not observe any significant direct cytotoxicity for either Pep16 or levofloxacin (administered at 2 x MIC) on uninfected osteoblasts (MG-63) after 3 hours of incubation (Figure S1).

In the acute model of macrophage infection, both Pep16 and levofloxacin (administered at 2 x MIC) were effective in significantly reducing the intracellular inoculum of the same four *S. aureus* clinical isolates (MRSA 1814, MRSA 1815, MSSA 1333 and MSSA 1334) 24 hours after treatment, compared to untreated cells (Figure 2). Pep16 produced substantial reductions in the intracellular inoculum, with decreases of 83% ($\pm 1.8\%$), 91.9% ($\pm 2.2\%$), 90.1% ($\pm 2.6\%$) and 90.1% ($\pm 8.0\%$) for MRSA 1814, MRSA 1815, MSSA 1333 and MSSA 1334, respectively (Figure 2). No significant differences were found between levofloxacin and Pep16 in reducing intracellular MRSA and MSSA isolates (Figure 2). Similar to the osteoblasts, no significant direct cytotoxicity was observed for either Pep16 or levofloxacin (at 2 x MIC) on uninfected macrophages (THP-1) after 24 hours of incubation (Figure S2). Altogether, we demonstrated that Pep16 exhibits substantial intracellular activity against both MRSA and MSSA strain in osteoblasts and macrophages, with comparable efficacy to levofloxacin, making it a promising candidate for the treatment of *S. aureus* infections, including those associated with BJI.

In vivo efficacy of Pep16 in a mouse model of septic arthritis

Based on these promising results, we proceeded to assess the efficacy of Pep16 in a mouse model. After subcutaneous treatment with Pep16 at a concentration of 10 mg/kg, a significant reduction in CFUs, approximately a 10-fold reduction of bacterial load, was observed within the knee joints of infected mice seven days after infection, in comparison to untreated mice. However, this reduction was not observed in the kidneys or spleen (Figure 3). A similar reduction in CFUs was noted in knee joints, kidneys, and spleen of mice treated with vancomycin (at 100 mg/kg), compared to control mice (Figure 3).

Additionally, a pharmacokinetic analysis of Pep16 following a single subcutaneous administration of 10 mg/kg revealed a gradual increase in plasma concentrations over the course of 12 hours, with a C_{max} value at 5.6 mg/L (Figure 4).

Here, we demonstrate that Pep16, administered subcutaneously, significantly reduces load in the knee joints of infected mice, underscoring its potential as an effective treatment for *S. aureus* infection, while its pharmacokinetic profile suggests a promising basis for further investigation.

Discussion

The aim of this research was to explore Pep16 antimicrobial potential against *S. aureus*, a key pathogen implicated in BJIs. Our approach involved a comprehensive investigation, designed to reflect clinical scenarios. It started with *in vitro* assessments against clinical isolates and progressing to the use of osteoblastic and macrophage cells infection models to evaluate its performance against intracellular *S. aureus*. Additionally, we employed a murine model of septic arthritis to assess the *in vivo* efficacy of Pep16.

Notably, Pep16 exhibited a substantial reduction in the intracellular burden of *S. aureus* within both osteoblasts and macrophages, demonstrating comparable efficacy to the reference antibiotic levofloxacin—a fluoroquinolone antibiotic known for its *in vitro* effectiveness against intracellular Gram-positive bacteria, including *S. aureus*.²⁰ Importantly, no drug-induced cytotoxicity was observed at the tested concentrations. By comparison with newer contenders like dalbavancin and rifamycins, Pep16 showcased remarkable intracellular activity. In fact, Chauvelot and al. showed that dalbavancin, a recently introduced extended-duration lipoglycopeptide, was able to significantly reduce the presence of *S. aureus* in osteoblasts starting at its MIC (0.125 mg/L) with a dose-dependent effectiveness.¹¹ However, Pep16 outperformed dalbavancin achieving reductions of 86.6% for MRSA isolates and approximately 63% for MSSA isolates whereas the peak of reduction by dalbavancin at 100 times its MIC achieved only 51.6%.¹¹ In another study, the research conducted by Abad et al. on rifamycins, a group of antibiotics that inhibit the bacterial RNA polymerase, highlighted the potential intracellular activity of these drugs against *S. aureus*.¹⁸ When examining concentrations that were 10 or 100 times their respective MICs, all rifamycins exhibited a significant intracellular activity. However, the extent of reduction in intracellular bacteria

varied: rifampicin reduced by approximately 54.0%, rifapentine by 45.3%, and rifabutin stood out with a reduction of around 62.1%. The intracellular activity of Pep16 against *S. aureus*, compared to dalbavancin and rifamycins, further underscores its potential as an effective agent. Pep16 unique structural composition, featuring non-natural amino acids,¹⁷ suggests enhanced cellular penetration, potentially supported by its amphiphilic properties. However, it is crucial to recognize that intracellular antimicrobial activity relies on factors beyond cellular concentration, including distribution within intracellular compartment and the phagolysosomal acidic environment.²²

The murine model of septic arthritis further confirmed Pep16 therapeutic potential, resulting in a 10-fold reduction in CFU counts within knee joints. These results build upon previous findings, indicating the promise of Pep16 as a therapeutic option.^{17,23} Indeed, the study by Nicolas et al. illustrated Pep16 significant efficacy in animal models of MRSA infections (sepsis and skin abscesses) and its ability to limit resistance emergence in multidrug-resistant pathogens. This robust defense against MRSA infections corroborates our results and extends Pep16 applicability beyond septic arthritis to include potential treatments for severe sepsis.¹⁷ Chosidow et al. findings present another dimension of Pep16 therapeutic promise. In their peritonitis mouse model, Pep16 alone was modest in its impact. However, in combination with colistin, it showcased a dramatic reduction in bacterial counts, also staving off colistin-resistant mutants.²³ This underscores the potential of leveraging combination therapies with Pep16 to achieve better clinical outcomes and manage drug resistance.

Nonetheless, our study has certain limitations that merit attention. The lack of standardized methodologies for assessing intracellular activity and the *in vivo* efficacy poses a challenge when comparing results across different studies. Methodological discrepancies, such as

treatment timing, can significantly impact findings. In particular, the majority of studies opt for immediate post-infection treatment while only a few consider delayed treatments, such as 12 hours or 7 days post-infection. This methodological choice can affect the relevance of the findings, especially in chronic osteomyelitis contexts where patients are often treated long after the infection's onset.²⁴ Moreover, a crucial distinction observed among existing studies is the cell model selected. Numerous studies utilize macrophages and cell lines, which exhibit contrasting behaviors to bone cells, particularly primary cells, in the context of *S. aureus* infection. Macrophages, being professional phagocytes, harbor substantially higher numbers of *S. aureus* compared to osteoblasts. Notably, primary osteoblasts, in comparison to other non-professional phagocytic cells, internalize fewer bacteria but present a higher rate of cell survival post-infection. To address this disparity, we employed both macrophages and osteoblasts to provide a comprehensive understanding of the infection dynamics of *S. aureus*. However, there are significant behavioral differences between osteoblastic cell lines, like MG-63 used in this study, and primary osteoblasts, with the latter showing reduced cell death upon infection and greater bacterial persistence in phagosomes.²⁵ While primary cells often present more clinically pertinent results, cell lines offer advantages in terms of consistency and availability. This emphasizes the importance of selecting a suitable bone cell model in evaluating the efficacy of BJI treatments. Also, variability in treatment durations and timings, especially in *in vitro* model involving osteoblasts and macrophages, could influence outcomes. Additionally, our *in vivo* model involved a single clinical isolate, highlighting the need for broader validation across diverse clinical isolates. Strain-dependent responses may introduce variability, emphasizing the importance of determining the MIC of Pep16 across a wider spectrum of *S. aureus* isolates. Relative to conventional antibiotics like vancomycin, the higher

MICs of Pep16 might be seen as a drawback. Regarding the pharmacokinetic analysis on mice, after administering Pep16 subcutaneously at a dose of 10 mg/kg in mice, there was a steady increase in Pep16 plasma concentration, with a peak at 12 hours. Still, the pharmacokinetic profile did not attain concentrations surpassing the MICs required to inhibit the studied strains. This discrepancy might be attributed to factors like metabolism, distribution or the potential binding of the compound to other plasma proteins, which warrants further investigation to elucidate the exact mechanism. Given the inherent variability in *in vivo* responses, it is imperative to evaluate Pep16 against a broader collection of clinical isolates in mice. Lastly, when compared to established antibiotics like vancomycin, the relatively higher MICs of Pep16 could be perceived as an obstacle.

In summary, our study demonstrates that Pep16 could be a promising therapeutic option for treating septic arthritis caused by *S. aureus*. Furthermore, its substantial intracellular activity in both non-professional and professional phagocytic cells could be relevant for treating chronic infections caused by *S. aureus*.

Acknowledgements

We thank Prof. Pascal Guggenbuhl for providing us the MG-63 osteoblastic cell line. We warmly thank Dr Alexander Kettner and Dr. Charlotte Michaux for their critical reading of the manuscript.

Funding

This work was supported by internal funding from “BRM” and by external funding from Olgram SA. Notably, JBM was the recipient of a CIFRE grant from Olgram SA supporting his three-year PhD fellowship.

Transparency declarations

JBM and IN are employed by Olgram SA, which has synthesized and developed Pep16. PR serves as the CEO and co-founder of Olgram. Pep16 is protected under European Patent Application #EP14191238.6, titled “Cyclic antimicrobial pseudopeptides and uses thereof”. All remaining authors declare that they have no conflict of interest to disclose.

Author contributions

All authors made substantial contributions to the study’s conception and design. Material preparation, data collection, and analysis were carried out collectively by all authors. The initial draft of the manuscript was written by JBM and VC with subsequent input and revisions provided by all authors on versions of the manuscript. Finally, all authors reviewed and gave their approval to the final manuscript.

References

1. Sendi P, Banderet F, Graber P, *et al.* Periprosthetic joint infection following *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J Infect* 2011; **63**: 17–22.
2. Kapadia BH, Berg RA, Daley JA, *et al.* Periprosthetic joint infection. *Lancet* 2016; **387**: 386–94.
3. He M, Arthur Vithran DT, Pan L, *et al.* An update on recent progress of the epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of acute septic arthritis: a review. *Front Cell Infect Microbiol* 2023; **13**: 1193645.
4. Masters EA, Ricciardi BF, Bentley KL de M, *et al.* Skeletal infections: microbial pathogenesis, immunity and clinical management. *Nat Rev Microbiol* 2022; **20**: 385–400.
5. Darby EM, Trampari E, Siasat P, *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nat Rev Microbiol* 2023; **21**: 280–95.
6. Josse J, Velard F, Gangloff SC. *Staphylococcus aureus* vs. Osteoblast: Relationship and Consequences in Osteomyelitis. *Front Cell Infect Microbiol* 2015; **5**: 85.
7. Valour F, Rasigade J-P, Trouillet-Assant S, *et al.* Delta-toxin production deficiency in *Staphylococcus aureus*: a diagnostic marker of bone and joint infection chronicity linked with osteoblast invasion and biofilm formation. *Clin Microbiol Infect* 2015; **21**: 568.e1-11.
8. Couderc M, Bart G, Coiffier G, *et al.* Recommandations françaises 2020 sur la prise en charge des arthrites septiques sur articulation native de l'adulte. *Revue du Rhumatisme* 2020; **87**: 428–38.
9. Barberán J. Management of infections of osteoarticular prosthesis. *Clin Microbiol Infect* 2006; **12 Suppl 3**: 93–101.

10. Wang J, Wang L. Novel therapeutic interventions towards improved management of septic arthritis. *BMC Musculoskelet Disord* 2021; **22**: 530.
11. Chauvelot P, Dupieux-Chabert C, Abad L, *et al.* Evaluation of intraosteoblastic activity of dalbavancin against *Staphylococcus aureus* in an ex vivo model of bone cell infection. *J Antimicrob Chemother* 2021; **76**: 2863–6.
12. Abad L, Tafani V, Tasse J, *et al.* Evaluation of the ability of linezolid and tedizolid to eradicate intraosteoblastic and biofilm-embedded *Staphylococcus aureus* in the bone and joint infection setting. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2019; **74**: 625–32.
13. Mergaert P. Role of antimicrobial peptides in controlling symbiotic bacterial populations. *Nat Prod Rep* 2018; **35**: 336–56.
14. Koehbach J, Craik DJ. The Vast Structural Diversity of Antimicrobial Peptides. *Trends Pharmacol Sci* 2019; **40**: 517–28.
15. Buda De Cesare G, Cristy SA, Garsin DA, *et al.* Antimicrobial Peptides: a New Frontier in Antifungal Therapy. *mBio* 2020; **11**: e02123-20.
16. Solecki O, Mosbah A, Baudy Floc'h M, *et al.* Converting a *Staphylococcus aureus* toxin into effective cyclic pseudopeptide antibiotics. *Chem Biol* 2015; **22**: 329–35.
17. Nicolas I, Bordeau V, Bondon A, *et al.* Novel antibiotics effective against gram-positive and -negative multi-resistant bacteria with limited resistance. *PLOS Biology* 2019; **17**: e3000337.
18. Abad L, Josse J, Tasse J, *et al.* Antibiofilm and intraosteoblastic activities of rifamycins against *Staphylococcus aureus*: promising in vitro profile of rifabutin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2020; **75**: 1466–73.

19. Bremell T, Lange S, Yacoub A, *et al.* Experimental Staphylococcus aureus arthritis in mice. *Infect Immun* 1991; **59**: 2615–23.
20. Smith RP, Baltch AL, Franke MA, *et al.* Levofloxacin penetrates human monocytes and enhances intracellular killing of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2000; **45**: 483–8.
21. Van Bambeke F, Carryn S, Seral C, *et al.* Cellular Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Glycopeptide Antibiotic Oritavancin (LY333328) in a Model of J774 Mouse Macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 2853–60.
22. Abad L, Chauvelot P, Audoux E, *et al.* Lysosomal alkalization to potentiate eradication of intra-osteoblastic Staphylococcus aureus in the bone and joint infection setting. *Clinical Microbiology and Infection* 2022; **28**: 135.e1-135.e7.
23. Chosidow S, Fantin B, Nicolas I, *et al.* Synergistic Activity of Pep16, a Promising New Antibacterial Pseudopeptide against Multidrug-Resistant Organisms, in Combination with Colistin against Multidrug-Resistant Escherichia coli, In Vitro and in a Murine Peritonitis Model. *Antibiotics* 2023; **12**: 81.
24. Zelmer AR, Nelson R, Richter K, *et al.* Can intracellular Staphylococcus aureus in osteomyelitis be treated using current antibiotics? A systematic review and narrative synthesis. *Bone Res* 2022; **10**: 1–18.
25. Strobel M, Pförtner H, Tuchscher L, *et al.* Post-invasion events after infection with Staphylococcus aureus are strongly dependent on both the host cell type and the infecting S. aureus strain. *Clin Microbiol Infect* 2016; **22**: 799–809.

Legends of the figures

Figure 1. Intracellular activity of Pep16 and levofloxacin against intra-osteoblastic *S. aureus* MRSA 1814 (a), MRSA 1815 (b), MSSA 1333 (c) and MSSA 1334 (d). At 3-h post-infection, MG-63 cells were treated with Pep16 or levofloxacin at 2 x MIC for 3 h. Data represents the mean \pm standard deviation from three independent experiments. Intracellular CFU counts were normalized relative to untreated cells (depicted black histograms), and differences between treated and untreated cells as well as between the two compounds, were assessed using the Mann-Whitney U-test. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ****P<0.0001.

Figure 2. Intracellular activity of Pep16 and levofloxacin against intra-macrophagic *S. aureus* MRSA 1814 (a), MRSA 1815 (b), MSSA 1333 (c) and MSSA 1334 (d). At 3-h post-infection, TH-P1 cells were treated with Pep16 or levofloxacin at 2 x MIC for 24 h. Data represents the mean \pm standard deviation of three independent experiments. Intracellular CFU counts were normalized relative to untreated cells (depicted by black histograms), and differences between treated and untreated cells as well as between the two compounds, were assessed using the Mann-Whitney U-test. ***P<0.001; ****P<0.0001.

Figure 3. Bacterial loads (in log CFU/g) at day 7 in knee joints, kidneys and spleen from mice infected by MSSA 1334. Mice were initially inoculated with approximately 1×10^8 CFUs of MSSA 1334. At 3-h post-infection, mice were treated with either with 10 mg/kg of Pep16 or 100 mg/kg of vancomycin, while untreated control mice received a saline solution without antibiotics. Treatments were administered via subcutaneous injection and continued daily until the conclusion of the experiment. Individual dots on the graph represent CFU counts for single animals (enumerated at day 7) with black horizontal lines indicating median values. The experiments were performed with 5 mice per condition, in triplicate for Pep16 and saline

solution and in duplicate for vancomycin. Statistical analysis was conducted using the Mann-Whitney U test. *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

Figure 4. Plasma pharmacokinetics of Pep16 in mice after a single subcutaneous administration of 10 mg/kg. Dots from represent the mean \pm SEM of three replicates.

Table 1. In vitro activity of Pep16 and comparators against the 7 clinical isolates of *S. aureus* responsible for septic arthritis.

<i>S. aureus</i> strain	Origin (location, date)	Resistance phenotype ^a	MIC/MBC (mg/L)				
			Pep16	Vancomycin	Teicoplanin	Daptomycin	Levofloxacin
1333	Clinical, joint fluid (Rennes, 09/2020)	MSSA, multi ^S	8/16	0.5/0.5	0.5/1	0.25/0.5	0.5/0.5
1334	Clinical, joint fluid (Rennes, 11/2020)	MSSA, multi ^S	8/16	0.5/0.5	0.25/0.5	0.25/0.5	0.5/0.5
1814	Clinical, joint fluid (Rennes, 09/2020)	MRSA, Cip ^R	8/16	0.5/0.5	0.5/1	0.25/0.5	4/4
1815	Clinical, joint fluid (Rennes, 03/2021)	MRSA, Gen ^R , Ery ^R	8/16	0.5/0.5	0.5/1	0.25/0.5	0.5/0.5
1816	Clinical, joint fluid (Rennes, 01/2021)	MSSA, multi ^S	8/16	0.5/0.5	0.25/0.5	0.25/0.5	0.25/0.25
1817	Clinical, joint fluid (Rennes, 02/2021)	MSSA, Ery ^R	8/16	0.5/0.5	0.5/1	0.25/0.5	0.25/0.25
1818	Clinical, joint fluid (Rennes, 02/2021)	MSSA, multi ^S	8/16	0.5/0.5	1/2	0.25/0.5	0.25/0.25
ATCC 29213	Reference	MSSA, multi ^S	8/16	0.5/0.5	0.5/1	0.25/0.5	0.5/0.5

^aCip^R, ciprofloxacin-resistant; Ery^R, erythromycin-resistant (inducible MLSb phenotype); Gen^R, gentamicin-resistant (KTG phenotype); MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*; MSSA, methicillin-susceptible *S. aureus*; multi^S, multi-susceptible.

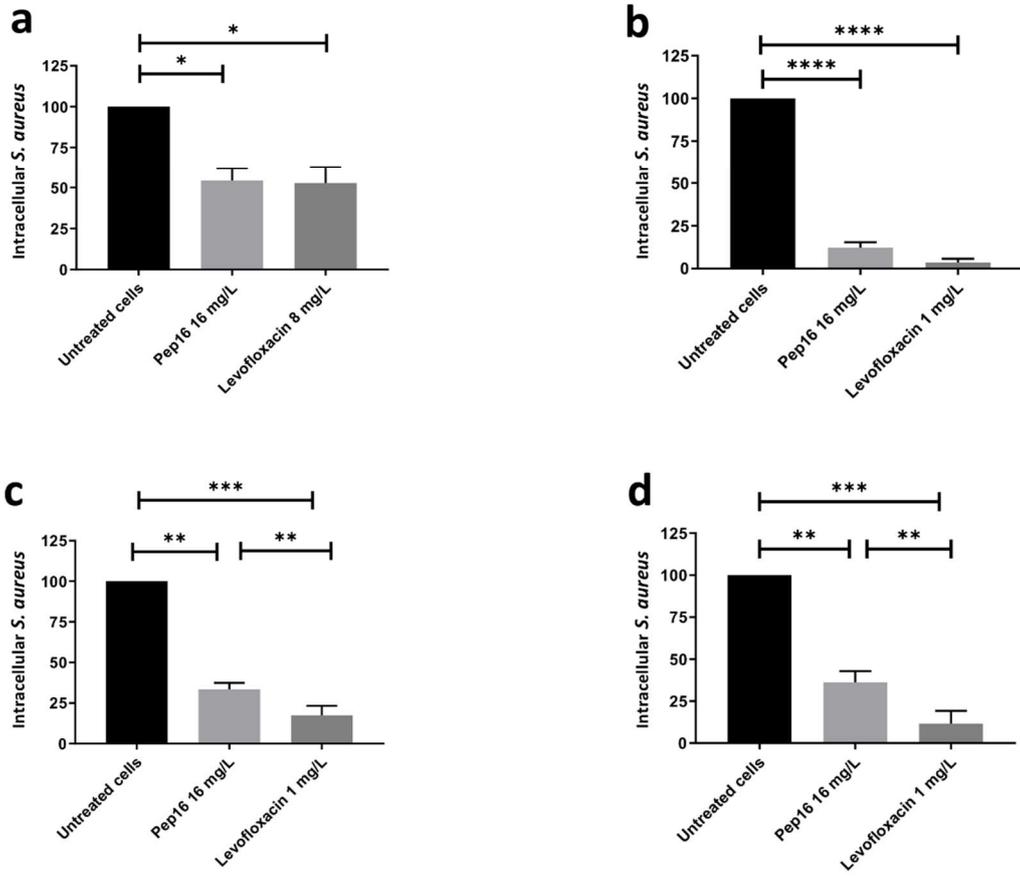


Figure 1.

