



HAL
open science

Vie intraostéoblastique de *Staphylococcus aureus* : étude de la dynamique de réplication et des persisters

Florian Marro

► To cite this version:

Florian Marro. Vie intraostéoblastique de *Staphylococcus aureus* : étude de la dynamique de réplication et des persisters. Microbiologie et Parasitologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2023. Français. NNT : 2023LYO10067 . tel-04574588

HAL Id: tel-04574588

<https://theses.hal.science/tel-04574588>

Submitted on 14 May 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 CLAUDE BERNARD LYON 1**

**Ecole Doctorale N° 341
Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation (E2M2)**

Discipline : Microbiologie

Soutenue publiquement le 11/05/2023, par :

Florian C. MARRO

**Vie intraostéoblastique de *Staphylococcus aureus* :
Etude de la dynamique de réplication et des persisters**

Devant le jury composé de :

JOSSE Jérôme, PharmD-PhD, MCU, Université Lyon 1	Co-directeur
LAURENT Frédéric, PharmD-PhD, PU-PH, Université Lyon 1	Directeur
MOLLE Virginie, PhD, DR, CNRS-Université de Montpellier	Rapporteure
VAN BAMBEKE Françoise, PharmD-PhD, PU extra., Université catholique de Louvain	Présidente et rapporteure
VELARD Frédéric, PhD, IR, Université de Reims	Rapporteur
VIANNEY Anne, PhD, MCU, Université Lyon 1	Examinatrice
BLOCKER Ariel J., PhD, Evotec ID Lyon	Invitée
DUBARRY Nelly, PhD, Evotec ID Lyon	Invitée

Pour Marie-Sophie, pour Lily-Rose

REMERCIEMENTS



Mes remerciements vont en premier lieu à **Evotec ID Lyon** ainsi qu'au programme des Conventions industrielles de formation par la recherche (**Cifre**) financé par le **ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation Français** qui en a confié la mise en œuvre à l'association nationale de la recherche et de la technologie (**ANRT**) pour avoir financé ma thèse.

Mes remerciements vont aux **Dr. MOLLE Virginie, Pr. VAN BAMBEKE Françoise, Dr. VELARD Frédéric, Dr. VIANNEY Anne** pour avoir accepté d'être membre du jury évaluant ce travail de thèse.

Mes remerciements vont aux **Dr. DESCOURS Ghislaine, Dr. FAURE Mathias, Dr. SALCEDO Suzana, Pr. VERHOEVEN Paul** pour avoir accepté d'être membre du comité de suivi individuel de ma thèse. Je remercie la Dr. SALCEDO Suzana et le Dr. VERHOEVEN Paul pour leurs conseils avisés et nos discussions de microscopie.

Mes remerciements et ma profonde reconnaissance vont aux **Dr. BLOCKER Ariel J., Dr. DUBARRY Nelly, Dr. JOSSE Jérôme, Pr. LAURENT Frédéric** pour avoir été des directeurs de thèse extraordinaires. Je vous remercie pour nos discussions de sciences et de microscopie toujours aussi passionnantes et souvent sur de longues heures. Je vous remercie pour la richesse de vos 4 visions et expertises scientifiques dont il ne m'a pas toujours été facile mais au combien enrichissant de combiner et d'accorder. Je vous remercie pour l'autonomie et la confiance que vous m'avez accordé pour initier et réaliser ce projet. Je vous remercie pour avoir soutenue ma frénésie de développement de nouvelles approches de microscopie au laboratoire. Je vous remercie également pour nos contradictions techniques et nos débats sur les persisters qui m'ont permis d'affiner ma position et mon regard sur la science.

Mes remerciements vont à : **Dr. BOUCINHA Lilia, BROCARD Jacques, CANONNE-DESBIOLLES Laurie, CARA Andréa, CHATRE Elodie, Dr. CONRAUX Laurence, DECHAUD Corentin, ERRAZURIZ-CERDA Elisabeth, FAURE Allison, Dr. FONTANA Célia, HIREL Johanna, JAFFRELOT Laura, Dr. LUCCARDINI Camilla, MONLONG Chantal, SION Angélique** pour vos aides à la conceptualisation, réalisation et analyses de certaines expériences sans lesquelles l'histoire présentée dans ce manuscrit n'aurait pas été la même. Je vous remercie pour avoir accepté de collaborer à ce projet, pour nos discussions et vos points de vue toujours enrichissants.

Mes remerciements vont à **l'ensemble de mes collègues de l'équipe « pathogénie des staphylocoques »** au CIRI et d'**Evotec** ainsi que des plateformes de microscopie **PLATIM** et **CIQLE** de la SFR Bioscience. La liste exhaustive de vos noms serait bien trop longue. Cependant, je suis sûr qu'en lisant ces lignes vous vous reconnaîtrez. Bien que mes présences aux laboratoires aient été entrecoupées en fonction des expériences, travaillant parfois dans 3 laboratoires différents lors d'une

même journée, votre accueil et votre sympathie ont toujours été formidables et nos discussions enrichissantes.

Mes remerciements vont au **Dr. FAUDRY Eric** pour m'avoir initié et fait découvrir le monde merveilleux des infections vues sous microscope.

Mes remerciements vont à tous ces **ostéoblastes** et ces ***Staphylococcus aureus*** qui se seront livrés à des batailles illuminées.

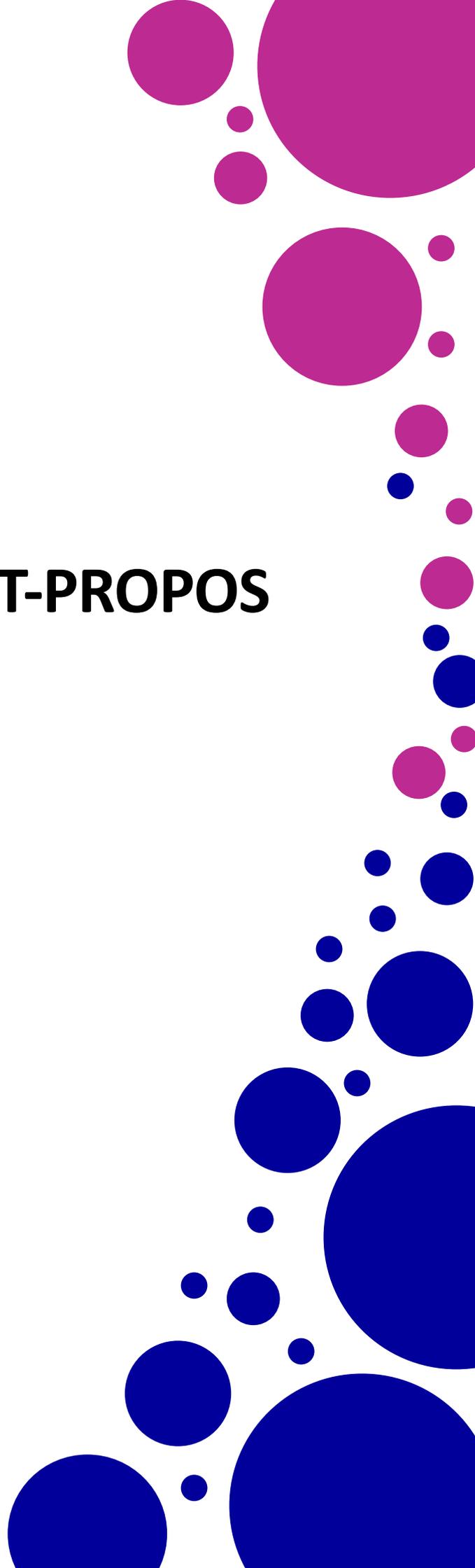
Mes remerciements et ma profonde reconnaissance vont à mes **Parents, Philippe et Gyslaine** et à mon **Frère, Alexis**. Mes parents, je vous remercie pour avoir financé mes études et ainsi m'avoir soutenu dans mes ambitions. Alexis, je te remercie pour notre passion commune des zombies qui m'a en parti conduit vers la recherche.

Mes remerciements vont à **nos compagnons** depuis 10 ans, **Iron** et **Minette**. Je les remercie d'avoir été à mes côtés depuis mes premières révisions à l'Université, en passant par les longues semaines d'analyses de microscopie jusqu'à l'écriture de ce manuscrit.

Mes derniers remerciements et ma profonde reconnaissance vont à ma **Femme, Marie-Sophie** et à ma **Fille, Lily-Rose** dite « *Crapito* ». Marie-Sophie, je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu m'as apporté au cours de ces 11 dernières années. Témoin de l'évolution de ma passion pour la science, tu étais déjà présente à ses débuts au lycée. Tu as été un soutien indéfectible. Nous avons bâti ensemble ce projet de vie (et scientifique) dès les fondations jusqu'à notre mariage au cours de ma / notre thèse. Je te suis reconnaissant pour m'avoir épaulé dans cette aventure notamment aux heures les plus sombres et très souvent tardives des analyses et de l'écriture de ce manuscrit. Lily-Rose, ta naissance lors de ma première année de thèse aura été la plus belle de mes expériences. Je te remercie pour tout le bonheur et l'amour que tu nous apportes ainsi que d'être un enfant merveilleux. Les plus belles images que j'ai prises au cours de cette thèse ne sont pas de microscopie, elles ont été de notre famille.

Merci !

AVANT-PROPOS



Publications

Marro FC, Abad L, Blocker AJ, Laurent F, Josse J, Valour F. (2021). In vitro antibiotic activity against intraosteoblastic *Staphylococcus aureus*: a narrative review of the literature. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 76(12):3091-3102.

Marro FC, Laurent F, Josse J, Blocker AJ. (2022). Methods to monitor bacterial growth and replicative rates at the single-cell level. *FEMS Microbiology Reviews*. 46(6):fuac030.

Communications

Présentations orales

Septembre 2021 16^e Congrès National de la Société Française de Microbiologie (SFM)

Nantes Intraosteoblastic *Staphylococcus aureus* growth rates monitoring via automated microscopy and fluorescence dilution: Highlighting persisters

Octobre 2021 V^{ème} Congrès National des Centres de Références des Infections Ostéo-Articulaires

Lyon complexes (CRIOAc) - Invité

Suivi des persisters par microscopie confocale automatisée et corrélative : un outil innovant pour le criblage de nouveaux antibactériens

Septembre 2022 Séminaire interne « Bacteriology Day » du Centre International de Recherche en Infectiologie

Lyon (CIRI)

Intraosteoblastic *Staphylococcus aureus* replicative dynamics and persisters

Octobre 2022 17^e Congrès National de la Société Française de Microbiologie (SFM)

Montpellier Intracellular *Staphylococcus aureus* persisters investigations (présenté par Jérôme Josse)

Novembre 2022 6th National Congress of Immunotherapies & Innovations for Infectious Diseases (I4ID)

Lyon Intracellular *Staphylococcus aureus*: replicative dynamics and persisters. New tools and model to monitor in cellulo infection

Décembre 2022 Séminaire interne du Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)

Lyon Intracellular *Staphylococcus aureus*: replicative dynamics and persisters.

Présentations affichées

Juillet 2022 International Gordon Research Conference and Seminar (GRC and GRS)

Barga, Italie New Antibacterial Discovery and Development

Intracellular *Staphylococcus aureus*: replicative dynamics monitoring under antibiotics challenges: highlighting persisters. Présenté en annexe.



Résumé

Staphylococcus aureus est une bactérie commensale de l'humain et un pathogène opportuniste majeur pouvant causer un large spectre d'infections telles que les infections ostéo-articulaires (IOA). Elles présentent un fort taux de morbidité et de mortalité ainsi que de rechute et de chronicisation. Des mécanismes d'échappement confèrent à *S. aureus* une protection mécanique à l'action du système immunitaire et des antibiotiques tels que son internalisation dans les cellules osseuses, notamment les ostéoblastes. Ce mécanisme pourrait exacerber les échecs thérapeutiques. L'implication de l'internalisation et de la survie de *S. aureus* dans les cellules osseuses au cours des IOA manque de supports notamment par la difficulté d'isolement et d'observation des cellules infectées.

Le premier objectif de ma thèse a donc été de développer un modèle d'étude *in cellulo* afin de déchiffrer les paramètres d'infection et la dynamique de réplication de *S. aureus* par microscopie photonique à fluorescence. L'hétérogénéité, entre individu et souche dépendante, de la vie intraostéoblastique de *S. aureus* a ainsi pu être mise en lumière. Les ostéoblastes ont été la niche de *S. aureus* exclusivement non répliatifs (I), ou d'au moins un *S. aureus* quittant la quiescence et engendrant une phase répliative lente (II), ou rapide dite classique (IIIa) caractérisée par l'éclatement de l'ostéoblaste et le relargage des *S. aureus*, ou non-conventionnelle (IIIb) ou avortée (IIIc).

La combinaison des rifamycines et des fluoroquinolones démontre une supériorité dans le traitement des IOA sur prothèses. Cependant, l'éradication complète de *S. aureus* intraostéoblastique n'est jamais atteinte *in vitro* quel que soit l'antibiotique et sa concentration utilisé. Le second objectif de ma thèse a donc été de déchiffrer la dynamique de réplication des survivants de *S. aureus* intraostéoblastique à un traitement de rifampicine et/ou de ciprofloxacine à concentrations cliniques. La ciprofloxacine créé un réservoir de *S. aureus* répliatifs au sein de structures circulaires probablement par une efficacité réduite, tandis que les survivants à la rifampicine sont des persisters non ou lentement répliatifs.

Ainsi, ces travaux de thèse de doctorat présentent la première étude quantitative de la dynamique de réplication intraostéoblastique de *S. aureus* sous traitement ou non d'antibiotiques à concentrations cliniques, en temps réel et à l'échelle de la cellule eucaryote. Ils s'insèrent dans la compréhension globale de la dynamique de réplication et de la persistance de *S. aureus* intracellulaire dans le cadre des IOA. Les *S. aureus* intraostéoblastiques répliatifs pourraient contribuer à la phase aigüe des IOA en colonisant les cellules et tissus voisins tandis que les non répliatifs pourraient être impliqués dans la rechute et la chronicisation des IOA en nichant dans des ostéoblastes viables et en persistant à un traitement antibiotique.

Mots clefs : infection ostéo-articulaires, *S. aureus*, ostéoblaste, dynamique de réplication, persisters.



Abstract

Staphylococcus aureus is a human commensal bacterium as well as a major opportunistic pathogen that can cause a wide spectrum of infections such as bone and joint infections (BJI). BJI possess a high rate of morbidity and mortality as well as relapse and chronicization. Escape mechanisms, such as internalization in bone cells like osteoblasts, bring a mechanical protection to *S. aureus* against the action of the immune system and antibiotics. This mechanism could exacerbate treatment failures. The implication of the internalization and the survival of *S. aureus* in cells during BJI lacks *in vivo* observation, especially due to the difficulty of sampling and observation of infected cells from patients.

The first goal of my thesis was therefore to develop an *in cellulo* study model to decipher the infection parameters and the replicative dynamics of *S. aureus* using fluorescence light microscopy. The heterogeneity of the intraosteoblastic lifestyle of *S. aureus* occurring between individual and strain was highlighted. Osteoblasts were the niche of exclusively non-replicating *S. aureus* (I), or at least one *S. aureus* leaving quiescence and generating a slow replicative phase (II), or a classical fast replicative phase (IIIa) characterized by the burst of host cell and the release of *S. aureus*, or an unconventional (IIIb) or aborted (IIIc) fast replicative phase.

The dual therapy of rifamycines and fluoroquinolones showed superiority to treat prosthetic joint infection (PJI). However, complete eradication of intraosteoblastic *S. aureus* is never achieved *in vitro* regardless of the antibiotic and its concentration used. The second goal of my thesis was therefore to decipher the replicative dynamics of intraosteoblastic *S. aureus* survivors to rifampicin and/or ciprofloxacin treatment at clinical concentrations. Ciprofloxacin creates a reservoir of replicating *S. aureus* within circular structures probably through reduced efficiency, while rifampicin survivors are non- or slowly replicative persisters.

Thus, this manuscript presents the first quantitative study of the intraosteoblastic replicative dynamics of *S. aureus* under treatment or not by antibiotics at clinical concentrations, in real time and at the single eucaryotic cell level. The results obtained are part of the overall understanding of the replicative dynamics and persistence of intracellular *S. aureus* in the context of BJI. Replicative intraosteoblastic *S. aureus* may contribute to the acute phase of BJI by colonizing neighboring cells and tissues while non-replicating *S. aureus* may be involved in the relapse and chronicization of BJI by nesting in viable osteoblasts and persisting to antibiotic treatment.

Key words: bone and joint infections, *S. aureus*, osteoblast, replicative dynamics, persisters.

Laboratoires de rattachement

Cette thèse de doctorat a été préparée au sein des laboratoires suivants :

- **Evotec ID Lyon, In Vitro Biology, Infectious Diseases and Antibacterials Unit.**

Adresse postale du laboratoire :
Evotec ID Lyon,
40 Avenue Tony Garnier
69007 Lyon, France.



- **INSERM U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Centre International de Recherche en Infectiologie, équipe Pathogénie des staphylocoques.**

Adresse postale du laboratoire :
CIRI-InsermU1111 Faculté de Médecine Lyon-Est,
7 rue Guillaume Paradin,
69008 Lyon, France.



Financement

Cette thèse de doctorat a été financée conjointement par :

- Le programme des Conventions industrielles de formation par la recherche (Cifre) financé par le ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation Français qui en a confié la mise en œuvre à l'association nationale de la recherche et de la technologie (ANRT).
Référence : Cifre 2019/0813
- Evotec ID Lyon.

Tables des matières

17	Abréviations utilisées
18	Listes des figures et tableaux
23	CONTEXTE
27	INTRODUCTION
28	1. <i>Staphylococcus aureus</i>
28	1.1. <u>Genre Staphylococcus</u>
28	1.1.1. Découverte
29	1.1.2. Taxonomie et classification
29	1.2. <u>Staphylococcus aureus</u>
29	1.2.1. Morphologie et phénotype
30	1.2.2. Classification
31	1.2.3. Portage chez l'humain et pathogénicité
32	2. <i>Staphylococcus aureus</i> et les infections ostéo-articulaires
32	2.1. <u>Physiologie du microenvironnement osseux</u>
32	2.1.1. L'os
33	2.1.2. Le remodelage osseux et les cellules impliquées
34	2.1.2.1. <u>Les ostéoclastes</u>
35	2.1.2.2. <u>La lignée ostéoblastique</u>
37	2.2. <u>Les infections ostéo-articulaires</u>
37	2.2.1. Classification et pathologie des infections ostéo-articulaires
38	2.2.2. Epidémiologie
39	2.2.3. Les pathogènes impliqués dans les infections ostéo-articulaires
39	2.2.4. Traitement des infections ostéo-articulaires
41	2.2.5. <u>Physiopathologie des infections ostéo-articulaires</u>
41	2.2.5.1. <u>Généralités</u>
43	2.2.5.2. <u>Biofilm</u>
44	2.2.5.3. <u>Abcès et séquestre osseux</u>
45	2.2.5.4. <u>Invasion des ostéoplastes</u>
46	2.2.5.5. <u>Internalisation dans les cellules osseuses</u>
48	2.2.5.6. <u>Internalisation dans les cellules articulaires</u>
49	3. <i>Staphylococcus aureus</i>, vie intracellulaire et dynamique de réplication
49	3.1. <u>Généralités sur les facteurs de virulence de surface</u>
51	3.2. <u>Mécanismes d'adhésion et d'internalisation</u>
51	3.2.1. <u>La voie FnBP-Fn-α5β1</u>
51	3.2.1.1. <u>Mécanismes d'adhésion</u>
52	3.2.1.2. <u>Mécanismes d'internalisation</u>

53	3.2.2. Les voies annexes
54	3.3. <u>Généralités sur les facteurs de virulence sécrétés et le système de régulation agr</u>
54	3.3.1. Toxines et enzymes sécrétées
54	3.3.1.1. <u>Toxines formant des pores</u>
54	3.3.1.2. <u>Phénol-soluble modulines</u>
55	3.3.1.3. <u>Protéases</u>
55	3.3.1.4. <u>Lipases</u>
56	3.3.2. Le système de régulation agr
57	3.4. <u>Devenir intracellulaire dans les cellules phagocytaires non-professionnelles</u>
58	3.4.1. Morphologie de la vacuole
58	3.4.2. Subversion de l'autophagie
60	3.4.3. Echappement ou résidence vacuolaire ?
61	3.4.4. Echappement ou résidence intracellulaire ?
61	3.4.4.1. <u>Echappement de la cellule hôte</u>
61	3.4.4.2. <u>Résidence dans la cellule hôte</u>
63	3.5. <u>Méthodes pour l'étude de la dynamique de réplication</u>
63	3.5.1. Méthodes pour l'étude de la dynamique de réplication et de croissance à l'échelle de la bactérie unique
	Publication : <i>Methods to monitor bacterial growth and replicative rates at the single-cell level</i> (FEMS Microbiol. Rev., 2022)
95	3.5.2. Méthodes sélectionnées pour l'étude de la dynamique de réplication intracellulaire
96	3.6. <u>Dynamique de réplication de <i>S. aureus</i> dans les cellules phagocytaires non-professionnelles</u>
99	3.7. <u>Localisation intracellulaire et dynamique de réplication de <i>S. aureus</i></u>
99	3.7.1. Evidence pour une multiplication cytosolique
100	3.7.2. Evidence pour une multiplication vacuolaire
101	3.8. <u>Activité intraostéoblastique des antibiotiques contre <i>S. aureus</i></u>
	Publication : <i>In vitro antibiotic activity against intraosteoblastic Staphylococcus aureus: a narrative review of the literature</i> (J. antimicrob. Chemother., 2021)
115	4. <u>Staphylococcus aureus et les persisters</u>
115	4.1. <u>Découverte et définitions</u>
115	4.1.1. Aux origines de la découverte
115	4.1.1.1. <u>Découverte <i>in vitro</i></u>
116	4.1.1.2. <u>Suggestion d'applications cliniques</u>
117	4.1.2. Une palette de définitions
119	4.2. <u>Etat de l'art</u>
119	4.2.1. Persisters de <i>S. aureus in vitro</i>
119	4.2.1.1. <u>Persisters planctoniques</u>
121	4.2.1.2. <u>Persisters en biofilms</u>

122	4.2.2. Persisters de <i>S. aureus in cellulo</i>
123	4.2.3. Persisters de <i>S. aureus in vivo</i> et isolats cliniques
125	4.2.4. Mécanismes de la persistance
125	4.2.4.1. <u>Stress environnementaux</u>
126	4.2.4.2. <u>Stress énergétiques</u>
128	4.2.4.3. <u>Modules toxines-antitoxines et réponse stringente</u>
128	4.2.4.4. <u>Divers mécanismes</u>
129	4.2.4.5. <u>Etat réplcatif</u>
131	OBJECTIFS DE LA THESE DE DOCTORAT
133	TRAVAUX DE RECHERCHE
134	Avant-propos
136	AXE 1. Dynamique de réplcation de <i>S. aureus</i>
	 intraostéoblastique
136	 1.1. <u>Introduction</u>
136	 1.2. <u>Méthodes</u>
136	1.2.1. Culture cellulaire
136	1.2.2. Souches bactériennes
137	1.2.3. Marquages moléculaires bactérien et cellulaire
137	1.2.3.1. <u>Marquage cellulaire</u>
137	1.2.3.2. <u>Marquage bactérien</u>
138	1.2.4. Cytométrie de flux
138	1.2.5. Infections intraostéoblastiques
139	1.2.6. Expériences de dénombrement sur gélose
139	1.2.7. Microscopie confocale en temps réel
140	1.2.8. Acquisition des images de fluorescence et analyse
141	1.2.9. Analyses statistiques
141	 1.3. <u>Validation du modèle</u>
141	1.3.1. Description du modèle
141	1.3.2. Multiplicité d'infection : charge bactérienne et cytotoxicité
143	1.3.3. Impact de la GFP et de l'eFluor 450 sur la charge bactérienne
143	1.3.4. Méthode d'analyse de dilution de fluorescence
146	1.3.5. Méthode d'analyse de la surface bactérienne
147	 1.4. <u>Etude de la dynamique de réplcation intraostéoblastique</u>
147	1.4.1. Dynamique de réplcation de <i>S. aureus</i> intraostéoblastique
151	1.4.2. Impact de la multiplicité d'infection
151	 1.5. <u>Conclusions et perspectives</u>
151	1.5.1. Validation du modèle
153	1.5.2. Dynamique de réplcation intraostéoblastique

155	AXE 2. Impact d'antibiotiques à concentrations cliniques
155	2.1. <u>Introduction</u>
155	2.2. <u>Méthodes</u>
155	2.2.1. Cultures et marquages bactériens et cellulaires
155	2.2.2. Infections, CFU et microscopie photonique en temps réel
156	2.2.3. Aire des colonies sur gélose
156	2.2.4. Concentration minimale inhibitrice
157	2.2.5. Courbe de survie
157	2.2.6. Spectrométrie de masse
158	2.2.7. Analyses statistiques
159	2.3. <u>Etudes de l'impact d'antibiotiques à concentrations cliniques osseuses</u>
159	2.3.1. Paramètres d'infection
159	2.3.2. Dynamique de réplication
159	2.3.2.1. Rifampicine et <i>S. aureus</i> non répliatifs
163	2.3.2.2. Ciprofloxacine et phases répliatives rapides non-conventionnelles
165	2.3.3. Croissance sur gélose et <i>small colony variants</i>
165	2.3.3.1. Croissance sur gélose et viabilité
167	2.3.3.2. <i>Small colony variants</i>
169	2.3.4. Recroissance intraostéoblastique
171	2.4. <u>Etudes de l'impact de la ciprofloxacine à concentration clinique plasmatique</u>
171	2.4.1. Concentration intraostéoblastique de ciprofloxacine
172	2.4.2. Paramètres d'infection
174	2.4.3. Dynamique de réplication
176	2.5. <u>Persistants, tolérants ou hétérorésistants planctoniques</u>
177	2.6. <u>Conclusions et perspectives</u>
177	2.6.1. Rifampicine
178	2.6.2. Ciprofloxacine
179	2.6.3. Combinaison rifampicine / ciprofloxacine
179	2.6.4. Perspectives
180	AXE 3. Dynamique de réplication, persisters et impact de la souche
180	3.1. <u>Introduction</u>
180	3.2. <u>Méthodes</u>
180	3.2.1. Cultures et marquages bactériens et cellulaires
181	3.2.2. Infections, CFU et microscopie photonique en temps réel
182	3.2.3. Concentration minimale inhibitrice
182	3.2.4. Analyses statistiques
182	3.3. <u>Souches employées</u>
183	3.4. <u>Croissance sur gélose et action de la rifampicine</u>
183	3.4.1. Croissance sur gélose
183	3.4.2. Impact de la rifampicine à concentration clinique osseuse

186	3.5. <u>Dynamique de réplication et phases réplicatives rapides</u>
186	3.5.1. Dynamique de réplication
188	3.5.2. Intensité des phases réplicatives rapides classiques
190	3.5.3. Phases réplicatives rapides avortées
190	3.6. <u>Impact de la souche sur la dynamique de réplication en présence de rifampicine</u>
193	3.7. <u>Conclusions et perspectives</u>
194	AXE 4. Dynamique de réplication et localisation intraostéoblastique
194	4.1. <u>Introduction</u>
194	4.2. <u>Méthodes</u>
194	4.2.1. Cultures et marquages bactériens et cellulaires
194	4.2.2. Infections et microscopie photonique en temps réel
194	4.2.3. Microscopie électronique à transmission
195	4.2.4. Microscopie corrélative
195	4.3. <u>Microscopie photonique en temps réel</u>
197	4.4. <u>Microscopie photonique et immunofluorescence</u>
197	4.5. <u>Microscopie électronique à transmission</u>
200	4.6. <u>Microscopie corrélative</u>
202	4.7. <u>Conclusions et perspectives</u>
203	CONCLUSIONS GENERALES
204	1.1. <u>Etude de la dynamique de réplication de <i>S. aureus</i> intraostéoblastique</u>
205	1.2. <u>Etude de la dynamique de réplication de <i>S. aureus</i> intraostéoblastique sous traitement antibiotique</u>
206	1.2.1. Etude de l'impact de la ciprofloxacine
206	1.2.2. Etude de l'impact de la rifampicine
207	1.3. <u>Etude de la localisation intraostéoblastique en fonction de la dynamique de réplication de <i>S. aureus</i></u>
211	DISCUSSIONS & PERSPECTIVES
212	1.1. <u>Modèle <i>in cellulo</i>, dynamique de réplication hétérogène et IOA</u>
214	1.2. <u>Impact d'antibiotique, persisters et IOA</u>
216	1.3. <u>Poursuite des travaux de recherche</u>
219	ANNEXE
221	REFERENCES



Abréviations utilisées

ADN	Acide désoxyribonucléique
agr	<i>Accessory gene regulator</i>
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
Bbp	Protéine de liaison à la sialprotéine osseuse (<i>BSP binding protein</i>)
BSP	Sialoprotéine osseuse (<i>bone sialoprotein</i>)
CFU	Colonie formant unité
ClfA et B	<i>Clumping factor A or B</i>
CMI	Concentration minimale inhibitrice
Cna	Protéine de liaison au collagène
Coa	Coagulase
CPNP	Cellules phagocytaires non-professionnelles
Fn	Fibronectine
FnBP (A or B)	Protéine de liaison à la fibronectine A ou B (<i>Fn binding proteins A or B</i>)
IOA	Infections ostéo-articulaires
LRP5 et 6	<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 or 6</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MEO	Matrice extra osseuse
MSCRAMM	<i>Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i>
OPG	Ostéoprotégérine
PSMs	<i>Phénol-soluble modulines</i>
PVL	<i>Panton-Valentine leucocidine</i>
RANKL	<i>Receptor activator of NF-κB ligand</i>
S. (espèce)	<i>Staphylococcus (espèce)</i>
SCoN	Staphylocoques à coagulase négative
SCoP	Staphylocoques à coagulase positive
SCV	<i>Small colony variants</i>
TA	Toxine-antitoxines
TCA	Cycle de l'acide tricarboxylique
vWbp	Facteur de lien protéique von Willebrand
WNT	Voie de signalisation <i>wint</i>

Figures**Introduction**

- 28 **Figure 1** Schéma d'observation microscopique de *A. Ogston*.
- 30 **Figure 2** Images de microscopie photonique, électronique à balayage et par force atomique de *S. aureus*.
- 32 **Figure 3** Schéma d'un os long et de l'os cortical.
- 34 **Figure 4** Le remodelage osseux et les cellules impliquées.
- 42 **Figure 5** Mécanisme d'échappement mécanique de *S. aureus* lors des infections ostéo-articulaires.
- 46 **Figure 6** Images de microscopie électronique à transmission de tissu osseux infecté de patient démontrant la déformation et l'invasion des ostéoplastes et des canalicules par des bactéries à Gram positif.
- 47 **Figure 7** Images de microscopie électronique à transmission de cellules de patient infectées par des bactéries à coques sphériques lors d'infections ostéo-articulaires.
- 50 **Figure 8** Fonction des protéines de surface de *S. aureus*.
- 52 **Figure 9** Les mécanismes d'adhésion et d'internalisation de *S. aureus* dans les cellules eucaryotes.
- 56 **Figure 10** Architecture et mécanisme du système agr.
- 58 **Figure 11** Microscopie électronique de *S. aureus* internalisé dans des neutrophiles au sein de vacuole lâche à gauche ou serrées à droite.
- 59 **Figure 12** Mécanismes de l'autophagie ciblée contre des pathogènes, nommée xénophagie.
- 97 **Figure 13** Dynamique de réplication de *S. aureus* au sein de cellules endothéliales et épithéliales.
- 98 **Figure 14** Impact de l'expression de la staphopaine A sur la dynamique de réplication de *S. aureus* au sein de cellules épithéliales.
- 118 **Figure 15** Résistance, tolérance, et persistance aux antibiotiques.
- 119 **Figure 16** Persisters de *S. aureus* à la ciprofloxacine en phase exponentielle ou stationnaire de culture planctonique.
- 120 **Figure 17** Effet antagoniste d'antibiotiques sur l'éradication d'une population de *S. aureus* planctonique en phase exponentielle de croissance.
- 122 **Figure 18** Persisters non réplicatifs de *S. aureus* en culture planctonique et intracellulaires.
- 124 **Figure 19** Principe de la méthode TDtest permettant de mettre en lumière les persisters sur géloses d'agar.

Axe 1. Dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique

- 142 **Figure I-1** Impact de la multiplicité d'infection, de l'expression de la GFP et du marquage à l'eFluor sur la charge bactérienne intraostéoblastique et l'intégrité des ostéoblastes.
- 144 **Figure I-2** Le marquage moléculaire « cell proliferation dye eFluor 450 » permet de suivre l'état réplcatif de *S. aureus* jusqu'à 6 générations.
- 148 **Figure I-3** Illustration de la dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique.
- 149 **Figure I-4** Quantification de la dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique.
- 152 **Figure I-5** Dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique et paramètres d'infection en fonction de la multiplicité d'infection.

Axe 2. Impact d'antibiotiques à concentrations cliniques

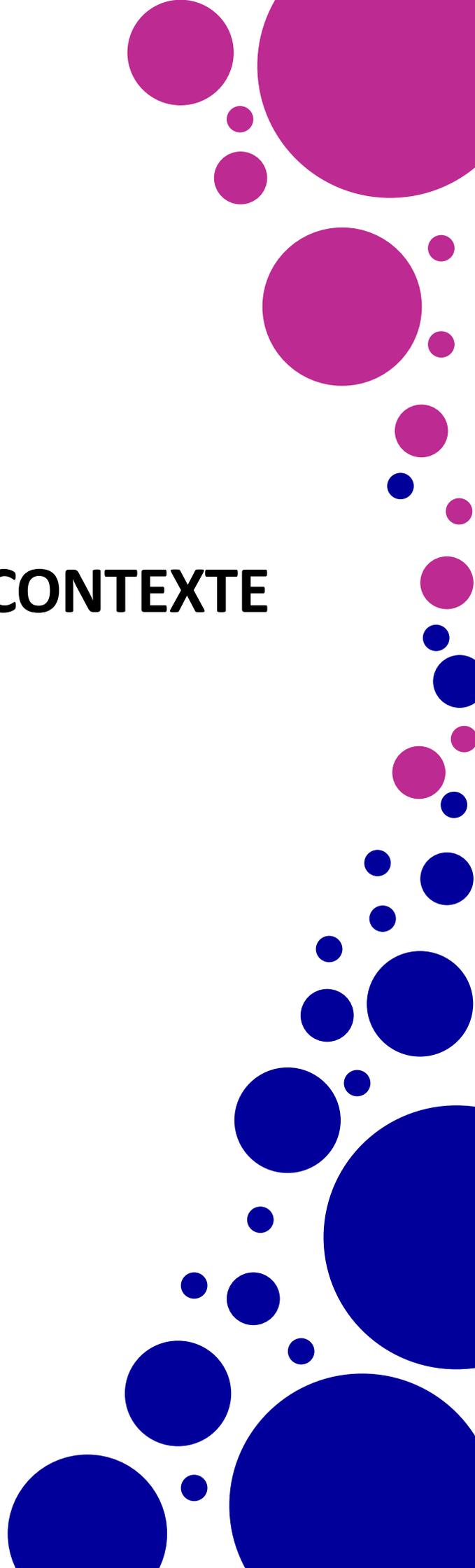
- 160 **Figure II-1** Paramètres d'infection sous traitement de rifampicine et/ou ciprofloxacine à concentrations cliniques osseuses.
- 161 **Figure II-2** Dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique sous un traitement de rifampicine et/ou ciprofloxacine à concentrations cliniques osseuses.
- 164 **Figure II-3** Un traitement de ciprofloxacine à concentration clinique osseuse induit des phases réplcatives non-conventionnelles.
- 166 **Figure II-4** Impact de la rifampicine et/ou de la ciprofloxacine à concentration clinique osseuse sur la capacité de *S. aureus* intraostéoblastique à former des colonies sur géloses d'agar.
- 168 **Figure II-5** Impact de la rifampicine et/ou de la ciprofloxacine à concentration clinique osseuse sur le taux de *small colony variants*.
- 170 **Figure II-6** Dosage de la rifampicine intraostéoblastique et dynamique de réplication intraostéoblastique après retrait du traitement antibiotique.
- 172 **Figure II-7** Dosage intraostéoblastique d'une gamme de ciprofloxacine.
- 173 **Figure II-8** Paramètres d'infection sous traitement de ciprofloxacine à différentes concentrations.
- 175 **Figure II-9** Dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique sous traitement de ciprofloxacine à différentes concentrations.
- 176 **Figure II-10** Cinétique de survie d'une culture planctonique sous traitement de rifampicine.

		Axe 3. Dynamique de réplication, persisters, et impact de la souche
184	Figure III-1	Impact de la souche sur la charge bactérienne intraostéoblastique formant des colonies sur gélose d'agar.
185	Figure III-2	Impact de la souche sur l'action de la rifampicine envers les <i>S. aureus</i> formant des colonies sur gélose d'agar ;
187	Figure III-3	Dynamique de réplication de diverses souches de <i>S. aureus</i> intraostéoblastique.
189	Figure III-4	Intensité des phases répliques rapides en fonction des souches de <i>S. aureus</i> intraostéoblastique.
191	Figure III-5	Phases répliques rapides avortées de <i>S. aureus</i> intraostéoblastique.
192	Figure III-6	Dynamique de réplication de diverses souches de <i>S. aureus</i> intraostéoblastique sous un traitement de rifampicine à concentration clinique osseuse.
		Axe 4. Dynamique de réplication et localisation intraostéoblastique
196	Figure IV-1	Phases répliques rapides intraostéoblastique de structure contrainte investiguées par microscopie photonique en temps réel.
198	Figure IV-2	Localisation intraostéoblastique investiguée par microscopie électronique à transmission.
199	Figure IV-3	Localisation intraostéoblastique sous traitement de rifampicine investiguée par microscopie électronique à transmission.
201	Figure IV-4	Etat réplique et localisation intraostéoblastique investigués par microscopie corrélative.
		Conclusions générales
209	Figure C1	Schéma récapitulatif des résultats obtenus.

Tableaux

- 158** **Tableau II-1** Détails des valeurs de la collision d'énergie et de la lentille RF des expériences de spectrométrie de masse.
- 181** **Tableau III-1** Liste des souches de *S. aureus* employées dans l'axe 3 des travaux de recherche.

CONTEXTE



Staphylococcus aureus est une bactérie sphérique à Gram positif décrite et observée en microscopie photonique pour la première fois par Louis Pasteur¹ et Alexander Ogston^{2,3} en 1878 et 1881, respectivement. *S. aureus* est une bactérie commensale de l'humain retrouvée chez 50 à 56% de la population, colonisant principalement la peau et les muqueuses^{4,5}. C'est également un pathogène opportuniste majeur pouvant causer un large spectre d'infections, bénignes à mortelles, dans un contexte nosocomial ou communautaire. Parmi celles-ci, les infections ostéo-articulaires (IOA) sont le contexte d'étude de ces travaux de recherche.

Les IOA sont associées à un fort taux de morbidité et de mortalité pouvant atteindre 8%^{6,7}. *S. aureus* est le pathogène le plus communément incriminé représentant en fonction des études 45 à 80% des cas⁸⁻¹⁰. On observe une récurrence d'infection dans 20 à 40% des cas¹¹⁻¹⁴. En effet, des mécanismes d'échappement peuvent impacter le succès thérapeutique en créant des réservoirs de pathogènes difficilement accessibles par le système immunitaire, les antibiotiques, ainsi que le chirurgien notamment lors du débridement¹⁵. Ces mécanismes d'échappement incluent la formation de structures tridimensionnelles telles que des biofilms, des abcès et séquestre osseux. L'invasion des ostéoplastes, lacunes osseuses niches des ostéocytes, et des cellules osseuses, telles que les ostéoblastes, a été mise en évidence à l'aide d'échantillons de patients. Ces mécanismes confèrent une protection mécanique à *S. aureus*. De plus, au sein de chacun d'eux la présence de persisters, sous-population de *S. aureus* non ou lentement répliquative survivante à un traitement antibiotique bactéricide dans une population clonale sensible, pourrait exacerber les échecs thérapeutiques.

Toutefois, l'implication de l'internalisation, de la survie et de la présence de persisters de *S. aureus* dans les cellules osseuses de l'hôte au cours des IOA chroniques, manque de support *in vivo* et en clinique, notamment par la difficulté d'isolement et d'observation des cellules infectées^{15,16}. Un procédé intermédiaire est le développement de modèles *in cellulo*. Ils permettent notamment d'appréhender et de déchiffrer la dynamique de *S. aureus* intracellulaire.

Dans ce contexte, un modèle *in cellulo* suivi par microscopie photonique à fluorescence a été développé. L'objectif est de caractériser les paramètres d'infection et la dynamique de répllication de *S. aureus* intraostéoblastique. La compréhension de ceux-ci dans un modèle *in cellulo* pourrait apporter des éléments de lumière sur les modes réplcatifs favorisant la dissémination ou la survie de *S. aureus* intracellulaire ainsi que son implication potentielle sur la physiopathologie des IOA.

Les rifamycines et les fluoroquinolones sont les deux classes d'antimicrobiens les plus efficaces pour traiter les *S. aureus* intraostéoblastiques. Cela est en adéquation avec la supériorité de cette combinaison en clinique pour traiter les infections à *S. aureus* sur matériels orthopédiques. Cependant, il est important de noter que l'éradication complète de la charge bactérienne intraostéoblastique *in*

vitro n'a jamais été atteinte quel que soit l'antibiotique et sa concentration utilisé. Ce réservoir peut ainsi être une source potentielle de rechute et de chronicisation des IOA. Ainsi, afin d'appréhender la présence de persisters de *S. aureus* intraostéoblastique ainsi que la dynamique de réplication associée en temps réel, une contrainte antibiotique telle que retrouvée en clinique a été appliquée. La rifampicine et la ciprofloxacine, à concentrations cliniques, ont donc été implémentées dans le modèle d'étude *in cellulo* développé. L'impact de la souche bactérienne sur l'ensemble des résultats observés a été étudié.

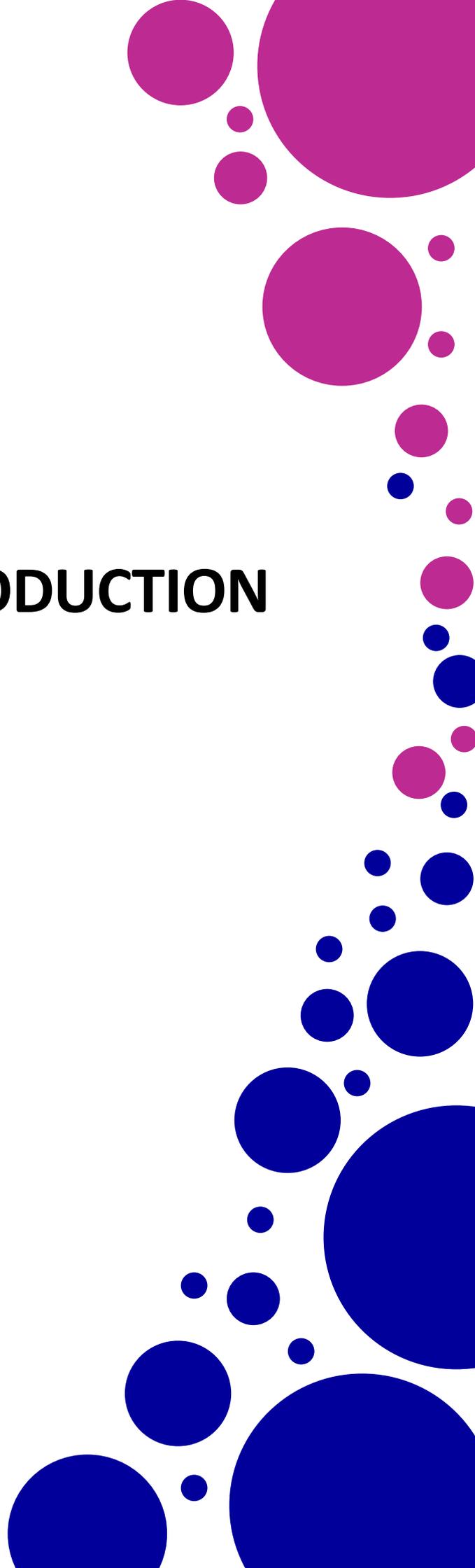
Enfin, la corrélation entre la localisation intraostéoblastique, vacuolaire ou non, et la dynamique de réplication a été investiguée. Celle-ci permettrait d'apporter des éléments de compréhension sur les mécanismes impliqués dans la quiescence et la réplication de *S. aureus*.

Ce manuscrit se compose d'une introduction bibliographique dont le but est d'établir les différentes notions nécessaires à la compréhension de ce projet. Une section travaux de recherche présente l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse. Enfin, ce manuscrit comporte une conclusion générale et une discussion dont le but est de contextualiser les résultats dans leur environnement global des IOA chroniques et des persisters.

Ainsi, ces travaux de thèse de doctorat présentent la première étude quantitative de la dynamique de réplication intraostéoblastique de *S. aureus* sous traitement ou non d'antibiotiques à concentrations cliniques ; en temps réel et à l'échelle de la cellule eucaryote.

L'ensemble de ces travaux de recherche s'insèrent dans la compréhension globale de la dynamique de réplication de *S. aureus* intracellulaire ainsi que de sa persistance intracellulaire aux antibiotiques couramment utilisés en clinique dans le cadre des IOA.

INTRODUCTION



1. *Staphylococcus aureus*

1.1. Genre *Staphylococcus*

1.1.1. Découverte

L'observation microscopique et la nomination du genre *Staphylococcus* ont été décrites pour la première fois en 1878 et 1881 par Louis Pasteur¹ et Alexander Ogston^{2,3}. A partir de prélèvements purulents, provenant notamment d'abcès cutanés et d'infections osseuses, ils ont observé deux formes phénotypiquement distinctes de « micrococci » : en (i) « chaînes », nommé *Streptococcus* par Theodor Billroth en 1874^{17,18}, et en (ii) « un organisme unique, formé de petits points sphériques réunis par couples de deux grains, rarement de quatre, mais fréquemment associés en petits amas »¹ que A. Ogston nommera *Staphylococcus* et qu'ils définiront comme l'agent responsable de ces maladies (Fig. 1). Le terme *Staphylococcus* provient du grec σταφυλή, staphylé « grappe de raisins » et κόκκος, kokkos « grain, baie »¹⁹. L'observation de colonies de *Staphylococcus* sur gélose d'agar a été décrite pour la première fois en 1884 par Friedrich Rosenbach à partir d'abcès purulents²⁰. Il catégorisa deux types de colonies distinctes par la pigmentation : « jaune / dorée » et « blanche ». Les espèces formant ces colonies ont été nommées respectivement *Staphylococcus aureus* du latin aurum, « or » et *S. albus*, plus tard connu sous le nom de *S. epidermidis*. Une troisième couleur « citron » sera ajoutée par la suite et l'espèce sera nommée *S. citreus*. La diversité du genre *Staphylococcus* est en développement constant avec la découverte de nouvelles espèces telles que récemment *S. borealis*²¹, *S. taiwanensis*²² et *S. ratti*²³.

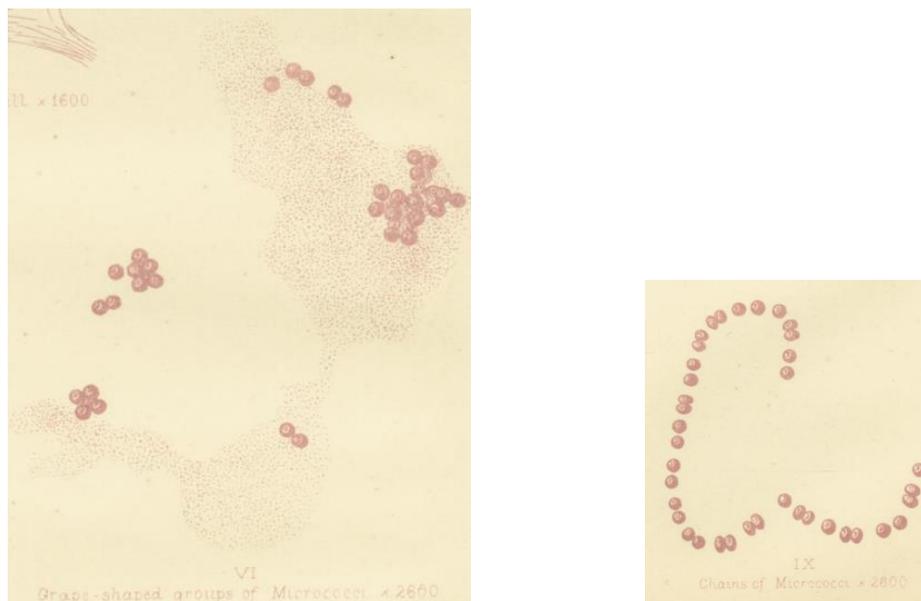


Figure 1 : Schéma d'observation microscopique de A. Ogston. Représentent à gauche des « groupes en forme de raisin de micrococci », *Staphylococcus* et à droite des « chaînes de micrococci », *Streptococcus*. Modifié d'après Ogston².

1.1.2. Taxonomie et classification

Dans l'arbre de la vie, les staphylocoques font partie du domaine des « Bactéries » distinct selon le séquençage des gènes d'ARN ribosomiaux²⁴. Dans ce domaine, le genre *Staphylococcus* appartient à l'embranchement des « Bacillota », la classe des « Bacilli », l'ordre des « Caryophanales » et la famille des « Staphylococcaceae »²⁴. Le genre *Staphylococcus* contient plus d'une soixantaine d'espèces découvertes à ce jour telles que *S. aureus*. Les staphylocoques sont tous des bactéries sphériques Gram positives, catalase positives, non motiles, non sporulées et de manière facultative anaérobies²⁵.

Les staphylocoques peuvent également être catégorisés en deux groupes selon qu'ils possèdent ou non le gène *coa* codant pour une enzyme appelée « coagulase » (Coa) : (i) Staphylocoques à coagulase positive (SCoP) et (ii) Staphylocoques à coagulase négative (SCoN)^{25,26}. La capacité des staphylocoques à convertir le fibrinogène en fibrine est traditionnellement testée en tube par la coagulation du plasma. Les SCoP sont représentés chez les humains uniquement par *S. aureus*, auquel d'autres espèces isolées chez l'animal telles que *S. intermedius* s'ajoutent. Tandis que, les SCoN ne possédant pas la coagulase sont représentés par diverses espèces telles que *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, et *S. warneri*. Certaines souches d'espèces telles que *S. chromogenes*, *S. agnetis* et *S. hyicus* ont la capacité de coaguler le plasma bien qu'elles ne possèdent pas le gène *coa* complexifiant ainsi cette catégorisation^{27,28}.

La classification des espèces selon l'ARN ribosomal 16S est la méthode de référence bien que celle-ci devienne limitée par la forte similarité entre espèces. Ainsi, de nouvelles techniques émergent basées notamment sur l'analyse de séquences d'ADN de gènes tels que *dnaJ* (protéine 40 du choc thermique), *rpoB* (sous-unité β de l'ARN polymérase) et *tuf* (facteur d'élongation Tu)²⁹.

1.2. *Staphylococcus aureus*

1.2.1. Morphologie et phénotype

Comme l'ensemble des espèces du genre *Staphylococcus*, *S. aureus* est une bactérie sphérique apparaissant le plus souvent sous forme d'amas à l'observation en microscopie photonique³⁰. Des observations de microscopies électroniques à balayage et à transmission ainsi que par force atomique ont révélé l'aspect sphérique de la bactérie avec une surface lisse, une paroi épaisse, une membrane cytoplasmique distincte et un cytoplasme amorphe (Fig. 2)³¹⁻³⁴. Le diamètre de *S. aureus* est compris entre 0,5 et 1 μM ³⁵.