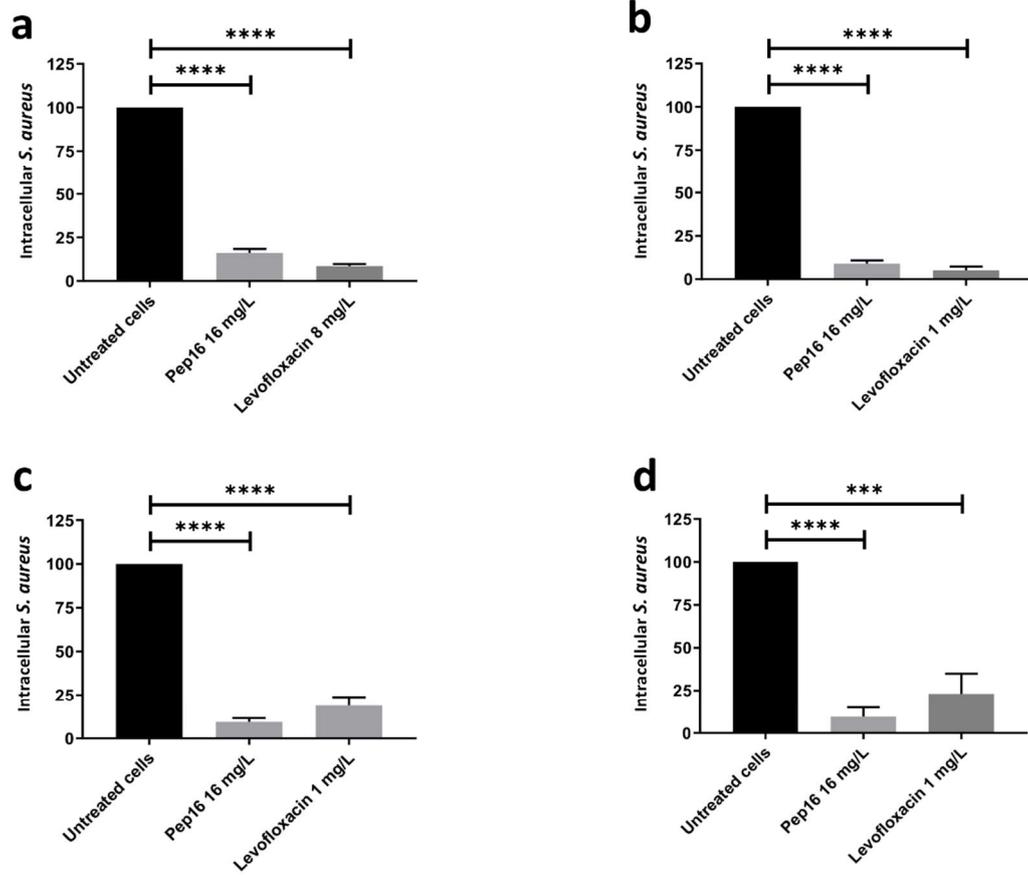


Figure 2.

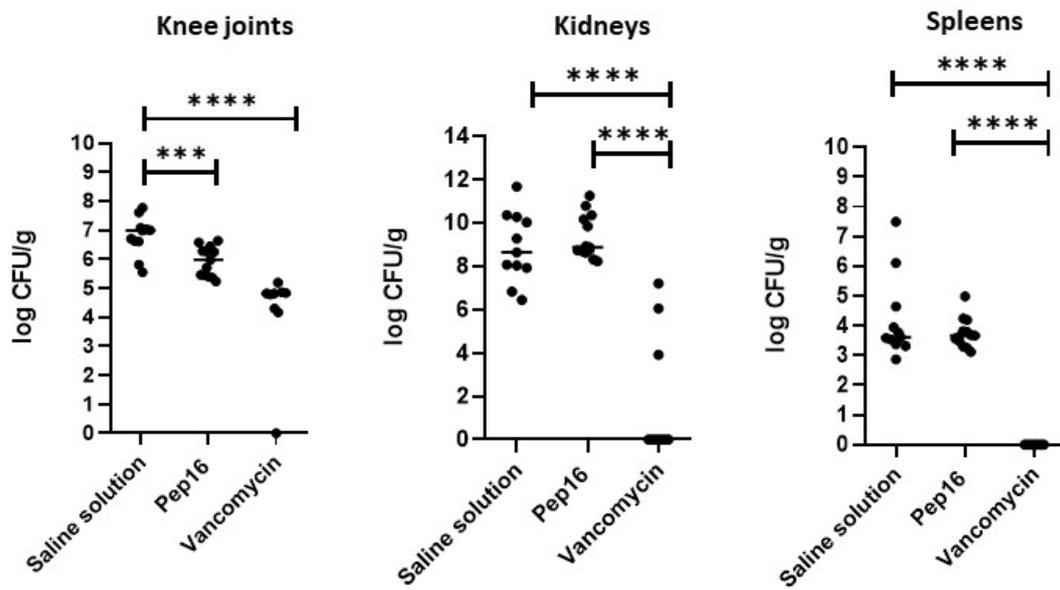


Figure 3.

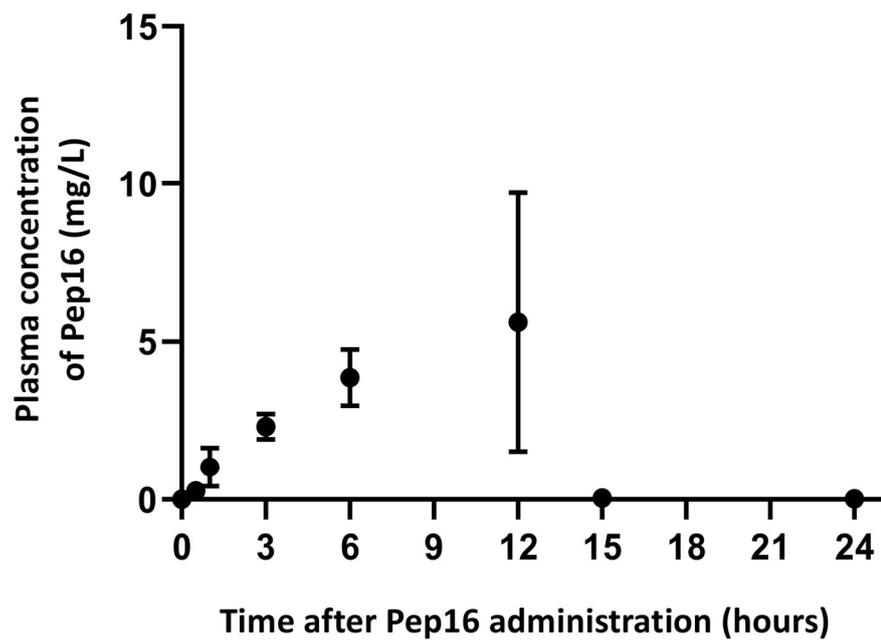


Figure 4.

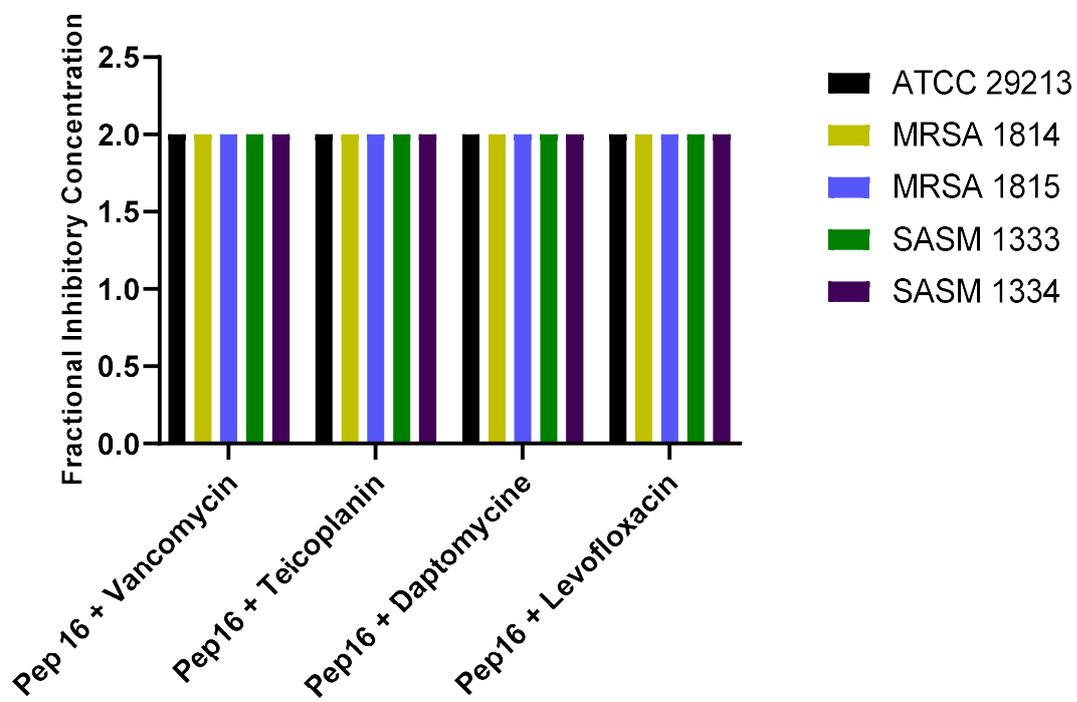


Figure S1. Summary of the fractional inhibitory concentration of antimicrobial combinations against SARM (1814 and 1815), MSSA (1333 and 1334) clinical isolates and the reference strain ATCC 29213.

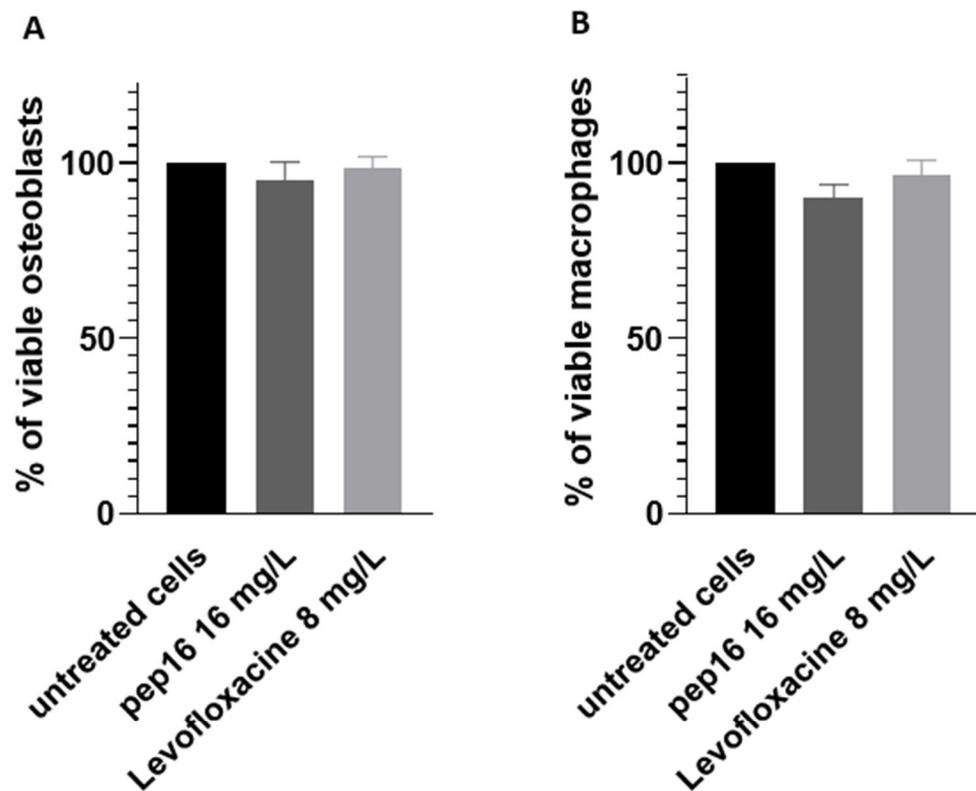


Figure S2. Viability of uninfected osteoblasts (A) and macrophages (B) after incubation with Pep16 or levofloxacin. Osteoblast were incubated 3 hours and macrophages 24 hours with antimicrobials.

Article

Synergistic Activity of Pep16, a Promising New Antibacterial Pseudopeptide against Multidrug-Resistant Organisms, in Combination with Colistin against Multidrug-Resistant *Escherichia coli*, In Vitro and in a Murine Peritonitis Model

Samuel Chosidow ¹, Bruno Fantin ^{1,2}, Irène Nicolas ³, Jean-Baptiste Mascary ^{3,4,5}, Françoise Chau ¹, Valérie Bordeau ⁴, Marie-Clemence Verdier ⁵, Pierre Rocheteau ³, Francois Guérin ⁶, Vincent Cattoir ^{4,6} and Victoire de Lastours ^{1,2,*}

¹ IAME UMR-1137, INSERM, Université de Paris, F-75018 Paris, France

² Service de Médecine Interne, Hôpital Beaujon, AP-HP, F-92210 Clichy, France

³ SAS. Olgram, F-56580 Bréhan, France

⁴ Unité Inserm U1230 BRM, Université de Rennes 1, F-35043 Rennes, France

⁵ Laboratoire de Pharmacologie Biologique, CHU Pontchaillou, F-35033 Rennes, France

⁶ Service de Bactériologie-Hygiène Hospitalière & CNR de la Résistance aux Antibiotiques (Laboratoire Associé "Entérocoques"), CHU Pontchaillou, F-35033 Rennes, France

* Correspondence: victoire.de-lastours@aphp.fr; Tel.: +33-1-4087-5227; Fax: +33-1-4087-1081



Citation: Chosidow, S.; Fantin, B.; Nicolas, I.; Mascary, J.-B.; Chau, F.; Bordeau, V.; Verdier, M.-C.; Rocheteau, P.; Guérin, F.; Cattoir, V.; et al. Synergistic Activity of Pep16, a Promising New Antibacterial Pseudopeptide against Multidrug-Resistant Organisms, in Combination with Colistin against Multidrug-Resistant *Escherichia coli*, In Vitro and in a Murine Peritonitis Model. *Antibiotics* 2023, 12, 81. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010081>

Academic Editor: Jean-Marc Sabatier

Received: 5 December 2022

Revised: 24 December 2022

Accepted: 25 December 2022

Published: 3 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Colistin is a drug of last resort to treat extreme drug-resistant Enterobacterales, but is limited by dose-dependent toxicity and the emergence of resistance. A recently developed antimicrobial pseudopeptide, Pep16, which acts on the cell membrane, may be synergistic with colistin and limit the emergence of resistance. We investigated Pep16 activity against *Escherichia coli* with varying susceptibility to colistin, in vitro and in a murine peritonitis model. Two isogenic derivatives of *E. coli* CFT073 (susceptible and resistant to colistin) and 2 clinical isolates (susceptible (B119) and resistant to colistin (Af31)) were used. Pep16 activity, alone and in combination with colistin, was determined in vitro (checkerboard experiments, time-kill curves, and flow cytometry to investigate membrane permeability). Toxicity and pharmacokinetic analyses of subcutaneous Pep16 were performed in mice, followed by the investigation of 10 mg/kg Pep16 + 10 mg/kg colistin (mimicking human concentrations) in a murine peritonitis model. Pep16 alone was inactive (MICs = 32–64 mg/L; no bactericidal effect). A concentration-dependent bactericidal synergy of Pep16 with colistin was evidenced on all strains, confirmed by flow cytometry. In vivo, Pep16 alone was ineffective. When Pep16 and colistin were combined, a significant decrease in bacterial counts in the spleen was evidenced, and the combination prevented the emergence of colistin-resistant mutants, compared to colistin alone. Pep16 synergizes with colistin in vitro, and the combination is more effective than colistin alone in a murine peritonitis by reducing bacterial counts and the emergence of resistance. Pep16 may optimize colistin use, by decreasing the doses needed, while limiting the emergence of colistin-resistant mutants.

Keywords: *Escherichia coli*; multiresistance; antimicrobial peptides; colistin; murine models

1. Introduction

The emergence and subsequent worldwide diffusion of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae (ESBL-*Es*), which are resistant to third-generation cephalosporins, has led to a dramatic increase in carbapenem consumption [1]. In this context, carbapenemase-producing Enterobacterales (CPEs) have emerged and spread globally. Notably, metallo- β -lactamases (MBLs) generate resistance to most available drugs, including the newly developed combinations of cephalosporins with β -lactamase inhibitors, such as ceftazidime-avibactam and meropenem-*avibactam*, or the new aminoglycoside, plazomicin. This

prompts the use of last-resort antibiotics, such as colistin, a polypeptide antibiotic, which remains active on 80% of CPEs including MBLs [2]. However, the use of this “old antibiotic” has been limited by its dose-dependent nephrotoxicity, its high inoculum effect, and its high risk of selecting resistant mutants in vivo [3–5]. Strains carrying resistance to colistin have subsequently appeared, leading to situations where few, if any, therapeutic options remain [6]. Additionally, the global spread of plasmids carrying *mcr*-like genes that confer colistin resistance could impede its further use [7,8]. Moreover, co-production of MCR-1 and MBLs by *E. coli* has recently been described [9]. Developing alternative antimicrobials that remain active against these highly resistant strains is a public health priority [10]. In the meantime, available clinical data suggest that combinations of “old” antibiotics are more effective in the management of infections caused by CPEs [11,12]. In vitro data also showed synergy between colistin and other antibiotics, even against colistin-resistant strains. For instance, we have recently shown that the combination of colistin and fosfomycin was beneficial in vitro and in vivo against NDM-1-producing *E. coli*, even with strains less susceptible to colistin and fosfomycin [13].

Recently, antimicrobial peptides inspired by and imitating a section of a *Staphylococcus aureus* toxin have been synthesized [14]. They have shown bacteriostatic and bactericidal effects against several Gram-positive and -negative multidrug-resistant (MDR) bacteria by altering membrane permeability, leading to bacterial death. One of these peptides, Pep16, has been studied in a murine model of sepsis due to methicillin-resistant *S. aureus* and succeeded in reducing 48 h mortality. This work also demonstrated that the use of Pep16 was associated with a low toxicity and low emergence of resistance, two imperative qualities of an antimicrobial drug candidate. Because of the urgent need for new antibiotic compounds to treat infections caused by MDR Enterobacteriaceae, and CPEs especially, we tested here the efficacy of Pep16 on *Escherichia coli* infections, as an update to the first paper published in 2019 by Nicolas et al. [14].

We hypothesized that combining Pep16 and colistin, which both operate on the outer membrane of Gram-negative bacteria, may potentiate their antibacterial effect. This may allow for the possibility of using lower, less-toxic doses, the decrease in the selection of resistance, or even the restoration of colistin activity in case of resistance. We developed a high-inoculum severe murine peritonitis model, responsible for 100% mice mortality in the absence of treatment. This model allows testing for animal survival and bacterial counts in the spleen and organ sterilization and is especially interesting to test for the efficacy of combinations of antibacterials [13,15–17].

Thus, the aim of this study was to determine the activity of Pep16 in vitro and in a murine model of peritonitis due to *E. coli*, alone and in combination with colistin.

2. Methods

2.1. Bacterial Strains

Four bacterial strains were used: (i) the plasmid pCR-Blunt II-TOPO (Life Technologies, Saint-Aubin, France), which carries a kanamycin resistance gene, was electroporated in an uropathogenic strain, *E. coli* CFT073, to construct *E. coli* CFT073-pTOPO, a strain previously used by our team in the peritonitis model [15,17]; (ii) a colistin-resistant isogenic strain *E. coli* CFT073-pTOPO-COLR previously selected under treatment with colistin in the peritoneal fluid from mice using the same murine peritonitis model [3]; (iii) two clinical isolates, one susceptible strain (*E. coli* B119) and one strain harboring the *mcr-1*-positive plasmid and resistant to colistin (*E. coli* Af31).

2.2. Antibiotics

The antibiotics used were colistin sulfate (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) and cefotaxime (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France for in vitro experiments and Mylan, Saint-Priest, France for in vivo experiments). Pep16 was supplied by S.A.S. Olgram (Bréhan, France), the manufacturer of the drug, with whom this work was conducted in collaboration. Details on the synthesis of Pep16, inspired by and

imitating a section of a *Staphylococcus aureus* toxin, can be found in the princeps paper published in 2019 [14].

2.3. In Vitro Experiments

2.3.1. MICs

The MICs of Pep16 and colistin were determined by the broth microdilution method in accordance with the EUCAST guidelines (www.eucast.org, accessed on 2 September 2022). In order to investigate for the presence of a potential inoculum effect in vitro, MICs were performed with various inoculum sizes, increasing from 10^5 to 10^7 CFU/mL. To explore MIC variations in the presence of albumin, MICs were also determined in Mueller–Hinton broth (MHB) supplemented with 4% human albumin.

2.3.2. Bacteriostatic and Bactericidal Synergy Tests

The existence of an in vitro synergy between colistin and Pep16 was tested by checkerboard synergy testing and time–kill curves using both antibiotics separately and in combination. Checkerboard synergy testing was performed by the broth microdilution method [18]. Combinations of colistin and Pep16 were tested at concentrations of 0.03–32 and 1–64 mg/L, respectively. The fractional inhibitory concentration (FIC) index was calculated by adding the FICs (the MIC of Drug A in combination with Drug B over the MIC of Drug A alone) of colistin and Pep16. An FIC index < 0.5 defined synergy.

Time–kill curves were performed with Pep16 (4–128 mg/L) and colistin (0.5–8 mg/L) alone or in combination. Exponentially growing *E. coli* cells were incubated in 10 mL of Mueller–Hinton broth to obtain 10^6 CFU/mL with Pep16 and/or colistin. Viable counts were enumerated by plating 100 μ L of appropriate culture dilutions on to lysogeny broth (LB) agar plates after 0, 1, 3, 6, and 24 h of incubation at 37 °C and expressed in \log_{10} CFU/mL. The lower limit of detection was 1 \log_{10} CFU/mL. A bactericidal effect is defined as a 3 \log_{10} decrease in CFU counts compared with the initial inoculum. A synergistic effect is defined as a 2 \log_{10} decrease in CFU counts between the combination and its most-active constituent after 24 h [19]. Additionally, the number of surviving organisms in the presence of the combination had to be 2 \log_{10} CFU/mL below the starting inoculum. The MICs of colistin-resistant mutants after 24 h of colistin monotherapy were determined (see above). All these experiments were repeated at least three times.