Les colonies de *S. aureus* sont caractérisées par leur aspect large, lisse et élevé au centre avec une couleur jaune / dorée qui est le résultat de la staphyloxanthine, un caroténoïde produit par la

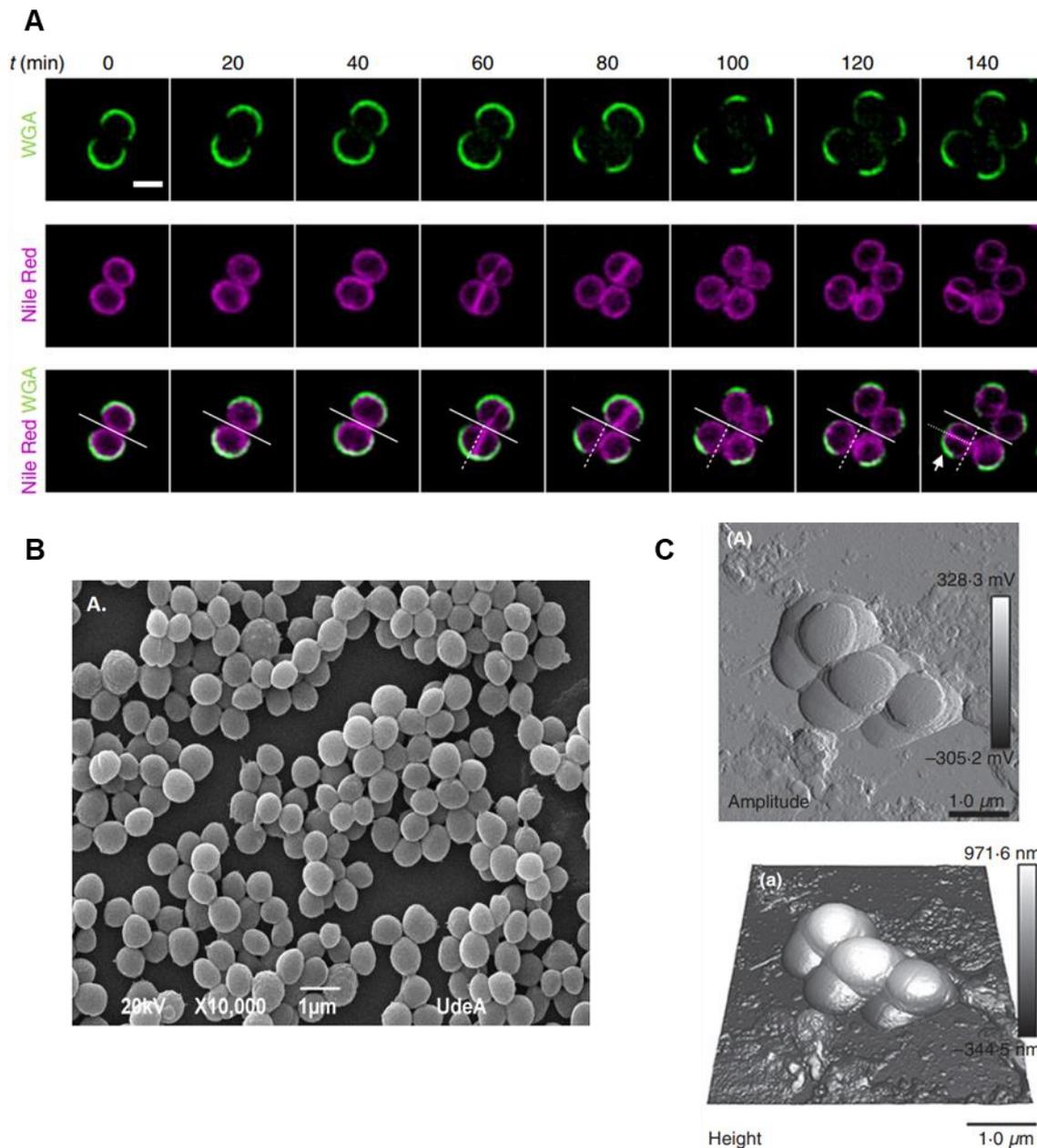


Figure 2 : Images de microscopie photonique, électronique à balayage et par force atomique de *S. aureus*. (A) Microscopie photonique à éclairage structuré en temps réel, peptidoglycane marqué au WGA-488 (acronyme de « *wheat germ agglutinin 488* ») et membrane marquée au *Nile Red*. (B) Microscopie électronique à balayage. (C) Microscopie par force atomique. Modifiée d'après Saraiva et al., Tenea et al., Lima et al., respectivement avec autorisations.

bactérie³⁶. Habituellement, les colonies produisent des zones d'hémolyses sur géloses enrichies en sang dues à la production d'enzymes appelées hémolysines.

1.2.2. Classification

Au sein des souches de *S. aureus*, l'analyse génétique de gènes appartenant au génome-cœur permet de les classer selon leur degré de parenté. Un premier niveau de regroupement est le complexe clonal

(CC) et/ou séquence type (ST) des souches reposant sur 185 gènes et plus de 300 allèles incluant des gènes codant des facteurs de virulence et des protéines d'adhésion ainsi que des déterminants de la résistance aux antibiotiques³⁷. Un second niveau de regroupement est l'analyse du système agr (acronyme de « *Accessory Gene Regulator* ») qui permet de classer *S. aureus* en quatre catégories d'après des variations dans les séquences codant le circuit d'autoinduction³⁸.

1.2.3. Portage chez l'humain et pathogénicité

S. aureus est une bactérie commensale de l'humain qui colonise principalement la peau et les muqueuses⁴. Bien que plusieurs sites puissent être colonisés, l'intérieur des narines en est le principal réservoir muqueux. Des sites annexes de portages sont à noter tels que le périnée et le pharynx, dans une moindre mesure, le tractus gastro-intestinal, le vagin, et les aisselles.

Généralement, les porteurs sains de *S. aureus* peuvent être divisés en deux catégories, les porteurs transitoires et les porteurs permanents. Cette classification est basée sur la période où le porteur est colonisé ainsi que sur le pourcentage de prélèvement positif au cours du temps. Les définitions de ces catégories sont différentes entre les études épidémiologiques, ce qui peut en expliquer les variations. Environ 50 à 56% de la population saine est porteuse de *S. aureus* au niveau nasal selon les revues et répartie comme suit 30% (16 à 70%) à 32% (9% à 69%) de manière transitoire et 20% (12% à 30%) à 24% (9% à 37%) de manière permanente^{4,5}.

S. aureus est également un pathogène opportuniste majeur pouvant causer un large spectre d'infections, bénignes à mortelles, dans un contexte nosocomial ou communautaire. Ce pathogène est responsable d'infections toxiques, suppuratives de la peau et des tissus mous, de bactériémies, de pneumonies et d'infections ostéo-articulaires (IOA). Les travaux de recherche de cette thèse de doctorat s'inscrivent dans le contexte des IOA à *S. aureus*.

2. *Staphylococcus aureus* et les infections ostéo-articulaires

Les infections ostéo-articulaires (IOA) regroupent deux classes d'infections distinctes, les arthrites septiques et les infections du tissu osseux. Dans le vocabulaire français, les ostéomyélites se rapportent à des infections osseuses hématogènes tandis les autres infections du tissu osseux sont qualifiées d'ostéites. Dans le vocabulaire anglo-saxon le terme « osteomyelitis » correspond à l'ensemble des infections osseuses. Ces terminologies pouvant être source de confusion, précisons que le terme « ostéomyélite » est employé dans ce manuscrit dans son acceptation francophone.

2.1. Physiologie du microenvironnement osseux

2.1.1. L'os

Les os du corps humain sont au nombre de 213 et peuvent être plats, irréguliers, longs, et courts³⁹. Ils sont tous constitués d'une structure externe formée d'os compact, aussi appelé os cortical, entourant un cœur d'os spongieux, aussi appelé os trabéculaire (Fig. 3). Les os compact et spongieux se distinguent structurellement. L'os compact est dense, lui permettant de tolérer les forces de compression, tandis que l'os spongieux est composé de lacunes réduisant la masse du squelette³⁹. L'os spongieux est composé de plaques et bâtonnets trabéculaires intercalés dans le compartiment

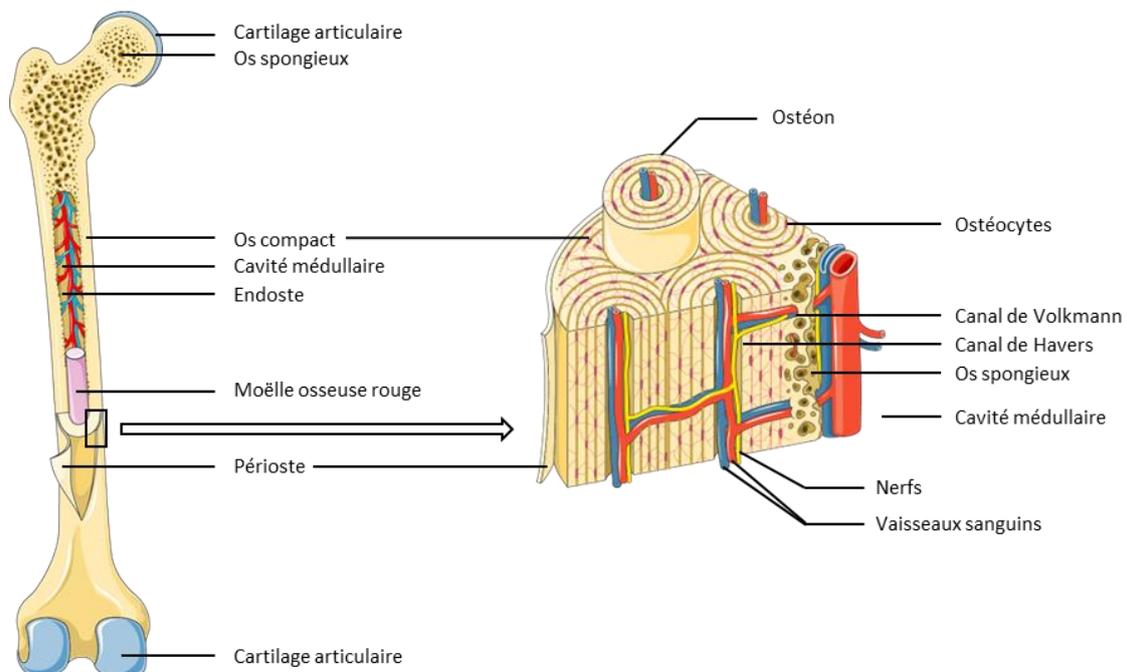


Figure 3 : Schéma d'un os long et de l'os cortical. Réalisé d'après les schémas de <https://smart.servier.com/> avec autorisation.

médullaire. Les os compact et spongieux ont pour unité de base l'ostéon formé de lamelles. Dans le cas de l'os spongieux, les ostéons sont appelés « paquets » et sont de forme semi-lunaire. Dans le cas de l'os cortical, les ostéons sont appelés système haversien. Ces systèmes sont cylindriques formant un réseau interconnecté au sein de l'os. La partie centrale de ces cylindres est caverneuse, nommée canal de Havers, contenant les vaisseaux sanguins, lymphatiques ainsi que les nerfs. L'ensemble de l'os cortical est parcouru par ce système de vaisseaux et de nerfs à l'aide de canaux perforants qui émanent perpendiculairement au canal de Havers, ils sont nommés canaux de Volkmann. A l'interface des lamelles des ostéons se trouve des lacunes nommées ostéoplastes, niches des ostéocytes de la lignée ostéoblastique (voir introduction 2.1.2.2.).

L'os compact est bordé à sa surface externe et interne d'un périoste et d'un endoste, respectivement. Le périoste est un tissu conjonctif fibreux que l'on retrouve sur l'ensemble des os corticaux hormis au niveau des articulations où il fait place au cartilage articulaire. Le périoste est impliqué dans la croissance en épaisseur et la réparation des fractures. L'endoste est une structure membranaire recouvrant également les os spongieux ainsi que les canaux de Volkmann. Le périoste et l'endoste comportent des vaisseaux sanguins, des fibres nerveuses, ainsi que des ostéoblastes et ostéoclastes impliqués dans le renouvellement osseux (voir introduction 2.1.2.).

La moëlle osseuse est un tissu conjonctif mou se situant à l'intérieur des os. Elle est constituée d'un stroma qui est le support de l'hématopoïèse et le siège de cellules souches mésenchymateuses et des précurseurs ostéoclastiques⁴⁰. La moëlle osseuse chez l'enfant est exclusivement rouge, elle est ensuite substituée par une moëlle osseuse jaune majoritairement composée de tissu adipeux. A l'âge adulte, la moëlle osseuse est retrouvée uniquement aux épiphyses des os longs ainsi qu'au niveau des os plats⁴¹.

2.1.2. Le remodelage osseux et les cellules impliquées

Le remodelage osseux est un procédé continu permettant de maintenir la force et l'homéostasie minérale de l'os au cours de la vie (Fig. 3)³⁹. Il permet de prévenir l'accumulation de petits dommages par le remplacement de portion d'os ancien *via* la minéralisation de nouvelles matrices extra osseuses (MEO). Les sites de remodelage apparaissent majoritairement de façon aléatoire mais peuvent aussi être dirigés sur des zones nécessitant une réparation^{42,43}. Les cellules impliquées dans ce remodelage sont les ostéoclastes et les ostéoblastes qui respectivement et séquentiellement résorbent l'os ancien et forme le nouveau. Le cycle du remodelage osseux est composé de phases successives : la résorption, le renversement et la formation comprenant la minéralisation. Il vient ensuite une phase de quiescence sans remodelage osseux (Fig. 4).

2.1.2.1. Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont les seules cellules connues ayant la capacité de résorber l'os³⁹. Les ostéoclastes sont originaires des cellules souches hématopoïétiques s'engageant dans la voie myéloïde. Les précurseurs mononucléés ainsi formés vont fusionner donnant naissance à un ostéoclaste activé multinucléé. La différenciation et l'activation ostéoclastique sont régulées par l'apparition successive de différentes molécules. Parmi les plus importantes, nous pouvons citer la cytokine M-CSF (acronyme de « *Macrophage colony-stimulating factor* ») qui est un facteur de croissance permettant la prolifération, la survie, et la différenciation des cellules appartenant à la lignée monocyte-macrophage. La seconde cytokine, critique pour le développement des ostéoclastes, est la RANKL (acronyme de « *receptor activator of NF- κ B ligand* »). Ces deux cytokines, M-CSF et RANKL, sont produites par le stroma de la moëlle osseuse ainsi que par les ostéoblastes dormants nommés cellules bordantes. Cette expression permet notamment le recrutement des précurseurs ostéoclastiques au site de la résorption^{39,44}. M-CSF favorise l'expression du récepteur RANK qui suite à la liaison avec RANKL induit la fusion des précurseurs mononucléés⁴⁵. L'ostéoprotégérine (OPG) est une protéine sécrétée capable de moduler l'activation des ostéoclastes en agissant comme un récepteur leurre à RANKL⁴⁶. À la suite de la phase d'activation, les cellules précurseurs expriment les gènes caractéristiques de la lignée ostéoclastique tels que la cathepsine K, TRAP, le récepteur à la calcitonine et l'intégrine $\alpha 4\beta 3$.

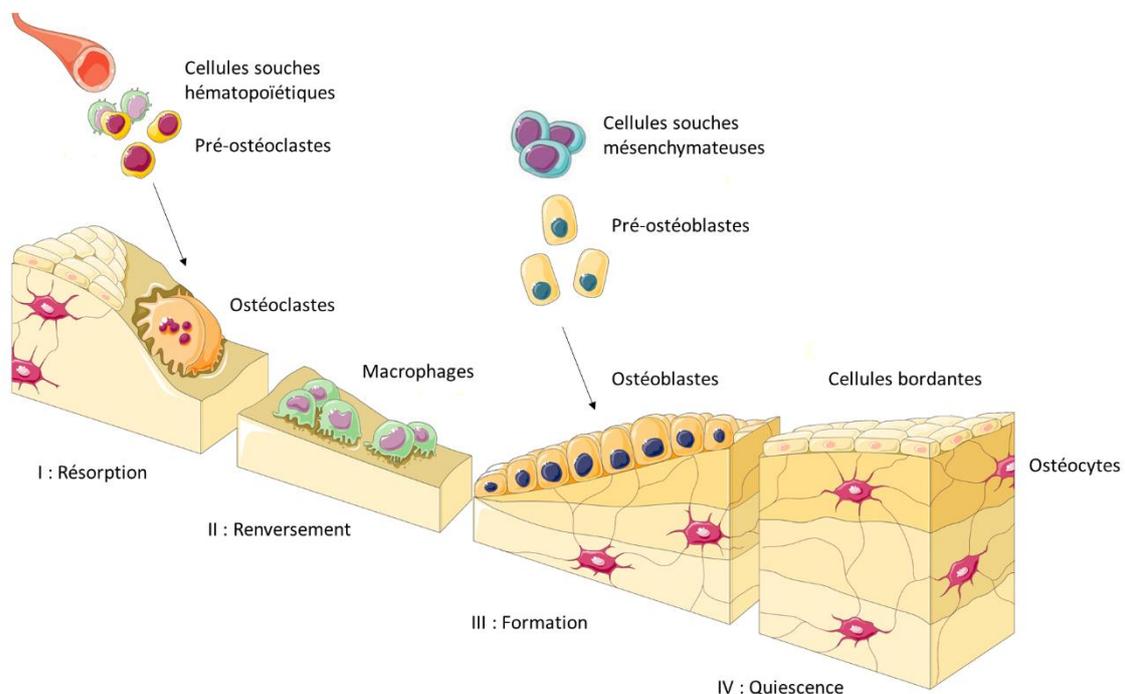


Figure 4 : Le remodelage osseux et les cellules impliquées. Modifiée d'après les schémas de <https://smart.servier.com/> avec autorisation.

La phase de résorption du cycle du remodelage osseux débute après l'adhésion de l'ostéoclaste à la MEO. L'adhésion forme des zones d'étanchéité autour des compartiments de résorption sous les ostéoclastes. Cet attachement est effectué par la liaison entre le récepteur à l'intégrine $\alpha 4 \beta 3$ exprimé à la surface de l'ostéoclaste et les protéines de la MEO contenant la séquence arginine-glycine-asparagine tels que l'ostéopontine et la sialoprotéine osseuse (BSP)^{39,47}. L'adhésion de l'ostéoclaste induit sa polarisation. Elle est caractérisée par une membrane basale en brosse due à la fusion des vésicules acidifiées contenant notamment des métalloprotéinases matricielles et de la cathepsine K. L'exocytose et l'action des enzymes sécrétées pour la digestion de la matrice organique osseuse sont favorisées par l'environnement acide du compartiment de résorption^{48,49}. Cette acidité résulte de la sécrétion d'ions hydrogènes par les ostéoclastes. Le pH acide lyse la matrice minérale de l'os tandis que la cathepsine K dégrade le collagène de type I⁴⁵. La phase de résorption se termine par l'apoptose des ostéoclastes.

La phase de renversement du cycle du remodelage osseux permet la transition entre la résorption de l'os et sa formation médiée par les ostéoblastes. Durant cette phase, des cellules mononucléées bordant la lacune de résorption se différencient en macrophages-*like* et retirent les débris restants⁵⁰.

2.1.2.2. La lignée ostéoblastique

Les cellules de la lignée ostéoblastique sont originaires de cellules souches mésenchymateuses. Les progéniteurs ostéoblastiques donnent naissance à trois catégories de cellules : les ostéoblastes, les ostéocytes, et les cellules bordantes³⁹. La différenciation et l'activation ostéoblastique sont régulées par l'apparition successives de différents facteurs de transcription. Parmi les plus importants, nous pouvons citer *Runt* (RUNX2), *Osterix* (OSX aussi appelé SP7) et la voie de signalisation *wint* (WNT)^{51,52}. RUNX2 est requis pour la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en pré-ostéoblastes et déclenche l'expression des protéines majeures de la MEO^{53,54}. Il empêche la transition d'ostéoblastes immatures à matures et inhibe la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en chondrocytes et adipocytes. Plus tard, OSX et la voie WNT entre en jeu et permettent le passage de pré-ostéoblastes à ostéoblastes matures. Les ligands WNT se lient aux récepteurs *Frizzled* et leurs co-récepteurs LRP5 et 6 (acronyme de « low-density lipoprotein receptor-related protein 5 or 6 ») empêchent la phosphorylation de la β -caténine⁵². Ainsi stabilisée, la β -caténine s'accumule dans le cytosol avant d'entrer dans le noyau et de stimuler la transcription de gènes cibles permettant le passage d'ostéoblastes immatures à matures.

La phase de formation du cycle du remodelage osseux a lieu tout au long du processus de différenciation de la lignée ostéoblastique par la sécrétion de protéines et de protéoglycanes de

manière vectorielle³⁹. Les ostéoblastes sont recrutés à la zone de résorption suite au relargage de facteurs initialement stockés dans la matrice osseuse tels que le TGFβ⁵⁰. Le répertoire d'ostéoblaste est hétérogène avec une expression de gènes différenciée pouvant expliquer notamment les variations d'architecture retrouvées à différents sites osseux. La MEO est composée d'une phase minérale et d'une phase organique dont le collagène de type I, sécrété par les ostéoblastes sous forme de fibrilles, en est le composant majeur. Les collagènes de type II, IV, et FACIT (acronyme de « *fibril-associated collagens with interrupted triple helix* ») composent la phase organique en plus faible quantité. Au cours de la différenciation ostéoblastique, le stade immature finalise la MEO organique tandis que le stade mature minéralise ensuite la MEO suite à la répression de RUNX2^{39,53}. La minéralisation de la MEO correspond principalement à la formation de cristaux d'hydroxyapatite comblant les espaces libres entre les fibrilles de collagène⁵⁵. L'hydroxyapatite est obtenue à l'aide de calcium et de phosphate concentrés par les ostéoblastes matures, les chondrocytes hypertrophiques, et les odontoblastes⁵⁶. La phosphatase alcaline en hydrolysant les pyrophosphates, des inhibiteurs de la déposition minérale, libère du phosphate inorganique et favorise la minéralisation⁵⁶. Les protéines sécrétées par l'ostéoblaste capables de lier le calcium et le phosphate telles que l'ostéonectine et la BSP agissent positivement sur la minéralisation de la MEO en initiant la nucléation de l'hydroxyapatite³⁹. L'ostéopontine et l'ostéocalcine quant à elles sont des inhibiteurs de la minéralisation impliquées dans la survie des ostéoclastes. La combinaison de ces protéines régule la taille et la quantité des cristaux d'hydroxyapatite au cours de la minéralisation de la MEO. La phase minérale confère la rigidité à l'os tandis que la phase organique confère l'élasticité et la flexibilité. La finalité de chaque cycle de remodelage osseux est la production de nouveaux ostéons.

A l'issue de l'étape de minéralisation, l'ostéoblaste mature peut soit mourir par apoptose, soit se différencier en cellules bordantes dans des zones dépourvues de remodelage osseux en cours, soit se différencier en ostéocytes suite à l'emmurement dans la matrice osseuse^{57,58}. Les ostéocytes, logés dans des lacunes nommées ostéoplastes, représentent la majeure partie des cellules du tissu osseux. Ce sont les dernières cellules différenciées de la lignée ostéoblastique. Les ostéocytes forment un réseau syncitial lié par des filopodes dont la première fonction est de transformer les signaux de flexion ou d'étirement de l'os en une activité biologique⁵⁹. Ce sont des mécano-senseurs capables de réguler le remodelage osseux *via* la voie WNT notamment par l'expression de la sclérostine. Cette dernière est un inhibiteur de LRP5 favorisant la différenciation des ostéoblastes négativement et des ostéoclastes positivement^{60,61}. Comme les ostéoblastes, les cellules bordantes et les ostéocytes influencent le remodelage osseux par la production d'OPG et de RANKL qui sont impliqués dans la résorption osseuse médiée par les ostéoclastes^{62,63}.

2.2. Les infections ostéo-articulaires

2.2.1. Classification et pathologie des infections ostéo-articulaires

La première infection osseuse est attribuée à un dimérodon, reptile du permien ayant vécu entre 295 et 272 millions d'année avant notre ère⁶⁴. Il présente les traces évidentes d'une inflammation faisant suite à une fracture de la colonne vertébrale. Les premières descriptions d'IOA ont été faites sur fractures par Hippocrate, ayant vécu entre 460 et 370 ans avant notre ère⁶⁵. Les IOA hémotogènes ont ensuite été décrites par William Bromfield en 1773 qu'il nomma « abcès médullaire »⁶⁶. En 1831, Nathan Smith décrivant ces infections les nomma « nécroses » pour qualifier la mort de l'os^{66,67}. Finalement c'est en 1844 qu'Auguste Nélaton introduisit le terme d'ostéomyélite pour désigner une infection de l'os et de la moëlle ainsi qu'une inflammation⁶⁸.

Il existe plusieurs systèmes de classifications des IOA. Parmi ces classifications, le système Cierny-Mader, apparu en 1984, est basé sur deux critères : le type et la sévérité de l'atteinte osseuse ainsi que l'état de santé du patient⁶⁹. En 2011, une classification plus complexe a été proposée basée sur 7 critères : la présentation clinique, l'étiopathogénèse, l'anatomo-pathologie, le statut et l'âge du patient, le microorganisme impliqué, le défaut osseux et le défaut des tissus mous⁷⁰. Cependant, le système le plus utilisé a été créé en 1970 et distingue les IOA en trois catégories selon la source de l'infection^{71,72} :

- IOA résultant de la propagation locale d'une première source d'infection contiguë. Ces infections peuvent faire suite à un trauma ou une inoculation directe durant un acte chirurgical notamment l'implémentation d'un matériel prothétique, par rupture d'asepsie. A la suite de fractures ouvertes et d'arthroplasties articulaires, la première cause d'échec thérapeutique est l'infection⁷³⁻⁷⁵.
- IOA dues à une insuffisance vasculaire ou neuropathique. Les patients impliqués sont majoritairement atteints de diabète. Ces infections sont principalement caractérisées par la propagation d'une première infection des tissus mous du pied aux os adjacents. Les ulcères des pieds diabétiques sont la plus grande cause d'amputations en dessous du genoux dans les pays développés technologiquement⁶.
- Les IOA de source hémotogène ou ostéomyélite. Ces infections surviennent principalement chez les enfants prépubères et les personnes âgées. Elles sont caractérisées par la migration de bactéries provenant de la circulation sanguine vers le tissu osseux. Chez l'enfant, les os longs au niveau des zones métaphysaires sont les plus communément touchés dû à leur anatomie particulière. En effet, dans cette région le flux sanguin est ralenti et turbulent favorisant la transmigration des bactéries.

Les IOA se caractérisent par une inflammation sévère, un œdème, une réduction de la vascularisation notamment par thrombose des petits vaisseaux ainsi qu'une destruction du tissu osseux^{12,76}. Ainsi, un signe clinique des infections osseuses est une réduction de la masse osseuse localisée, appelée ostéolyse. Cette destruction est le résultat en partie de la sécrétion de cytokines ostéoclastogéniques et de la réduction du réservoir ostéoblastique par l'activité lytique notamment de *S. aureus*⁷⁷. Cependant, l'impact de *S. aureus* sur la capacité de différenciation et de minéralisation des ostéoblastes n'est pas encore totalement élucidé. En effet, différentes études démontrent par exemple soit une prévention soit une favorisation de la minéralisation lors d'infection *in vitro*^{77,78}. La formation d'abcès purulent peut conduire à la formation d'un séquestre osseux, caractéristique des infections chroniques. Ces deux phénomènes pathologiques seront détaillés dans les sections suivantes. Les séquestres osseux et abcès peuvent être entourés de nouvelles formations osseuses appelées involucra formées de gaine périosté. A travers un tractus osseux, le pus ou l'exsudat peuvent s'échapper du site de l'infection osseuse et peuvent ainsi propager l'infection. Dans le cadre des arthrites septiques, infections de l'espace articulaire, la multiplication du pathogène peut engendrer un épanchement purulent local contenant un cocktail d'enzymes, de toxines et de radicaux libres provenant des cellules immunitaires et des bactéries. Celui-ci peut provoquer la destruction du cartilage et de l'os sous-chondral. Les complications de l'arthrite septique incluent les bactériémies pouvant conduire à des méningites et endocardites.

2.2.2. Epidémiologie

Les IOA sont associées à un fort taux de morbidité et de mortalité pouvant atteindre 8%^{6,7}. Malgré les innovations techniques médicales, le taux d'incidence des IOA est en constante augmentation^{7,16}. Ceci est notamment dû au vieillissement de la population qui accroît le nombre total d'arthroplasties de hanche, de genoux, d'épaules et de coudes⁷⁹⁻⁸². Le taux d'incidence de toutes les infections orthopédiques est de 0,1% à 30% tandis que celui des primo infections articulo-prothétique est de 1 à 2% avec un taux de rechute de 8% pour les opérations ciblant les hanches et les genoux⁸⁰. De plus, le taux d'incidence des IOA pédiatriques a augmenté de 2,8 fois en 20 ans⁸³.

Le taux d'incidence des IOA contiguë relative à un trauma représente de 2% à 50% des fractures ouvertes selon leur sévérité⁸⁴⁻⁹⁰. Les IOA dues à une insuffisance vasculaire chez les patients diabétiques présentent le plus fort taux de morbidité avec deux tiers des cas se finalisant par une amputation⁹¹⁻⁹³. L'espérance de vie associée est de l'ordre de 5 ans. Les ostéomyélites représentent 20% des IOA avec une prévalence accrue chez les patients de moins de 17 ans pouvant atteindre 85% des cas^{16,76}.

Il est estimé que les infections articulo-prothétique de genoux et de hanches auront un coût de 1,85 milliards de dollars en 2030 aux Etats-Unis ce qui est en adéquation avec les coûts actuels des infections orthopédiques allant de 17 000 à 150 000 dollars par patient^{80,94}.

2.2.3. Les pathogènes impliqués dans les infections ostéo-articulaires

Tandis que les IOA par contiguïté et insuffisance vasculaire sont majoritairement polymicrobiennes, les IOA hématogènes sont principalement dues à un unique pathogène^{6,71,76}. Les IOA dans leur ensemble sont le plus communément causées par *S. aureus*, représentant en fonction des études 45 à 80% des cas^{8-10,95-97}. A l'instar de *S. aureus* une multitude d'autres pathogènes peuvent être responsables d'IOA.

Dans le cas d'une infection par contiguïté, notamment faisant suite à un trauma, le pathogène incriminé dépend du type et de la sévérité de la blessure. En effet, les infections dues à une fracture ouverte sans contamination environnementale sont causées par la flore de la peau. A l'inverse, si la fracture ouverte est concomitante à une contamination environnementale alors l'IOA résultante peut être due à un large panel de pathogène. Nous pouvons citer pour les bactéries à Gram positif les genres *Bacillus* et *Enterococcus*, et pour les Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Enterobacter cloacae*^{6,72}. Les bactéries du genre *Clostridioïdes* et les mycobactéries non-tuberculeuses peuvent aussi conduire à des IOA dans ces conditions. Les IOA par insuffisance vasculaire peuvent pour leur part être dues aux SCoN et Enterobacteriaceae, ainsi qu'à *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, et *Pseudomonas aeruginosa*^{98,99}. Les IOA hématogènes peuvent également être causées par *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* et la bactérie Gram négative *Kingella kingae* fréquemment incriminée chez les enfants en bas âge¹⁰⁰⁻¹⁰². Chez les prématurés, nous pouvons retrouver les streptocoques du groupe B et les bactéries Gram négative entériques¹⁰³.

2.2.4. Traitement des infections ostéo-articulaires

Avant l'apparition des antibiotiques, notamment la pénicilline comme agent thérapeutique en 1940, la prise en charge des IOA se caractérisait uniquement par une intervention chirurgicale : l'amputation ou le débridement^{104,105}. La méthode du débridement lors d'IOA a été décrite en 1927 par Winnett Orr. Elle visait à retirer intégralement les tissus infectés dont l'os nécrotique. Les pansements de la plaie, laissée ouverte et sans antiseptique, devaient être changés le moins possible pour éviter des infections secondaires dont le signe clinique était la fièvre. 20 ans plus tard, l'action de la pénicilline pour le traitement d'ostéomyélite infantile dans une approche non chirurgicale a été rapporté¹⁰⁶.

De nos jours, la prise en charge des IOA est interdisciplinaire impliquant par pondération décroissante : l'évaluation du patient, un traitement antibiotique, une intervention chirurgicale, ainsi que de manière encore anecdotique des traitements innovants tels que la phagothérapie^{6,11,15,76}. Dans la chronologie du traitement des IOA, les antibiotiques sont majoritairement mis en place en première intention, ensuite si nécessaire une intervention chirurgicale peut toutefois avoir lieu. Ceci limite les thérapies antimicrobiennes ciblées notamment dû à la difficulté de prélèvement d'échantillons pré-opératoires⁶. Les indications d'infections osseuses nécessitant une opération chirurgicale sont la présence d'abcès, de séquestrum osseux, d'infection chronique, d'arthrite septique concomitante, ainsi que l'échec thérapeutique du traitement antibiotique initial. Dans le cas d'infection sur matériel aigüe et sans complication, l'intervention chirurgicale, à l'appréciation du praticien, peut suivre le protocole nommé DAIR, acronyme de « débridement, antibiotiques, irrigation, rétention »^{107,108}. Il permet de retirer les tissus mous infectés et de réduire la charge bactérienne. Dans le cas d'échec du protocole DAIR ou d'infections osseuses chroniques sur implant, l'intervention chirurgicale a pour but de remplacer la prothèse infectée. La révision en 2 temps opératoires est le traitement chirurgical standard. Il permet l'excision de tous les tissus durs et mous infectés, un lavage abondant, et l'ablation de la prothèse en place. Un espaceur en ciment aux antibiotiques est installé à la place de la prothèse retirée^{6,11,15,76}. Ces ciments sont majoritairement constitués d'une base de poly-méthyl-méthacrylate chargée en antibiotique lors de sa polymérisation⁶. Ils permettent une décharge d'antibiotiques locale à forte dose et un remplacement des tissus et prothèses retirés maintenant ainsi la tension des tissus restants avant le second temps opératoire. Celui-ci consiste à la réimplantation d'une nouvelle prothèse. Toutefois, il y a un intérêt grandissant pour la chirurgie de révision en 1 temps. Celle-ci permet de réduire le temps de séjour hospitalier et le nombre d'interventions chirurgicales requises puisque l'ablation et la réimplantation de la nouvelle prothèse sont effectuées lors de la même opération. L'avantage des techniques en 1 ou 2 temps l'une sur l'autre ne semble pas clair et est une source d'intense débats¹⁰⁹⁻¹¹¹. Les décharges des ciments ne durent que quelques jours à haute dose et ils sont ensuite de probables sources d'infections secondaires. En effet, les décharges résiduelles à des concentrations sous-inhibitrices d'antibiotiques ainsi que l'augmentation des surfaces contaminables par la présence du ciment pourraient conduire à l'apparition d'infections chroniques et de résistances.

Des protocoles pour le traitement des infections osseuses sur implant ont été édités notamment par l'IDSA (acronyme de « Infectious Diseases Society of America ») et l'ESPID (acronyme de « European Society for Pediatric Infectious Disease »)^{112,113}. L'IDSA recommande pour les infections osseuses sur implants un traitement empirique à la rifampicine combinée à la vancomycine ou à la daptomycine durant deux semaines¹¹². Puis il est recommandé de combiner la rifampicine avec soit une

fluoroquinolone, soit du triméthoprime-sulfaméthoxazole, soit de la tétracycline, soit de la clindamycine durant 3 à 6 mois, ceci afin d'éviter l'apparition de résistance à la rifampicine.

Des nouvelles approches dans la prise en charge d'IOA sont à noter telles que l'utilisation d'antibiotiques conjugués à des anticorps monoclonaux (AAC) ou la phagothérapie. Les AAC, actuellement en phase pré-clinique, se lient à *S. aureus*, à la suite de son internalisation dans les cellules hôtes, des protéases eucaryotes vont permettre le relargage de l'antibiotique conjugué¹¹⁴⁻¹¹⁶. Ce dernier en forte concentration élimine ainsi les *S. aureus* intracellulaires potentiellement sources d'infections chroniques. Les bactériophages ont été proposés comme traitement dans les années 1920 puis abandonnés à l'apparition des antibiotiques sauf en Pologne, Géorgie et Russie¹¹⁷. Ils sont de nouveaux à l'étude dans les pays de l'ouest depuis quelques années comme adjuvant. En France, l'agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) a autorisé un accès compassionnel pour des bactériophages anti-*Staphylococcus aureus* pour les traitements d'IOA graves en impasse thérapeutique¹¹⁸. Sporadiquement et à titre exceptionnel, dans des cas d'infections du genou notamment, des bactériophages ont été utilisés en dernier recours^{119,120}.

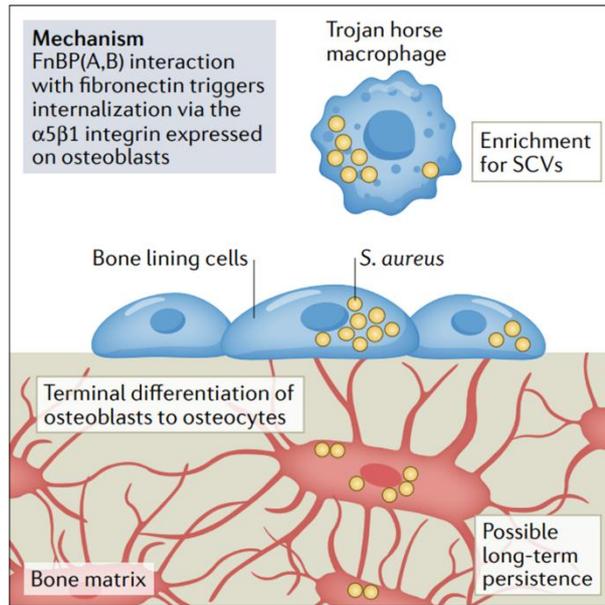
Enfin, la prévention de l'infection est un aspect important de la prise en charge du patient permettant de réduire l'incidence des IOA. Les antibioprofylaxies systémiques précédant les interventions chirurgicales sont les préventions les plus efficaces. Elles font notamment partie du protocole du SCIP (acronyme de « *Surgical Care Improvement Project* ») pour la prévention des infections¹²¹. L'emploi de prothèses à surfaces antimicrobiennes, garnies d'argent ou de gentamicine, sont un traitement local et préventif à développer^{122,123}. Les stratégies vaccinales pour leur part n'ont à ce jour pas donné de résultats satisfaisants malgré des études atteignant la phase clinique¹⁵.

2.2.5. Physiopathologie des infections ostéo-articulaires

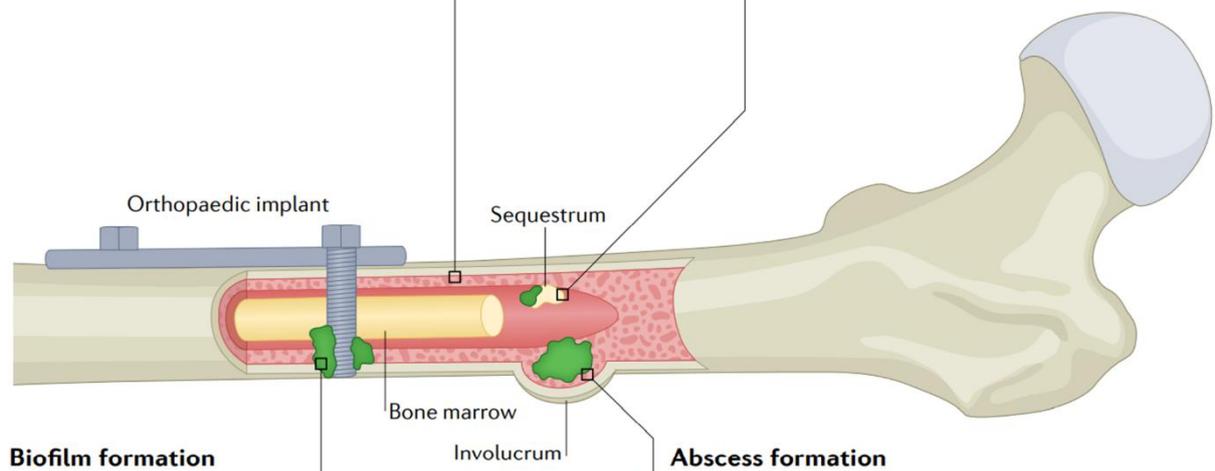
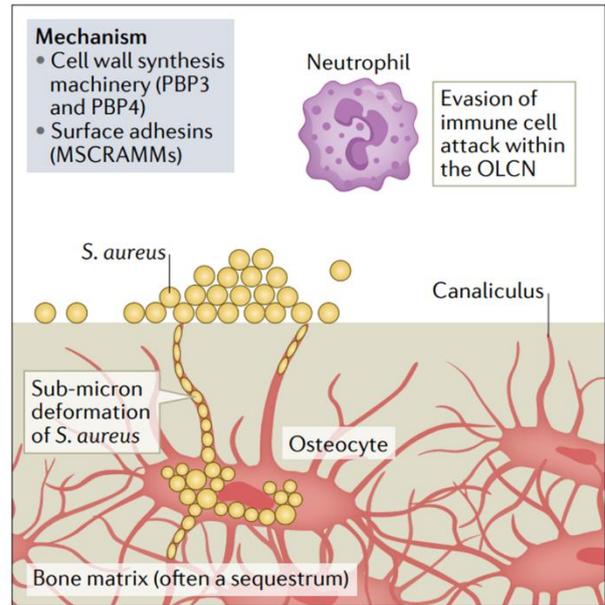
2.2.5.1. Généralités

Bien que la prise en charge par antibiotiques des IOA à de nos jours un fort taux de réussite, il reste toutefois de nombreux cas nécessitant une intervention chirurgicale combinée à un traitement antibiotique de long terme. Malgré cela, on observe une récurrence d'infections dans 20 à 40% des cas¹¹⁻¹⁴. L'intervalle de temps entre ces récurrences peut s'étendre de quelques mois à bien des années plus tard^{7,11}.

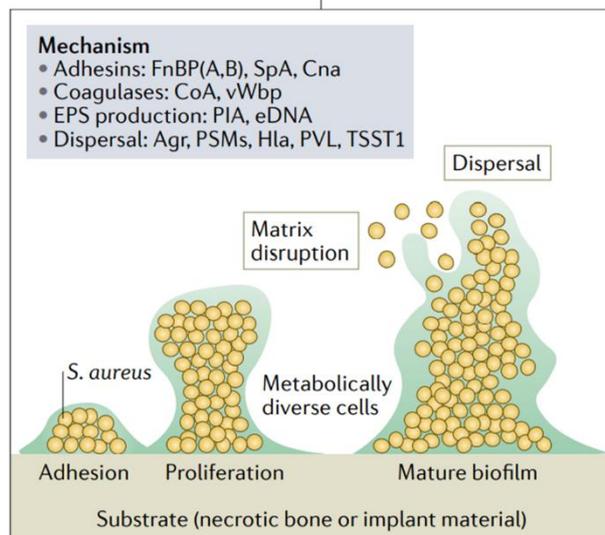
Intracellular infection



OLCN invasion



Biofilm formation



Abscess formation

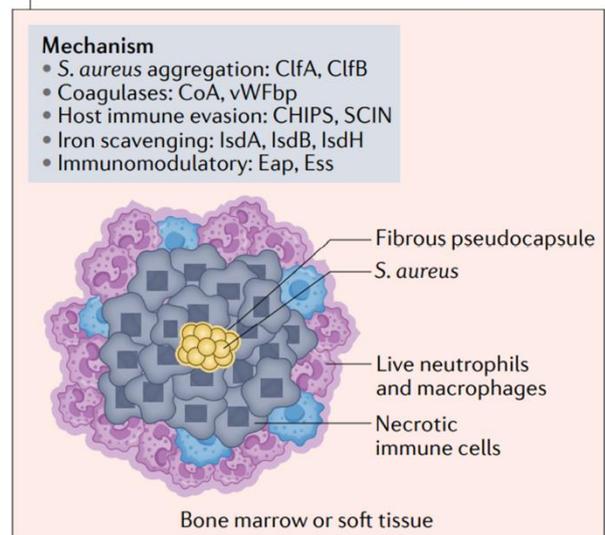


Figure 5 : Mécanisme d'échappement mécanique de *S. aureus* lors des infections ostéo-articulaires.
 D'après Masters et al. Reproduit avec l'autorisation de Springer Nature.

Notons les cas particuliers de deux patients dont la récurrence a eu lieu environ 75 et 80 ans après la première infection traitée chirurgicalement^{124,125}. Ces deux patients ont été infectés par *S. aureus* et pour l'un d'eux, une analyse génétique a révélé qu'il s'agissait de la même souche ayant gardé sa sensibilité à la pénicilline et à l'oxacilline. Ce cas met en lumière la capacité de *S. aureus* à rester quiescent sur des décennies, d'échapper au système immunitaire et de se réveiller causant une récurrence sévère de l'infection.

Le succès thérapeutique peut être impacté par la difficulté des antibiotiques à atteindre une concentration adéquate au sein du tissu osseux due à sa structure physiologique particulière qui en diminue la pénétration¹²⁶⁻¹²⁸. De plus, des mécanismes d'échappement, créant des réservoirs de pathogènes, peuvent également impacter le succès thérapeutique. Ces réservoirs permettent un échappement au système immunitaire, à l'action des antibiotiques, et au débridement en rendant pour certains les pathogènes difficilement identifiable par le chirurgien. Ces mécanismes d'échappement physiques confèrent une protection mécanique aux bactéries et sont à dissocier de la protection conférée par l'état physiologique de la bactérie.

Le phénotype bactérien appelé SCV (acronyme de « *Small colony variants* ») et les persisters, sous-population bactérienne non ou lentement répliquative survivant à un traitement bactéricide au sein d'une population clonale sensible, peuvent être concomitant à l'ensemble des mécanismes d'échappement mécaniques et confèrent une protection physiologique. Les SCV se caractérisent notamment par leur phénotype particulier sur gélose d'agar. Ils forment des colonies de tailles réduites dues à un défaut de croissance de la population, ou un retard à la première étape répliquative, ou un arrêt de croissance précoce. Dans le contexte des IOA, *S. aureus* ayant un phénotype SCV a été extensivement étudié¹²⁹⁻¹³¹. Ce phénotype a été décrit dans le cadre d'infections chroniques et est suspecté d'être responsable de la chronicisation et des rechutes. Cependant, ils ne sont actuellement pas pris en compte dans la stratégie thérapeutique¹³².

S. aureus étant le pathogène majeur des IOA, nous aborderons les mécanismes d'échappement mécanique de la récurrence *via* son prisme de lecture.

2.2.5.2. Biofilm

La formation de biofilm sur les prothèses et les os nécrotiques est impliquée dans la pathologies des IOA (Fig. 5)¹⁵. Il confère une résistance mécanique et limite la diffusion des antibiotiques ainsi que des cellules immunitaires.

A de faible densité de population les MSCRAMM (acronyme de « *Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* ») sont exprimés et permettent l'initiation de l'adhésion sur les surfaces abiotiques¹³³. A la suite de cette adhésion, les bactéries continuent de proliférer et sécrètent de manière concomitante des substances extracellulaires telles que des polysaccharides et de l'ADN qui forment la matrice du biofilm¹⁵. Lorsqu'une densité de population seuil est atteinte le système agr, un senseur du quorum, est activé¹³⁴. Celui-ci induit la répression de l'expression des adhésines de surfaces et l'induction de l'expression de toxines telles que les PSMs, la PVL, et la toxine- α . Ceci conduit à la rupture du biofilm et à la dispersion des bactéries le constituant^{133,134}.

2.2.5.3. Abcès et séquestre osseux

La formation d'abcès et de séquestre osseux est un élément clefs de la récurrence des IOA (Fig. 5). *S. aureus* possède la capacité d'infecter la moëlle osseuse et les tissus mous par la formation d'abcès. Ces derniers confèrent un échappement à l'action des antibiotiques et du système immunitaire par la formation d'une barrière protectrice^{135,136}. Cette dernière est créée par l'intermédiaire de facteurs de virulence membranaires et sécrétés de *S. aureus*. Les facteurs de virulence sécrétés qui sont impliqués dans la formation d'abcès sont appelés cofacteurs. Ils n'ont pas d'activité enzymatique par eux-mêmes, mais possèdent la capacité d'activer des proenzymes de l'hôte, encore appelées « zymogènes »¹³⁷. Ces cofacteurs sont au nombre de trois : la coagulase (Coa), le facteur de lien protéique von Willebrand (vWbp), et la staphylokinase (Sak). Tandis que Coa et vWbp, par l'activation de la prothrombine, qui clive le fibrinogène en fibrine, induisent la formation de caillots fibrinaires. Le cofacteur Sak se lie à la plasmine, le complexe Sak-plasmine ainsi formé clive le plasminogène pour former de la plasmine qui rompt les caillots de fibrine permettant à *S. aureus* de se disséminer. Les facteurs de virulence de surface ClfA et ClfB (acronyme de « *Clumping factor A or B* »), via la liaison au fibrinogène sont impliqués dans la formation des abcès par l'agrégation plaquettaire^{138,139}.

De manière concomitante à la formation d'abcès, *S. aureus* sécrète les protéines d'évasion immunitaire telles que SCIN (acronyme de « *Staphylococcal complement inhibitor* ») et CHIPS (acronyme de « *Chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus aureus* ») pour échapper aux premières réponses immunitaires aigües¹⁴⁰. CHIPS impact négativement l'activation et la chimiotaxie des neutrophiles^{141,142}. Parallèlement, SCIN comme son nom l'indique est un inhibiteur du complément empêchant le clivage de C3 en C3b par l'inhibition des C3 convertases et ainsi il prévient la phagocytose efficace par les neutrophiles¹⁴³.

Au fur et à mesure que *S. aureus* s'agrège, des cellules immunitaires s'infiltrent et se dirigent contre l'abcès en formation^{15,144}. Ces cellules sont tuées par *S. aureus*, elles deviennent nécrotiques et

forment une barrière protectrice purulente empêchant l'action des cellules immunitaires viables et des antibiotiques contre le pathogène à l'intérieur de l'abcès. L'enzyme modifiant les acides gras (FAME) agit en synergie avec les lipases pour favoriser la survie de *S. aureus* dans les abcès. Tandis que les lipases dégradent les triglycérides, qui elles-mêmes inhibent l'activité de FAME, FAME détoxifie les acides gras relargués par les lipases qui sont toxiques pour la bactérie *via* estérification¹⁴⁵⁻¹⁴⁷.

L'unique méthode pour éradiquer un abcès est donc sa dissolution naturelle ou bien une intervention chirurgicale par débridement. Dans les infections chroniques, les abcès, rognant le périoste et affectant le flux sanguin, créés des zones non vascularisées d'os nécrotiques appelées séquestres osseux⁷⁶. Le séquestre osseux est une zone providentielle pour la formation de biofilm et l'invasion des ostéoplastes qui réduisent l'activité des antibiotiques du fait de leurs structures. De la même manière que pour les abcès, les séquestres osseux nécessitent d'être retirés par intervention chirurgicale puisqu'ils peuvent être la source d'infections récurrentes⁷⁶.

2.2.5.4. Invasion des ostéoplastes

S. aureus à la capacité d'atteindre et d'envahir les ostéoplastes via les canalicules (Fig. 5 et 6), notamment dans des modèles murins mais également dans des cas cliniques d'infections osseuses chroniques^{148,149}. *S. aureus*, non motile de 1 à 1,5 µm de diamètre, s'insère dans les canalicules de 0,1 à 0,6 µm de diamètre en se déformant. Il se propage ensuite vers les ostéocytes potentiellement par haptotaxie, durotaxie et prolifération binaire asymétrique. Un modèle *in vitro* mimant l'invasion des canalicules ainsi qu'une étude *in vivo* ont mis en lumière les protéines 3 et 4 liants la pénicilline (PBP3 et PBP4), impliquées dans la synthèse du peptidoglycane, comme cruciales pour l'invasion des ostéoplastes^{150,151}. Actuellement, il n'y a pas d'étude permettant de définir si les antibiotiques peuvent atteindre des concentrations inhibitrices au sein des ostéoplastes et du réseau canaliculaire. Dans un modèle murin, du bromodeoxyuridine a été ajouté à l'alimentation et a été retrouvé au sein d'un canalicule, confirmant sa diffusion sans pour autant informer sur sa concentration¹⁴⁸. *S. aureus* ainsi logé dans le système canaliculaire et les ostéoplastes pourrait être protégé du système immunitaire et de l'action des antibiotiques. Cette niche pourrait donc être une source de chronicisation et de rechute infectieuse.