Flow cytometry was used to investigate membrane permeability after exposure to antibiotics. Experiments were executed on a Fortessa X-20 flow cytometer (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) equipped with a 488 nm laser. Exponentially growing *E. coli* CFT073-pTOPO cells at 10^6 CFU/mL were obtained and incubated with colistin and/or Pep16 at $0.25 \times$ MIC during 30 min. A negative control was incubated without antibiotics, and a positive control was incubated with a solution of 90% ethanol. The samples were centrifuged and reconstituted in phosphate-buffered saline twice. Cells were then stained by using a Live/Dead BacLight kit (Molecular Probes, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) as previously shown [20]. The kit consists of two fluorescent intercalating agents, propidium iodide (PI) and SYTO9, which both stain nucleic acids. The green-fluorescing SYTO9 is able to enter all cells when used alone, whereas the red-fluorescing PI only enters cells with damaged cytoplasmic membranes. The appropriate mixture of the SYTO9 and PI stains enables differentiation between bacteria with intact cytoplasmic membranes and dead bacteria with permeabilized cytoplasmic membranes. Optical filters were set up such that red fluorescence was measured at 635 nm and green fluorescence was measured at 500 nm. The proportion of dead cells (colored in red)/marked cells (colored in red and/or green) was retrieved for each condition. A minimum of 50,000 events per condition were recorded.

2.4. In Vivo Experiments

2.4.1. Ethics

Animal experiments were performed in accordance with the prevailing regulations and ethical requirements of the Direction of Veterinary Services of Paris. The experimental

protocol was approved by the French Ministry of Research and by the Ethics Committee for Animal Experiments (No. APAFIS 22330-2019092415325730). Animals were housed in regulation cages and given free access to food and water. Swiss ICR-strain female mice weighing 25 to 30 g were used.

2.4.2. Survival Study

Non-infected mice survival was assessed after a single subcutaneous administration of Pep16 at 10 or 100 mg/kg. Mice were monitored for a minimum of 6 h after administration of Pep16.

2.4.3. Pep16 Pharmacokinetic Analysis

Pep16 concentrations were determined in plasma from non-infected mice 0.5, 1, 3, 6, 12, and 24 h after subcutaneous Pep16 injection. Blood samples of 40–300 μ L were collected in Eppendorf Protein LoBind Tubes (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) through intracardiac puncture. Tubes were then centrifuged for 5 min at 8000 rpm, and the plasma supernatant was retrieved and stored at -80 °C. Dosages were then performed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS). Samples were prepared for analysis by adding 30 μ L of analyte to 30 μ L of internal standard, 30 μ L of water/methanol (*v/v* 50/50), and 90 μ L of 2% ZnSO₄ acetonitril solution. Daptomycin was used as the internal control. The mix was then vortexed for 10 min at 10,000 rpm. Then, 100 μ L of the supernatant was transferred into vials containing 900 μ L of water/methanol (50/50, *v/v*), and 2 μ L was then injected into the chromatographic system. A HYPERSIL GOLD™ C18 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used to perform chromatographic separation of Pep16 from the sample. The mobile phase used was constituted of water with 0.1% formic acid (A) and acetonitril with 0.1% formic acid (B). This column was maintained at 40 °C. The gradient started with 10%(B) and ended with 90% (B) for 7 min. The chromatography system was coupled to a triple-quadrupole Xevo TQ-XS⁶⁹ mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA). The method has a fixation concentration range going from 1 to 120 μ g/mL.

2.4.4. Murine Peritoneal Infection Model

We used the lethal murine intraperitoneal infection model previously developed by our group [13,15–17]. Mice were inoculated by the intraperitoneal route with 250 μ L of a bacterial suspension in porcine mucin 10% (Sigma-Aldrich), corresponding to a final inoculum of approximately 2.5×10^7 CFU/mL. The strains tested were CFT073-pTOPO and CFT073-pTOPO-COLR. Two hours after inoculation, at least three mice per strain were sacrificed to determine the pre-therapeutic bacterial loads, referred to as start-of-treatment controls, since all untreated mice died within 12 h (data not shown), preventing the use of end-of-treatment controls. Each treatment group was composed of 9 mice, which were administered a single dose of antibiotic (or of a combination of antibiotics) subcutaneously 2 h after inoculation. The treatment groups were Pep16 10 mg/kg, colistin 10 mg/kg, cefotaxime 100 mg/kg, and Pep16 10 mg/kg + colistin 10 mg/kg. Doses of cefotaxime and colistin were chosen based on previous pharmacokinetic analysis, while the dose of Pep16 was chosen based on the present survival study and pharmacokinetic analysis. In each treatment group, mice were sacrificed by 200 μ L of pentobarbital 40% (Euthasol VetVR, Dechra Veterinary Products, Montigny-Le-Bretonneux, France) in a sequential way: 3 mice 3 h after treatment, 3 mice 6 h after treatment, and 3 mice 12 h after treatment. Immediately after death, the spleens were extracted and homogenized. Samples were plated on LB agar. To detect resistant mutants after treatment with colistin, samples were also plated on LB agar containing colistin at $4 \times$ MIC. The MICs of colistin-resistant mutants were determined (see above). Colony counts were then determined after 48 h of culture. Endpoints were spontaneous death (before the planned time of the sacrifice), bacterial counts in the spleen, and the emergence of colistin-resistant mutants. The assessment criteria of the murine model were: (i) mortality rate; (ii) bacterial counts in peritoneal fluid (PF) and the spleen; and (iii) the selection of colistin-resistant mutants after 24 h of treatment.

2.5. Statistical Analysis

Continuous variables are expressed as the median and ranges (minimum to maximum) and compared using the non-parametric Kruskal–Wallis test followed, when significant, by the Mann–Whitney test for comparisons between two groups. Proportions were compared using Fisher exact or Chi-squared tests, when appropriate. Statistical analyses were performed with the R software (version 3.6.0). A p -value < 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. In Vitro Studies

3.1.1. Minimum Inhibitory Concentrations

The MICs of Pep16 and colistin for the studied strains of *E. coli* are shown in Table 1. Increases in the inoculum of CFT073-pTOPO from 10^5 CFU/mL to 10^6 CFU/mL and 10^7 CFU/mL were associated with an increase in the MICs of Pep16 from 64 mg/L to 128 mg/L and 1024 mg/L, respectively. The MICs of Pep16 for CFT073-pTOPO in the presence of 4% human albumin increased from 64 to >128 mg/L.

Table 1. MICs of the study strains.

<i>E. coli</i> Isolates	Origin	Inoculum (CFU/mL)	MICs		
			Pep16 (mg/L)	Colistin (mg/L) (S < 2; R > 2)	Cefotaxime (mg/L) (S < 1; R > 2)
CFT073-pTOPO	Derived from CFT073 clinical isolate (UTI)	10^5	64	1	0.06
		10^6	128	2	1
		10^7	1024	32	8
CFT073-pTOPO-COLR	In vivo mutant from CFT073	10^5	64	16	0.06
Af31	Clinical isolate (UTI)	10^5	32	8	0.06
B119	Clinical isolate (UTI)	10^5	32	1	0.06

All experiments were performed at least three times. MIC: minimal inhibitory concentration, S: susceptibility, R: resistance. All breakpoints used are those recommended by EUCAST.

3.1.2. Synergy Studies

The checkerboard method showed a synergistic interaction between Pep16 and colistin on the two colistin-susceptible *E. coli* strains CFT073-pTOPO and B119 with median FIC indices of 0.19 and 0.28, respectively. For both colistin-resistant strains, median FIC indices were above 0.5, indicating the absence of synergy. Using time–kill curves, a synergistic effect was observed with the combination of Pep16 and colistin against all studied strains, as shown in Figure 1. When used alone, Pep16 did not show any bactericidal effect, despite high concentrations (Panel A in Supplementary Materials Figure S1). The minimal concentrations that yielded a synergy for CFT073-pTOPO were Pep16 16 mg/L ($0.25 \times$ MIC) and colistin 2 mg/L ($2 \times$ MIC) (Figure 1). For both susceptible strains CFT073-pTOPO and B119, the combination of both molecules prevented the emergence of colistin-resistant mutants that was generated by the exposure to colistin alone (MIC of colistin-resistant mutants: 8–16 mg/L). When used alone, high concentrations of colistin were needed to impede the emergence of mutants (Panel B in Figure S1). Notably, the concentrations needed to show synergy with the colistin-resistant strains were significantly higher: Pep16 64 mg/L ($2 \times$ MIC and $1 \times$ MIC for Af31 and CFT073-pTOPO-COLR, respectively) and colistin 8 mg/L ($0.5 \times$ MIC and $1 \times$ MIC for Af31 and CFT073-pTOPO-COLR, respectively).

Figure 2 shows the results of the flow cytometry experiments used to investigate membrane permeability after exposure to antibiotics. In the study of membrane permeability on CFT073-pTOPO, the percentage of dead cells/marked cells after exposure to Pep16 $0.25 \times$ MIC, to colistin $0.25 \times$ MIC and to the combination of both molecules, was 2%, 60%, and 82% ($p < 0.001$), respectively (Figure 2). In the absence of a validated definition of synergy in flow cytometry experiments, the increase in the percentage of dead

cells/marked cells with the combination of Pep16 and colistin suggests a beneficial effect of the combination against the outer bacterial cell membrane.

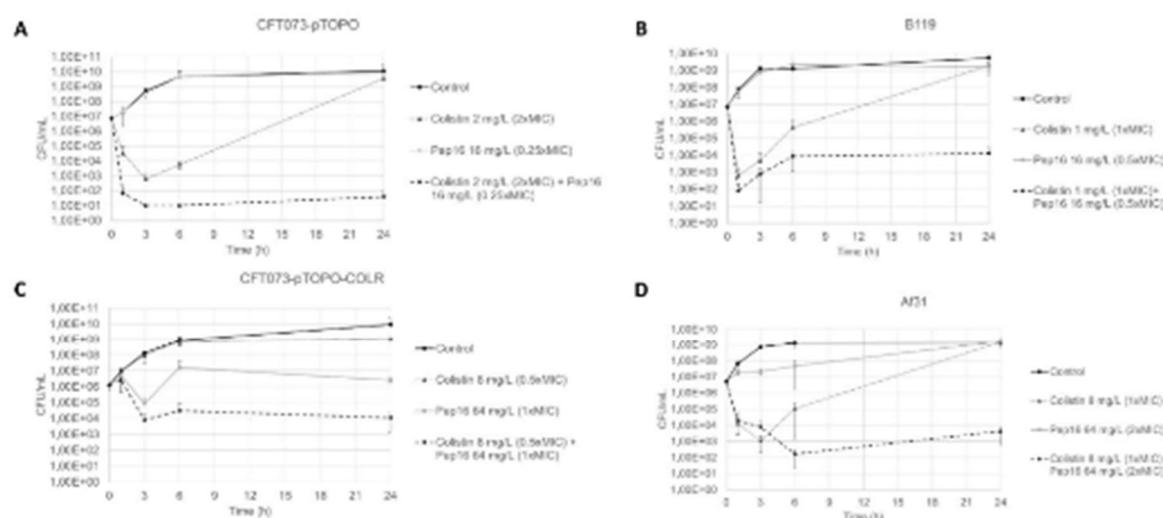


Figure 1. Time-kill curves of Pep16 and colistin alone or in combination against the studied strains at inocula between 10^6 and 10^7 CFU/mL. (A) CFT073-pTOPO. (B) B119. (C) Af31. (D) CFT073-pTOPO-COLR. Data expressed as the mean and the standard deviation. All experiments were conducted at least 3 times.

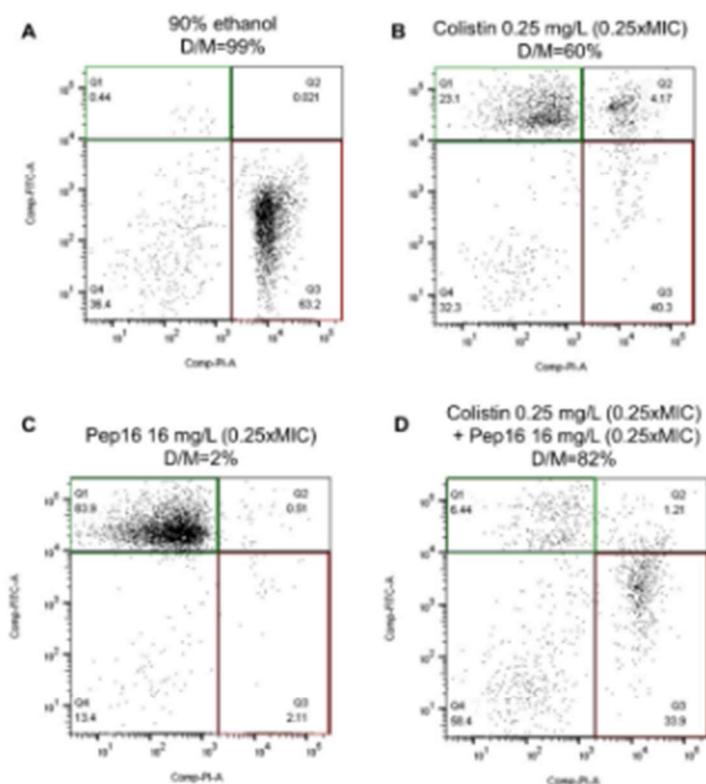


Figure 2. Flow cytometry study of membrane permeability. Bacteria showing green fluorescence have an intact membrane, and bacteria showing red fluorescence have a permeabilized membrane.

The percentage of dead/marked is the number of bacteria with red fluorescence divided by the number of bacteria with red and/or green fluorescence. The upper left quadrant (Q1) shows cells with an intact membrane (green fluorescence), and the lower right quadrant (Q3) shows cells with a disrupted membrane. The figure shows the results 30 min after exposure of CFT073-pTOPO to (A) 90% ethanol. (B) Colistin 0.25 mg/L. (C) Pep16 16 mg/L. (D) Colistin 0.25 mg/L + Pep16 16 mg/L. D/M: ratio of dead cells/marked cells, calculated as $Q3/(Q1 + Q2 + Q3)$.

3.2. In Vivo Studies

3.2.1. Toxicity Study

A total of 36 mice were treated with a single dose of Pep16, and six were used as controls and sacrificed 2 h after inoculation. Among the 18 mice who received Pep16 at a dose of 100 mg/kg subcutaneously, 6 (33%) survived at least 6 h. At a dose of 10 mg/kg of Pep16 administered subcutaneously, all (18/18) survived at least 6 h, including six mice that were monitored for 24 h.

3.2.2. Pep16 Pharmacokinetic Analysis

As shown in Figure 3A, the pharmacokinetic analysis of Pep16 after a single subcutaneous administration of 10 mg/kg showed a slow increase in plasma concentrations, with a C_{max} of 3 mg/L and a T_{max} of 6 h. The full data are available in Supplementary Materials Table S1 (as supporting information). Of note, pharmacokinetic analysis of colistin and cefotaxime had already been completed and was not repeated for ethical reasons [3,21].

3.2.3. Murine Peritoneal Infection Model—In Vivo Time-Kill Curves

First, the susceptible strain *E. coli* CFT073-pTOPO was used to create the murine peritoneal infection model. In groups of infected mice treated in monotherapy with either Pep16 10 mg/kg or colistin 10 mg/kg, 6/8 (75%) mice and 1/9 (11%) mice died before the planned time of the sacrifice, respectively, as compared with no spontaneous death in mice treated with the antibiotic combination (0/9 mice) or for the group treated with the reference treatment cefotaxime 100 mg/kg (0/9 mice) ($p < 0.001$). The mean bacterial counts in the spleen were 7.7×10^8 CFU/g, 2.7×10^8 CFU/g, 1.6×10^7 CFU/g and 3.6×10^6 CFU/g in the groups treated with Pep16 10 mg/kg, colistin 10 mg/kg, colistin 10 mg/kg + Pep16 10 mg/kg, and cefotaxime 100 mg/kg, respectively ($p = 0.002$ for comparison of the four treatment groups). In particular, bacterial counts in the spleen of mice treated with the combination of colistin 10 mg/kg + Pep16 10 mg/kg were significantly lower than those from mice treated with colistin alone ($p = 0.017$) (Figure 3B) and Pep16 alone ($p = 0.004$). The mean counts of colistin-resistant mutants were significantly higher in the spleens of mice treated with colistin alone compared to those treated with the combination of colistin and Pep16 (1.6×10^3 CFU/g vs. 2.3×10^1 CFU/g, respectively; $p < 0.001$), as well as the proportion of mice with colistin-resistant mutants (9/9 vs. 3/9, respectively; $p = 0.01$). The MICs of colistin-resistant mutants ranged from 8 to 16 mg/L.

Second, *E. coli* CFT073-pTOPO-COLR was used in the murine peritoneal infection model. In the groups treated with Pep16 10 mg/kg, colistin 10 mg/kg, or colistin 10 mg/kg + Pep16 10 mg/kg, 3/7 mice, 5/9 mice and 5/9 mice died before the planned time of the sacrifice, respectively ($p = 0.84$), and the mean bacterial counts in the spleen were 3.3×10^8 CFU/g, 4.0×10^8 CFU/g and 5.4×10^8 CFU/g, respectively ($p = 0.09$).

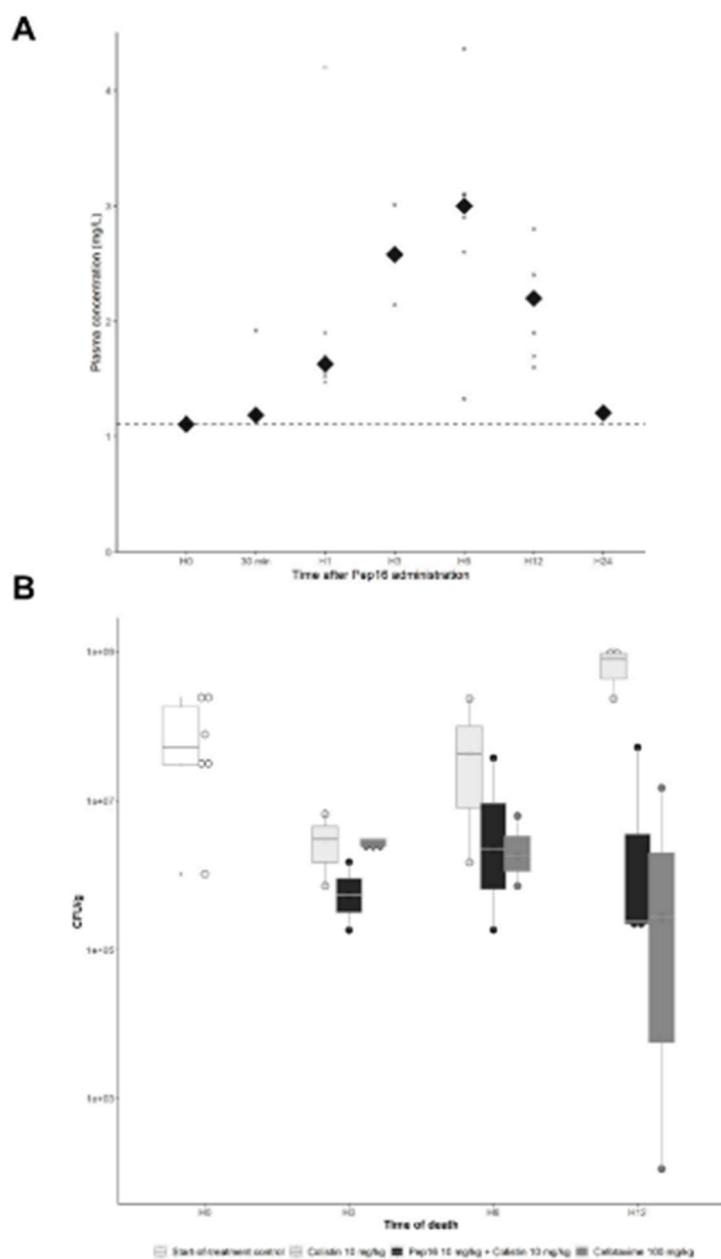


Figure 3. In vivo studies of Pep16. (A) Pharmacokinetics of Pep16 in mice after a single subcutaneous administration of 10 mg/kg. Each dot represents a sample, and the diamonds represent the median at each time point. One value at H12 (11.3 mg/L) is not shown on the graph, but has been integrated to determine the median. Dotted line represents the limit of detection. (B) Murine model of peritonitis due to CFT073-pTOPO. Bacterial counts in the spleens according to the time of death in 3 treatment groups: colistin alone, colistin + Pep16, and cefotaxime ($p = 0.002$). The group treated with Pep16 10 mg/kg alone is not shown considering the high spontaneous mortality (6/8 mice). Mice that died before their planned time of death were classified as having died at the closest upcoming time point.

4. Discussion

Despite high MICs and microbiological inefficiency when used alone, Pep16 is synergistic with colistin *in vitro*, and the combination is beneficial *in vivo*, even at sub-inhibitory concentrations, against colistin-susceptible isolates, and limits the emergence of colistin-resistant mutants. Although disappointing concerning the potential bactericidal effect of Pep16 alone, these findings are important as using Pep16 with colistin could limit the doses of colistin needed to obtain efficacy while reducing the emergence of colistin-resistant mutants.

In vitro, Pep16 alone did not show any activity on the different *E. coli* strains, with high MICs and no bactericidal effect even at high concentrations. The increase in the MICs in the presence of 4% human albumin indicates a high protein-bound fraction, and Pep16 showed a significant inoculum effect, albeit lower than colistin and cefotaxime. In addition to these findings, Pep16, when administered alone in the murine peritoneal infection model at 10 mg/kg, showed neither efficacy on spontaneous mortality nor on bacterial counts in the spleen. Owing to the high toxicity at 100 mg/kg, which was evidenced in the survival study, increasing the dose above 10 mg/kg was not deemed relevant.