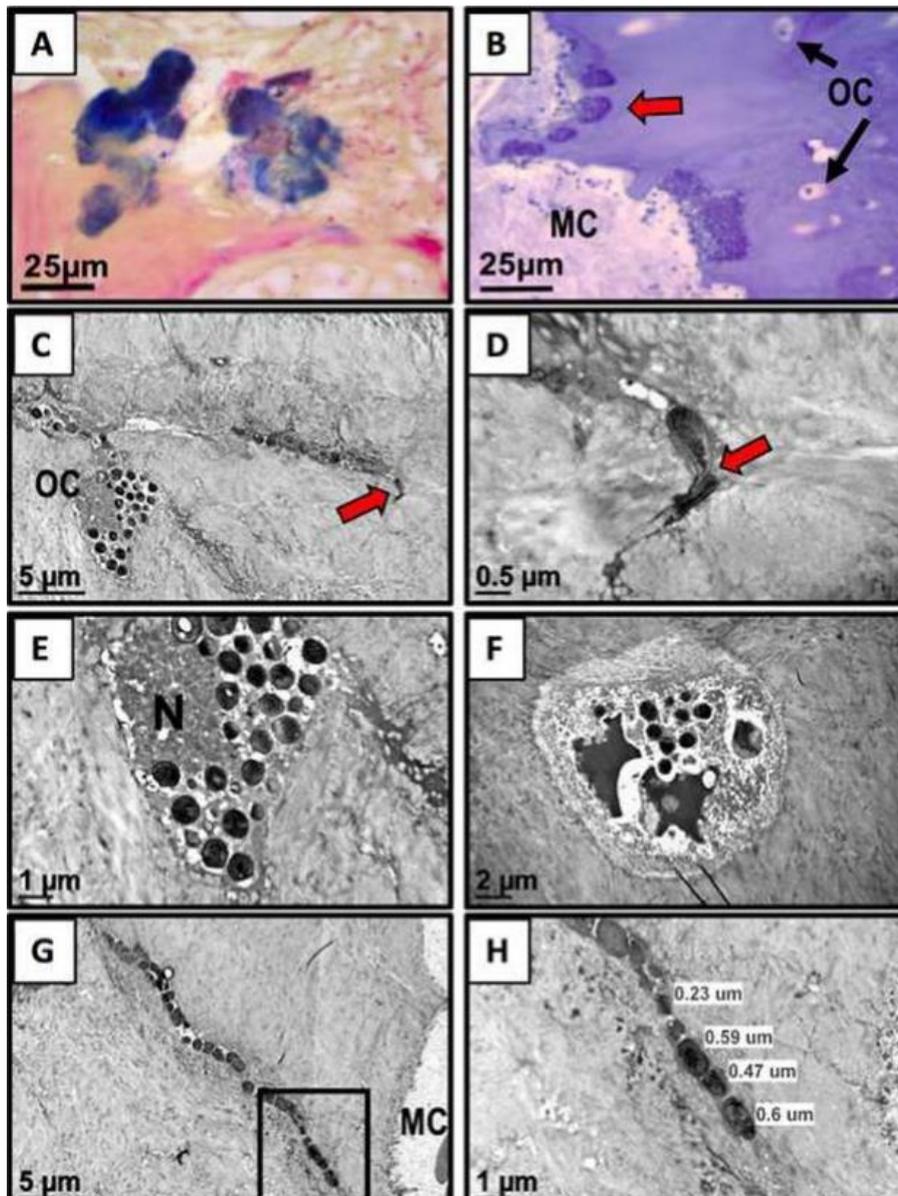


Figure 6 : Images de microscopie électronique à transmission de tissu osseux infecté de patient démontrant la déformation et l'invasion des ostéoplastes et des canalicules par des bactéries à Gram positif. MC = cavité médullaire, OC = ostéocyte, N = noyau. (A) Microscopie photonique démontrant le marquage Gram positif des bactéries de l'échantillon. (B) Marquage au bleu de toluidine montrant des bactéries (flèche rouge) festonnant le tissu osseux. (C) Microscopie électronique à transmission d'un ostéocyte mort et de ses canalicules (flèche rouge) colonisés par des bactéries déformées. (D, E) Magnifications de l'image présentée en (C). (F) Autre ostéoplaste colonisé par les bactéries. (G) Bactéries déformées en forme de bâtonnet dans les canalicules. (H) Magnification de l'image présentée en (G). D'après de Mesy Bentley et al. Reproduit avec autorisation.

2.2.5.5. Internalisation dans les cellules osseuses

L'implication de l'internalisation et de la survie de *S. aureus* dans les cellules osseuses de l'hôte au cours d'infections chroniques (Fig. 4), source de débats, manque de support *in vivo* et en clinique. Ceci est notamment dû à la difficulté de prélèvement, d'isolement et d'observation des cellules

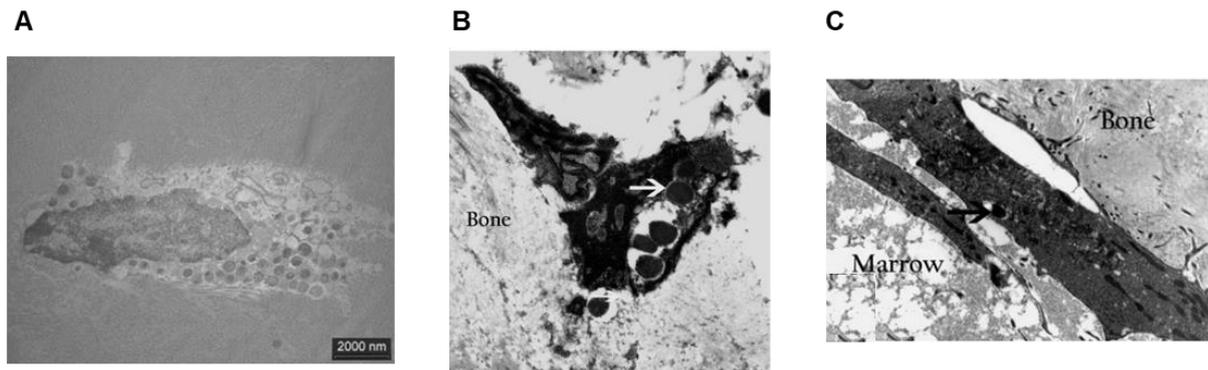


Figure 7 : Images de microscopie électronique à transmission de cellules de patient infectées par des bactéries à coques sphériques lors d'infections ostéo-articulaires. (A) Fibroblaste (B) Ostéocyte (C) Ostéoblaste. Modifiée d'après Bosse et al., Sendi et al. avec autorisation.

infectées^{15,16}. Il existe donc encore de nombreuses zones d'ombres concernant la vie de *S. aureus* dans les cellules osseuses chez le patient tel que son état répliatif, sa durée de survie, le taux de cellules infectées, et par extension son implication dans la chronicisation et la récurrence. Ainsi, des études *in vivo* et cliniques sont requises pour apporter des éléments de lumière à ces questions. Un procédé intermédiaire est le développement de modèles *in cellulo* afin d'appréhender et de déchiffrer la dynamique de *S. aureus* intracellulaire.

Notons toutefois que des études de cas cliniques ont démontré la présence de bactéries à coques dans des ostéoblastes, ostéocytes, ainsi que des fibroblastes lors d'IOA à *S. aureus* présentant des rechutes (Fig. 7)^{129,152-154}.

L'internalisation dans des ostéoclastes, ostéoblastes et ostéocytes lors d'infections osseuses crâniennes a également été rapporté par deux études *in vivo*^{155,156}. Celles-ci ont utilisé soit un modèle murin à l'aide de bactéries et ostéoclastes fluorescents soit un modèle d'embryons de poulet. Cependant, le lien entre la récurrence et la chronicisation des infections osseuses et la vie intracellulaire de *S. aureus* ne peut pas être déterminé avec ces modèles. Suggérant que les ostéocytes sont inaccessibles et la démonstration de l'invasion des ostéoplastes n'ayant pas encore été démontré à l'époque de l'étude, les auteurs ont émis l'hypothèse que les ostéocytes infectés dériveraient d'ostéoblastes infectés poursuivant leur différenciation en ostéocytes¹⁵⁵.

Les ostéoblastes ont une durée de vie de quelques jours à une centaine et sont donc un réservoir transitoire à *S. aureus*¹⁵⁷. Pour perdurer dans l'environnement intraostéoblastique entre les rechutes, *S. aureus* devrait donc infecter séquentiellement de nouveaux ostéoblastes. A l'inverse, les ostéocytes peuvent servir de réservoir à long terme puisqu'ayant une demi-vie de l'ordre de 25 ans¹⁵⁸. Les ostéocytes pourraient ainsi être le site de nidification intracellulaire principal de *S. aureus* conduisant

à la récurrence des infections osseuses après plusieurs décennies. L'étude *in vitro* de l'infection des ostéocytes en routine est rendue difficile par leur production^{159,160}.

Bien que les niches intracellulaires pourraient être une source de rechute de l'infection, la capacité des antibiotiques à cibler notamment le réservoir intraostéoblastique n'est pas pris en compte dans le choix thérapeutique¹⁶¹.

2.2.5.6. Internalisation dans les cellules articulaires

Les chondrocytes sont les seules cellules composant le cartilage de l'articulation. Bien que *Porphyromonas gingivalis* et *Erysipelothrix rhusiopathiae* ont la capacité *in vitro* de nicher dans ces cellules, la capacité de *S. aureus* à s'internaliser dans les chondrocytes reste à élucider^{7,162,163}. Parallèlement, l'implication de l'internalisation dans les fibroblastes synoviaux, composant de la synoviale, et les macrophages de la synovie n'a pas été élucidé *in vivo* malgré la capacité de *S. aureus* à envahir ces cellules *in vitro*⁷. Cependant, il a été rapporté un cas dans lequel des bactéries à coque ont été retrouvées par microscopie électronique à transmission dans des fibroblastes synoviaux provenant de la capsule de l'articulation de la hanche d'un patient atteint d'une arthrite septique sur prothèse¹²⁹.

3. *Staphylococcus aureus*, vie intracellulaire et dynamique de réplication

S. aureus à la capacité d'envahir les cellules phagocytaires professionnelles telles que les macrophages et les neutrophiles ainsi que les cellules phagocytaires non-professionnelles (CPNP) telles que les cellules épithéliales et endothéliales¹⁶⁴⁻¹⁶⁷. Dans le contexte du tissu osseux, *S. aureus* a été retrouvé colonisant les ostéoclastes (résorption osseuse), les ostéoblastes (formation osseuse), et les ostéocytes (différentiation terminale des ostéoblastes) *in vitro* et *in vivo*^{77,153,156,168,169}. De plus, des études cliniques ont démontré la colonisation de fibroblastes périprothétiques, d'ostéoblastes, et d'ostéocytes provenant de tissu osseux infectés de patients^{129,152}.

L'étude de la dynamique de réplication de *S. aureus* pourrait apporter des éléments de réponses sur les différences observées dans son devenir intracellulaire, la persistante aux antibiotiques ainsi que la survie à long terme dans les cellules eucaryotes pouvant être associée à la chronicité et la rechute des IOA. Le terme « réplication » est associé en génétique à la duplication de l'ADN. Pour éviter toutes confusions, précisons que dans ce manuscrit de thèse, le terme « réplication » est employé pour désigner la capacité de multiplication d'un individu bactérien en deux descendants.

Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit de thèse se focalisant sur la vie intraostéoblastique de *S. aureus*, dans cette section l'accent est donc porté sur les CPNP.

Les mécanismes d'adhésion de *S. aureus* aux cellules hôtes, l'internalisation et la vie intracellulaire font intervenir différents facteurs de virulence qui vont être décrits dans cette section.

3.1. Généralités sur les facteurs de virulence de surface

La surface de *S. aureus* est décorée par plus de vingt protéines ancrées de manière covalente au peptidoglycane via l'action de l'enzyme appelée « sortase A »^{6,170,171}. Ces protéines de surface ancrées à la paroi contribuent à l'adhésion, étape nécessaire avant l'internalisation. Elles permettent également l'adhésion aux tissus, aux composants de la MEO tels que le collagène, le fibrinogène, la BSP, et la fibronectine (Fn) ainsi qu'aux dispositifs médicaux recouverts de protéines de la MEO. De plus, elles aident à l'échappement du système immunitaire, à la formation de biofilm et elles participent à l'acquisition du fer via l'hémoglobine de l'hôte (Fig. 8). Ces protéines sont classées en différentes familles d'après leurs structures et fonctions. La plus grande est la famille des MSCRAMM (acronyme de « *Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* ») qui sont

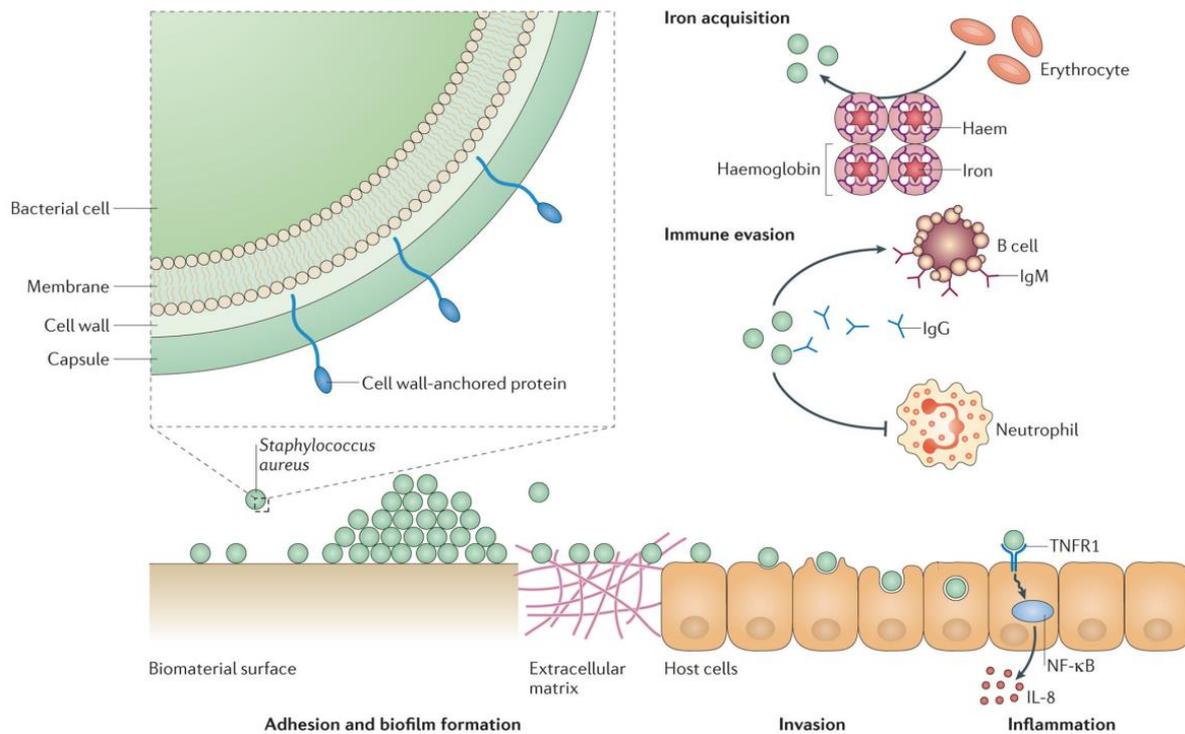


Figure 8 : Fonction des protéines de surface de *S. aureus*. Modifié d'après Foster et al. Reproduit avec l'autorisation de Springer Nature.

formés de domaines repliés d'immunoglobulines (Ig) de type G répétés en tandem. Au sein de cette famille, les protéines ClfA et de liaison au collagène (Cna) permettent l'évasion du système immunitaire. ClfA promeut la dégradation de C3b du complément via la protéine régulatrice nommée « facteur I » tandis que Cna promeut l'inhibition de la voie classique du complément par la fixation à C1q qui empêche ainsi son interaction avec C1r¹⁷²⁻¹⁷⁵. La protéine A participe également à l'échappement du système immunitaire¹⁷¹. En se liant à la région Fc des IgG elle induit une agglutination des IgG à sa surface. Incorrectement orienté ils ne peuvent être reconnu par les récepteurs des neutrophiles et préviennent l'activation du complément. De plus, la protéine A en se liant au récepteur TNFR1 (acronyme de « tumour necrosis factor receptor 1 ») induit la synthèse de cytokines causant une inflammation. La protéine A agit comme un super-antigène pour les lymphocytes B et dérégule la réponse immunitaire adaptative ainsi que la mémoire immunitaire. La protéine ClfA est impliquée dans la virulence d'arthrite septique chez un modèle murin obèse¹³⁸. Le collagène ainsi que la BSP, composant de la MEO, sont les cibles des protéines Cna et de liaison à la sialoprotéine osseuse (Bbp) de *S. aureus*, respectivement. Ces dernières notamment par l'ancrage de la bactérie à la MEO jouent un rôle important dans la pathogénicité des IOA à *S. aureus*¹⁷⁶⁻¹⁸¹. Toutefois, des souches ne possédant pas le gène *cna* codant pour la protéine Cna ont été isolés d'IOA suggérant que l'implication de ce gène dans la pathogénicité de *S. aureus* est souche dépendant^{182,183}. ClfA et ClfB, Bbp ainsi que FnBPA et FnBPB sont capables de lier le fibrinogène¹⁸⁴⁻¹⁸⁸. Ces deux dernières peuvent

également se lier à la fibronectine et au-delà de leur rôle d'adhésion, les FnBP favorisent l'internalisation de *S. aureus* au sein des cellules eucaryotes¹⁸⁹. De plus, les FnBP conjointement à l'action d'autres protéines de surface participent à la phase d'accumulation de la formation de biofilm par interactions homophiliques ou non de bactéries adjacentes^{188,190}. Il est à noter que la délétion de l'une ou l'autre des FnBP diminue fortement la capacité de colonisation des reins de la souche SH1000 dans un modèle murin de septicémie. Chacune des FnBP semble être nécessaire pour le développement d'infections sévères¹⁹¹.

3.2. Mécanismes d'adhésion et d'internalisation

La capacité d'adhésion de *S. aureus* aux cellules eucaryotes est un prérequis à son internalisation. Ce phénomène est connu depuis le début des années 1980. *S. aureus* a la capacité d'adhérer sur des cellules provenant de divers tissus, qu'elles soient primaires ou issues de lignées¹⁹²⁻¹⁹⁴. La voie FnBP-Fn- $\alpha 5\beta 1$, dans laquelle la bactérie est passive, est le mécanisme d'adhésion et d'internalisation principal. Cependant, la multiplicité de voies annexes impliquant notamment un mécanisme actif du côté bactérien suggère que *S. aureus* peut adapter sa stratégie d'internalisation dans des conditions environnementales particulières comme en l'absence de Fn.

3.2.1. La voie FnBP-Fn- $\alpha 5\beta 1$

3.2.1.1. Mécanisme d'adhésion

La principale voie d'adhésion et d'internalisation est la voie liant les FnBP de *S. aureus* à l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ de la cellule eucaryote, ceci par l'intermédiaire de la Fn de la matrice extracellulaire¹⁹⁵⁻¹⁹⁸. Les FnBP font parties de la famille des MSCRAMM et se composent d'une séquence « signal de sécrétion » du côté de l'amine terminale de la protéine (Fig. 9a). Cette séquence est suivie par le domaine A qui est proche de celui de ClfA et qui possède une structure semblable à celle des IgG. C'est ce domaine qui est capable de lier le fibrinogène et l'élastine, il est aussi impliqué dans l'adhésion à la Fn^{184,188,199,200}. Les domaines A de FnBPA et FnBPB ne partagent que 40% d'homologie de séquence²⁰¹. A la suite du domaine A nous retrouvons des motifs répétés en tandem qui lient la Fn, 11 pour FnBPA contre 10 pour FnBPB¹⁸⁹. Enfin, le côté C-terminal de la protéine se termine par un motif liant le peptidoglycane (LPXTG) ainsi que les domaines d'ancrages à la paroi et à la membrane.

Les fortes affinités et spécificités de la liaison des FnBP à la Fn sont dues à des structures qu'elles forment ensembles dites « β -zipper »^{197,202}. La Fn forme un lien entre *S. aureus* via les FnBP et la cellule eucaryote par sa liaison avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (Fig. 9b)²⁰³. L'efficacité de cette liaison varie en fonction

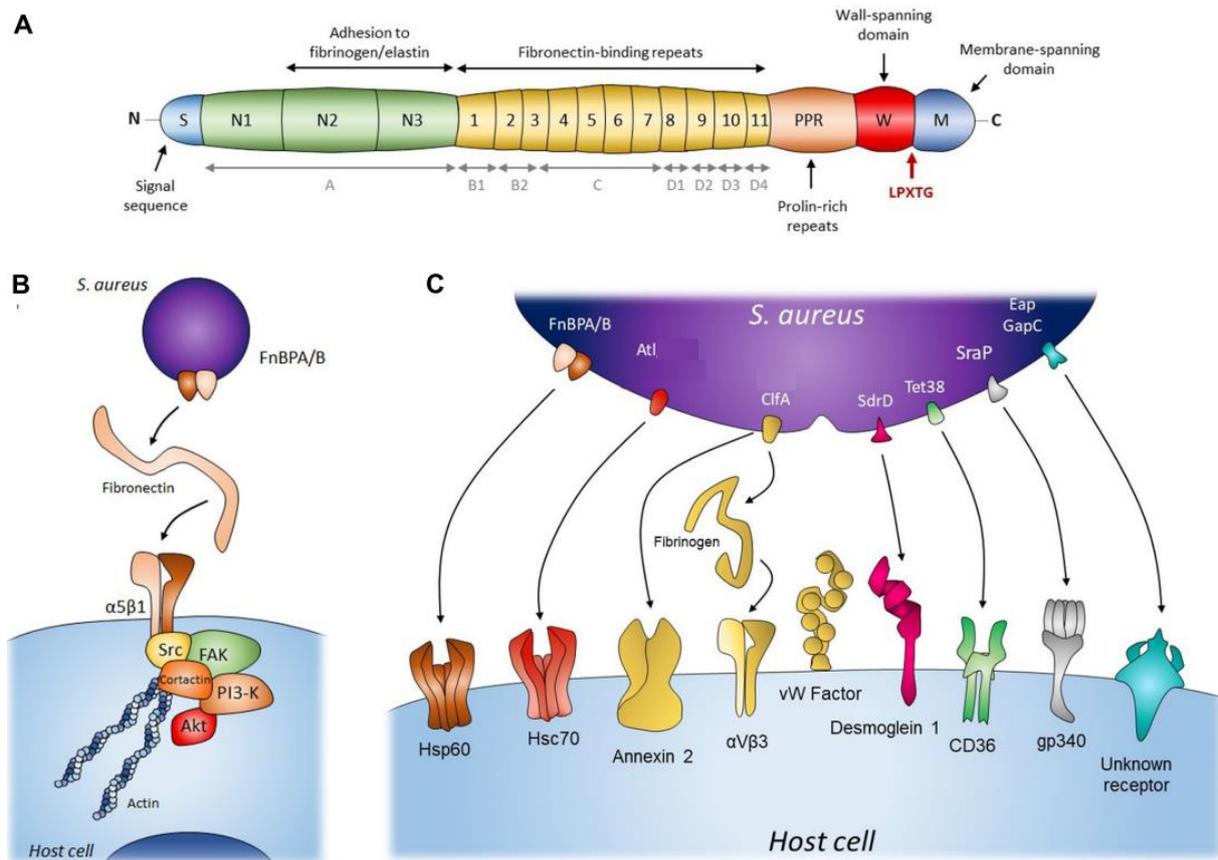


Figure 9 : Les mécanismes d'adhésion et d'internalisation de *S. aureus* dans les cellules eucaryotes. Modifié d'après Josse et al. avec autorisation.

du type cellulaire et de la souche de *S. aureus*. En effet, il ne suffit que d'une région de liaison à la Fn pour l'adhésion et l'internalisation dans les cellules endothéliales alors qu'il en faut trois pour les kératinocytes^{166,204}. Enfin, il est estimé qu'une FnBP peut lier 6 à 9 molécules de Fn²⁰⁵. Ceci pourrait regrouper les intégrines $\alpha 5\beta 1$ à la surface de la cellule et ainsi permettre la formation d'un signal intracellulaire suffisant pour l'internalisation¹⁸⁹. Enfin, FnBPA seule est suffisante pour l'adhésion et l'internalisation^{198,206}.

3.2.1.2. Mécanisme d'internalisation

A la suite de l'adhésion de *S. aureus* aux intégrines $\alpha 5\beta 1$ par l'intermédiaire de la Fn, une voie de signalisation intracellulaire se met en place du côté eucaryote (Fig. 9b). Cette voie de signalisation implique premièrement les kinases des adhésions focales (FAK) ainsi que la tyrosine kinase Src activée^{203,207}. Ensuite, cette dernière recrute la cortactine ce qui induit la polymérisation de l'actine et la mobilisation de la mécanique endocyttaire^{207,208}. De plus, les activations de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) ainsi que de la protéine kinase B (Akt) sont également impliquées dans l'internalisation de la bactérie^{209,210}. Toutefois, cette cascade de signalisation n'est pas complètement élucidée.

Pour que l'internalisation soit effective il est nécessaire que la cellule eucaryote possède un cytosquelette d'actine dynamique ainsi qu'une membrane fluide^{193,196}. De plus, le mécanisme d'internalisation de *S. aureus* par les cellules eucaryotes semble être un procédé actif uniquement du côté eucaryote. En effet, des bactéries précédemment fixées ou tuées par la chaleur peuvent être internalisées dans les cellules eucaryotes¹⁸⁹. Cependant, *S. aureus* peut stimuler son internalisation via la production de l' α -toxine, une toxine sécrétée, qui augmente l'expression de la sous-unité $\beta 1$ de l'intégrine^{211,212}.

Bien que la voie FnBP-Fn- $\alpha 5\beta 1$ est la voie majoritaire dans le processus d'internalisation, il existe d'autres voies annexes. En effet, les inhibitions de l'adhésion à l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et des FnBPs à la Fn réduisent mais n'empêchent pas l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules eucaryotes, notamment dans les ostéoblastes de la lignée cellulaire MG63²⁰⁶.