In vitro, the combination of Pep16 with colistin proved to be synergistic. It allowed the reduction in colistin concentrations needed to reach a bacteriostatic effect on colistin-susceptible strains and a bactericidal effect on colistin-susceptible and -resistant strains. Notably, the combination of these molecules avoided the emergence of colistin-resistant mutants, a common and important limitation to the use of colistin in clinical practice [22]. Interestingly, the flow cytometry experiments confirmed these findings on the susceptible strains and confirmed that the interaction takes place on the bacterial membrane, which was expected as both molecules act by permeating the outer membrane of Gram-negative bacteria [14]. It is noteworthy that a beneficial effect of the combination was evidenced at low concentrations in the flow cytometry experiment, well below the MICs of the strain studied. This finding corroborates those of previous works that showed the sub-inhibitory effects of antimicrobial peptides [23].

This positive interaction between Pep16 and colistin was reproduced *in vivo*, with a reduction of bacterial counts in the spleen of mice treated with the combination compared to mice treated with colistin alone, however only on colistin-susceptible *E. coli*. Although it is probably not the only mechanism explaining its increased efficacy, the combination of molecules also reduced the emergence of colistin-resistant mutants *in vivo*. The beneficial effect of the combination was particularly apparent 6–12 h after the beginning of treatment, which coincides with the peak plasma concentration of Pep16 after subcutaneous administration. Pep16 could therefore allow the use of lower doses of colistin, therefore limiting its toxicity, but also be a partner against some CPEs for which very few antimicrobials remain active. Indeed, some CPEs remain susceptible only to colistin, and the risk of emergence of resistant mutants is then extremely high [22].

In the previous paper by Nicolas et al., Pep16, when used alone, was effective against *S. aureus* *in vitro* and in mild and severe sepsis mouse models. However, several differences can be identified between their work and ours. First, the MICs of Pep16 for *S. aureus* were significantly lower at 4.5 mg/L, compared with values ranging from 32 to 64 mg/L for *E. coli*. Second, Pep16 was given intravenously in the original study and at different dosages. Third, the model used here, which has a high inoculum and high spontaneous mortality of 97% at 24 h [17], may not have allowed time for Pep16's activity, considering its delayed peak plasma concentrations.

5. Conclusions

Altogether, although less optimistic than for the treatment of Gram-positive organisms and especially *S. aureus* and despite a lack of efficacy when used alone against *E. coli*, Pep16 may be of interest in combination with colistin. Indeed, the combination has proven synergistic *in vitro* and beneficial *in vivo*, compared to colistin alone. The precise mechanism of this synergy on the outer bacterial membrane needs to be explored further. It is also of interest that a synergy is evidenced using two compounds that are both derived from peptides

and interact with the outer bacterial membrane, whereas synergy is usually described for drugs with distinct mode of actions, suggesting molecular targets on the outer membrane are likely different. The optimal route, dose, and frequency of Pep16 administration, as well as its tolerance also remain to be determined. In the context of the urgent need of new antimicrobials against MDR *Enterobacterales*, Pep16 may potentialize colistin usage by limiting the doses needed to obtain efficacy—thus limiting toxicity—as well as reducing the emergence of colistin-resistant mutants. Furthermore, testing this compound with other partner drugs and other organisms will be necessary and is underway by our group, in order to determine whether it should be pursued as a lead investigational compound and may help fill the therapeutic gap we are facing concerning MDR bacteria in the future.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antibiotics12010081/s1>, Figure S1: Time-kill curves at high concentrations of Pep16 or colistin monotherapy on CFT073-pTOPO. (A) Pep16. (B) Colistin. Data expressed as the mean and the standard deviation. All experiments were conducted at least 3 times. A bactericidal effect is defined as a 3 log₁₀ decrease in CFU counts compared with the initial inoculum. Table S1: Pharmacokinetics of Pep16 in mice after a single subcutaneous administration of 10 mg/kg, full data.

Author Contributions: Conceptualization, S.C., B.F., V.C. and V.d.L.; methodology, I.N. and J.-B.M.; validation, M.-C.V. and P.R.; formal analysis, S.C., M.-C.V. and V.d.L.; investigation, S.C., I.N., J.-B.M., F.C., V.B. and F.G.; resources, P.R. and F.G.; writing—original draft, S.C. and V.d.L.; writing—review and editing, B.F., F.G., V.C. and V.d.L.; supervision, B.F., V.C. and V.d.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by internal funding from “IAME” and from the “Fondation pour la Recherche Médicale” (Equipe FRM 2016, Grant Number DEQ20161136698).

Institutional Review Board Statement: Not Applicable as no research was conducted on humans. Animal experiments were performed in accordance with the prevailing regulations and ethical requirements of the Direction of Veterinary Services of Paris. The experimental protocol was approved by the French Ministry of Research and by the Ethics Committee for Animal Experiments (No. APAFIS 22330-2019092415325730).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: J.-B.M. and I.N. are employees of Olgram SA, which has synthesized and developed Pep16. P.R. is the CEO and co-founder of Olgram. Pep16 is covered under European Patent Application #EP14191238.6, “Cyclic antimicrobial pseudopeptides and uses thereof”. All other authors declare they have no conflict of interest. This work was presented in part at the 32nd ECCMID in Lisbon, Portugal (2022), as a poster presentation (Abstract #P1326).

References

- Laxminarayan, R.; Van Boeckel, T.; Frost, I.; Kariuki, S.; Khan, E.A.; Limmathurotsakul, D.; Larsson, D.G.J.; Levy-Hara, G.; Mendelson, M.; Outterson, K.; et al. The Lancet Infectious Diseases Commission on Antimicrobial Resistance: 6 Years Later. *Lancet Infect. Dis.* **2020**, *20*, e51–e60. [CrossRef] [PubMed]
- Cornaglia, G.; Giamarellou, H.; Rossolini, G.M. Metallo- β -Lactamases: A Last Frontier for β -Lactams? *Lancet Infect. Dis.* **2011**, *11*, 381–393. [CrossRef] [PubMed]
- Fantin, B.; Poujade, J.; Grégoire, N.; Chau, F.; Roujansky, A.; Kieffer, N.; Berleur, M.; Couet, W.; Nordmann, P. The Inoculum Effect of *Escherichia coli* Expressing Mcr-1 or Not on Colistin Activity in a Murine Model of Peritonitis. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2019**, *25*, 1563.e5–1563.e8. [CrossRef] [PubMed]
- Poirel, L.; Jayol, A.; Nordmann, P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin. Microbiol. Rev.* **2017**, *30*, 557–596. [CrossRef] [PubMed]
- Grégoire, N.; Aranzana-Climent, V.; Magréault, S.; Marchand, S.; Couet, W. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Colistin. *Clin. Pharmacokinet.* **2017**, *56*, 1441–1460. [CrossRef]
- Abdelaziz, S.M.; Aboshanab, K.M.; Yahia, I.S.; Yassien, M.A.; Hassouna, N.A. Correlation between the Antibiotic Resistance Genes and Susceptibility to Antibiotics among the Carbapenem-Resistant Gram-Negative Pathogens. *Antibiotics* **2021**, *10*, 255. [CrossRef]

7. Dénervaud Tendon, V.; Poirel, L.; Nordmann, P. Transferability of the Mcr-1 Colistin Resistance Gene. *Microb. Drug Resist.* **2017**, *23*, 813–814. [\[CrossRef\]](#)
8. Liu, Y.-Y.; Wang, Y.; Walsh, T.R.; Yi, L.-X.; Zhang, R.; Spencer, J.; Doi, Y.; Tian, G.; Dong, B.; Huang, X.; et al. Emergence of Plasmid-Mediated Colistin Resistance Mechanism MCR-1 in Animals and Human Beings in China: A Microbiological and Molecular Biological Study. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, *16*, 161–168. [\[CrossRef\]](#)
9. Li, Y.; Sun, Q.-L.; Shen, Y.; Zhang, Y.; Yang, J.-W.; Shu, L.-B.; Zhou, H.-W.; Wang, Y.; Wang, B.; Zhang, R.; et al. Rapid Increase in Prevalence of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae (CRE) and Emergence of Colistin Resistance Gene Mcr-1 in CRE in a Hospital in Henan, China. *J. Clin. Microbiol.* **2018**, *56*, e01932-17. [\[CrossRef\]](#)
10. Tacconelli, E.; Carrara, E.; Savoldi, A.; Harbarth, S.; Mendelson, M.; Monnet, D.L.; Pulcini, C.; Kahlmeter, G.; Kluytmans, J.; Carmeli, Y.; et al. Discovery, Research, and Development of New Antibiotics: The WHO Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria and Tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, 318–327. [\[CrossRef\]](#)
11. Rodríguez-Baño, J.; Gutiérrez-Gutiérrez, B.; Machuca, I.; Pascual, A. Treatment of Infections Caused by Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-, AmpC-, and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Clin. Microbiol. Rev.* **2018**, *31*, e00079-17. [\[CrossRef\]](#)
12. Gutiérrez-Gutiérrez, B.; Salamanca, E.; de Cueto, M.; Hsueh, P.-R.; Viale, P.; Paño-Pardo, J.R.; Venditti, M.; Tumbarello, M.; Daikos, G.; Cantón, R.; et al. Effect of Appropriate Combination Therapy on Mortality of Patients with Bloodstream Infections Due to Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (INCREMENT): A Retrospective Cohort Study. *Lancet Infect. Dis.* **2017**, *17*, 726–734. [\[CrossRef\]](#)
13. Le Menestrel, A.; Guerin, F.; Chau, F.; Massias, L.; Benchetrit, L.; Cattoir, V.; Fantin, B.; de Lastours, V. Activity of the Combination of Colistin and Fosfomycin against NDM-1-Producing *Escherichia coli* with Variable Levels of Susceptibility to Colistin and Fosfomycin in a Murine Model of Peritonitis. *J. Antimicrob. Chemother.* **2021**, *77*, 155–163. [\[CrossRef\]](#)
14. Nicolas, I.; Bordeau, V.; Bondon, A.; Baudy-Floc'h, M.; Felden, B. Novel Antibiotics Effective against Gram-Positive and -Negative Multi-Resistant Bacteria with Limited Resistance. *PLoS Biol.* **2019**, *17*, e3000337. [\[CrossRef\]](#)
15. Berleur, M.; Guérin, F.; Massias, L.; Chau, F.; Poujade, J.; Cattoir, V.; Fantin, B.; de Lastours, V. Activity of Fosfomycin Alone or Combined with Temocillin in Vitro and in a Murine Model of Peritonitis Due to KPC-3- or OXA-48-Producing *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73*, 3074–3080. [\[CrossRef\]](#)
16. Cheminet, G.; de Lastours, V.; Poirel, L.; Chau, F.; Peoc'h, K.; Massias, L.; Fantin, B.; Nordmann, P. Dimercaptosuccinic Acid in Combination with Carbapenems against Isogenic Strains of *Escherichia coli* Producing or Not Producing a Metallo- β -Lactamase in Vitro and in Murine Peritonitis. *J. Antimicrob. Chemother.* **2020**, *75*, 3593–3600. [\[CrossRef\]](#)
17. Alexandre, K.; Chau, F.; Guérin, F.; Massias, L.; Lefort, A.; Cattoir, V.; Fantin, B. Activity of Temocillin in a Lethal Murine Model of Infection of Intra-Abdominal Origin Due to KPC-Producing *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2016**, *71*, 1899–1904. [\[CrossRef\]](#)
18. Berenbaum, M.C. A Method for Testing for Synergy with Any Number of Agents. *J. Infect. Dis.* **1978**, *137*, 122–130. [\[CrossRef\]](#)
19. White, R.L.; Burgess, D.S.; Manduru, M.; Bosso, J.A. Comparison of Three Different in Vitro Methods of Detecting Synergy: Time-Kill, Checkerboard, and E Test. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 1914–1918. [\[CrossRef\]](#)
20. Chau, F.; Lefort, A.; Benadda, S.; Dubée, V.; Fantin, B. Flow Cytometry as a Tool to Determine the Effects of Cell Wall-Active Antibiotics on Vancomycin-Susceptible and -Resistant Enterococcus Faecalis Strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 395–398. [\[CrossRef\]](#)
21. Rossi, B.; Soubirou, J.F.; Chau, F.; Massias, L.; Dion, S.; Lepeule, R.; Fantin, B.; Lefort, A. Cefotaxime and Amoxicillin-Clavulanate Synergism against Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in a Murine Model of Urinary Tract Infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60*, 424–430. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Wangchinda, W.; Pati, N.; Maknakhon, N.; Seenama, C.; Tiengrim, S.; Thamlikitkul, V. Collateral Damage of Using Colistin in Hospitalized Patients on Emergence of Colistin-Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Colonization and Infection. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **2018**, *7*, 84. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Vasilchenko, A.S.; Rogozhin, E.A. Sub-Inhibitory Effects of Antimicrobial Peptides. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1160. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

ANNEXES

Valorisation scientifique du travail de thèse

1. Communications orales

- ❖ **12eme journées de Recherche UFR Pharmacie – Université de Rennes 1 – Janvier 2023 (Rennes) :**

Study of Pep16, a new antibiotic in a mouse model of osteoarticular infection by *S. aureus*.
Jean-Baptiste Mascary, Valérie Bordeau, Irène Nicolas, Marie-Clémence Verdier, Pierre Rocheteau, Brice Felden, Vincent Cattoir

- ❖ **MUFOPAM - Multifonction des peptides antimicrobiens - Octobre 2022 (Amboise) :**

Study of a new antibiotic in a mouse model of osteoarticular infection by *S. aureus*.
Jean-Baptiste Mascary, Valérie Bordeau, Irène Nicolas, Marie-Clémence Verdier, Pierre Rocheteau, Brice Felden, Vincent Cattoir

- ❖ **11eme journées de Recherche UFR Pharmacie – Université de Rennes 1 – Janvier 2022 (Rennes) :**

Pharmacokinetic study of a new pseudopeptide antibiotic and its effects on a murin model of osteoarticular *Staphylococcus aureus* infection.
Jean-Baptiste Mascary, Valérie Bordeau, Irène Nicolas, Marie-Clémence Verdier, Pierre Rocheteau, Brice Felden, Vincent Cattoir

2. Communications affichées

- ❖ **10eme journées de Recherche UFR Pharmacie – Université de Rennes 1 – Janvier 2022 (Rennes) :**

Pharmacokinetic study of a new pseudopeptide antibiotic and its effects on a murin model of osteoarticular *Staphylococcus aureus* infection.
Jean-Baptiste Mascary, Valérie Bordeau, Irène Nicolas, Marie-Clémence Verdier, Pierre Rocheteau, Brice Felden, Vincent Cattoir

- ❖ **Journées de scientifique de l'école doctorale SVS – Collège doctorale de Bretagne – Décembre 2021 (Brest) :**

Pharmacokinetic study of a new pseudopeptide antibiotic and its effects on a murin model of osteoarticular *Staphylococcus aureus* infection.

Jean-Baptiste Mascary, Valérie Bordeau, Irène Nicolas, Marie-Clémence Verdier, Pierre Rocheteau, Brice Felden, Vincent Cattoir

❖ **MUFOPAM - Multifonction des peptides antimicrobiens - Octobre 2021 (Marseille) :**

Pharmacokinetic study of a new pseudopeptide antibiotic and its effects on a murin model of osteoarticular *Staphylococcus aureus* infection.

Jean-Baptiste Mascary, Valérie Bordeau, Irène Nicolas, Kevin Huguet, Marie-Clémence Verdier, Samuel Chosidow, Pierre Rocheteau, Brice Felden, Vincent Cattoir

RERERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Masters, E. A. *et al.* Skeletal infections: microbial pathogenesis, immunity and clinical management. *Nat Rev Microbiol* **20**, 385–400 (2022).
2. Darby, E. M. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nat Rev Microbiol* **21**, 280–295 (2023).
3. Josse, J., Velard, F. & Gangloff, S. C. Staphylococcus aureus vs. Osteoblast: Relationship and Consequences in Osteomyelitis. *Front Cell Infect Microbiol* **5**, 85 (2015).
4. Valour, F. *et al.* Delta-toxin production deficiency in Staphylococcus aureus: a diagnostic marker of bone and joint infection chronicity linked with osteoblast invasion and biofilm formation. *Clin Microbiol Infect* **21**, 568.e1–11 (2015).
5. Nicolas, I., Bordeau, V., Bondon, A., Baudy-Floc'h, M. & Felden, B. Novel antibiotics effective against gram-positive and -negative multi-resistant bacteria with limited resistance. *PLOS Biology* **17**, e3000337 (2019).
6. Cowan, S. T., Shaw, C. & Williams, R. E. O. Type Strain for Staphylococcus aureus Rosenbach. *Microbiology* **10**, 174–176 (1954).
7. Jarraud, S. *et al.* Exfoliatin-producing strains define a fourth agr specificity group in Staphylococcus aureus. *J Bacteriol* **182**, 6517–6522 (2000).
8. Monecke, S., Slickers, P. & Ehricht, R. Assignment of Staphylococcus aureus isolates to clonal complexes based on microarray analysis and pattern recognition. *FEMS Immunol Med Microbiol* **53**, 237–251 (2008).
9. We, K. & TI, B. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clinical microbiology reviews* **7**, (1994).
10. Foster, T. J. Surface Proteins of Staphylococcus aureus. *Microbiology Spectrum* **7**, 10.1128/microbiolspec.gpp3-0046–2018 (2019).
11. Wann, E. R., Dassy, B., Fournier, J. M. & Foster, T. J. Genetic analysis of the cap5 locus of Staphylococcus aureus. *FEMS Microbiol Lett* **170**, 97–103 (1999).
12. Vudhya Gowrisankar, Y. *et al.* Staphylococcus aureus grown in anaerobic conditions exhibits elevated glutamine biosynthesis and biofilm units. *Can J Microbiol* **67**, 323–331 (2021).
13. Wong Fok Lung, T. *et al.* Staphylococcus aureus adaptive evolution: Recent insights on how immune evasion, immunometabolic subversion and host genetics impact vaccine development. *Front Cell Infect Microbiol* **12**, 1060810 (2022).
14. Zeng, J. *et al.* Antimicrobial and anti-biofilm activity of Polygonum chinense L. aqueous extract against Staphylococcus aureus. *Sci Rep* **12**, 21988 (2022).

15. Deinhardt-Emmer, S. *et al.* Virulence patterns of *Staphylococcus aureus* strains from nasopharyngeal colonization. *J Hosp Infect* **100**, 309–315 (2018).
16. Laux, C., Peschel, A. & Krismer, B. *Staphylococcus aureus* Colonization of the Human Nose and Interaction with Other Microbiome Members. *Microbiol Spectr* **7**, (2019).
17. Salgado-Pabón, W. & Schlievert, P. M. Models matter: the search for an effective *Staphylococcus aureus* vaccine. *Nat Rev Microbiol* **12**, 585–591 (2014).
18. Lowy, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* **111**, 1265–1273 (2003).
19. Chambers, H. F. & Deleo, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* **7**, 629–641 (2009).
20. Stryjewski, M. E. & Chambers, H. F. Skin and soft-tissue infections caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* **46 Suppl 5**, S368-377 (2008).
21. Inoshima, N., Wang, Y. & Bubeck-Wardenburg, J. Genetic requirement for ADAM10 in severe *Staphylococcus aureus* skin infection. *J Invest Dermatol* **132**, 1513–1516 (2012).
22. Popov, L. M. *et al.* The adherens junctions control susceptibility to *Staphylococcus aureus* α -toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 14337–14342 (2015).
23. Otto, M. Staphylococcal Biofilms. *Microbiol Spectr* **6**, (2018).
24. Schlievert, P. M. & Davis, C. C. Device-Associated Menstrual Toxic Shock Syndrome. *Clin Microbiol Rev* **33**, e00032-19 (2020).
25. Ono, H. K. *et al.* Histamine release from intestinal mast cells induced by staphylococcal enterotoxin A (SEA) evokes vomiting reflex in common marmoset. *PLoS Pathog* **15**, e1007803 (2019).
26. Senn, L. *et al.* The Stealthy Superbug: the Role of Asymptomatic Enteric Carriage in Maintaining a Long-Term Hospital Outbreak of ST228 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *mBio* **7**, e02039-02015 (2016).
27. McCullers, J. A. The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung. *Nat Rev Microbiol* **12**, 252–262 (2014).
28. Hodille, E. *et al.* Delta Hemolysin and Phenol-Soluble Modulins, but Not Alpha Hemolysin or Pantone-Valentine Leukocidin, Induce Mast Cell Activation. *Front Cell Infect Microbiol* **6**, 180 (2016).
29. Yeboah-Manu, D. *et al.* Secondary bacterial infections of buruli ulcer lesions before and after chemotherapy with streptomycin and rifampicin. *PLoS Negl Trop Dis* **7**, e2191 (2013).
30. Cheung, G. Y. C., Bae, J. S. & Otto, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence* **12**, 547–569.

31. Lekstrom-Himes, J. A. & Gallin, J. I. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *N Engl J Med* **343**, 1703–1714 (2000).
32. Pollitt, E. J. G., Szkuta, P. T., Burns, N. & Foster, S. J. Staphylococcus aureus infection dynamics. *PLoS Pathog* **14**, e1007112 (2018).
33. de Jong, N. W. M., van Kessel, K. P. M. & van Strijp, J. A. G. Immune Evasion by Staphylococcus aureus. *Microbiology Spectrum* **7**, 10.1128/microbiolspec.gpp3-0061–2019 (2019).
34. Otto, M. Novel targeted immunotherapy approaches for staphylococcal infection. *Expert opinion on biological therapy* **10**, 1049 (2010).
35. Kolaczkowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* **13**, 159–175 (2013).
36. El-Benna, J. *et al.* Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunol Rev* **273**, 180–193 (2016).
37. Nguyen, H. T. T., Nguyen, T. H. & Otto, M. The staphylococcal exopolysaccharide PIA – Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. *Comput Struct Biotechnol J* **18**, 3324–3334 (2020).
38. Dziarski, R. & Gupta, D. Peptidoglycan recognition in innate immunity. *J Endotoxin Res* **11**, 304–310 (2005).
39. Hemmi, H. *et al.* A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740–745 (2000).
40. Krepel, S. A. & Wang, J. M. Chemotactic Ligands that Activate G-Protein-Coupled Formylpeptide Receptors. *Int J Mol Sci* **20**, 3426 (2019).
41. Hashimoto, M. *et al.* Not lipoteichoic acid but lipoproteins appear to be the dominant immunobiologically active compounds in Staphylococcus aureus. *J Immunol* **177**, 3162–3169 (2006).
42. Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* **30**, 16–34 (2011).
43. Chatterjee, S. S. *et al.* Essential Staphylococcus aureus toxin export system. *Nat Med* **19**, 364–367 (2013).
44. Kretschmer, D. *et al.* Human formyl peptide receptor 2 senses highly pathogenic Staphylococcus aureus. *Cell Host Microbe* **7**, 463–473 (2010).
45. Bestebroer, J. *et al.* Staphylococcal superantigen-like 5 binds PSGL-1 and inhibits P-selectin-mediated neutrophil rolling. *Blood* **109**, 2936–2943 (2007).
46. Tuffs, S. W. *et al.* The Staphylococcus aureus superantigen SEIX is a bifunctional toxin that inhibits neutrophil function. *PLoS Pathog* **13**, e1006461 (2017).
47. Yokoyama, R. *et al.* Staphylococcal superantigen-like protein 3 binds to the Toll-like receptor 2 extracellular domain and inhibits cytokine production induced by Staphylococcus aureus, cell wall component, or lipopeptides in murine macrophages. *Infect Immun* **80**, 2816–2825 (2012).

48. Walenkamp, A. M. *et al.* Staphylococcal Superantigen-like 10 Inhibits CXCL12-Induced Human Tumor Cell Migration. *Neoplasia* **11**, 333–344 (2009).
49. Bestebroer, J. *et al.* Staphylococcal SSL5 inhibits leukocyte activation by chemokines and anaphylatoxins. *Blood* **113**, 328–337 (2009).
50. Postma, B. *et al.* Chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus aureus binds specifically to the C5a and formylated peptide receptor. *J Immunol* **172**, 6994–7001 (2004).
51. Prat, C. *et al.* A homolog of formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) inhibitor from Staphylococcus aureus (FPRL1 inhibitory protein) that inhibits FPRL1 and FPR. *J Immunol* **183**, 6569–6578 (2009).
52. Laarman, A. J. *et al.* Staphylococcus aureus Staphopain A inhibits CXCR2-dependent neutrophil activation and chemotaxis. *EMBO J* **31**, 3607–3619 (2012).
53. Chen, X. & Alonzo, F. Bacterial lipolysis of immune-activating ligands promotes evasion of innate defenses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 3764–3773 (2019).
54. Fournier, J. M., Vann, W. F. & Karakawa, W. W. Purification and characterization of Staphylococcus aureus type 8 capsular polysaccharide. *Infect Immun* **45**, 87–93 (1984).
55. Diekema, D. J. *et al.* Continued emergence of USA300 methicillin-resistant Staphylococcus aureus in the United States: results from a nationwide surveillance study. *Infect Control Hosp Epidemiol* **35**, 285–292 (2014).
56. Boyle-Vavra, S. *et al.* USA300 and USA500 Clonal Lineages of Staphylococcus aureus Do Not Produce a Capsular Polysaccharide Due to Conserved Mutations in the cap5 Locus. *mBio* **6**, e02585-14 (2015).
57. Cramton, S. E., Gerke, C., Schnell, N. F., Nichols, W. W. & Götz, F. The intercellular adhesion (ica) locus is present in Staphylococcus aureus and is required for biofilm formation. *Infect Immun* **67**, 5427–5433 (1999).
58. Cerca, N. *et al.* Molecular Basis for Preferential Protective Efficacy of Antibodies Directed to the Poorly Acetylated Form of Staphylococcal Poly-N-Acetyl- β -(1-6)-Glucosamine. *Infect Immun* **75**, 3406–3413 (2007).
59. Cheng, A. G. *et al.* Contribution of Coagulases towards Staphylococcus aureus Disease and Protective Immunity. *PLoS Pathog* **6**, e1001036 (2010).
60. McAdow, M. *et al.* Preventing Staphylococcus aureus sepsis through the inhibition of its agglutination in blood. *PLoS Pathog* **7**, e1002307 (2011).
61. Fitzgerald, J. R. *et al.* Fibronectin-binding proteins of Staphylococcus aureus mediate activation of human platelets via fibrinogen and fibronectin bridges to integrin GPIIb/IIIa and IgG binding to the Fc γ RIIIa receptor. *Mol Microbiol* **59**, 212–230 (2006).

62. Tam, K. & Torres, V. J. Staphylococcus aureus Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. *Microbiol Spectr* **7**, (2019).
63. Pauli, N. T. *et al.* Staphylococcus aureus infection induces protein A-mediated immune evasion in humans. *J Exp Med* **211**, 2331–2339 (2014).
64. Atkins, K. L. *et al.* S. aureus IgG-binding proteins SpA and Sbi: host specificity and mechanisms of immune complex formation. *Mol Immunol* **45**, 1600–1611 (2008).
65. Itoh, S. *et al.* Staphylococcal superantigen-like protein 10 (SSL10) binds to human immunoglobulin G (IgG) and inhibits complement activation via the classical pathway. *Mol Immunol* **47**, 932–938 (2010).
66. Lambris, J. D., Ricklin, D. & Geisbrecht, B. V. Complement evasion by human pathogens. *Nat Rev Microbiol* **6**, 132–142 (2008).
67. von Köckritz-Blickwede, M., Konrad, S., Foster, S., Gessner, J. E. & Medina, E. Protective role of complement C5a in an experimental model of Staphylococcus aureus bacteremia. *J Innate Immun* **2**, 87–92 (2010).
68. Rooijackers, S. H. M. *et al.* Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nat Immunol* **6**, 920–927 (2005).
69. Ko, Y.-P. *et al.* Phagocytosis escape by a Staphylococcus aureus protein that connects complement and coagulation proteins at the bacterial surface. *PLoS Pathog* **9**, e1003816 (2013).
70. Jongerius, I., Garcia, B. L., Geisbrecht, B. V., van Strijp, J. A. G. & Rooijackers, S. H. M. Convertase Inhibitory Properties of Staphylococcal Extracellular Complement-binding Protein. *J Biol Chem* **285**, 14973–14979 (2010).
71. Kang, M. *et al.* 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 (2013).
72. Zhang, Y. *et al.* Staphylococcus aureus SdrE captures complement factor H's C-terminus via a novel 'close, dock, lock and latch' mechanism for complement evasion. *Biochem J* **474**, 1619–1631 (2017).
73. Woehl, J. L. *et al.* The extracellular adherence protein from Staphylococcus aureus inhibits the classical and lectin pathways of complement by blocking formation of the C3 proconvertase. *J Immunol* **193**, 6161–6171 (2014).
74. Langley, R. *et al.* The staphylococcal superantigen-like protein 7 binds IgA and complement C5 and inhibits IgA-Fc alpha RI binding and serum killing of bacteria. *J Immunol* **174**, 2926–2933 (2005).
75. Dubin, G. Extracellular proteases of Staphylococcus spp. *Biol Chem* **383**, 1075–1086 (2002).
76. Rousseaux, J., Rousseaux-Prévost, R., Bazin, H. & Biserte, G. Proteolysis of rat IgG subclasses by Staphylococcus aureus V8 proteinase. *Biochim Biophys Acta* **748**, 205–212 (1983).

77. Brezski, R. J. & Jordan, R. E. Cleavage of IgGs by proteases associated with invasive diseases: an evasion tactic against host immunity? *MAbs* **2**, 212–220 (2010).
78. Kobayashi, S. D., Malachowa, N. & DeLeo, F. R. Neutrophils and Bacterial Immune Evasion. *J Innate Immun* **10**, 432–441 (2018).
79. Klebanoff, S. J., Kettle, A. J., Rosen, H., Winterbourn, C. C. & Nauseef, W. M. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *J Leukoc Biol* **93**, 185–198 (2013).
80. Pelz, A. *et al.* Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **280**, 32493–32498 (2005).
81. Clements, M. O., Watson, S. P. & Foster, S. J. Characterization of the Major Superoxide Dismutase of *Staphylococcus aureus* and Its Role in Starvation Survival, Stress Resistance, and Pathogenicity. *J Bacteriol* **181**, 3898–3903 (1999).
82. Cosgrove, K. *et al.* Catalase (KatA) and alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) have compensatory roles in peroxide stress resistance and are required for survival, persistence, and nasal colonization in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **189**, 1025–1035 (2007).
83. Richardson, A. R., Libby, S. J. & Fang, F. C. A nitric oxide-inducible lactate dehydrogenase enables *Staphylococcus aureus* to resist innate immunity. *Science* **319**, 1672–1676 (2008).
84. Thammavongsa, V., Kern, J. W., Missiakas, D. M. & Schneewind, O. *Staphylococcus aureus* synthesizes adenosine to escape host immune responses. *J Exp Med* **206**, 2417–2427 (2009).
85. Zapotoczna, M. *et al.* Mobile-Genetic-Element-Encoded Hypertolerance to Copper Protects *Staphylococcus aureus* from Killing by Host Phagocytes. *mBio* **9**, e00550-18 (2018).
86. Joo, H.-S. & Otto, M. Mechanisms of resistance to antimicrobial peptides in staphylococci. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1848**, 3055–3061 (2015).
87. Peschel, A. *et al.* Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem* **274**, 8405–8410 (1999).
88. Cm, E. *et al.* The lipid-modifying multiple peptide resistance factor is an oligomer consisting of distinct interacting synthase and flippase subunits. *mBio* **6**, (2015).
89. Li, M. *et al.* The antimicrobial peptide-sensing system *aps* of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **66**, 1136–1147 (2007).
90. Falord, M., Karimova, G., Hiron, A. & Msadek, T. GraXSR Proteins Interact with the VraFG ABC Transporter To Form a Five-Component System Required for Cationic Antimicrobial Peptide Sensing and Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 1047–1058 (2012).
91. Lai, Y. *et al.* The human anionic antimicrobial peptide dermcidin induces proteolytic defence mechanisms in staphylococci. *Mol Microbiol* **63**, 497–506 (2007).

92. Bera, A., Herbert, S., Jakob, A., Vollmer, W. & Götz, F. Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **55**, 778–787 (2005).
93. Stapels, D. A. C. *et al.* *Staphylococcus aureus* secretes a unique class of neutrophil serine protease inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 13187–13192 (2014).
94. Papayannopoulos, V. & Zychlinsky, A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol* **30**, 513–521 (2009).
95. Jann, N. J. *et al.* Neutrophil antimicrobial defense against *Staphylococcus aureus* is mediated by phagolysosomal but not extracellular trap-associated cathelicidin. *J Leukoc Biol* **86**, 1159–1169 (2009).
96. Berends, E. T. M. *et al.* Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *J Innate Immun* **2**, 576–586 (2010).
97. Thammavongsa, V., Missiakas, D. M. & Schneewind, O. *Staphylococcus aureus* degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death. *Science* **342**, 863–866 (2013).
98. Berube, B. J. & Bubeck-Wardenburg, J. *Staphylococcus aureus* α -toxin: nearly a century of intrigue. *Toxins (Basel)* **5**, 1140–1166 (2013).
99. Francis Alonzo, I. I. I. & Torres, V. J. The Bicomponent Pore-Forming Leukocidins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* **78**, 199 (2014).
100. Cheung, G. Y. C., Joo, H.-S., Chatterjee, S. S. & Otto, M. Phenol-soluble modulins--critical determinants of staphylococcal virulence. *FEMS Microbiol Rev* **38**, 698–719 (2014).
101. Song, L. *et al.* Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* **274**, 1859–1866 (1996).
102. Craven, R. R. *et al.* *Staphylococcus aureus* α -Hemolysin Activates the NLRP3-Inflammasome in Human and Mouse Monocytic Cells. *PLOS ONE* **4**, e7446 (2009).
103. Suttorp, N. & Habben, E. Effect of staphylococcal alpha-toxin on intracellular Ca²⁺ in polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* **56**, 2228–2234 (1988).
104. Spaan, A. N., van Strijp, J. A. G. & Torres, V. J. Leukocidins: staphylococcal bi-component pore-forming toxins find their receptors. *Nat Rev Microbiol* **15**, 435–447 (2017).
105. DuMont, A. L. *et al.* *Staphylococcus aureus* LukAB cytotoxin kills human neutrophils by targeting the CD11b subunit of the integrin Mac-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 10794–10799 (2013).
106. Yamashita, K. *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* **108**, 17314–17319 (2011).
107. Wang, R. *et al.* Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat Med* **13**, 1510–1514 (2007).

108. Winstel, V., Schneewind, O. & Missiakas, D. Staphylococcus aureus Exploits the Host Apoptotic Pathway To Persist during Infection. *mBio* **10**, e02270-19 (2019).
109. Genestier, A.-L. *et al.* Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J Clin Invest* **115**, 3117–3127 (2005).
110. Smagur, J. *et al.* A New Pathway of Staphylococcal Pathogenesis: Apoptosis-Like Death Induced by Staphopain B in Human Neutrophils and Monocytes. *J Innate Immun* **1**, 98–108 (2009).
111. Cheng, A. G., DeDent, A. C., Schneewind, O. & Missiakas, D. A play in four acts: Staphylococcus aureus abscess formation. *Trends Microbiol* **19**, 225–232 (2011).
112. Foster, T. J. The MSCRAMM Family of Cell-Wall-Anchored Surface Proteins of Gram-Positive Cocci. *Trends in Microbiology* **27**, 927–941 (2019).
113. Peacock, S. J., Foster, T. J., Cameron, B. J. & Berendt, A. R. Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of Staphylococcus aureus to resting human endothelial cells. *Microbiology (Reading)* **145 (Pt 12)**, 3477–3486 (1999).
114. Xu, Y., Rivas, J. M., Brown, E. L., Liang, X. & Höök, M. Virulence potential of the staphylococcal adhesin CNA in experimental arthritis is determined by its affinity for collagen. *J Infect Dis* **189**, 2323–2333 (2004).
115. Bubeck Wardenburg, J., Williams, W. A. & Missiakas, D. Host defenses against Staphylococcus aureus infection require recognition of bacterial lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 13831–13836 (2006).
116. Cheng, A. G. *et al.* Genetic requirements for Staphylococcus aureus abscess formation and persistence in host tissues. *FASEB J* **23**, 3393–3404 (2009).
117. Cheung, G. Y. C. *et al.* Production of an Attenuated Phenol-Soluble Modulin Variant Unique to the MRSA Clonal Complex 30 Increases Severity of Bloodstream Infection. *PLOS Pathogens* **10**, e1004298 (2014).
118. Cheung, G. Y. C., Duong, A. C. & Otto, M. Direct and synergistic hemolysis caused by Staphylococcus phenol-soluble modulins: implications for diagnosis and pathogenesis. *Microbes Infect* **14**, 380–386 (2012).
119. Moormeier, D. E. & Bayles, K. W. Staphylococcus aureus biofilm: a complex developmental organism. *Mol Microbiol* **104**, 365–376 (2017).
120. Kennedy, C. A. & O’Gara, J. P. Contribution of culture media and chemical properties of polystyrene tissue culture plates to biofilm development by Staphylococcus aureus. *J Med Microbiol* **53**, 1171–1173 (2004).
121. Moormeier, D. E., Bose, J. L., Horswill, A. R. & Bayles, K. W. Temporal and stochastic control of Staphylococcus aureus biofilm development. *mBio* **5**, e01341-01314 (2014).
122. Hogley, L., Harkins, C., MacPhee, C. E. & Stanley-Wall, N. R. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiol Rev* **39**, 649–669 (2015).
123. Schwartz, K., Ganesan, M., Payne, D. E., Solomon, M. J. & Boles, B. R. Extracellular DNA facilitates the formation of functional amyloids in Staphylococcus aureus biofilms. *Mol Microbiol* **99**, 123–134 (2016).

124. Costerton, W. *et al.* The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* **112**, 1466–1477 (2003).
125. Rani, S. A. *et al.* Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis, and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states. *J Bacteriol* **189**, 4223–4233 (2007).
126. Archer, N. K. *et al.* Staphylococcus aureus biofilms: Properties, regulation and roles in human disease. *Virulence* **2**, 445–459 (2011).
127. Periasamy, S. *et al.* How Staphylococcus aureus biofilms develop their characteristic structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 1281–1286 (2012).
128. Otto, M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med* **64**, 175–188 (2013).
129. Thurlow, L. R. *et al.* Staphylococcus aureus biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation in vivo. *J Immunol* **186**, 6585–6596 (2011).
130. Beenken, K. E. *et al.* Global gene expression in Staphylococcus aureus biofilms. *J Bacteriol* **186**, 4665–4684 (2004).
131. Hanke, M. L. & Kielian, T. Deciphering mechanisms of staphylococcal biofilm evasion of host immunity. *Front Cell Infect Microbiol* **2**, 62 (2012).
132. Gresham, H. D. *et al.* Survival of Staphylococcus aureus inside neutrophils contributes to infection. *J Immunol* **164**, 3713–3722 (2000).
133. Kubica, M. *et al.* A potential new pathway for Staphylococcus aureus dissemination: the silent survival of S. aureus phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS One* **3**, e1409 (2008).
134. Garzoni, C. & Kelley, W. L. Staphylococcus aureus: new evidence for intracellular persistence. *Trends Microbiol* **17**, 59–65 (2009).
135. Que, Y.-A. *et al.* Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in Staphylococcus aureus experimental endocarditis. *J Exp Med* **201**, 1627–1635 (2005).
136. Bur, S., Preissner, K. T., Herrmann, M. & Bischoff, M. The Staphylococcus aureus extracellular adherence protein promotes bacterial internalization by keratinocytes independent of fibronectin-binding proteins. *J Invest Dermatol* **133**, 2004–2012 (2013).
137. Schwarz-Linek, U. *et al.* Pathogenic bacteria attach to human fibronectin through a tandem beta-zipper. *Nature* **423**, 177–181 (2003).
138. Moldovan, A. & Fraunholz, M. J. In or out: Phagosomal escape of Staphylococcus aureus. *Cell Microbiol* **21**, e12997 (2019).
139. Proctor, R. A. *et al.* Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol* **4**, 295–305 (2006).

140. Vaudaux, P. *et al.* Increased expression of clumping factor and fibronectin-binding proteins by hemB mutants of *Staphylococcus aureus* expressing small colony variant phenotypes. *Infect Immun* **70**, 5428–5437 (2002).
141. Peetermans, M. *et al.* Plasminogen activation by staphylokinase enhances local spreading of *S. aureus* in skin infections. *BMC Microbiol* **14**, 310 (2014).
142. Cho, J. S. *et al.* IL-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice. *J Clin Invest* **120**, 1762–1773 (2010).
143. Hewitt, C. R. *et al.* Major histocompatibility complex independent clonal T cell anergy by direct interaction of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B with the T cell antigen receptor. *J Exp Med* **175**, 1493–1499 (1992).
144. Llewelyn, M. & Cohen, J. Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. *Lancet Infect Dis* **2**, 156–162 (2002).
145. Ziegler, C. *et al.* The dynamics of T cells during persistent *Staphylococcus aureus* infection: from antigen-reactivity to in vivo anergy. *EMBO Mol Med* **3**, 652–666 (2011).
146. Tebartz, C. *et al.* A major role for myeloid-derived suppressor cells and a minor role for regulatory T cells in immunosuppression during *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol* **194**, 1100–1111 (2015).
147. Lindsay, J. A. *Staphylococci: Evolving Genomes*. *Microbiol Spectr* **7**, (2019).
148. Novick, R. P. Pathogenicity Islands and Their Role in Staphylococcal Biology. *Microbiol Spectr* **7**, (2019).
149. Kläui, A. J., Boss, R. & Graber, H. U. Characterization and Comparative Analysis of the *Staphylococcus aureus* Genomic Island vSa β : an In Silico Approach. *J Bacteriol* **201**, e00777-18 (2019).
150. N, M. & Fr, D. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **67**, (2010).
151. Huseby, M. *et al.* Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **189**, 8719–8726 (2007).
152. Carroll, J. D., Cafferkey, M. T. & Coleman, D. C. Serotype F double- and triple-converting phage insertionally inactivate the *Staphylococcus aureus* beta-toxin determinant by a common molecular mechanism. *FEMS Microbiol Lett* **106**, 147–155 (1993).
153. Katayama, Y., Baba, T., Sekine, M., Fukuda, M. & Hiramatsu, K. Beta-Hemolysin Promotes Skin Colonization by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **195**, 1194 (2013).
154. Langley, R., Patel, D., Jackson, N., Clow, F. & Fraser, J. D. Staphylococcal superantigen super-domains in immune evasion. *Crit Rev Immunol* **30**, 149–165 (2010).
155. Nguyen, M. T. *et al.* The vSa α Specific Lipoprotein Like Cluster (lpl) of *S. aureus* USA300 Contributes to Immune Stimulation and Invasion in Human Cells. *PLoS Pathog* **11**, e1004984 (2015).