3.2.2. Les voies annexes

Parmi les voies annexes d'adhésion et d'internalisation les plus représentées sont celles incluant des protéines de la famille des MSCRAMM : la protéine D contenant des motifs sérine aspartate répétés (SdrD), ClfA, l'autolysine (Atl), ainsi que l'adhésine pour plaquettes riche en sérine (SraP) ; (Fig. 9c). L'ensemble de ces protéines de surface agissent via une liaison directe à des récepteurs des cellules eucaryotes. SdrD se lie à la Desmogléine 1, tandis que ClfA lie l'annexine 2, Atl lie la protéine chaperonne Hsc70, et SraP lie la protéine salivaire gp340²¹³⁻²¹⁷. ClfA se lie également à l'intégrine $\alpha V\beta 3$ ainsi qu'au vWbp par l'intermédiaire respectivement du fibrinogène et de la protéine de liaison au facteur von Willebrand^{218,219}. Les voies annexes impliquant SdrD et Atl nécessitent que la bactérie soit active. En effet, SdrD est exprimée à la suite d'un contact avec la cellule eucaryote, et la production de Hsc70 est stimulée par la bactérie^{215,220}.

Au sein des ligands bactériens impliqués dans les voies annexes d'internalisation, nous pouvons également citer la protéine d'adhérence extracellulaire (Eap) ainsi que la Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase GapC, notamment impliquée dans le développement de la mastite^{221,222}. Les récepteurs à ces deux protéines de surface sont inconnus. Notons également qu'en plus des adhésines, la pompe d'efflux Tet38 permet l'adhésion et l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules eucaryotes par la liaison avec CD36²²³. Enfin, les FnBPs peuvent interagir directement avec la protéine du choc thermique Hsp60 et favoriser l'internalisation de *S. aureus*²²⁴.

3.3. Généralités sur les facteurs de virulence sécrétés et le système de régulation agr

Dans la vie intracellulaire de *S. aureus*, l'implication de certaines toxines et protéines sécrétées ainsi que du système de régulation agr a été démontrée.

3.3.1. Toxines et enzymes sécrétées

S. aureus possède dans son arsenal de facteurs de virulence la capacité de sécréter des toxines, appelées « exotoxines », qui sont au nombre de 40 connues et représentent approximativement 10% du sécrétome global^{137,225}. Parmi les toxines et protéines sécrétées, les toxines formant des pores, les phénol-soluble modulines (PSMs), les protéases et lipases sont impliquées dans la vie intracellulaire de *S. aureus*.

3.3.1.1. Toxines formant des pores

Les toxines formant des pores incluent l' α -toxine et les leucocidines à 2 composants.

L' α -toxine, également connue sous le nom d'hémolysine α , est responsable de la lyse de multiples cellules eucaryotes telles que les érythrocytes, les plaquettes, les cellules endothéliales et épithéliales, certains leucocytes²²⁶⁻²²⁹. Les monomères de l' α -toxine s'assemblent à la surface des cellules cibles pour former dans la membrane, des pores de structure heptamérique dite β -barrel²³⁰. Le récepteur eucaryote de cette toxine est ADAM-10 (acronyme de « *A disintegrin and metalloprotease 10* »)²³¹. Il est différenciellement exprimé entre les types cellulaires ce qui explique le tropisme de l' α -toxine.

Les toxines formant des pores (PFT) à deux composants sont relatives à l' α -toxine puisque partageant une homologie de structure et un mécanisme similaire, à ceci près qu'elles requièrent deux sous-unités distinctes pour la formation du pore¹³⁷. Ces toxines cibles principalement les leucocytes expliquant leur nom plus commun de leucocidines (Luk). Parmi les PFT à deux composants, 5 sont associées à des infections humaines : LukSF-PV (connue sous le nom de Panton-Valentine leucocidine [PVL]), γ -hémolysines AB et CB (HlgAB, HlgCB), LukED, et LukAB (connue sous le nom de LukHG)²³²⁻²³⁴. LukMF et LukPQ, sont quant à elles retrouvées en pathologie vétérinaire²³⁵⁻²³⁷.

3.3.1.2. Phénol-soluble modulines

Les PSMs appartiennent à la famille des peptides amphipatiques uniquement retrouvés chez les staphylocoques¹³⁷. Chez *S. aureus* nous retrouvons les PSM α 1-4, PSM β 1-2, la δ -toxine ainsi que PSM-

mec chez certaines souches résistantes à la méticilline. Elles sont sécrétées par un transporteur ABC dont l'absence induit leur accumulation dans le cytosol conduisant à la mort bactérienne²³⁸.

Les lipoprotéines présentes dans le sérum inhibent l'action cytolytique des PSMs qui agissent donc depuis l'environnement intracellulaire notamment chez les neutrophiles et les ostéoblastes²³⁹⁻²⁴¹.

L'absence d'expression de la δ -toxine dans des isolats cliniques de *S. aureus* à partir d'IOA a été corrélée avec la chronicité des infections²⁴². Notons également que l'application d'un traitement de rifabutine, de rifampicine, ou de rifapentine a réduit l'expression intraostéoblastique des PSM α 1-4 ainsi que la cytotoxicité de *S. aureus*²⁴³.

3.3.1.3. Protéases

Les protéases staphylococciques peuvent être classées en trois groupes : les métalloprotéases, les sérine protéases, et les cystéines protéases¹³⁷. *S. aureus* produit 12 protéases : 1 métalloprotéase appelée l'auréolysine (Aur), 2 cystéines protéases appelées staphopaïne A (ScpA) et staphopaïne B (SspB), et 9 sérines protéases. Elles sont constituées de la protéase V8 (SspA), des sérines protéases-*like* (SplA à SplF), et de l'ETA et de l'ETB.

L'expression des protéases Aur, SspA et SspB a été détectée dans les neutrophiles suite à la phagocytose suggérant ainsi leurs implications dans le processus d'infection intracellulaire²⁴⁴. ScpA induit la lyse cellulaire après la translocation de *S. aureus* dans le cytoplasme de la cellule hôte²⁴⁵. Aur est un déterminant critique de la pathogénicité de *S. aureus* dans le cadre d'infections osseuses murines par la modulation du sécrétome et l'action des PSMs²⁴⁶.

3.3.1.4. Lipases

S. aureus produit 2 phospholipases, la β -toxine aussi connue sous le nom de β -hémolysine est une sphingomyélinase clivant spécifiquement la sphingomyéline²⁴⁷. La phospholipase C spécifique du phosphatidylinositol (PI-PLC) favorise la survie dans le sang et les neutrophiles^{137,248}.

3.3.2. Le système de régulation agr

Parmi les systèmes de régulation des facteurs de virulence de *S. aureus*, celui qui en est le plus étudié est le système agr (acronyme de « *accessory gene regulator* »)^{134,249}. Il s'agit d'un système dit de détection du quorum qui peut jauger la concentration locale d'une molécule signal (Fig. 10). Il est utilisé par *S. aureus* pour l'adaptation à des changements environnementaux durant la croissance ainsi que pour réguler la virulence²⁵⁰⁻²⁵². Ce dernier est également impliqué dans la vie intracellulaire de *S. aureus*.

Le groupe de gène codant pour ce système de détection du quorum est appelé « *accessory gene regulator* » (*agr*). La molécule signal est un peptide cyclique auto-inducteur (AIP). L'AIP s'accumule dans l'environnement extracellulaire après excrétion par la bactérie. Une fois que le signal atteint un certain seuil il active le système d'expression cible (Fig. 10). Le système agr est composé de deux transcrits adjacents nommés RNAII et RNAIII dont les expressions sont régulées par deux promoteurs, P2 et P3, respectivement²⁵³. Le transcrit RNAII est un opéron composé de quatre gènes *agrB*, *agrD*, *agrC*, et *agrA* codant pour les protéines éponymes de ce système²⁴⁹. Le transcrit RNAIII et l'effecteur majeur régulant l'expression de la plupart des gènes cibles dépendant du système agr.

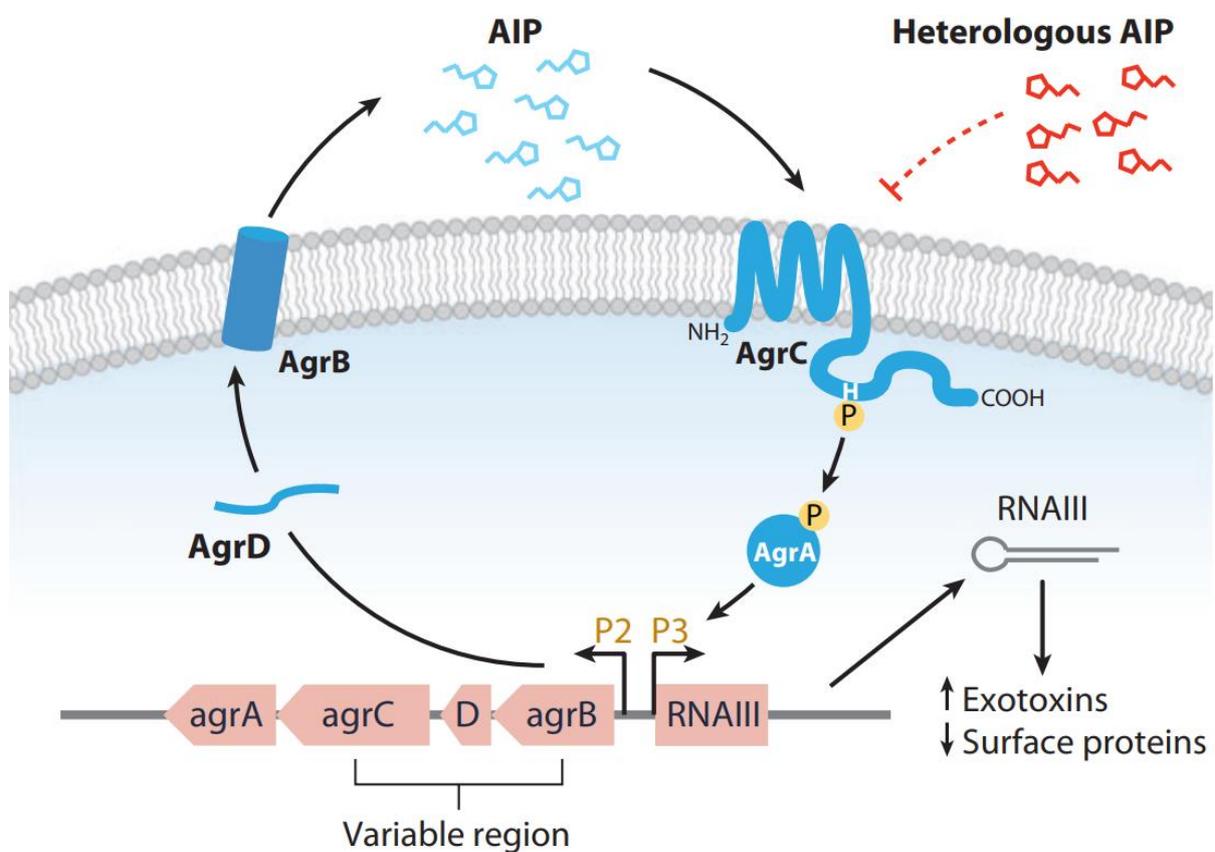


Figure 10 : Architecture et mécanisme du système agr. D'après Novick et Geisinger. Reproduit avec autorisation.

AgrD est un peptide ribosomal précurseur de l'AIP, il est clivé par AgrB, une peptidase liée à la membrane^{254,255}. Puis après cyclisation il est transporté à travers la membrane. Une fois du côté extracellulaire, AgrD maturé est clivé par SpsB (acronyme de « *type I signal peptidase* ») ce qui relargue l'AIP mature dans l'environnement extracellulaire²⁵⁶. L'AIP est ensuite détecté par le récepteur AgrC, une kinase liée à la membrane. La liaison de l'AIP à AgrC conduit à l'autophosphorylation d'une histidine et à la transmission du signal à un receveur aspartate sur le régulateur de réponse AgrA^{257,258}. AgrA ainsi phosphorylé peut se lier aux promoteurs P2 et P3 et conduire à l'expression de RNAII et RNAIII²⁵⁹. L'expression de RNAII conduit donc à une boucle de régulation positive. RNAIII conduit à la surexpression de facteurs de virulence tels que les hémolysines α , β , δ , γ , et TSST-1^{250,260-262}. En opposition, RNAIII conduit à la sous-expression de protéines de surface telles que la protéine A, FnBPA, et FnBPB faisant partie des MSCRAMM^{263,264}. Il est à noter que RNAIII code également pour la δ -hémolysine²⁶⁵.

Dans un modèle d'infection murin de la peau, des souches de *S. aureus* ayant des mutations dans le système agr ont conduit à des tailles de lésions et une charge bactérienne réduite²⁶⁶⁻²⁷⁰. Ces mutants sont également moins pathogéniques dans des modèles d'infections de pneumonies aiguës murines et ont un taux d'endocardites réduit dans un modèle de lapin^{268,271-274}. En utilisant le rapporteur P3-lux bioluminescent, la dynamique d'activation du système agr a été étudiée en temps réel durant des infections et a montré des évidences pour une activation en vagues répétées^{269,275,276}. Enfin, des mutants dans le système agr employés dans des modèles de lapin ont démontré une capacité réduite à établir des infections osseuses²⁷⁷.

3.4. Devenir intracellulaire dans les cellules phagocytaires non-professionnelles

Plusieurs scénarii sont possibles pour la vie intracellulaire de *S. aureus* à la suite de son internalisation. Il peut être éliminé par l'autophagie, survivre au sein de vacuoles ou s'en échapper et survivre dans le cytosol à long terme. Il peut également s'échapper de la cellule hôte et coloniser les cellules adjacentes. Au sein de ces niches, *S. aureus* pourrait être en réplication active ou bien être quiescent. Le déroulement du cycle de vie de *S. aureus* au niveau intracellulaire est encore mal cerné. Les études portant sur les CPNP utilisent des modèles cellulaires et des conditions d'infections différents. Ces divergences rendent difficile de conclure sur la chronologie des étapes de la vie intracellulaire de *S. aureus* au sein des ostéoblastes.

3.4.1. Morphologie de la vacuole

S. aureus intracellulaire peut se loger à l'intérieur d'une vacuole au sein des cellules phagocytaires professionnelles et non-professionnelles. Cette vacuole peut être lâche et spacieuse ou à l'inverse être serrée autour de la bactérie (Fig. 11)^{278,279}. Les vacuoles peuvent également être à simple membrane dans le cas de vésicules endosomales ou bien multi-lamellaire dans le cas de l'autophagie²⁸⁰.

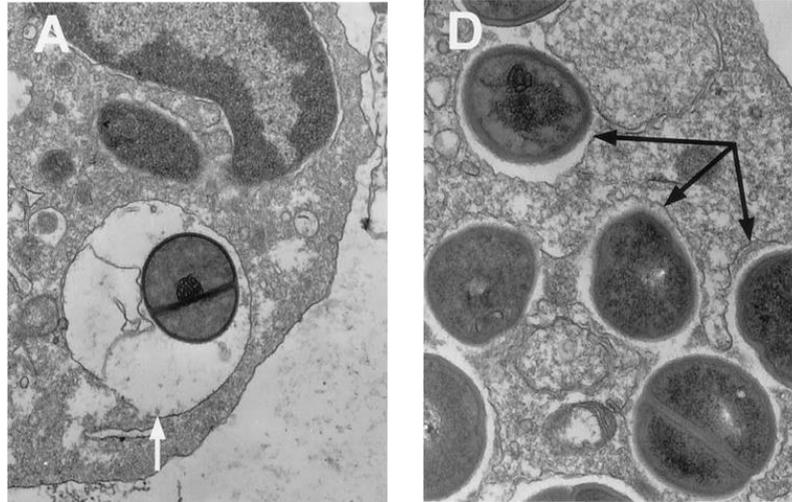


Figure 11 : Microscopie électronique de *S. aureus* internalisé dans des neutrophiles au sein de vacuole lâche à gauche ou serrées à droite. Modifiée d'après Gresham et al.

3.4.2. Subversion de l'autophagie

L'autophagie est un mécanisme catabolique fondamental de l'homéostasie cellulaire. Il est impliqué dans la dégradation de son propre matériel cytoplasmique via la formation de vésicule d'autophagie à double membrane et la fusion lysosomale. Durant une infection, les CPNP possèdent dans leur arsenal immunitaire la xénophagie qui est une forme de l'autophagie ciblant les bactéries internalisées dans le but de les éliminer (Fig. 12)²⁸¹⁻²⁸³. La xénophagie, mécanisme de l'immunité innée, est initiée lors de la reconnaissance par la cellule eucaryote *via* ses TLR (acronyme de « *Toll-like receptor* ») des PAMPs (acronyme de « *Pathogen-associated molecular pattern* ») de la bactérie. La bactérie est ensuite, si elle ne l'est pas déjà, internalisée. La xénophagie peut-être non sélective ou sélective. Dans ce cas, la bactérie intracellulaire est ubiquitinée (Ub) et dirigée à un autophagosome en formation *via* des protéines autophagiques adaptatrices nommées SLR (acronyme de « *sequestosome 1/p62-like receptors* »). Un mécanisme parallèle à la xénophagie est la phagocytose associée à la protéine LC3 (acronyme de « *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3* »). Elle se caractérise par une vésicule phagosomale à simple membrane et le recrutement de protéines LC3 à sa surface. L'ensemble des autophagosomes formés mûrent en fusionnant avec les lysosomes et forment ainsi des autophagolysosomes, ceci aboutit à la dégradation du pathogène pris en charge.

S. aureus a la capacité de détourner ce mécanisme. En effet, il a été démontré que dans un mécanisme dépendant du système agr et de l' α -toxine, *S. aureus* induit l'autophagie des CPNP et empêche la maturation des autophagosomes via l'inhibition de la fusion des lysosomes et de son acidification^{284,285}. Le rôle de l' α -toxine dans l'induction de l'autophagie n'est pas clairement élucidé. En effet, selon la même équipe de recherche, elle induirait l'autophagie ou préviendrait l'association de la protéine LC3 par le recrutement de la PKC α ^{285,286}. Des souches n'exprimant pas les PSMs et ayant une cytotoxicité réduite ont été retrouvées colocalisées avec LC3 tandis qu'elles ne le sont pas avec Lamp1, marqueur des lysosomes²⁸⁰. Ceci suggère que l'absence des PSMs promeut l'autophagie tout en inhibant la fusion avec les lysosomes et crée ainsi un réservoir de *S. aureus* intracellulaire. Le processus d'enclenchement de l'autophagie est rapide. La colocalisation de *S. aureus* avec LC3 est observée dès 30 minutes post-infection²⁸⁷. Ceci coïncide avec l'ubiquitination précoce des bactéries et la colocalisation après l'internalisation avec les protéines autophagiques adaptatrices suivantes : sequestosome-1, CALCOCO2 (acronyme de « *calcium binding coiled-coil domain 2* »), et l'optineurine. En confirmation de ces résultats, des analyses en microscopie électronique ont démontré l'aspect multi-lamellaire des vacuoles entourant la bactérie^{280,287}.

S. aureus peut éventuellement s'échapper de l'autophagosomes notamment dès 30 minutes après la formation de ce dernier^{284,287}.

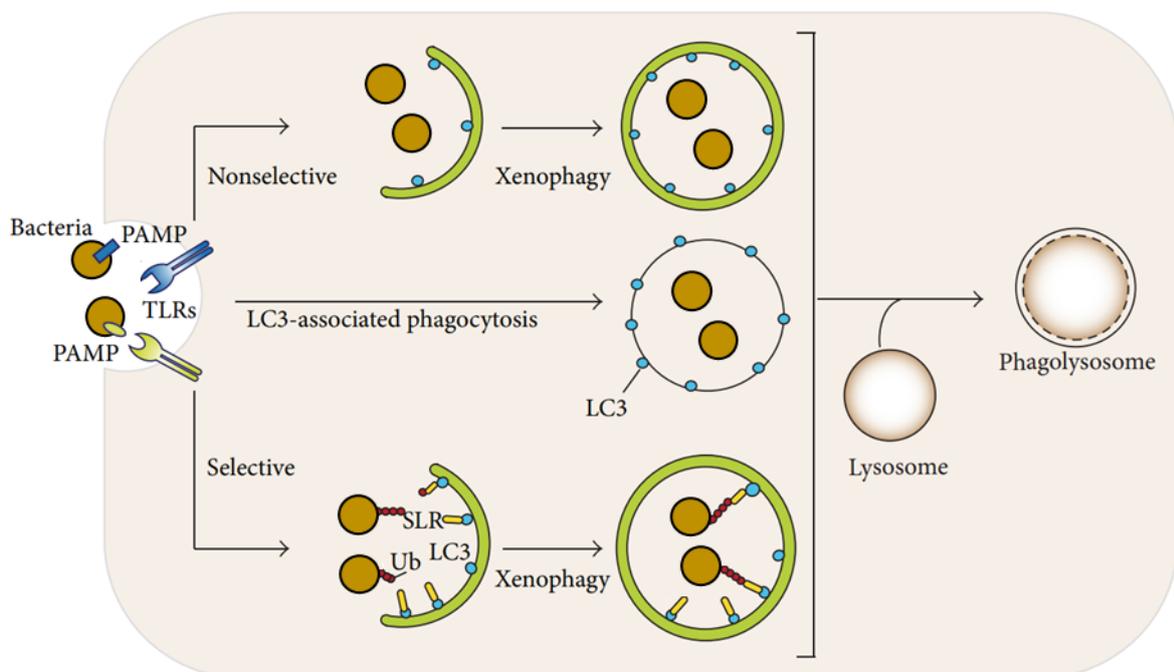


Figure 12 : Mécanismes de l'autophagie ciblée contre des pathogènes, nommée xénophagie.

Modifiée d'après Vural et Kehrl avec autorisation.

Durant l'infection par *S. aureus*, le métabolisme de la cellule hôte est profondément modifié²⁸⁸. En effet, il a été démontré par exemple que l'import de glucose par la cellule eucaryote est augmenté lors de l'infection tandis que le taux de glucose au sein de la cellule hôte est réduit²⁸⁸. Bien que l'autophagie soit activée, la plupart des autophagosomes de cette étude ont été retrouvés sans bactéries. L'hypothèse émise est que *S. aureus* induirait l'autophagie dans l'objectif de détourner les nutriments produit, dont le glucose, depuis le cytosol pour y survivre.

3.4.3. Echappement ou résidence vacuolaire ?

On a observé que *S. aureus* peut soit s'échapper de la vacuole où il loge soit s'y maintenir. En effet, qu'elle soit endocyttaire ou autophagosomale immature *S. aureus* à la capacité de s'y maintenir^{284,289}.

L'échappement de la vacuole d'internalisation de *S. aureus* a été retrouvée dans divers types de CPNP telles que les cellules épithéliales et endothéliales, ainsi que les kératinocytes. Ce mécanisme serait probablement médié par désintégration de la membrane à l'aide de toxines formant des pores²⁹⁰. L'échappement du compartiment endocyttaire a été suggéré dès 1998 dans les CPNP²⁹¹. Ce processus de translocation dans le cytosol des cellules infectées est souches dépendantes. De plus, celles en étant capables démontrent une cytotoxicité élevée²⁹².

Divers facteurs de virulence dépendant du système agr ont été mis en évidence comme étant impliqués dans l'échappement de la vacuole²⁹⁰. Les PSM- α sont des médiateurs clefs de l'échappement des cellules épithéliales et endothéliales, notamment au sein d'isolats cliniques^{280,293}. L'inactivation de ces derniers, du système agr, ou du transporteur pmtC spécifique des PSMs réduit l'échappement^{238,280,293,294}. En complément, une forte expression des PSMs et une activation du système agr ont été retrouvées précédant l'échappement^{293,295}. Néanmoins, la surexpression des PSMs seule n'induit pas l'échappement suggérant ainsi une complémentarité de mécanismes²⁹⁶. Notons dans cette optique que la δ -toxine et la PSM- β n'induisent l'échappement de *S. aureus* que lorsqu'elles sont co-exprimées avec la β -hémolysine²⁹⁶. Toutefois, cette dernière peut être retrouvée dans un état non fonctionnel dans des souches pourtant douées d'échappement²⁹⁷. Ceci suggère donc la multiplicité des voies d'échappement.

Certains de ces médiateurs semblent être dépendant du type de cellule eucaryote infectée. En effet, l' α -toxine jouerait un rôle uniquement dans les cellules épithéliales ayant un phénotype dit de mucoviscidose tandis que la PVL ne semble pas être impliquée dans l'échappement vacuolaire de *S. aureus* au sein de cellules épithéliales mais dans les kératinocytes^{293,294,298–301}. D'autres médiateurs ont été identifiés tels que la pompe d'efflux Tet38 dans les cellules épithéliales²²³. Tandis que d'autres ont

été écartés tels que la cystéine protéase nommée staphopaine A qui n'est pas impliquée dans l'échappement vacuolaire des cellules épithéliales mais serait impliquée dans l'induction de la mort cellulaire²⁴⁵.

3.4.4. Echappement ou résidence intracellulaire ?

On a observé que les survivants intracellulaires peuvent soit se maintenir dans la cellule hôte soit s'en échapper notamment pour aller coloniser d'autres cellules adjacentes, d'autres tissus.

3.4.4.1. Echappement de la cellule hôte

L'échappement de la niche intracellulaire peut intervenir à la suite d'une phase de réplication active conduisant à la lyse de la cellule hôte^{245,302,303}. Parallèlement, il a été décrit que sur des infections de longues durées, de 7 et 10 jours, des bactéries non-réplicatives pouvaient rejoindre le milieu extracellulaire s'y multiplier et coloniser des cellules adjacentes³⁰². Cet échappement peut s'opérer de manière active ou passive à la suite de la mort naturelle de la cellule hôte.