156. Joo, H.-S., Cheung, G. Y. C. & Otto, M. Antimicrobial activity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is caused by phenol-soluble modulins derivatives. *J Biol Chem* **286**, 8933–8940 (2011).
157. Cerca, N., Brooks, J. L. & Jefferson, K. K. Regulation of the Intercellular Adhesin Locus Regulator (icaR) by SarA, σ B, and IcaR in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **190**, 6530–6533 (2008).
158. Joo, H.-S. & Otto, M. Toxin-mediated gene regulatory mechanism in *Staphylococcus aureus*. *Microb Cell* **4**, 29–31 (2016).
159. Le, K. Y. & Otto, M. Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview. *Front Microbiol* **6**, 1174 (2015).
160. Recsei, P. *et al.* Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by agar. *Mol Gen Genet* **202**, 58–61 (1986).
161. Redfield, R. J. Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends Microbiol* **10**, 365–370 (2002).
162. Cheung, G. Y. C., Wang, R., Khan, B. A., Sturdevant, D. E. & Otto, M. Role of the accessory gene regulator agr in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Infect Immun* **79**, 1927–1935 (2011).
163. Novick, R. P. *et al.* Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J* **12**, 3967–3975 (1993).
164. Queck, S. Y. *et al.* RNAIII-independent target gene control by the agr quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. *Mol Cell* **32**, 150–158 (2008).
165. Geisinger, E., Adhikari, R. P., Jin, R., Ross, H. F. & Novick, R. P. Inhibition of rot translation by RNAIII, a key feature of agr function. *Mol Microbiol* **61**, 1038–1048 (2006).
166. Ji, G., Beavis, R. C. & Novick, R. P. Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 12055–12059 (1995).
167. Ji, G., Beavis, R. & Novick, R. P. Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* **276**, 2027–2030 (1997).
168. Quave, C. & Horswill, A. Flipping the switch: Tools for detecting small molecule inhibitors of staphylococcal virulence. *Frontiers in microbiology* **5**, 706 (2014).
169. Cheung, A. L. *et al.* Diminished virulence of a sar-/agr- mutant of *Staphylococcus aureus* in the rabbit model of endocarditis. *J Clin Invest* **94**, 1815–1822 (1994).
170. Wright, J. S., Jin, R. & Novick, R. P. Transient interference with staphylococcal quorum sensing blocks abscess formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1691–1696 (2005).
171. Wardenburg, J. B., Patel, R. J. & Schneewind, O. Surface Proteins and Exotoxins Are Required for the Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Pneumonia. *Infect Immun* **75**, 1040–1044 (2007).

172. Montgomery, C. P., Boyle-Vavra, S. & Daum, R. S. Importance of the global regulators Agr and SaeRS in the pathogenesis of CA-MRSA USA300 infection. *PLoS One* **5**, e15177 (2010).
173. Abdelnour, A., Arvidson, S., Bremell, T., Rydén, C. & Tarkowski, A. The accessory gene regulator (agr) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine arthritis model. *Infect Immun* **61**, 3879–3885 (1993).
174. Gillaspay, A. F. *et al.* Role of the accessory gene regulator (agr) in pathogenesis of staphylococcal osteomyelitis. *Infect Immun* **63**, 3373–3380 (1995).
175. Nakamura, Y. *et al.* *Staphylococcus* Agr virulence is critical for epidermal colonization and associates with atopic dermatitis development. *Sci Transl Med* **12**, eaay4068 (2020).
176. He, L. *et al.* Resistance to leukocytes ties benefits of quorum sensing dysfunctionality to biofilm infection. *Nat Microbiol* **4**, 1114–1119 (2019).
177. Fowler, V. G. *et al.* Persistent bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection is associated with agr dysfunction and low-level in vitro resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein. *J Infect Dis* **190**, 1140–1149 (2004).
178. Villaruz, A. E. *et al.* 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 (2009).
179. Adhikari, R. P., Arvidson, S. & Novick, R. P. A Nonsense Mutation in agrA Accounts for the Defect in agr Expression and the Avirulence of *Staphylococcus aureus* 8325-4 traP::kan. *Infect Immun* **75**, 4534–4540 (2007).
180. Xiong, A., Singh, V. K., Cabrera, G. & Jayaswal, R. K. Molecular characterization of the ferric-uptake regulator, fur, from *Staphylococcus aureus*. *Microbiology (Reading)* **146 (Pt 3)**, 659–668 (2000).
181. Yarwood, J. M., McCormick, J. K. & Schlievert, P. M. Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **183**, 1113–1123 (2001).
182. Johnson, M. *et al.* Fur is required for the activation of virulence gene expression through the induction of the sae regulatory system in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* **301**, 44–52 (2011).
183. Torres, V. J. *et al.* *Staphylococcus aureus* fur regulates the expression of virulence factors that contribute to the pathogenesis of pneumonia. *Infect Immun* **78**, 1618–1628 (2010).
184. Horsburgh, M. J., Ingham, E. & Foster, S. J. In *Staphylococcus aureus*, Fur Is an Interactive Regulator with PerR, Contributes to Virulence, and Is Necessary for Oxidative Stress Resistance through Positive Regulation of Catalase and Iron Homeostasis. *J Bacteriol* **183**, 468–475 (2001).
185. Tiwari, N. *et al.* The SrrAB two-component system regulates *Staphylococcus aureus* pathogenicity through redox sensitive cysteines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 10989–10999 (2020).

186. Kinkel, T. L., Roux, C. M., Dunman, P. M. & Fang, F. C. The *Staphylococcus aureus* SrrAB two-component system promotes resistance to nitrosative stress and hypoxia. *mBio* **4**, e00696-00613 (2013).
187. Ulrich, M. *et al.* The staphylococcal respiratory response regulator SrrAB induces ica gene transcription and polysaccharide intercellular adhesin expression, protecting *Staphylococcus aureus* from neutrophil killing under anaerobic growth conditions. *Mol Microbiol* **65**, 1276–1287 (2007).
188. Cheung, A. L., Nishina, K. A., Pous, M. P. T. & Tamber, S. The SarA protein family of *Staphylococcus aureus*. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 355–361 (2008).
189. Liu, Y. *et al.* Structural and function analyses of the global regulatory protein SarA from *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2392–2397 (2006).
190. Beenken, K. E. *et al.* Epistatic relationships between sarA and agr in *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *PLoS One* **5**, e10790 (2010).
191. Liu, Q., Yeo, W.-S. & Bae, T. The SaeRS Two-Component System of *Staphylococcus aureus*. *Genes (Basel)* **7**, 81 (2016).
192. Liang, X. *et al.* Global Regulation of Gene Expression by ArlRS, a Two-Component Signal Transduction Regulatory System of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **187**, 5486–5492 (2005).
193. Ingavale, S., van Wamel, W., Luong, T. T., Lee, C. Y. & Cheung, A. L. Rat/MgrA, a Regulator of Autolysis, Is a Regulator of Virulence Genes in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **73**, 1423–1431 (2005).
194. Jonsson, I.-M., Lindholm, C., Luong, T. T., Lee, C. Y. & Tarkowski, A. mgrA regulates staphylococcal virulence important for induction and progression of septic arthritis and sepsis. *Microbes Infect* **10**, 1229–1235 (2008).
195. Li, L. *et al.* MgrA Governs Adherence, Host Cell Interaction, and Virulence in a Murine Model of Bacteremia Due to *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* **220**, 1019–1028 (2019).
196. Luong, T. T., Dunman, P. M., Murphy, E., Projan, S. J. & Lee, C. Y. Transcription Profiling of the mgrA Regulon in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **188**, 1899–1910 (2006).
197. Chen, P. R. *et al.* An oxidation-sensing mechanism is used by the global regulator MgrA in *Staphylococcus aureus*. *Nat Chem Biol* **2**, 591–595 (2006).
198. Chen, P. R. *et al.* A new oxidative sensing and regulation pathway mediated by the MgrA homologue SarZ in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **71**, 198–211 (2009).
199. Kullik, I. & Giachino, P. The alternative sigma factor sigmaB in *Staphylococcus aureus*: regulation of the sigB operon in response to growth phase and heat shock. *Arch Microbiol* **167**, 151–159 (1997).
200. Bischoff, M., Entenza, J. M. & Giachino, P. Influence of a Functional sigB Operon on the Global Regulators sar and agr in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **183**, 5171–5179 (2001).

201. Nicholas, R. O. *et al.* Isolation and Characterization of a sigB Deletion Mutant of Staphylococcus aureus. *Infect Immun* **67**, 3667–3669 (1999).
202. Tuchscher, L. *et al.* Sigma Factor SigB Is Crucial to Mediate Staphylococcus aureus Adaptation during Chronic Infections. *PLoS Pathog* **11**, e1004870 (2015).
203. Sharff, K. A., Richards, E. P. & Townes, J. M. Clinical management of septic arthritis. *Curr Rheumatol Rep* **15**, 332 (2013).
204. Berbari, E. F. *et al.* 2015 Infectious Diseases Society of America (IDSA) Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Native Vertebral Osteomyelitis in Adults. *Clin Infect Dis* **61**, e26-46 (2015).
205. Tafer, N. *et al.* Optimal diagnosis, prevention, and management of periprosthetic joint infection. *ORR* **7**, 11–19 (2015).
206. Grammatico-Guillon, L. *et al.* Bone and joint infections in hospitalized patients in France, 2008: clinical and economic outcomes. *J Hosp Infect* **82**, 40–48 (2012).
207. S, K., K, O., E, L., F, M. & M, H. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* **89**, (2007).
208. Wilson, N., Broatch, J., Jehn, M. & Davis, C. National projections of time, cost and failure in implantable device identification: Consideration of unique device identification use. *Healthc (Amst)* **3**, 196–201 (2015).
209. Mathews, C. J., Weston, V. C., Jones, A., Field, M. & Coakley, G. Bacterial septic arthritis in adults. *Lancet* **375**, 846–855 (2010).
210. Waldvogel, F. A., Medoff, G. & Swartz, M. N. Osteomyelitis: a review of clinical features, therapeutic considerations and unusual aspects. *N Engl J Med* **282**, 198–206 (1970).
211. Cierny, G., Mader, J. T. & Penninck, J. J. A clinical staging system for adult osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res* 7–24 (2003) doi:10.1097/01.blo.0000088564.81746.62.
212. Zimmerli, W. Clinical practice. Vertebral osteomyelitis. *N Engl J Med* **362**, 1022–1029 (2010).
213. Mylona, E., Samarkos, M., Kakalou, E., Fanourgiakis, P. & Skoutelis, A. Pyogenic vertebral osteomyelitis: a systematic review of clinical characteristics. *Semin Arthritis Rheum* **39**, 10–17 (2009).
214. Kaplan, S. S., Heine, R. P. & Simmons, R. L. Defensins Impair Phagocytic Killing by Neutrophils in Biomaterial-Related Infection. *Infect Immun* **67**, 1640–1645 (1999).
215. Rohde, H. *et al.* Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* **28**, 1711–1720 (2007).
216. Zimmerli, W., Waldvogel, F. A., Vaudaux, P. & Nydegger, U. E. Pathogenesis of foreign body infection: description and characteristics of an animal model. *J Infect Dis* **146**, 487–497 (1982).

217. Murdoch, D. R. *et al.* Infection of orthopedic prostheses after *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis* **32**, 647–649 (2001).
218. Tande, A. J. *et al.* Clinical Presentation, Risk Factors, and Outcomes of Hematogenous Prosthetic Joint Infection in Patients with *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Am J Med* **129**, 221.e11–20 (2016).
219. Sendi, P., Banderet, F., Graber, P. & Zimmerli, W. Periprosthetic joint infection following *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J Infect* **63**, 17–22 (2011).
220. Wa, J., Ac, W., Sr, H. & Gl, G. Surgical Treatment of Prosthetic Joint Infections of the Hip and Knee: Changing Paradigms? *The Journal of arthroplasty* **30**, (2015).
221. Zimmerli, W., Trampuz, A. & Ochsner, P. E. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med* **351**, 1645–1654 (2004).
222. Lipsky, B. A., Weigelt, J. A., Gupta, V., Killian, A. & Peng, M. M. Skin, soft tissue, bone, and joint infections in hospitalized patients: epidemiology and microbiological, clinical, and economic outcomes. *Infect Control Hosp Epidemiol* **28**, 1290–1298 (2007).
223. Corvec, S., Portillo, M. E., Pasticci, B. M., Borens, O. & Trampuz, A. Epidemiology and new developments in the diagnosis of prosthetic joint infection. *Int J Artif Organs* **35**, 923–934 (2012).
224. Kremers, H. M. *et al.* Trends in the epidemiology of osteomyelitis: a population-based study, 1969 to 2009. *J Bone Joint Surg Am* **97**, 837–845 (2015).
225. Rao, N., Cannella, B., Crossett, L. S., Yates, A. J. & McGough, R. A preoperative decolonization protocol for *staphylococcus aureus* prevents orthopaedic infections. *Clin Orthop Relat Res* **466**, 1343–1348 (2008).
226. Hacek, D. M. *et al.* *Staphylococcus aureus* nasal decolonization in joint replacement surgery reduces infection. *Clin Orthop Relat Res* **466**, 1349–1355 (2008).
227. Patel, R., Osmon, D. R. & Hanssen, A. D. The diagnosis of prosthetic joint infection: current techniques and emerging technologies. *Clin Orthop Relat Res* 55–58 (2005) doi:10.1097/01.blo.0000175121.73675.fd.
228. Osmon, D. R. *et al.* Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **56**, e1–e25 (2013).
229. Atkins, B. L. *et al.* Prospective evaluation of criteria for microbiological diagnosis of prosthetic-joint infection at revision arthroplasty. The OSIRIS Collaborative Study Group. *J Clin Microbiol* **36**, 2932–2939 (1998).
230. Trampuz, A. *et al.* Advances in the laboratory diagnosis of prosthetic joint infection. *Reviews in Medical Microbiology* **14**, 1–14 (2003).
231. Schäfer, P. *et al.* Prolonged bacterial culture to identify late periprosthetic joint infection: a promising strategy. *Clin Infect Dis* **47**, 1403–1409 (2008).

232. Bori, G. *et al.* Usefulness of histological analysis for predicting the presence of microorganisms at the time of reimplantation after hip resection arthroplasty for the treatment of infection. *J Bone Joint Surg Am* **89**, 1232–1237 (2007).
233. Pandey, R., Drakoulakis, E. & Athanasou, N. A. An assessment of the histological criteria used to diagnose infection in hip revision arthroplasty tissues. *J Clin Pathol* **52**, 118–123 (1999).
234. Fenollar, F., Lévy, P.-Y. & Raoult, D. Usefulness of broad-range PCR for the diagnosis of osteoarticular infections. *Curr Opin Rheumatol* **20**, 463–470 (2008).
235. Rao, N., Ziran, B. H. & Lipsky, B. A. Treating osteomyelitis: antibiotics and surgery. *Plast Reconstr Surg* **127 Suppl 1**, 177S-187S (2011).
236. Barberán, J. Management of infections of osteoarticular prosthesis. *Clin Microbiol Infect* **12 Suppl 3**, 93–101 (2006).
237. Lew, D. P. & Waldvogel, F. A. Osteomyelitis. *Lancet* **364**, 369–379 (2004).
238. Coakley, G. *et al.* BSR & BHPR, BOA, RCGP and BSAC guidelines for management of the hot swollen joint in adults. *Rheumatology (Oxford)* **45**, 1039–1041 (2006).
239. Shirtliff, M. E. & Mader, J. T. Acute Septic Arthritis. *Clin Microbiol Rev* **15**, 527–544 (2002).
240. Kowalski, T. J. *et al.* The management and outcome of spinal implant infections: contemporary retrospective cohort study. *Clin Infect Dis* **44**, 913–920 (2007).
241. Crockarell, J. R., Hanssen, A. D., Osmon, D. R. & Morrey, B. F. Treatment of infection with débridement and retention of the components following hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* **80**, 1306–1313 (1998).
242. Marculescu, C. E. *et al.* Outcome of prosthetic joint infections treated with debridement and retention of components. *Clin Infect Dis* **42**, 471–478 (2006).
243. Silva, M., Tharani, R. & Schmalzried, T. P. Results of direct exchange or debridement of the infected total knee arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 125–131 (2002) doi:10.1097/00003086-200211000-00022.
244. Brandt, C. M. *et al.* Staphylococcus aureus prosthetic joint infection treated with debridement and prosthesis retention. *Clin Infect Dis* **24**, 914–919 (1997).
245. Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318–1322 (1999).
246. Bosse, M. J., Gruber, H. E. & Ramp, W. K. Internalization of bacteria by osteoblasts in a patient with recurrent, long-term osteomyelitis. A case report. *J Bone Joint Surg Am* **87**, 1343–1347 (2005).
247. Stengel, D., Bauwens, K., Sehouli, J., Ekkernkamp, A. & Porzolt, F. Systematic review and meta-analysis of antibiotic therapy for bone and joint infections. *Lancet Infect Dis* **1**, 175–188 (2001).
248. Conterno, L. O. & Turchi, M. D. Antibiotics for treating chronic osteomyelitis in adults. *Cochrane Database Syst Rev* CD004439 (2013) doi:10.1002/14651858.CD004439.pub3.

249. Mackintosh, C., White, H. & Seaton, R. Outpatient parenteral antibiotic therapy (OPAT) for bone and joint infections: Experience from a UK teaching hospital-based service. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **66**, 408–15 (2010).
250. Senneville, E. *et al.* Outcome and predictors of treatment failure in total hip/knee prosthetic joint infections due to *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* **53**, 334–340 (2011).
251. Widmer, A. F., Gaechter, A., Ochsner, P. E. & Zimmerli, W. Antimicrobial treatment of orthopedic implant-related infections with rifampin combinations. *Clin Infect Dis* **14**, 1251–1253 (1992).
252. Frippiat, F., Meunier, F. & Derue, G. Place of newer quinolones and rifampicin in the treatment of Gram-positive bone and joint infections. *J Antimicrob Chemother* **54**, 1158; author reply 1159 (2004).
253. Curis, E. *et al.* Pharmacokinetic variability of clindamycin and influence of rifampicin on clindamycin concentration in patients with bone and joint infections. *Infection* **43**, 473–481 (2015).
254. Shah, N. B., Tande, A. J., Patel, R. & Berbari, E. F. Anaerobic prosthetic joint infection. *Anaerobe* **36**, 1–8 (2015).
255. Landersdorfer, C. B., Bulitta, J. B., Kinzig, M., Holzgrabe, U. & Sörgel, F. Penetration of antibacterials into bone: pharmacokinetic, pharmacodynamic and bioanalytical considerations. *Clin Pharmacokinet* **48**, 89–124 (2009).
256. Graziani, A. L., Lawson, L. A., Gibson, G. A., Steinberg, M. A. & MacGregor, R. R. Vancomycin concentrations in infected and noninfected human bone. *Antimicrob Agents Chemother* **32**, 1320–1322 (1988).
257. de Lalla, F. *et al.* Regional and systemic prophylaxis with teicoplanin in monolateral and bilateral total knee replacement procedures: study of pharmacokinetics and tissue penetration. *Antimicrob Agents Chemother* **37**, 2693–2698 (1993).
258. Tice, A. D., Hoaglund, P. A. & Shoultz, D. A. Risk factors and treatment outcomes in osteomyelitis. *J Antimicrob Chemother* **51**, 1261–1268 (2003).
259. Stryjewski, M. E. *et al.* Use of vancomycin or first-generation cephalosporins for the treatment of hemodialysis-dependent patients with methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis* **44**, 190–196 (2007).
260. Kim, S.-H. *et al.* Outcome of vancomycin treatment in patients with methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 192–197 (2008).
261. Malizos, K. *et al.* Daptomycin for the treatment of osteomyelitis and orthopaedic device infections: real-world clinical experience from a European registry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **35**, 111–118 (2016).
262. Roux, S. *et al.* Daptomycin > 6 mg/kg/day as salvage therapy in patients with complex bone and joint infection: cohort study in a regional reference center. *BMC Infect Dis* **16**, 83 (2016).

263. Couderc, M. *et al.* 2020 French recommendations on the management of septic arthritis in an adult native joint. *Joint Bone Spine* **87**, 538–547 (2020).
264. Bone Tissue Adaptation. in *Tissue Mechanics* (eds. Cowin, S. C. & Doty, S. B.) 385–424 (Springer, 2007). doi:10.1007/978-0-387-49985-7_12.
265. Väänänen, H. K. & Laitala-Leinonen, T. Osteoclast lineage and function. *Arch Biochem Biophys* **473**, 132–138 (2008).
266. Bossy, E. Evaluation ultrasonore de l'os cortical par transmission axiale : modélisation et expérimentation in vitro et in vivo.
267. Blair, H. C. How the osteoclast degrades bone. *Bioessays* **20**, 837–846 (1998).
268. Mackie, E. J. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol* **35**, 1301–1305 (2003).
269. Blair, H. C., Teitelbaum, S. L., Ghiselli, R. & Gluck, S. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* **245**, 855–857 (1989).
270. Kornak, U. *et al.* Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell* **104**, 205–215 (2001).
271. Bossard, M. J. *et al.* Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification. *J Biol Chem* **271**, 12517–12524 (1996).
272. Drake, F. H. *et al.* Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. *J Biol Chem* **271**, 12511–12516 (1996).
273. Henderson, B. & Nair, S. P. Hard labour: bacterial infection of the skeleton. *Trends Microbiol* **11**, 570–577 (2003).
274. Baron, R. L'ostéoclaste et les mécanismes moléculaires de la résorption osseuse. *Med Sci (Paris)* **17**, 1260–1269 (2001).
275. Kwan Tat, S., Padrines, M., Théoleyre, S., Heymann, D. & Fortun, Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* **15**, 49–60 (2004).
276. Evans, C. A., Jellis, J., Hughes, S. P., Remick, D. G. & Friedland, J. S. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and interleukin-8 secretion and the acute-phase response in patients with bacterial and tuberculous osteomyelitis. *J Infect Dis* **177**, 1582–1587 (1998).
277. Klosterhalfen, B. *et al.* Local and systemic inflammatory mediator release in patients with acute and chronic posttraumatic osteomyelitis. *J Trauma* **40**, 372–378 (1996).
278. Osiri, M., Ruxrungtham, K., Nookhai, S., Ohmoto, Y. & Deesomchok, U. IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha in synovial fluid of patients with non-gonococcal septic arthritis. *Asian Pac J Allergy Immunol* **16**, 155–160 (1998).

279. Bost, K. L. *et al.* Staphylococcus aureus infection of mouse or human osteoblasts induces high levels of interleukin-6 and interleukin-12 production. *J Infect Dis* **180**, 1912–1920 (1999).
280. Ishimi, Y. *et al.* IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol* **145**, 3297–3303 (1990).
281. Marriott, I., Hughes, F. M. & Bost, K. L. Bacterial infection of osteoblasts induces interleukin-1beta and interleukin-18 transcription but not protein synthesis. *J Interferon Cytokine Res* **22**, 1049–1055 (2002).
282. Mundy, G. R. Inflammatory mediators and the destruction of bone. *J Periodontal Res* **26**, 213–217 (1991).
283. Pfeilschifter, J., Chenu, C., Bird, A., Mundy, G. R. & Roodman, G. D. Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclastlike cells in vitro. *J Bone Miner Res* **4**, 113–118 (1989).
284. Tokukoda, Y. *et al.* Interleukin-1beta stimulates transendothelial mobilization of human peripheral blood mononuclear cells with a potential to differentiate into osteoclasts in the presence of osteoblasts. *Endocr J* **48**, 443–452 (2001).
285. Azuma, Y., Kaji, K., Katogi, R., Takeshita, S. & Kudo, A. Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J Biol Chem* **275**, 4858–4864 (2000).
286. Taubman, M. A. & Kawai, T. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med* **12**, 125–135 (2001).
287. Thomson, B. M., Mundy, G. R. & Chambers, T. J. Tumor necrosis factors alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. *J Immunol* **138**, 775–779 (1987).
288. Kotake, S. *et al.* Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. *J Bone Miner Res* **11**, 88–95 (1996).
289. Lacey, D. C., Simmons, P. J., Graves, S. E. & Hamilton, J. A. Proinflammatory cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: implications for bone repair during inflammation. *Osteoarthritis Cartilage* **17**, 735–742 (2009).
290. Trouillet-Assant, S. *et al.* Dual impact of live Staphylococcus aureus on the osteoclast lineage, leading to increased bone resorption. *J Infect Dis* **211**, 571–581 (2015).
291. Claro, T. *et al.* Staphylococcus aureus Protein A Binds to Osteoblasts and Triggers Signals That Weaken Bone in Osteomyelitis. *PLOS ONE* **6**, e18748 (2011).
292. Fiedler, T. *et al.* Impact of bacteria and bacterial components on osteogenic and adipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* **319**, 2883–2892 (2013).
293. Shi, S.-F., Zhang, X.-L., Zhu, C., Chen, D. S. & Guo, Y.-Y. Ultrasonically enhanced rifampin activity against internalized Staphylococcus aureus. *Experimental and therapeutic medicine* **5**, 257–262 (2013).
294. Kintarak, S., Whawell, S. A., Speight, P. M., Packer, S. & Nair, S. P. Internalization of Staphylococcus aureus by Human Keratinocytes. *Infect Immun* **72**, 5668–5675 (2004).

295. Ellington, J. K. *et al.* Mechanisms of Staphylococcus aureus invasion of cultured osteoblasts. *Microb Pathog* **26**, 317–323 (1999).
296. Hudson, M. C., Ramp, W. K., Nicholson, N. C., Williams, A. S. & Nousiainen, M. T. Internalization of Staphylococcus aureus by cultured osteoblasts. *Microb Pathog* **19**, 409–419 (1995).
297. Jevon, M. *et al.* Mechanisms of internalization of Staphylococcus aureus by cultured human osteoblasts. *Infect Immun* **67**, 2677–2681 (1999).
298. Reilly, S. S., Hudson, M. C., Kellam, J. F. & Ramp, W. K. In vivo internalization of Staphylococcus aureus by embryonic chick osteoblasts. *Bone* **26**, 63–70 (2000).
299. Hamza, T. *et al.* Intra-cellular Staphylococcus aureus alone causes infection in vivo. *Eur Cell Mater* **25**, 341–350; discussion 350 (2013).
300. Ellington, J. K. *et al.* Intracellular Staphylococcus aureus. A mechanism for the indolence of osteomyelitis. *J Bone Joint Surg Br* **85**, 918–921 (2003).
301. Xu, K. D., McFeters, G. A. & Stewart, P. S. Biofilm resistance to antimicrobial agents. *Microbiology (Reading)* **146 (Pt 3)**, 547–549 (2000).
302. Schwank, S., Rajacic, Z., Zimmerli, W. & Blaser, J. Impact of Bacterial Biofilm Formation on In Vitro and In Vivo Activities of Antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 895–898 (1998).
303. Monzón, M., Oteiza, C., Leiva, J., Lamata, M. & Amorena, B. Biofilm testing of Staphylococcus epidermidis clinical isolates: low performance of vancomycin in relation to other antibiotics. *Diagn Microbiol Infect Dis* **44**, 319–324 (2002).
304. von Eiff, C., Peters, G. & Becker, K. The small colony variant (SCV) concept -- the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. *Injury* **37 Suppl 2**, S26-33 (2006).
305. Tuchscher, L. *et al.* Staphylococcus aureus small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. *J Infect Dis* **202**, 1031–1040 (2010).
306. Gagnaire, J. *et al.* Detection of Staphylococcus aureus Delta-Toxin Production by Whole-Cell MALDI-TOF Mass Spectrometry. *PLOS ONE* **7**, e40660 (2012).
307. Valour, F. *et al.* Antimicrobial activity against intraosteoblastic Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother* **59**, 2029–2036 (2015).
308. Abe, Y. *et al.* Development of mineralized nodules in fetal rat mandibular osteogenic precursor cells: requirement for dexamethasone but not for beta-glycerophosphate. *Calcif Tissue Int* **66**, 66–69 (2000).
309. Bellows, C. G., Aubin, J. E., Heersche, J. N. M. & Antosz, M. E. Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif Tissue Int* **38**, 143–154 (1986).
310. Cao, X.-Y., Yin, M.-Z., Zhang, L.-N., Li, S.-P. & Cao, Y. Establishment of a new model for culturing rabbit osteoblasts in vitro. *Biomed Mater* **1**, L16-19 (2006).

311. Collignon, H., Davicco, M. J. & Barlet, J. P. Isolation of cells from ovine fetal long bone and characterization of their osteoblastic activities during in vitro mineralization. *Arch Physiol Biochem* **105**, 158–166 (1997).
312. Wang, D. *et al.* Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential. *J Bone Miner Res* **14**, 893–903 (1999).
313. Billiau, A. *et al.* Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63. *Antimicrob Agents Chemother* **12**, 11–15 (1977).
314. Rodan, S. B. *et al.* Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. *Cancer Res* **47**, 4961–4966 (1987).
315. Czekanska, E. M., Stoddart, M. J., Richards, R. G. & Hayes, J. S. In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *Eur Cell Mater* **24**, 1–17 (2012).
316. Czekanska, E. M., Stoddart, M. J., Ralphs, J. R., Richards, R. G. & Hayes, J. S. A phenotypic comparison of osteoblast cell lines versus human primary osteoblasts for biomaterials testing. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **102**, 2636–2643 (2014).
317. Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L. & Karsenty, G. *Osf2/Cbfa1*: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation. *Cell* **89**, 747–754 (1997).
318. Wenstrup, R. J., Witte, D. P. & Florer, J. B. Abnormal differentiation in MC3T3-E1 preosteoblasts expressing a dominant-negative type I collagen mutation. *Connect Tissue Res* **35**, 249–257 (1996).
319. Ryoo, H. M. *et al.* Stage-specific expression of *Dlx-5* during osteoblast differentiation: involvement in regulation of osteocalcin gene expression. *Mol Endocrinol* **11**, 1681–1694 (1997).
320. Kirkham, G. & Cartmell, S. Genes and Proteins Involved in the Regulation of Osteogenesis. *Topics in Tissue Engineering* **3**, (2007).
321. Ahmed, S. *et al.* Staphylococcus aureus fibronectin binding proteins are essential for internalization by osteoblasts but do not account for differences in intracellular levels of bacteria. *Infect Immun* **69**, 2872–2877 (2001).
322. Jauregui, C. e., Mansell, J. p., Jepson, M. a. & Jenkinson, H. f. Differential interactions of *Streptococcus gordonii* and *Staphylococcus aureus* with cultured osteoblasts. *Molecular Oral Microbiology* **28**, 250–266 (2013).
323. Schroder, K. & Tschopp, J. The Inflammasomes. *Cell* **140**, 821–832 (2010).
324. Lamkanfi, M. & Dixit, V. M. The inflammasomes. *PLoS Pathog* **5**, e1000510 (2009).
325. Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E. & Flavell, R. Inflammasomes in health and disease. *Nature* **481**, 278–286 (2012).
326. Dinarello, C. A., Simon, A. & van der Meer, J. W. M. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov* **11**, 633–652 (2012).

327. Bongiorno, D. *et al.* Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* persistence in osteoblasts using imaging flow cytometry. *MicrobiologyOpen* **9**, e1017 (2020).
328. Johansen, L. K. & Jensen, H. E. Animal models of hematogenous *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in long bones: a review. *ORR* **5**, 51–64 (2013).
329. An, Y. H., Kang, Q. K. & Arciola, C. R. Animal Models of Osteomyelitis. *Int J Artif Organs* **29**, 407–420 (2006).
330. Mader, J. T. Animal models of osteomyelitis. *The American Journal of Medicine* **78**, 213–217 (1985).
331. Thompson, R. H. & Dubos, R. J. PRODUCTION OF EXPERIMENTAL OSTEOMYELITIS IN RABBITS BY INTRAVENOUS INJECTION OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS. *J Exp Med* **68**, 191–206 (1938).
332. Starr, C. L. Acute hematogenous osteomyelitis. Clarence L. Starr, M.D. (1868-1928). 1922. *Clin Orthop Relat Res* 4–7 (2002).
333. SCHEMAN, L., JANOTA, M. & LEWIN, P. THE PRODUCTION OF EXPERIMENTAL OSTEOMYELITIS: PRELIMINARY REPORT. *Journal of the American Medical Association* **117**, 1525–1529 (1941).
334. Hamblen, D. L. Hyperbaric Oxygenation: ITS EFFECT ON EXPERIMENTAL STAPHYLOCOCCAL OSTEOMYELITIS IN RATS. *JBJS* **50**, 1129 (1968).
335. Fitzgerald, R. H. J. Experimental osteomyelitis: description of a canine model and the role of depot administration of antibiotics in the prevention and treatment of sepsis. *JBJS* **65**, 371 (1983).
336. Deysine, M., Rosario, E. & Isenberg, H. D. Acute hematogenous osteomyelitis: an experimental model. *Surgery* **79**, 97–99 (1976).
337. Passl, R., Weber, P., Egkher, E. & Kovac, W. [Acute and chronic experimental posttraumatic osteomyelitis in guinea pigs]. *Helv Chir Acta* **46**, 163–165 (1979).
338. Emslie, K. R., Ozanne, N. R. & Nade, S. M. Acute haematogenous osteomyelitis: an experimental model. *J Pathol* **141**, 157–167 (1983).
339. Emslie, K. R. & Nade, S. Acute hematogenous staphylococcal osteomyelitis. A description of the natural history in an avian model. *Am J Pathol* **110**, 333–345 (1983).
340. Patterson, A. L., Galloway, R. H., Baumgartner, J. C. & Barsoum, I. S. Development of chronic mandibular osteomyelitis in a miniswine model. *J Oral Maxillofac Surg* **51**, 1358–1362 (1993).
341. Kaarsemaker, S., Walenkamp, G. H. & vd Bogaard, A. E. New model for chronic osteomyelitis with *Staphylococcus aureus* in sheep. *Clin Orthop Relat Res* 246–252 (1997) doi:10.1097/00003086-199706000-00033.
342. Aerssens, J., Boonen, S., Lowet, G. & Dequeker, J. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology* **139**, 663–670 (1998).
343. Swindle, M. & Smith, A. C. Comparative anatomy and physiology of the pig. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science* **25**, 11–21 (1998).

344. Wang, Y. *et al.* Mouse model of hematogenous implant-related *Staphylococcus aureus* biofilm infection reveals therapeutic targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E5094–E5102 (2017).
345. Meroni, G. *et al.* A Journey into Animal Models of Human Osteomyelitis: A Review. *Microorganisms* **10**, 1135 (2022).
346. Katz, L. & Baltz, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. *J Ind Microbiol Biotechnol* **43**, 155–176 (2016).
347. Haas, L. F. Papyrus of Ebers and Smith. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* **67**, 578–578 (1999).
348. Fleming, A. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol* **10**, 226–236 (1929).
349. Silver, L. L. Challenges of Antibacterial Discovery. *Clin Microbiol Rev* **24**, 71–109 (2011).
350. Prescott, J. F. The resistance tsunami, antimicrobial stewardship, and the golden age of microbiology. *Vet Microbiol* **171**, 273–278 (2014).
351. Cook, M. A. & Wright, G. D. The past, present, and future of antibiotics. *Sci. Transl. Med.* **14**, eabo7793 (2022).
352. European Centre for Disease Prevention and Control (EU body or agency) *et al.* *Assessing the health burden of infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU/EEA, 2016-2020*. (Publications Office of the European Union, 2022).
353. Walsh, C. T. & Wencewicz, T. A. Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective. *J Antibiot* **67**, 7–22 (2014).
354. Anderson, M. *et al.* Challenges and opportunities for incentivising antibiotic research and development in Europe. *Lancet Reg Health Eur* **33**, 100705 (2023).
355. Payne, D. J., Gwynn, M. N., Holmes, D. J. & Pompliano, D. L. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 29–40 (2007).
356. Hutchings, M. I., Truman, A. W. & Wilkinson, B. Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology* **51**, 72–80 (2019).
357. Kapoor, G., Saigal, S. & Elongavan, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol* **33**, 300–305 (2017).
358. Fijalkowska, I. J., Schaaper, R. M. & Jonczyk, P. DNA replication fidelity in *Escherichia coli*: a multi-DNA polymerase affair. *FEMS Microbiol Rev* **36**, 1105–1121 (2012).
359. Wistrand-Yuen, E. *et al.* Evolution of high-level resistance during low-level antibiotic exposure. *Nat Commun* **9**, 1599 (2018).

360. Magiorakos, A.-P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* **18**, 268–281 (2012).
361. Barcudi, D. *et al.* MRSA dynamic circulation between the community and the hospital setting: New insights from a cohort study. *J Infect* **80**, 24–37 (2020).
362. Mlynarczyk-Bonikowska, B., Kowalewski, C., Krolak-Ulinska, A. & Marusza, W. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Int J Mol Sci* **23**, 8088 (2022).
363. Ling, L. L. *et al.* A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* **517**, 455–459 (2015).
364. Imai, Y. *et al.* A new antibiotic selectively kills Gram-negative pathogens. *Nature* **576**, 459–464 (2019).
365. Culp, E. J. *et al.* Evolution-guided discovery of antibiotics that inhibit peptidoglycan remodelling. *Nature* **578**, 582–587 (2020).
366. O’Shea, R. & Moser, H. E. Physicochemical properties of antibacterial compounds: implications for drug discovery. *J Med Chem* **51**, 2871–2878 (2008).
367. Richter, M. F. & Hergenrother, P. J. The challenge of converting Gram-positive-only compounds into broad-spectrum antibiotics. *Ann N Y Acad Sci* **1435**, 18–38 (2019).
368. Liu, F. & Myers, A. G. Development of a platform for the discovery and practical synthesis of new tetracycline antibiotics. *Curr Opin Chem Biol* **32**, 48–57 (2016).
369. Myers, A. G. & Clark, R. B. Discovery of Macrolide Antibiotics Effective against Multi-Drug Resistant Gram-Negative Pathogens. *Acc Chem Res* **54**, 1635–1645 (2021).
370. Mitcheltree, M. J. *et al.* A synthetic antibiotic class overcoming bacterial multidrug resistance. *Nature* **599**, 507–512 (2021).
371. Stokes, J. M. *et al.* A Deep Learning Approach to Antibiotic Discovery. *Cell* **181**, 475–483 (2020).
372. Ouyang, P. *et al.* Erianin against *Staphylococcus aureus* Infection via Inhibiting Sortase A. *Toxins* **10**, 385 (2018).
373. Mühlen, S. & Dersch, P. Anti-virulence Strategies to Target Bacterial Infections. *Curr Top Microbiol Immunol* **398**, 147–183 (2016).
374. Aggarwal, C. *et al.* Identification of Quorum-Sensing Inhibitors Disrupting Signaling between Rgg and Short Hydrophobic Peptides in *Streptococci*. *mBio* **6**, e00393-00315 (2015).
375. Koppolu, V. *et al.* Small-Molecule Inhibitor of the *Shigella flexneri* Master Virulence Regulator VirF. *Infect Immun* **81**, 4220–4231 (2013).
376. Zahid, M. S. H. *et al.* Suppression of Virulence of Toxigenic *Vibrio cholerae* by Anethole through the Cyclic AMP (cAMP)-cAMP Receptor Protein Signaling System. *PLoS One* **10**, e0137529 (2015).

377. Sully, E. K. *et al.* Selective chemical inhibition of agr quorum sensing in *Staphylococcus aureus* promotes host defense with minimal impact on resistance. *PLoS Pathog* **10**, e1004174 (2014).
378. Rasko, D. A. *et al.* Targeting QseC Signaling and Virulence for Antibiotic Development. *Science* **321**, 1078–1080 (2008).
379. Fleitas Martínez, O., Cardoso, M. H., Ribeiro, S. M. & Franco, O. L. Recent Advances in Anti-virulence Therapeutic Strategies With a Focus on Dismantling Bacterial Membrane Microdomains, Toxin Neutralization, Quorum-Sensing Interference and Biofilm Inhibition. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **9**, (2019).
380. Lin, D. M., Koskella, B. & Lin, H. C. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* **8**, 162–173 (2017).
381. Hill, C., Mills, S. & Ross, R. P. Phages & antibiotic resistance: are the most abundant entities on earth ready for a comeback? *Future Microbiol* **13**, 711–726 (2018).
382. Połaska, M. & Sokołowska, B. Bacteriophages-a new hope or a huge problem in the food industry. *AIMS Microbiol* **5**, 324–346 (2019).
383. Broncano-Lavado, A., Santamaría-Corral, G., Esteban, J. & García-Quintanilla, M. Advances in Bacteriophage Therapy against Relevant MultiDrug-Resistant Pathogens. *Antibiotics (Basel)* **10**, 672 (2021).
384. Abdelkader, K., Gerstmans, H., Saafan, A., Dishisha, T. & Briers, Y. The Preclinical and Clinical Progress of Bacteriophages and Their Lytic Enzymes: The Parts are Easier than the Whole. *Viruses* **11**, 96 (2019).
385. Aghaee, B. L., Mirzaei, M. K., Alikhani, M. Y. & Mojtahedi, A. Sewage and sewage-contaminated environments are the most prominent sources to isolate phages against *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol* **21**, 132 (2021).
386. Göller, P. C. *et al.* Multi-species host range of staphylococcal phages isolated from wastewater. *Nat Commun* **12**, 6965 (2021).
387. Chen, Y. *et al.* Genetic Engineering of Bacteriophages Against Infectious Diseases. *Front Microbiol* **10**, 954 (2019).
388. Mullard, A. FDA approves 100th monoclonal antibody product. *Nat Rev Drug Discov* **20**, 491–495 (2021).
389. Antibody therapeutics approved or in regulatory review in the EU or US. *The Antibody Society* <https://www.antibodysociety.org/resources/approved-antibodies/>.
390. Lu, R.-M. *et al.* Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J Biomed Sci* **27**, 1 (2020).
391. Zahavi, D. & Weiner, L. Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. *Antibodies* **9**, 34 (2020).
392. Drago, J. Z., Modi, S. & Chandarlapaty, S. Unlocking the potential of antibody-drug conjugates for cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* **18**, 327–344 (2021).

393. Ma, J. *et al.* Bispecific Antibodies: From Research to Clinical Application. *Front Immunol* **12**, 626616 (2021).
394. Yamamoto, B. J. *et al.* Obiltoximab Prevents Disseminated Bacillus anthracis Infection and Improves Survival during Pre- and Postexposure Prophylaxis in Animal Models of Inhalational Anthrax. *Antimicrob Agents Chemother* **60**, 5796–5805 (2016).
395. Migone, T.-S. *et al.* Raxibacumab for the treatment of inhalational anthrax. *N Engl J Med* **361**, 135–144 (2009).
396. Goldenberg, J. Z. *et al.* Probiotics for the prevention of Clostridium difficile-associated diarrhea in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev* **12**, CD006095 (2017).
397. Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R. & Rastall, R. A. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **16**, 605–616 (2019).
398. Commissioner, O. of the. Fecal Microbiota for Transplantation: Safety Alert - Risk of Serious Adverse Events Likely Due to Transmission of Pathogenic Organisms. *FDA* (2020).
399. Theuretzbacher, U., Outterson, K., Engel, A. & Karlén, A. The global preclinical antibacterial pipeline. *Nat Rev Microbiol* **18**, 275–285 (2020).
400. van Werkhoven, C. H. *et al.* Incidence and predictive biomarkers of Clostridioides difficile infection in hospitalized patients receiving broad-spectrum antibiotics. *Nat Commun* **12**, 2240 (2021).
401. Montassier, E. *et al.* Probiotics impact the antibiotic resistance gene reservoir along the human GI tract in a person-specific and antibiotic-dependent manner. *Nat Microbiol* **6**, 1043–1054 (2021).
402. Lewnard, J. A., Lo, N. C., Arinaminpathy, N., Frost, I. & Laxminarayan, R. Childhood vaccines and antibiotic use in low- and middle-income countries. *Nature* **581**, 94–99 (2020).
403. Heilmann, K. P. *et al.* Decreasing prevalence of beta-lactamase production among respiratory tract isolates of Haemophilus influenzae in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 2561–2564 (2005).
404. Tomczyk, S. *et al.* Prevention of Antibiotic-Nonsusceptible Invasive Pneumococcal Disease With the 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine. *Clin Infect Dis* **62**, 1119–1125 (2016).
405. Jansen, K. U., Gruber, W. C., Simon, R., Wassil, J. & Anderson, A. S. The impact of human vaccines on bacterial antimicrobial resistance. A review. *Environ Chem Lett* **19**, 4031–4062 (2021).
406. Pipeline of vaccines. *TBVI* <https://www.tbvi.eu/what-we-do/pipeline-of-vaccines/>.
407. Tam, J. P., Wang, S., Wong, K. H. & Tan, W. L. Antimicrobial Peptides from Plants. *Pharmaceuticals (Basel)* **8**, 711–757 (2015).
408. Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389–395 (2002).
409. Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J. L. & Hoffmann, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev Comp Immunol* **23**, 329–344 (1999).