L'induction de la mort de la cellule hôte est un phénomène dépendant de la souche bactérienne, du type cellulaire employé, et de la multiplicité d'infection²⁷⁸. En effet, toutes les souches de *S. aureus* ne sont pas capables d'induire la mort de la cellule hôte³⁰⁴. De plus, le chemin conduisant à la mort de la cellule hôte est tout autant dépendant des paramètres cités précédemment. En effet, tandis que dans les cellules endothéliales la mort est accompagnée de la voie des caspases, dans les cellules mésothéliales la mort est indépendante de ce mécanisme^{305,306}. Les toxines de *S. aureus* telles que l' α -toxine et la PVL sont suffisantes pour induire la mort des CPNP telles que des kératinocyte et leucocytes mononucléaires, ainsi que des neutrophiles respectivement³⁰⁷⁻³¹⁰. Notons que la PVL n'est pas cytotoxique pour les ostéoblastes²⁴¹. L' α -toxine ainsi que les leucocidines peuvent induire la mort des CPNP par apoptose, pyroptose, et nécroptose³¹¹. *S. aureus* pourrait fonctionner comme un activateur de NLRP3 (acronyme de « *NOD-like receptor protein 3* ») impliqué dans l'inflammasome conduisant à la nécroptose³¹². La présence et la multiplication intracellulaire de *S. aureus*, notamment chez les ostéoblastes, induisent un changement de morphologie signe de l'apoptose de la cellule hôte qui est caractérisée par une dégradation de l'ADN^{245,289,313,314}. L'apoptose des cellules épithéliales et endothéliales serait médiée par le système agr tandis que sarA, un second système de régulation des facteurs de virulence, ne serait pas impliqué^{289,298,306}. L'initiation de l'apoptose dans les cellules épithéliales pourrait dépendre de la caspase-2 à la suite de l'action de l' α -toxine et de l'auréolysine³¹⁵. L'apoptose des ostéoblastes médiée par *S. aureus* pourrait avoir lieu au travers de l'induction du TRAIL

(acronyme de « *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* »), membre de la famille TNF (acronyme de « *tumor necrosis factor* »)³¹⁶. Toutefois, le mécanisme moléculaire précis et la voie de signalisation impliqués dans l'induction de la mort cellulaire par *S. aureus* nécessite de futures études³¹¹.

Ainsi, la colonisation intraostéoblastique de *S. aureus* dans le contexte des IOA pourrait exacerber l'ostéolyse via l'induction directe de la mort des ostéoblastes.

3.4.4.2. Résidence dans la cellule hôte

A l'opposé de l'échappement, la survie à long terme de *S. aureus* notamment dans les leucocytes a été décrite dès les années 1950³¹⁷⁻³¹⁹. Afin d'éviter toutes confusions notons que les termes « persistance » et « persistant » sont communément employés pour qualifier les survivants intracellulaires à long terme de *S. aureus*. Dans ce manuscrit de thèse de doctorat ils ont pour but de qualifier les persisters aux antibiotiques et stress environnementaux.

La résidence dans les CPNP a été retrouvée jusqu'à 28 jours post-infection, arrêt de l'observation^{302,303,320,321}. Une fois récupérés et déposés sur gélose d'agar, ces survivants forment, dans 30 à 40% des cas à 7 et 10 jours et atteignant 90% à 28 jours, des colonies plus petites caractéristiques des *small colony variants* (SCV)^{302,320}. Un passage intracellulaire au sein d'ostéoblastes et d'ostéocytes induit la formation de SCV notamment dès 24 heures post-infection (hpi)^{153,322}. Les souches SCV stables ont une survie accrue par rapport aux souches sauvages au sein de cellules endothéliales, passant notamment de 1% à 4% de survivants^{302,323}. Au-delà de la caractéristique phénotypique sur gélose d'agar, les survivants adaptent l'expression de leurs facteurs de virulence. Ceci est notamment visible par l'augmentation des FnBP, la réduction de l'expression de toxines et le développement d'un profil hautement invasif³²¹. Cette adaptation pourrait être initiée en vue d'infecter les cellules adjacentes dans le cas où les survivants seraient relargués. De plus, l'absence d'expression de toxines durant les infections à longs termes permettrait de promouvoir le maintien de *S. aureus* sur des temps longs en n'activant pas le système immunitaire de l'hôte. Notons également que la protéine du choc thermique *clpC* impacte négativement le taux de survie à long terme de *S. aureus* dans les cellules endothéliales et les kératinocytes via la modulation du système toxine-antitoxine MazEF et du système *agr*³²⁴. Les survivants à long terme de *S. aureus* ont été retrouvés dans le cytosol 4 jours post-infection et pourraient également loger dans des lysosomes acides^{303,323}.

Au sein des cellules phagocytaires professionnelles il a été démontré que la survie à long terme de *S. aureus* est dépendant de la multiplicité d'infection ainsi que de la phase de croissance utilisée³²⁵. En

effet, le nombre de survivants retrouvé lors de l'utilisation d'une phase exponentielle est plus faible au sein de cellules phagocytaires professionnelles que lors de l'utilisation d'une phase stationnaire. Ceci est en adéquation avec l'hypothèse que les survivants à long terme sont non répliatifs. L'utilisation d'une phase stationnaire lors de l'infection accroît le nombre de bactéries quiescentes au début de l'infection ce qui devrait donc accroître le taux de survivant. Ceci est notamment médié par l'inhibition de la lyse de la cellule hôte, faisant suite à la réplication, qui augmente ainsi le taux de niches intracellulaires viables pour la survie à long terme. Notons également que *S. aureus* est capable dans les macrophages d'accroître l'expression de facteur anti-apoptotique ainsi que de décroître le taux de SUMOylation, une modification post-transcriptionnelle, ce qui favorise la survie à long terme^{326,327}.

Ainsi, les survivants à long terme de *S. aureus* dans les cellules hôtes sont localisés dans le cytosol ou les lysosomes, dont une partie croissante est caractérisée par un phénotype SCV. Ces survivants sont capables de sortir de la cellule hôte et d'infecter les cellules adjacentes. Les *S. aureus* ainsi cachés du système immunitaire dans les cellules eucaryotes pourraient être une source d'infections chroniques et de rechutes. L'étude de la dynamique de réplication de *S. aureus* au sein des cellules hôtes permettrait de mieux appréhender la physiopathologie des IOA.

3.5. Méthodes pour l'étude de la dynamique de réplication

3.5.1. Méthodes pour l'étude de la dynamique de réplication et de croissance à l'échelle de la bactérie unique

L'hétérogénéité de la dynamique de réplication au sein d'une population a été observée dès le début du XX^{ème} siècle. En effet, la fréquente discordance entre les dénombrements des CFU (acronyme de « colonie formant unité ») et par microscopie a été assignée à une sous-population de bactéries, supposées mortes ou dormantes au sein d'une population croissante, ne pouvant former des colonies sur géloses d'agar. Cette sous-population augmente avec l'âge de la culture et a notamment été proposée pour expliquer la présence des persisters. Les persisters sont une sous-population de bactéries survivantes à un traitement antibiotique qui est bactéricide pour le reste de la population clonale sans transmission de la persistance aux générations futures.

Les récentes innovations techniques, notamment l'apport de la fluorescence, ont permis de remettre à l'ordre du jour l'étude du taux de croissance et de réplication à l'échelle de la cellule unique et d'en approfondir notre compréhension.

L'article de revue « *Methods to monitor bacterial growth and replicative rates at the single-cell level* » publié dans le journal « *FEMS Microbiology Reviews* » a pour but de décrire les méthodes disponibles

pour étudier les taux de croissance et de réplication à l'échelle de la bactérie unique tout en discutant les objectifs dans lesquels elles ont été employées, les résultats obtenus, ainsi que leurs forces et faiblesses.

Il est à noter que le taux de croissance à l'échelle de la bactérie unique correspond à l'augmentation en taille ou en masse de l'individu dans une temporalité donnée tandis qu'à l'échelle de la population il correspond à l'augmentation du nombre d'individu dans la population. Dans cet article de revue, le terme « réplication » est employé pour désigner la multiplication de la bactérie et le taux de réplication correspond à la capacité de multiplication d'un individu en deux descendants dans une temporalité donnée.

La méthode la plus ancienne et utilisée dès le début du XX^{ème} siècle est la méthode de microscopie en temps réel permettant de suivre les taux de croissance et de réplication. Il s'agit également de la méthode la plus répandue. Plus récemment, elle a été combinée avec la micro-fluidique. La méthode de dilution de fluorescence, nécessitant une analyse par microscopie ou cytométrie de flux, informe uniquement sur le taux de réplication. Elle en permet l'analyse au sein de populations planctoniques, de biofilms, ou de cellules eucaryotes. De nouvelles méthodes élégantes émergent ou sont sporadiquement employées telles que la mesure de masse flottante et le marquage à l'aide d'isotope stable. Enfin, de telles méthodes sont largement utilisées pour investiguer et comparer les taux de croissance et de réplication à l'échelle de l'individu pour l'étude de persisters, de bactéries se développant dans des niches écologiques spécifiques, ou encore de bactéries collectées de patients.

Article de revue page suivante

Methods to monitor bacterial growth and replicative rates at the single-cell level

Florian C. Marro^{1,2}, Frédéric Laurent^{2,3,4,5}, Jérôme Josse^{2,3,4}, Ariel J. Blocker^{1,*}

¹Evotec ID Lyon, In Vitro Biology, Infectious Diseases and Antibacterials Unit, Gerland, 69007 Lyon, France

²CIRI – Centre International de Recherche en Infectiologie, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Univ Lyon, F-69007 Lyon, France

³Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISPB), Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

⁴Centre de Référence pour la prise en charge des Infections ostéo-articulaires complexes (CRIOAc Lyon; www.crioac-lyon.fr), Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

⁵Laboratoire de bactériologie, Institut des Agents Infectieux, French National Reference Center for Staphylococci, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

*Corresponding author. Evotec ID Lyon, In Vitro Biology, Infectious Diseases and Antibacterials Unit, France. E-mail: ariel.blocker@evotec.com

One sentence summary: Review of the current available methods to monitor at the single-cell level the bacterial growth and replicative rates, discussing both the type of queries these have been used to answer and the specific strengths and limitations of each method.

Abstract

The heterogeneity of bacterial growth and replicative rates within a population was proposed a century ago notably to explain the presence of bacterial persisters. The term “growth rate” at the single-cell level corresponds to the increase in size or mass of an individual bacterium while the “replicative rate” refers to its division capacity within a defined temporality. After a decades long hiatus, recent technical innovative approaches allow population growth and replicative rates heterogeneity monitoring at the single-cell level resuming in earnest. Among these techniques, the oldest and widely used is time-lapse microscopy, most recently combined with microfluidics. We also discuss recent fluorescence dilution methods informing only on replicative rates and best suited. Some new elegant single cell methods so far only sporadically used such as buoyant mass measurement and stable isotope probing have emerged. Overall, such tools are widely used to investigate and compare the growth and replicative rates of bacteria displaying drug-persistent behaviors to that of bacteria growing in specific ecological niches or collected from patients. In this review, we describe the current methods available, discussing both the type of queries these have been used to answer and the specific strengths and limitations of each method.

Introduction

To an historical perspective, at the beginning of the 20th century, scientists had already emphasized the importance of measuring the bacterial replicative rate at the single cell level (Barber 1908, Reichenbach 1911, Wilson 1922, Kelly and Rahn 1932). It correlated with the concomitantly wide development of techniques to isolate single microorganisms as reviewed by Hildebrand in 1938 (Hildebrand 1938). Marshall Barber developed an elegant mechanical method to isolate single cell within microdrops involving capillary micropipettes that he combined with manual time-lapse microscopy (Barber 1904). Helped by this method Barber investigated the replicative rates at the single-cell level of *Bacillus coli* at different temperatures and further demonstrated that homologous immune antipneumococcal serum had no effect on the *Pneumococcus* replicative rate of single isolated bacterial pairs (Barber 1908, 1919). Meanwhile, bacteriologists questioned the accuracy of population measurements, especially when specific subsets were found unable to grow on agar plates (Reichenbach 1911, Wilson 1922). In 1922, Wilson highlighted the frequent discrepancy of colony forming unit measurements and direct microscopic counts (Wilson 1922). This was assigned to a subset of bacteria within an actively growing population that would not grow on agar plates but could still be seen looking down a microscope. He proposed that this subpopulation corresponded to dead bacteria (Wilson 1922). Before that, Reichenbach had proposed that a certain proportion of the actively growing bacteria became dor-

mant at each new generation and that, therefore, this population increased with age explaining the viable but non-culturable bacterial subset observed (Reichenbach 1911). Later, Kelly and Rahn tested these hypotheses by studying the replicative rate of single isolated bacteria via manual time-lapse microscopy (Kelly and Rahn 1932). Interestingly, they showed that all cells continue to multiply once they have started to do so and that no progenies cease growing, become dormant or die. Results must be counterbalanced by the temporal limitation: tracking was not possible beyond the fourth generation. Moreover, few cases were recorded where a cell did not divide in the new medium as previously shown by Barber (Barber 1908, Kelly and Rahn 1932). A decade later, Hobby and Bigger both separately working on the mechanism of action of penicillin toward streptococci and staphylococci showed that it killed the actively growing bacteria (Hobby et al. 1942, Bigger 1944). Bigger discovered and employed for the first time the term persisters to name a small subset of antibiotic-insensitive, drug-persistent bacteria within a population of replicating cells (Bigger 1944). Persisters were supposed to persist penicillin pressure owing to their arrest in a temporally dormant, non-dividing phase, corroborating Reichenbach's assumption. After a decades long hiatus, the study of growth and replicative bacterial rates at the single-cell level resumed in earnest only in the last decades (Balaban et al. 2004, Godin et al. 2010, Helaine et al. 2010, Wang et al. 2010; Wakamoto et al. 2013, Claudi et al. 2014, Ursell et al. 2014, Flannagan and Heinrichs 2018, Table 1).

Received: February 26, 2022. Accepted: June 28, 2022

© The Author(s) 2022. Published by Oxford University Press on behalf of FEMS. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

Table 1: Summary of the different methods available to monitor at the single-cell level the growth and replicative rates.

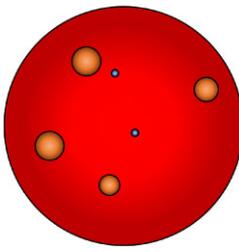
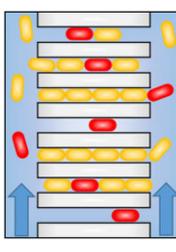
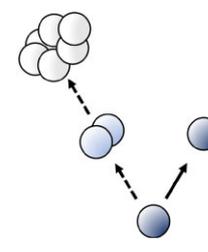
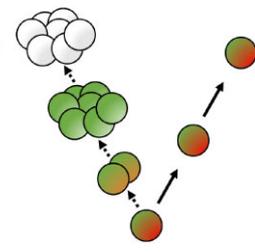
Methods	Schemes	Purposes	Number of generations tracking	Strengths	Limitations
Mains methods		The first replicative step and the bacterial lag time. Colony growth rates. Viable but non-cultivable bacteria ratio.	1	Rapid and inexpensive user-friendly method.	Indirect method. Requires a known number of bacteria spread.
Time-lapse microscopy and microfluidics		Growth and replicative rates. Inter and intra lineages comparisons. Mother cell and/or progenies tracking	From 4 to hundreds	Long generations tracking. Combined measurement of growth and replicative rates. Works with concomitant genes fluorescent reporter.	Constant microscopic tracking requirement. End-point monitoring failed.
Dyes dilution		Replicative rates	Up to 8	Tremendous events analyze at a time by FACS. Fit with <i>in cellulo</i> and <i>in situ</i> analysis.	Mismatch lineages and growth rates monitoring. Limited generations tracking. Previous genetic engineering or dyes labeling required.
Fluorescent proteins dilution		Replicative rates	Up to 10	Tremendous events analyze at a time by FACS. Report on metabolic behavior following replicative monitoring. Fit with <i>in cellulo</i> and <i>in vivo</i> analysis.	Mismatch lineages and growth rates monitoring. Limited generations tracking. Previous genetic engineering or dyes labeling required.

Table 1: Continued

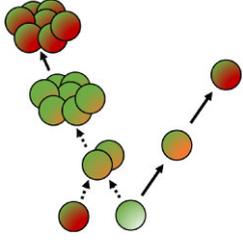
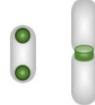
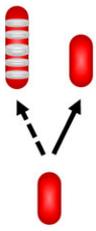
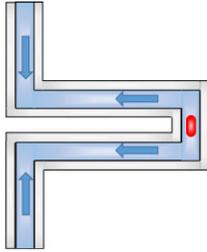
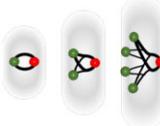
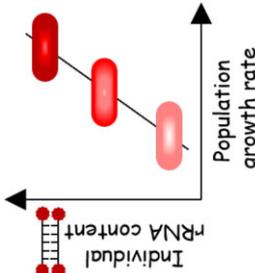
Methods	Schemes	Purposes	Number of generations tracking	Strengths	Limitations
Fluorescent proteins dilution and maturation kinetic		Replicative rates	Not tested, theoretically infinite	Tremendous events analyze at a time by FACS. Overcome generations tracking limitation. Fit with <i>in cellulo</i> and <i>in vivo</i> analysis. Does not require inducer.	Mismatch lineages and growth rates monitoring. Long time required to detect replicative rates switching. DsRed works best with aerobic condition. Poor discrimination of the extremes replicative rates. Previous genetic engineering required.
Structural markers		Regrowth delay-body (RDB): distinguishes non-growing subset; monitoring the bacterial lag time. Septum: replicative rates.	None	RDB: end-point analysis allowing discrimination based on the growth behavior. Septum: combined with time-lapse microscopy allows hundreds of generations tracking.	RDB: mismatch lineages. Manichean discrimination depending on the growth behavior. Septum: required time-lapse microscopy.
Peptidoglycan and mycomembrane synthesis enlightenment		Bacterial and subcellular growth rates. Distinguishes dividing subset	None	Report on subcellular growth patterns. Fit with intracellular analysis.	Mismatch lineages. To our knowledge, not employed to discriminate bacterial subset depending on growth and replicative behavior despite its theoretical workability.

Table 1: Continued

Methods	Schemes	Purposes	Number of generations tracking	Strengths	Limitations
Emerging and/or sporadically used methods		Growth rates	Few minutes	Precise growth rate measurement relying on buoyant mass.	Weak events at a time. Short tracking. System not broadly used.
Chromosomal replication monitoring		Distinguish respectively growing or replicating versus non-growing or non-replicating subsets	None	Fit with <i>in vivo</i> assays. Based for growth monitoring on replication initiation at conserved bacterial sized per chromosome.	Previous genetic engineering required. Manichean growth analysis depending on integer ratio. Manichean replicative monitoring based on time-lapse microscopy control. Work with mass doubling times < 60 minutes. Mismatch lineages.
Stable isotope probing	^2H , ^{15}N , ^{13}C , ...	Bacterial and subcellular growth rates	None	Report on the isotope incorporation notably via anabolic activity. Allowed monitoring of clinical isolates without prior treatment. Short incubation time <i>ex vivo</i> . Inter and intra-bacterial isotope incorporation monitoring.	Based on (population) empirical relationship. Required maintenance turnover measurement. Mismatch lineages and dividing assessment.
rRNA content		Linking single-cell rRNA level with population growth rates	None	Allowed monitoring of clinical isolates without prior treatment. Short incubation time <i>ex vivo</i> .	Based on <i>in vitro</i> standard curve correlating single-cell rRNA content with population growth rate. Mismatch lineages and dividing assessment.

The bacterial growth rate at a population level commonly refers to the increase of bacterial number in the batch. At the single-cell level, the growth rate corresponds to the increase in size or mass of an individual bacterium. Thus, the growth rate at the single-cell level had to be distinguished from the replicative rate referring to the division capacity of a single bacterium into two daughter cells within a defined temporality. Actually, a single bacterium can grow without dividing, thus forming a filament while it cannot divide without having previously grown.

Time-lapse microscopy is at our knowledge the oldest method to monitor the bacterial replicative rate at the single-cell level (Barber 1908, Kelly and Rahn 1932). Conceptually it is based on microscopic tracking over-time of bacteria and their progenies division time and size. Thus, the created lineages of microcolonies informed on the replicative and growth rates at the single-cell level. Combination with (i) microfluidics allow almost instantaneous medium variation while keeping tracking and (ii) micropatterning allows trapping of bacteria improving the temporal resolution of the method especially by removal of the daughter cells (Balaban et al. 2004, Wakamoto et al. 2005, Wang et al. 2010). Owing to the improvement of microfluidics and single-cell level microscopy, Balaban et al. (2004) were able to demonstrate for the first time the hypotheses of Bigger 60 years later. Rare *Escherichia coli* survivors that resumed growth after drug pressure removal were indeed initially non-growing or slow growing. The best-suited approaches currently available to monitor the replicative rate are methods involving the tracking of fluorescence dilution by flow cytometry and microscopy (Roostalu et al. 2008, Helaine et al. 2010, Flannagan and Heinrichs 2018). These emerged from advances in fluorescent dyes and materials, preceded by the discovery of fluorescent proteins. In concept, it is based on the assumption that the total bacterial content is halved at each replicative step. Labeling of at least a part of this bacterial content or the use of fluorescent proteins permits monitoring of bacterial replicative rates and generation rank at the single cell level *in vitro* and *in vivo*. Combination with slow sequentially maturing fluorescent proteins whose maturation time are longer than the generation time overcome the fluorescence dilution sensitivity threshold (Claudi et al. 2014, Schulte et al. 2021). De facto, other methods are employed to determine the growth and replicative rates at the single cell level such as structural markers monitoring (Table 1, Kuru et al. 2012, Santi et al. 2013, Ursell et al. 2014, Yu et al. 2019). Emerging and/or as of yet sporadically used but elegant methods allow monitoring of growth rates at the single-cell level. Amongst others, the suspended microchannel resonator (SMR) enables growth rates measurement via buoyant mass monitoring (Godin et al. 2010, Cermak et al. 2016). Moreover, chromosomal replication marker monitoring and stable isotope probing give insight into single-cell growth rate (Kopf et al. 2016, Haugan et al. 2018). Individual rRNA content monitoring via FISH is linked to population growth rates via a standard curve (Poulsen et al. 1993, Kragh et al. 2014). Finally, population level monitoring such as bacterial colony appearance informs indirectly on the ability of a single bacterium to perform at least one replicative step as well as its extrapolated lag time (Levin-Reisman et al. 2010, Bär et al. 2020).

Several other methods, such as plasmid or fluorescent particle dilution, rely on single-cell level analysis to inform on the population growth rate (Gill et al. 2009, Adams et al. 2011, Myhrvold et al. 2015). Plasmid and particle dilution methods are based on the fact that a single copy of a plasmid or a particle will be dispatched within only one of the two resulting daughter cells. Thus, diluting by half the bacterial population carrying the plasmid or particle at each replicative step. Monitoring at the single-cell level the re-

maining proportion of the population bearing the plasmid, or the particle allows measurement of the population growth rate and is, therefore, not discussed here.

In this review, we discuss the different available methods to monitor bacterial growth and replicative rates at the single-cell level *in vitro* and *in vivo* (Table 1). Furthermore, we review the findings obtained using concomitant techniques such as antibiotics susceptibility and intracellular bacterial localization, to assess their appropriateness and likely increasing importance in the future.

Monitoring of colony appearance and size: not true single cell methods, even indirectly

End-point monitoring of bacterial colonies on agar plate inform on the ability of a single bacterial ancestor to perform at least one division (Fig. 1; Table S1, Supporting Information). Then, the replicative information at the single cell level is lost. Immediately after the first replication step, two hypothesis are in conflict: (i) both daughter cell could continue to divide or (ii) one can stop while the other continues to replicate. Thus, to indirectly measure the percentage of bacteria having the capability to perform at least one replication cycle versus the percentage of non-growing also called viable but non-cultivable (VBNC) bacteria, a known number of bacteria must be spread on agar plate. Then, colonies are recordable when they reach a sufficient area or volume named the detection threshold, which is a major limitation of this indirect method. It depends on the image resolution and quality, depending amongst other elements on the lighting system. Indeed, if the progeny of a replicative bacterium enters an arrested growth phase before that the detection threshold of the method is reached, it cannot be positively counted and becomes a false negative as well as colony having a delayed appearance.

Monitoring of colony appearance and size using real-time systems to capture and analyze images over time brings new parameters such as the lag time of the colonies appearance. It is defined at the single cell level as the time needed by each bacterium to perform its first replicative step. However, this indirect population level method measures the lag time as the time required by the resulting colonies to be detected by the system giving only an estimation of the accurate single cell lag time. Quantitative microscopic single cell tracking must be done to discriminate between both hypotheses (i) a lag time before the first replication or (ii) a slow growth of the colony. Besides, the growth rates, sizes, shapes, and colors of the colonies could be monitored allowing among other segregation depending on the surface and, thus highlighting of small colony variants. Another limitation of this method is that clumped bacteria or inhomogeneous spreading methods could lead to single colonies actually deriving not from a bacterium but from an uninterpretable cluster of them. Further, conventional methods for spreading on plates using glass balls or a rake could conduct to uneven spreading leading to different neighbor effects affecting the growth rate by nutrient competition and colonies crosstalk using quorum sensing. Finally, several other issues inherent to the method could lead to artefacts such as imperfection in the plate, low image resolution, light reflectance distortions and temperature variation. Of note, some software were developed to analyze other types of colonies such as eukaryotic (Shah et al. 2007, Bewes et al. 2008, Cai et al. 2011). However, although the switch from yeast to bacterial colonies seems to be reliable, others eukaryotic colonies can present some difficulties. Thus, due to the wide range of software and systems available we cannot suggest

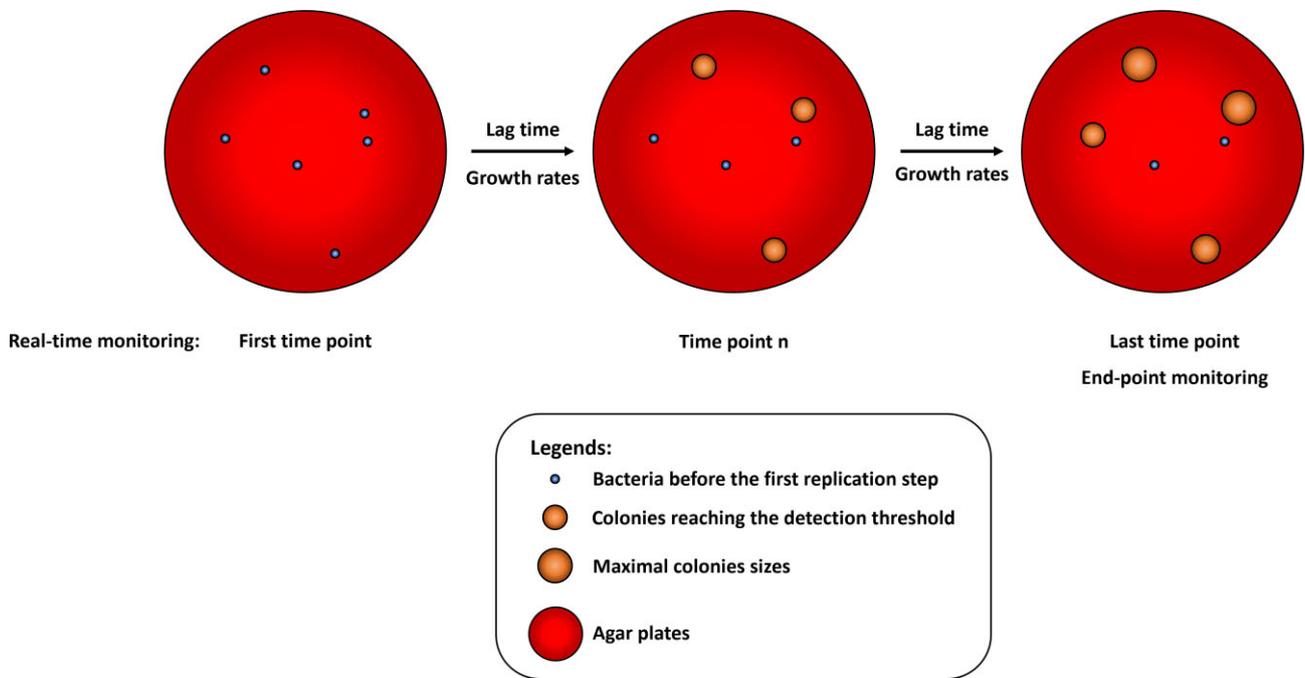


Figure 1. Principle of the colonies monitoring methods to record indirectly bacterial first replicative step at the single cell level. A known number of bacteria are spread onto agar plates (left panel). Then acquisition device, either a scanner or a digital camera, record plates at intervals during the experiment to perform real-time monitoring or at the end of the experiments to perform end-point monitoring. Using both methods, colonies are detected when it reaches the detection threshold of the systems (middle panel). End-point monitoring allows determining at a specific time point the ratio of bacteria having done at least one replicative step versus VBNC (right panel). Real-time monitoring allows determining colony lag time and/or subsequent growth rates of colonies. Using live microscopic control, the colonies calculated appearance delays could be extrapolated as bacterial lag time.

a specific one to the user. Their choice must rely on the purpose and the combination of agar and colony colors, image resolution, and so on.