410. Wang, G., Li, X. & Wang, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res* **44**, D1087-1093 (2016).
411. Fjell, C. D., Hiss, J. A., Hancock, R. E. W. & Schneider, G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nat Rev Drug Discov* **11**, 37–51 (2012).
412. Tossi, A., Sandri, L. & Giangaspero, A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **55**, 4–30 (2000).
413. Huang, Y., Huang, J. & Chen, Y. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. *Protein Cell* **1**, 143–152 (2010).
414. Chan, D. I., Prenner, E. J. & Vogel, H. J. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta* **1758**, 1184–1202 (2006).
415. Scocchi, M., Tossi, A. & Gennaro, R. Proline-rich antimicrobial peptides: converging to a non-lytic mechanism of action. *Cell Mol Life Sci* **68**, 2317–2330 (2011).
416. Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M. & Tempst, P. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J* **8**, 2387–2391 (1989).
417. Koehbach, J. & Craik, D. J. The Vast Structural Diversity of Antimicrobial Peptides. *Trends Pharmacol Sci* **40**, 517–528 (2019).
418. Hancock, R. E. & Chapple, D. S. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 1317–1323 (1999).
419. Aguilera-Mendoza, L. *et al.* Overlap and diversity in antimicrobial peptide databases: compiling a non-redundant set of sequences. *Bioinformatics* **31**, 2553–2559 (2015).
420. ET_MUFOPAM_16mars2016_DIVERSITESTRUTURALE_part1_CELINE_LANDON.pdf. *Google Docs* https://drive.google.com/file/d/15ZfW16ay84nYtqiTpsur9qaiCtp6bF11/view?usp=gmail&usp=embed_fac ebook.
421. Blondelle, S. E. & Houghten, R. A. Design of model amphipathic peptides having potent antimicrobial activities. *Biochemistry* **31**, 12688–12694 (1992).
422. Melo, M. N., Ferre, R. & Castanho, M. A. R. B. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nat Rev Microbiol* **7**, 245–250 (2009).
423. Roversi, D. *et al.* How many antimicrobial peptide molecules kill a bacterium? The case of PMAP-23. *ACS Chem Biol* **9**, 2003–2007 (2014).
424. Torrent, M., Valle, J., Nogués, M. V., Boix, E. & Andreu, D. The Generation of Antimicrobial Peptide Activity: A Trade-off between Charge and Aggregation? *Angewandte Chemie International Edition* **50**, 10686–10689 (2011).
425. Mergaert, P. Role of antimicrobial peptides in controlling symbiotic bacterial populations. *Nat Prod Rep* **35**, 336–356 (2018).

426. Oppedijk, S. F., Martin, N. I. & Breukink, E. Hit 'em where it hurts: The growing and structurally diverse family of peptides that target lipid-II. *Biochim Biophys Acta* **1858**, 947–957 (2016).
427. Hasper, H. E. *et al.* An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II. *Science* **313**, 1636–1637 (2006).
428. Pogliano, J., Pogliano, N. & Silverman, J. A. Daptomycin-mediated reorganization of membrane architecture causes mislocalization of essential cell division proteins. *J Bacteriol* **194**, 4494–4504 (2012).
429. Lee, E. Y., Lee, M. W., Fulan, B. M., Ferguson, A. L. & Wong, G. C. L. What can machine learning do for antimicrobial peptides, and what can antimicrobial peptides do for machine learning? *Interface Focus* **7**, 20160153 (2017).
430. Scocchi, M., Mardirossian, M., Runti, G. & Benincasa, M. Non-Membrane Permeabilizing Modes of Action of Antimicrobial Peptides on Bacteria. *Curr Top Med Chem* **16**, 76–88 (2016).
431. Mattiuzzo, M. *et al.* Role of the Escherichia coli SbmA in the antimicrobial activity of proline-rich peptides. *Mol Microbiol* **66**, 151–163 (2007).
432. Handler, A. A., Lim, J. E. & Losick, R. Peptide inhibitor of cytokinesis during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **68**, 588–599 (2008).
433. Yadavalli, S. S. *et al.* Antimicrobial peptides trigger a division block in *Escherichia coli* through stimulation of a signalling system. *Nat Commun* **7**, 12340 (2016).
434. Otto, M. Bacterial sensing of antimicrobial peptides. *Contrib Microbiol* **16**, 136–149 (2009).
435. Cole, J. N. & Nizet, V. Bacterial Evasion of Host Antimicrobial Peptide Defenses. *Microbiology Spectrum* **4**, 10.1128/microbiolspec.vmbf-0006–2015 (2016).
436. Nguyen, L. T., Haney, E. F. & Vogel, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol* **29**, 464–472 (2011).
437. Boucher, H. W. *et al.* Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **48**, 1–12 (2009).
438. Giuliani, A. *et al.* Antimicrobial peptides: natural templates for synthetic membrane-active compounds. *Cell Mol Life Sci* **65**, 2450–2460 (2008).
439. Gould, K. Antibiotics: from prehistory to the present day. *J Antimicrob Chemother* **71**, 572–575 (2016).
440. Loose, C., Jensen, K., Rigoutsos, I. & Stephanopoulos, G. A linguistic model for the rational design of antimicrobial peptides. *Nature* **443**, 867–869 (2006).
441. Porto, W. F., Pires, A. S. & Franco, O. L. Computational tools for exploring sequence databases as a resource for antimicrobial peptides. *Biotechnol Adv* **35**, 337–349 (2017).
442. Porto, W. F., Fensterseifer, I. C. M., Ribeiro, S. M. & Franco, O. L. Joker: An algorithm to insert patterns into sequences for designing antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **1862**, 2043–2052 (2018).

443. Torres, M. D. T., Sothiselvam, S., Lu, T. K. & de la Fuente-Nunez, C. Peptide Design Principles for Antimicrobial Applications. *J Mol Biol* **431**, 3547–3567 (2019).
444. Li, J. *et al.* Membrane Active Antimicrobial Peptides: Translating Mechanistic Insights to Design. *Frontiers in Neuroscience* **11**, (2017).
445. Cherkasov, A. *et al.* Use of artificial intelligence in the design of small peptide antibiotics effective against a broad spectrum of highly antibiotic-resistant superbugs. *ACS Chem Biol* **4**, 65–74 (2009).
446. Hänchen, A. *et al.* Alanine scan of the peptide antibiotic feglymycin: assessment of amino acid side chains contributing to antimicrobial activity. *Chembiochem* **14**, 625–632 (2013).
447. Hancock, R. E. W. Concerns regarding resistance to self-proteins. *Microbiology (Reading)* **149**, 3343–3344 (2003).
448. Fleitas, O. & Franco, O. L. Induced Bacterial Cross-Resistance toward Host Antimicrobial Peptides: A Worrying Phenomenon. *Front Microbiol* **7**, 381 (2016).
449. Maria-Neto, S., de Almeida, K. C., Macedo, M. L. R. & Franco, O. L. Understanding bacterial resistance to antimicrobial peptides: From the surface to deep inside. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1848**, 3078–3088 (2015).
450. Yu, G., Baeder, D. Y., Regoes, R. R. & Rolff, J. Predicting drug resistance evolution: insights from antimicrobial peptides and antibiotics. *Proc Biol Sci* **285**, 20172687 (2018).
451. Rodríguez-Rojas, A., Makarova, O. & Rolff, J. Antimicrobials, stress and mutagenesis. *PLoS Pathog* **10**, e1004445 (2014).
452. Amso, Z. & Hayouka, Z. Antimicrobial random peptide cocktails: a new approach to fight pathogenic bacteria. *Chem. Commun.* **55**, 2007–2014 (2019).
453. da Cunha, N. B. *et al.* The next generation of antimicrobial peptides (AMPs) as molecular therapeutic tools for the treatment of diseases with social and economic impacts. *Drug Discov Today* **22**, 234–248 (2017).
454. Zhu, X. *et al.* Design of imperfectly amphipathic α -helical antimicrobial peptides with enhanced cell selectivity. *Acta Biomater* **10**, 244–257 (2014).
455. Piotrowska, U., Sobczak, M. & Oledzka, E. Current state of a dual behaviour of antimicrobial peptides- Therapeutic agents and promising delivery vectors. *Chem Biol Drug Des* **90**, 1079–1093 (2017).
456. Biswaro, L. S., da Costa Sousa, M. G., Rezende, T. M. B., Dias, S. C. & Franco, O. L. Antimicrobial Peptides and Nanotechnology, Recent Advances and Challenges. *Frontiers in Microbiology* **9**, (2018).
457. Clark, R. J. *et al.* Engineering stable peptide toxins by means of backbone cyclization: stabilization of the alpha-conotoxin MII. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13767–13772 (2005).
458. Gomes, B. *et al.* Designing improved active peptides for therapeutic approaches against infectious diseases. *Biotechnol Adv* **36**, 415–429 (2018).

459. Ghosh, C., Sarkar, P., Issa, R. & Haldar, J. Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance. *Trends Microbiol* **27**, 323–338 (2019).
460. Sayed, N., Jousselin, A. & Felden, B. A cis-antisense RNA acts in trans in *Staphylococcus aureus* to control translation of a human cytolytic peptide. *Nature Structural and Molecular Biology* **19**, 105 (2012).
461. Solecki, O., Mosbah, A., Baudy Floc'h, M. & Felden, B. Converting a *Staphylococcus aureus* toxin into effective cyclic pseudopeptide antibiotics. *Chem Biol* **22**, 329–335 (2015).
462. Dong, N. *et al.* Strand Length-Dependent Antimicrobial Activity and Membrane-Active Mechanism of Arginine- and Valine-Rich β -Hairpin-Like Antimicrobial Peptides. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 2994–3003 (2012).
463. Sundriyal, S., Sharma, R. K., Jain, R. & Bharatam, P. V. Minimum requirements of hydrophobic and hydrophilic features in cationic peptide antibiotics (CPAs): pharmacophore generation and validation with cationic steroid antibiotics (CSAs). *Journal of Molecular Modeling* **14**, 265–278 (2008).
464. Laurencin, M., Amor, M., Fleury, Y. & Baudy-Floc'h, M. De novo cyclic pseudopeptides containing aza- β -amino acids exhibiting antimicrobial activities. *J Med Chem* **55**, 10885–10895 (2012).
465. Dathe, M., Nikolenko, H., Klose, J. & Bienert, M. Cyclization increases the antimicrobial activity and selectivity of arginine- and tryptophan-containing hexapeptides. *Biochemistry* **43**, 9140–9150 (2004).
466. Solecki, O., Mosbah, A., Baudy Floc'h, M. & Felden, B. Converting a *Staphylococcus aureus* Toxin into Effective Cyclic Pseudopeptide Antibiotics. *Chemistry & Biology* **22**, 329–335 (2015).
467. Nicolas, I., Bordeau, V., Bondon, A., Baudy-Floc'h, M. & Felden, B. Novel antibiotics effective against gram-positive and -negative multi-resistant bacteria with limited resistance. *PLOS Biology* **17**, e3000337 (2019).
468. eucast: EUCAST. <https://www.eucast.org/>.
469. Courvalin Patrice. *L'antibiogramme / P. Courvalin, F. Goldstein, A. Philippon... [et al.]*. (MPC Vigot, 1985).
470. Berenbaum, M. C. What is synergy? *Pharmacol Rev* **41**, 93–141 (1989).
471. Browne, K. *et al.* Antimicrobial Peptidomimetics Prevent the Development of Resistance against Gentamicin and Ciprofloxacin in *Staphylococcus* and *Pseudomonas* Bacteria. *International Journal of Molecular Sciences* **24**, 14966 (2023).
472. Abad, L. *et al.* Antibiofilm and intraosteoblastic activities of rifamycins against *Staphylococcus aureus*: promising in vitro profile of rifabutin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **75**, 1466–1473 (2020).
473. Meléndez-Carmona, M., Muñoz-Gallego, I., Viedma, E., Lora-Tamayo, J. & Chaves, F. Intraosteoblastic Activity of Levofloxacin and Rifampin Alone and in Combination Against Clinical Isolates of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* causing Prosthetic Joint Infection. *International Journal of Antimicrobial Agents* **54**, (2019).

474. Chauvelot, P. *et al.* Evaluation of intraosteoblastic activity of dalbavancin against *Staphylococcus aureus* in an ex vivo model of bone cell infection. *J Antimicrob Chemother* **76**, 2863–2866 (2021).
475. Zelmer, A. R., Nelson, R., Richter, K. & Atkins, G. J. Can intracellular *Staphylococcus aureus* in osteomyelitis be treated using current antibiotics? A systematic review and narrative synthesis. *Bone Res* **10**, 1–18 (2022).
476. Park, E. K. *et al.* Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm Res* **56**, 45–50 (2007).
477. Becher, F. *et al.* A simple and rapid LC-MS/MS method for therapeutic drug monitoring of cetuximab: a GPCO-UNICANCER proof of concept study in head-and-neck cancer patients. *Sci Rep* **7**, 2714 (2017).
478. Skalnikova, H., Cizkova, J., Červenka, J. & Vodicka, P. Advances in Proteomic Techniques for Cytokine Analysis: Focus on Melanoma Research. *International Journal of Molecular Sciences* **18**, 2697 (2017).
479. Sharma, D., Misba, L. & Khan, A. U. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* **8**, 76 (2019).
480. Franklin, M. J., Chang, C., Akiyama, T. & Bothner, B. New Technologies for Studying Biofilms. *Microbiol Spectr* **3**, (2015).
481. Peeters, E., Nelis, H. J. & Coenye, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods* **72**, 157–165 (2008).
482. Ommen, P., Zobek, N. & Meyer, R. L. Quantification of biofilm biomass by staining: Non-toxic safranin can replace the popular crystal violet. *Journal of Microbiological Methods* **141**, 87–89 (2017).
483. Van den Driessche, F., Rigole, P., Brackman, G. & Coenye, T. Optimization of resazurin-based viability staining for quantification of microbial biofilms. *Journal of Microbiological Methods* **98**, 31–34 (2014).
484. Stiefel, P., Schmidt-Emrich, S., Maniura-Weber, K. & Ren, Q. Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC Microbiology* **15**, 36 (2015).
485. Atienza, J. M., Zhu, J., Wang, X., Xu, X. & Abassi, Y. Dynamic monitoring of cell adhesion and spreading on microelectronic sensor arrays. *J Biomol Screen* **10**, 795–805 (2005).
486. Ferrer, M. D. *et al.* Effect of antibiotics on biofilm inhibition and induction measured by real-time cell analysis. *J Appl Microbiol* **122**, 640–650 (2017).
487. Chosidow, S. *et al.* Synergistic Activity of Pep16, a Promising New Antibacterial Pseudopeptide against Multidrug-Resistant Organisms, in Combination with Colistin against Multidrug-Resistant *Escherichia coli*, In Vitro and in a Murine Peritonitis Model. *Antibiotics* **12**, 81 (2023).
488. Häffner, N. *et al.* Intracellular Environment and agr System Affect Colony Size Heterogeneity of *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol* **11**, 1415 (2020).

489. Barcia-Macay, M., Seral, C., Mingeot-Leclercq, M.-P., Tulkens, P. M. & Van Bambeke, F. Pharmacodynamic evaluation of the intracellular activities of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a model of THP-1 macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 841–851 (2006).
490. Yang, X. *et al.* Eradicating intracellular MRSA via targeted delivery of lysostaphin and vancomycin with mannose-modified exosomes. *Journal of Controlled Release* **329**, 454–467 (2021).
491. Yang, X., Shi, G., Guo, J., Wang, C. & He, Y. Exosome-encapsulated antibiotic against intracellular infections of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Nanomedicine* **13**, 8095–8104 (2018).
492. Abad, L. *et al.* Lysosomal alkalization to potentiate eradication of intra-osteoblastic *Staphylococcus aureus* in the bone and joint infection setting. *Clinical Microbiology and Infection* **28**, 135.e1-135.e7 (2022).
493. The Biofilm Laboratory: Step-by-Step Protocols for Experimental Design, Analysis, and Data Interpretation - Martin Hamilton; Joanna Heersink; Kelli Buckingham-Meyer; Darla Goeres: 9780974180229 - AbeBooks. <https://www.abebooks.com/9780974180229/Biofilm-Laboratory-Step-by-Step-Protocols-Experimental-097418022X/plp>.
494. Ribeiro, S. M. *et al.* New frontiers for anti-biofilm drug development. *Pharmacol Ther* **160**, 133–144 (2016).
495. Kaplan, J. B. Antibiotic-induced biofilm formation. *Int J Artif Organs* **34**, 737–751 (2011).
496. Kaandorp, C. J., Van Schaardenburg, D., Krijnen, P., Habbema, J. D. & van de Laar, M. A. Risk factors for septic arthritis in patients with joint disease. A prospective study. *Arthritis Rheum* **38**, 1819–1825 (1995).
497. Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L. & Fowler, V. G. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clin Microbiol Rev* **28**, 603–661 (2015).
498. Jin, T., Mohammad, M., Pullerits, R. & Ali, A. Bacteria and Host Interplay in *Staphylococcus aureus* Septic Arthritis and Sepsis. *Pathogens* **10**, 158 (2021).
499. Lowy, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* **339**, 520–532 (1998).
500. Smith, R. L., Kajiyama, G. & Schurman, D. J. Staphylococcal septic arthritis: antibiotic and nonsteroidal anti-inflammatory drug treatment in a rabbit model. *J Orthop Res* **15**, 919–926 (1997).
501. Sakiniene, E., Bremell, T. & Tarkowski, A. Addition of corticosteroids to antibiotic treatment ameliorates the course of experimental *Staphylococcus aureus* arthritis. *Arthritis Rheum* **39**, 1596–1605 (1996).
502. Fei, Y. *et al.* The combination of a tumor necrosis factor inhibitor and antibiotic alleviates staphylococcal arthritis and sepsis in mice. *J Infect Dis* **204**, 348–357 (2011).
503. Miller, L. S., Fowler, V. G., Shukla, S. K., Rose, W. E. & Proctor, R. A. Development of a vaccine against *Staphylococcus aureus* invasive infections: Evidence based on human immunity, genetics and bacterial evasion mechanisms. *FEMS Microbiol Rev* **44**, 123–153 (2020).

Titre : Etude de Pep16, un nouveau peptide antimicrobien dans différents modèles *in vitro* et *in vivo* d'infection à *Staphylococcus aureus*

Mots clés : *Staphylococcus aureus*, peptide antimicrobien, infections ostéoarticulaires, biofilm

Résumé : L'objectif de la thèse était d'évaluer le potentiel thérapeutique d'un nouveau pseudopeptide antimicrobien, nommé Pep16, à la fois *in vitro* et *in vivo* pour le traitement de l'arthrite septique causée par *Staphylococcus aureus*. Sept isolats cliniques de *S. aureus* (dont 1 SARM et 5 SASM) ont été étudiés. Les CMI de Pep16 et des comparateurs (vancomycine, teicoplanine, daptomycine et lévofloxacine) ont été déterminées par la méthode de microdilution en bouillon. L'activité intracellulaire de Pep16 et de la lévofloxacine a été évaluée en utilisant deux modèles d'infection, avec des cellules phagocytaires non-professionnelles (ostéoblastes MG-63) ou professionnelles (macrophages THP-1). L'impact de Pep16 sur la dynamique de croissance du biofilm a été évalué. Un modèle murin d'arthrite septique a été utilisé pour évaluer l'efficacité *in vivo* de Pep16.

Une analyse PK préliminaire a été effectuée en mesurant la concentration plasmatique par LC-MS/MS après une seule injection sous-cutanée de Pep16. Les CMI de Pep16 étaient de 8 mg/L pour tous les isolats cliniques de *S. Aureus* (de 2 à 32 fois supérieures à celles des comparateurs) tandis que les ratios CMB/CMI confirmaient une activité bactéricide. Tant Pep16 que la lévofloxacine (à 2 x CMI) ont réduit de manière significative la charge bactérienne de tous les isolats testés (2 SASM et 2 SARM) à la fois dans les ostéoblastes et les macrophages. Pep16 a réduit de manière significative les charges bactériennes dans les articulations des genoux des souris infectées par SASM. L'analyse PK après une seule administration sous-cutanée de Pep16 (10 mg/kg) a montré une augmentation lente des concentrations plasmatiques jusqu'à 12 heures (Cmax à 5,6 mg/L).

Title : Study of Pep16, a novel antimicrobial peptide in *in vitro* and *in vivo* model of *Staphylococcus aureus* infection

Keywords : *Staphylococcus aureus*, antimicrobial peptide, bone joint infections, biofilm

Abstract : The aim of the thesis was to evaluate the therapeutic potential of novel antimicrobial pseudopeptide, named Pep16, both *in vitro* and *in vivo* for the treatment of septic arthritis caused by *Staphylococcus aureus*. Seven clinical isolates of *S. aureus* (incl. 1 MRSA and 5 MSSA) collected were studied. MICs of Pep16 and comparators (vancomycin, teicoplanin, daptomycin and levofloxacin) were determined using the broth microdilution method. The intracellular activity of Pep16 and levofloxacin were evaluated using two models of infection, using non-professional (osteoblasts MG-63) or professional (macrophages THP-1) phagocytic cells. The impact of Pep16 on biofilm growth dynamics was evaluated. A mouse model of septic arthritis was used to evaluate the *in vivo* efficacy of Pep16.

A preliminary PK analysis was performed by measurement of plasma concentration using LC-MS/MS after a single subcutaneous injection of Pep16.

MICs of Pep16 were at 8 mg/L for all *S. Aureus* clinical isolates (2-to-32 fold higher to those comparators) while MBC/MIC ratios confirmed bactericidal activity. Both Pep16 and levofloxacin (at 2 x MIC) significantly reduced the bacterial load of all isolates tested (2 MSSA and 2MRSA) in both osteoblasts and macrophages. Pep16 significantly reduced bacterial loads in knee joints of MSSA-injected mice. PK analysis after a single subcutaneous administration of Pep16 (10 mg/kg) showed a slow increase in plasma concentrations up to 12 hours (Cmax at 5.6 mg/L).