End-point colony monitoring

The user could do end-point colony monitoring manually. However, it is time consuming and suffers from variability between one person to another. Thus, image analysis devices and software were developed allowing high-throughput assessment. Automatic colony counters are commercially available such as *Scan* from Interscience, *Easycount* from Biomérieux as well as *Premium 90 HR* from VWR.

A less expensive solution consists of plates pictures using a digital camera or scanner and analysis using end-user software homemade. Despite some variation, image analysis algorithms either on MATLAB, ImageJ, or CellProfiler follow the same pipeline. It consists of images preprocessing to remove noise and improve images, thresholding and optional watershed or edge segmentation algorithms leading to isolated colonies count (Bewes et al. 2008, Clarke et al. 2010, Cai et al. 2011, Geissmann 2013, Choudhry 2016, Khan et al. 2018). Furthermore, in the last decade few applications were developed to acquire and process images using smartphone helped by the improvement of their camera resolution (Wong et al. 2016, Austerjost et al. 2017). This paves the ways of scientific apps development, which could displace well-established laboratory devices.

Monitoring of colony appearance and size

As for end-point monitoring the user can do monitoring of colony appearance and size by repeating tedious end-point monitoring. However, end-point monitoring devices are generally out-

side temperature-controlled chambers and repeated temperature variation could impact the results. Thus, real-time colony counting incubator was developed. It is commercially available at Interscience and named *ScanStation* allowing to monitor up to 300 petri dishes at 1-hour intervals automatically.

Several high-throughput homemade solutions were designed combining an automated acquisition device and image analysis software, rather similar to monitor colony parameters such as count, appearance, size, or volume and physical characteristic (Michel et al. 2008, Levin-Reisman et al. 2010, Takeuchi et al. 2014). These colony growth dynamics parameters could inform on the lag of colony appearance, the growth rates of the colony, and the maximal size reached. The system is predominantly composed of an array of scanners placed in a temperature-controlled room. It was employed to monitor resistant bacteria arising across a 2D matrix of drug concentration (Michel et al. 2008), to show that starvation resulted in more bacteria remaining dormant for longer periods (Levin-Reisman et al. 2010) and to demonstrate growth defects of single-gene protein synthesis knockouts *E. coli* mutants (Takeuchi et al. 2014). Besides, to confirm that the Scan-Lag method monitors the lag time of single cells before the first replicative step and not subsequent events, data were compared with single cell microscopy and support that the delay of colonies monitoring is due to bacterial lag time and not to slow growth of the colony (Levin-Reisman et al. 2010). Of note, this control should be repeated for each bacterial species and strains studied. Further, the main limitation of the Colony-live system is due to the spreading technique; grown colonies were spotted into agar plate using short pins (Takeuchi et al. 2014). A colony evidently arise from more than one bacterium and impeded with indirect single cell first replication monitoring. A method to bypass this issue could be to spot single bacteria using fluorescence-activated cell sort-

ing (FACS). Moreover, it was showed that measuring the colony mass of the center of the colony minimized the neighbor effect (Takeuchi et al. 2014). A limitation of this method is that periodic scanning of the plates induces strong light exposure and temperature gradients, which could be sensed by the bacteria and might impact the growth. An optional module which turns on the electronics components that heat up only when an acquisition is done could be implemented (Levin-Reisman et al. 2010).

Bär et al. (2020) created a software called ColTapp supporting both standard endpoint analysis and time-lapse images analysis, thus filling a gap within previous existing image analysis tools. This application allows extraction of parameters such as colony lag time, growth rate, size, and further morphology descriptors as well as spatial metrics. Moreover, the software includes an endpoint framework allowing estimation of colony lag time.

Time-lapse microscopy and microfluidics-based methods

Single cell tracking overtime using time-lapse microscopy is a powerful tool to monitor the bacterial growth and replicative rates highlighting non-replicative bacteria for experiments with long durations (Fig. 2). Conceptually it relies on basic photonic, later fluorescent, time-lapse imaging of fields and manually tracking over-time of the non-replicating or replicating bacteria and their progenies within microcolonies, thus creating lineages. To our knowledge it is the first reported method employed to monitor the bacterial replicative rates at the single cell level (Barber 1908). Later, automated microscopes and design of homemade macros working within analysis images software improve this tedious task by implementing automated analysis. Next, microfluidics allows applying almost instantaneous medium variation without loss of the bacteria tracked. Moreover, microfluidics by providing fresh medium renewal and waste removal allows for the first time long-term monitoring of single-cell dynamics. The bias to the time-lapse microscopy method of 2D microcolonies is that analysis of a large number of single cell events at a time is technically challenging. Furthermore, after a defined number of replication events, the mother cell can no longer be linked to its progenies. Actually, the microcolonies can exceed the dimensional limits of the field and the bacteria tend to create stack impeding analysis. For this reason, it is a prerequisite of the method that the system holds the bacteria in a single focal plane. Later, micropatterning connectable with microfluidics allows trapping of the bacteria and increase the time-span resolution of the method, notably by sequentially removing the daughter cells via shear force. Moreover, due to the intrinsic properties of the method, historical growth and replicative rates from intracellular or *in vivo* recovered bacteria cannot be evaluated in contrast with the fluorescence dilution method. The growth rates are obtained by fitting to an exponential curve the size of an individual bacterium over-time. Subsequent potential division between two daughter cells can be highlighted by rapid drop and scission of the curve or by manual tracking.

Time-lapse microscopy of microcolonies

Since the first part of the 20th century, time-lapse microscopy method to monitor the bacterial replicative rates at the single cell level was reported (Barber 1908, Kelly and Rahn 1932). Helped by sequential isolation of progeny every few generations within microdrops, Barber elucidate the replicative rates at the single cell level of *B. coli* over different temperatures by manual time-lapse

microscopy (Barber 1908). Later, Kelly and Rahn isolated single cell of *Bacterium aerogenes*, *Bacillus cereus*, and *Saccharomyces ellipsoideus* using a method derived from the one developed by Ørskov in 1922 using spreading of bacteria onto agar (Ørskov 1922). The authors demonstrated that if any bacterium divided once, all its progenies maintained replication over four generations corresponding to the limit of the method since after that the progenies could not be linked to their mother cells. Of note, bacterial lag time before the first replicative step was in some cases reported.

In the last decades, improvement of the microscopic device and analysis software allowed automated acquisition of time-lapse single cell tracking and data analysis. Liquid culture spotted on a coverslip could be covered with a semipermeable membrane and a micropatterned polydimethylsiloxane (PDMS) chip allowing microfluidic medium switches or a polyacrylamide gel leading to sparsely platted bacteria (Wakamoto et al. 2013, Manina et al. 2015). Then phase and fluorescence image were recorded at intervals. Analysis of the images series records bacterial planar area over time as well as their fluorescence intensity and specifies their position in a lineage tree (Wakamoto et al. 2013, Manina et al. 2015). This method allowed monitoring nine generations of lineages representing about 500 cell cycles (Kiviet et al. 2014). Growth rates were obtained by sequentially fitting cell length or area with exponential curves and divisions were highlighted by shift in the curve. The division rates were calculated from the number of division events normalized by the total cell number at each time point divided by the time-lapse interval. Wakamoto et al. (2013) employed the time-lapse microscopy method to analyze the growth and replicative rates of *Mycobacterium smegmatis* framing and during isoniazid drug challenge. Helped by the time-lapse method, it was demonstrated that *M. smegmatis* persistence against isoniazid is not correlated with single-cell growth rates but linked with the isoniazid-activating enzyme catalase-peroxidase KatG dynamics. Moreover, the authors showed that isoniazid inhibits growth faster than division. Later, Kiviet et al. (2014) employed time-lapse microscopy method to investigate the growth rates of *E. coli* at the single cell level and quantify time-resolved cross-correlations with expression of *lac* genes. Cells were first manually selected and then automatic followed by microscopy. It was shown that the growth rates varied in time depending on the medium employed in the gel, as an example, the more the IPTG concentration increased the more the growth rate increased. Moreover, *lac* genes expression was monitored by GFP fusion into the *lac* operon allowing quantifying the *lac* production rate and concentration at the single cell level. This allowed highlighting that *lac* expression fluctuations positively correlated later growth fluctuations and that it then propagates back to disturb expression. Manina et al. (2015) combined quantitative time-lapse microscopy and fluorescent reporters to assess both bacterial growth rates and ribosomal RNA expression concomitantly. Single-cell dynamics of ribosomal RNA of *Mycobacterium tuberculosis* was monitored using a genetically encoded fluorescent reporter consisting of a destabilized green fluorescent protein (GFP) inserted at the *rrn* locus. The half-life of the radiolabeled GFP destabilized was several hours depending on the growth phase of the bacteria. Single-cell tracking by time-lapse microscopy of *M. tuberculosis* was done framing and during isoniazid intoxication which was done by intermittent pulses using the microfluidic device to mimic the pharmacokinetic profile in patients. Moreover, bacteria were stained with Sytox blue, a reporter of membrane damaging. This combined method highlighted three undamaged membrane bacterial subsets after the isoniazid removal (i) cells that resumed growth and recovered fluorescence (ii) non-growing but metabolically ac-

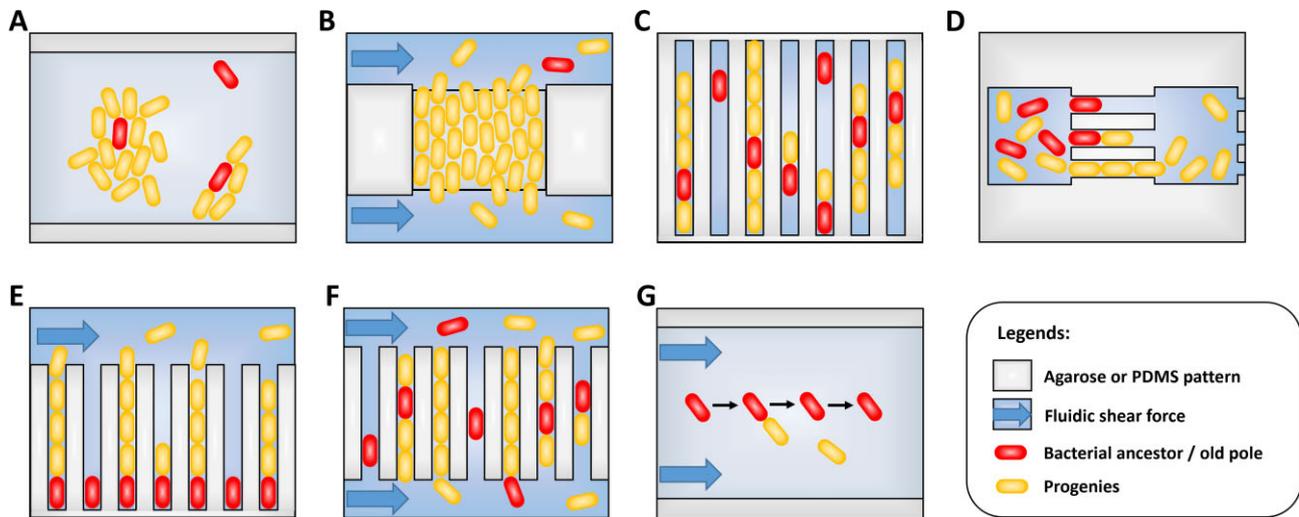


Figure 2. Patterns of the time-lapse microscopy method to monitor growth and replicative rates. Schemes representing methods for time-lapse microscopy 2D microcolonies (A) and (B), (top left), linear microcolonies (C)–(F), (top right and bottom left), and individual bacterium monitoring (G), (bottom right). (A) 2D monolayer microcolonies method; bacteria are spread on a pad and allowed to grow and divide in two dimensions. (A)–(G) Optionally, medium is flowed in via microfluidics to feed the microcolonies. (B) Turbidostat method; bacteria are caught on a trap formed by two large neighboring cavities (above and below). Laminar fluidic shear force remove and flow away the bacterial ancestor and its progenies having fallen into the opposite openings via growth and dividing spatial force. (C) Narrow grooves method, bacteria are caught on linear traps and allowed to grow and divide, thus forming linear microcolonies. (D) Successive interconnected chambers method; bacteria are seeded inside the first chamber of the array. Ancestors enter within narrow grooves, growth and dividing spatial force push half of the linear microcolonies inside the next chamber. The successive chambers have thinner grooves than the first it is connect to. (E) Mother machine method; individual bacteria are seeded at the dead end of narrow grooves. Growth and dividing spatial force pushes progenies toward the opened end. Bacteria are then flowed away by laminar fluidic shear force. Mother bacteria with the oldest pole remain at the bottom of the channels. (F) Chemostat method; bacteria are seeded inside narrow grooves opened at both sides. Growth and dividing spatial force pushes progenies and ancestor outside of the channels. Shear force flows away bacteria having fallen. (G) Individual bacteria monitoring method; adherent bacteria are spread on a pad and allowed to grow and divide. Laminar fluidic shear force removes the non-adhering progenies while the ancestors remain anchored. Furthermore, ancestor and progenies can be isolated or trashed via optical tweezers able to penetrate inside micropattern (not represented).

tive cells that contain bursts of fluorescence and (iii) non-growing cells with equal fluorescence. Interestingly, single-cell time-lapse analysis showed no exclusive correlations between growth rates prior to drug intoxication and the bacterial fates after drug removal. Furthermore, bacteria explanted from the lungs of chronically infected immune-competent mice were inoculated into the permissive condition of the microfluidic device. The majority of the recovered bacteria did not resume growth despite the fact that a substantial fraction was physically intact and metabolically active as demonstrated by rRNA locus *de novo* expression monitored by fluorescence intensity. Next, Goormaghtigh and Van Melderen (2019) used single-cell time-lapse method coupled with SOS induction and DNA content reporters to characterize exponential phase *E. coli* persists to ofloxacin. The bacteria were design to express a *psulA::gfp* reporter monitoring the SOS response induction and an HU-GFP reporter to record nucleoids. Using this system, they showed that prior to ofloxacin treatment, persistent bacteria are not necessarily non or slow growing. Actually, the authors observed growing and dividing bacteria that only ceased replicating during drug intoxication while resuming growth upon drug removal, subsequently forming long polynucleoide bacterial filaments prior to eventual division and nucleoid segregation. Moreover, persisters and sensitive cells showed similar level of SOS induction during ofloxacin intoxication. Suggesting that the growth rate and the SOS response cannot be employed as a marker of persisters. Of note, they defined persisters by the ability to regrow after drug exposure, which put aside possible long term non regrowth persisters cells.

Thus, improvement of the systems required for the time-lapse method simplified monitoring of bacterial growth rate and repli-

cation at the single cell level. Moreover, microfluidic devices permit growth rates monitoring under rapidly various successive medium conditions without loss of the bacteria of interest. Time-lapse microscopy method was parallelized with genes expression monitoring via fluorescent reporter allowing to establish such a cross-correlation *in vitro* and using *in vivo* explanted bacteria at the single-cell level. Moreover, due to the lack of bacterial growth history, end-point analysis failed, and prior *in vivo* growth and replicative rates cannot be recorded or extrapolated. Finally, bacterial growth rates and division at the single-cell level was monitored before, during and after antibiotics treatment helped by microfluidics.

The microfluidics had improved the temporal resolution of the time-lapse microscopy method via constant medium input, as previously discussed, but also via bacterial progenies removal. Actually, Ullman et al. (2013) designed a microfluidic turbidostat for single-cell growth monitoring and high-throughput gene expression analysis. The micropattern consists of a trap limited by two walls and two openings. Bacteria are caught in the traps and allowed to grow until covering the entire surface as 2D microcolony. Then the acquisition is started, the daughter cells reaching the openings are removed into the surrounding cavity and carried away via medium flow. Each experiment allows monitoring of around 3000 complete replication steps. The authors demonstrated that length of bacteria in rich media vary more than generation time at birth while the reverse was observed in poor media. Further, the dynamics of synthesis and localization of the lactose repressor were investigated using a LacI-Venus fluorescent construction expressed from native promoter in *E. coli*. Single fluorescent molecules detection using short excitation light pulses

showed an increase in the expression at the birth. Later, Wallden et al. (2016) employed the microfluidic turbidostat to decipher the chromosome replication cycle to the replication rate of *E. coli* via labeled DNA replication components. The authors labeled the epsilon subunit of the DNA polymerase III named DnaQ allowing monitoring of single replisomes via single-molecule fluorescence imaging. Using this single-cell method they demonstrated that the initiation of the chromosome replication is launched at a fixed volume per chromosome independently of growth rates and bacterial volume at birth. Furthermore, it was showed that the generation time and division size was dependent to the growth rate.

Thus, removal of the bacteria from the 2D microcolonies increase the temporal and spatial resolution of the time-lapse microscopy method. Coupling it with replisomes detection and localization allow both chromosome and cell cycle correlation. However, large individual bacterial shifting within the 2D microcolonies can induces loss of cells and lineages end.

Overall, the oldest method to monitor at the single-cell level the bacterial growth and replicative rates was improved by the breakthrough of automation and software analysis (Fig. 2). Time-lapse method allows monitoring the bacterial growth and replicative rates at the single-cell level by analyzing the individual's cellular size and their drop within 2D microcolonies. A strength of the method is the cross-correlation with fluorescent reporter and medium switches with microfluidics. The main limitation relies on the bacterial tracking to create among other the lineages. Actually, the temporal limit of the methods to measure replicative rates within a 2D microcolonies depend on the robustness of the analysis to link daughters cells to their mothers, which mainly depends on the size of the microcolonies and individual bacterial shifting. Microfluidic turbidostat development improves the temporal resolution of the method by sequential removal of the bacteria from the trap via neighboring cavities, thus improving the spatial resolution. Furthermore, due to the intervals tracking principle of the method, end-point analysis is not possible. Indeed, bacterial growth history before starting acquisition cannot be recordable nor extrapolated.

Time-lapse microscopy of linear microcolonies

Channel-design allows long-term single-cell tracking of a unique lineage from a single ancestor tacking over the spatial limitation of the 2D microcolonies method (Fig. 2). It relies on linear narrow grooves mainly made in PDMS, which trap bacteria allowing only 1D motility. The grooves are slightly taller than the cell to avoid cell stranding and allow optimal and equal nutrition all along the channel. Linear colonies simplified tracking and lineage construction compared to 2D microcolonies. Of note, this method is, however, only suitable for rod-shaped bacteria.

Balaban et al. (2004) employed the channel-design combined to time-lapse microscopy to investigate the single-cell growth rate of *E. coli* during antibiotic challenge. The micropattern device used consisted of a stack of layers made by linear grooves in PDMS, a cellulose membrane and a flow channel in PDMS. The bacteria were seeded into the PDMS channels and allowed several cell divisions before exposure to ampicillin treatment using microfluidics. The growth rates of the daughter cells were derived from the length of the newly formed linear microcolonies. The authors showed that rare non-growing or slow growing bacteria could survive antibiotic treatment and then regrow and divide after drug removal. Thus, a channel-type design micropattern combined with microfluidics allow for the easiest microcolony tracking, by limit-

ing spatial diffusion of the bacteria during longer periods of time, as well as antibiotic growth rates susceptibility monitoring.

Männik et al. (2009) engineered a submicron channel containing microfluidic device to monitor the bacterial growth and replicative rates as well as motility at the single-cell level. The micropattern consisted of successive chambers interconnected by progressively narrower channels ranging in width from 5 to 0.3 μm while the bacterial diameter used ranged from 0.7 to 1.1 μm . The swimming bacterial ancestor enters the channel by itself or pressed by the other bacteria. Helped by this time-lapse microscopy method, the authors showed that *E. coli* and *Bacillus subtilis* escaped channels exceeding only marginally their diameters by swimming. In smaller grooves, although the bacterial motility capacity was lost, the bacterial escaping ability was maintained. Actually, within narrower channels the bacterial dispersal is driven by the growth and replication pushing themselves. Half of the population was pushed forward into the next chamber while the other half was pushed backward toward the originating chamber. *Escherichia coli* was still able to pass through channels smaller than its diameter by a factor two resulting in a variety of anomalous cell shapes. Later, this model was employed to demonstrate that despite irregular morphologies *E. coli* maintains its ability to divide into two equally sized daughter cells (Männik et al. 2012). Moreover, inhibition of the Min system and of nucleoid occlusion are largely dispensable regarding the accuracy of central divisions in these bacteria with anomalous shapes. Of note, *minC* deletion impacts the divisive placement within normal rod-shaped bacteria. Thus, an interconnected successively narrower channels design allows monitoring of growth and replicative rates depending on constrictions forces at the single-cell level via time-lapse microscopy.

Wang et al. (2010) improved the temporal resolution range of the narrow grooves method by removing the daughter cells at one side of the channels via constant flow allowing monitoring of the mother cell growth and replicative rates for hundreds of generations. It allows monitoring of a large number of bacteria at a defined reproductive age simultaneously. A series of single bacterially seeded narrow grooves are oriented at right angles toward a mainstream channel carrying the growth medium at a constant flow, which results to both bacterial nutrition and removal of progenies emerging from the growth grooves. The bacterium, i.e. confined at the end of the groove is the mother cell, which donates one of its poles to the growing bacterial lineage and which never leaves channel. In contrast, after the channel fills up, subsequent growth pushes the earliest progenies out and they are removed by the flowing medium. The authors called the method "mother machine" since it allows monitoring of cells inheriting the same pole over many generations. Using this method, they showed that the growth rates of the mother cell and its immediate progenies did not change over time. The cell length of 10^5 individual cells was fitted to a time curve, and then interval between birth and division was fitted to exponential function giving the growth rate at each replicative age. Thus, the mother machine improves the temporal resolution range of the narrow grooves method to monitor growth rates of the mother cell for hundreds of generations as it is gradually getting old, and of its direct progenies.

The mother machine method was broadly used to monitor bacterial growth rates and divisions at the single-cell level. Transient oscillations in *E. coli* initial cell size, which could extend over several generations was highlighted (Tanouchi et al. 2015). The authors demonstrated negative feedback on the cell size control, i.e that bacteria with an initially higher cell size tend to divide earlier and inversely. Using the mother machine, it was shown

depending on studies that a progeny taller than its sister tends to grow slower or that the growth rate is independent of initial cell size (Tanouchi et al. 2015, Kohram et al. 2021). Fluorescent reporters were broadly combined with the phenotypically analysis of the mother machine. Virulence genes fluorescent reporter in *Salmonella typhimurium* was correlated with drug intoxication showing that virulence expression promotes survival by reducing growth (Arnoldini et al. 2014). Fluorescent reporter and the mother machine were further associated with end-point live/dead assay showing that both VBNC and persisters cells, here defined as having the ability to growth after drug removal, shared similar cell length before drug intoxication as well as similar *tnaC* level (Barnford et al. 2017). Of note, *tnaC* is part of the *tnaCAB* operon responsible for tryptophan metabolism and was half of those reported in susceptible cells prior to drug intoxication and can, therefore, be considered as new biomarkers. Later, fluorescent reporter of the main multidrug efflux pump AcrAB-TolC in *E. coli* showed that it was unevenly allocated between daughters cells since it accumulates at the old pole (Bergmiller et al. 2017). Furthermore, a growth difference was highlighted between successive generations under subinhibitory tetracycline challenge. The mother machine was further combined with a library of CRISPR interference knock-downs to highlight genes involved in the regulation of chromosome replication initiation (Camsund et al. 2020). The initiation of replication was simultaneously monitored via a *seqA-yfp* fusion allowing tracking of the chromosomal replication machinery. After phenotypic monitoring, bacteria were fixed, and genotype monitoring was done by sequential FISH to a barcode. The authors thus identified genes as required in the regulation of chromosome replication initiation at a defined volume per chromosome. Recently, Manuse et al. (2021) employed an ATP concentration reporter to characterize the persisters physiology. The reporter consists of a genetically modified ATP synthase binding subunit which absorbs at two different wavelengths between both free and ATP linked states and emits at one. The ratio between fluorescent signals from the two excitations wavelengths reports on the ATP concentration. Interestingly, the authors showed that even prior to antibiotic treatment persisters did not grow or grew very slowly at low ATP levels and resumed growth heterogeneously after drug removal. Thus, time-lapse microscopy methods employing a mother machine-type micropattern were combined with fluorescent reporters informing on genes expressions and efflux pump localization. Further combined with drug intoxication via microfluidics and ATP concentration reporter.

Norman et al. (2013) improved the mother machine method to decipher the *B. subtilis* switch between motile and sessile connected chains during the exponential phase of growth. The length of the narrow grooves must accommodate two parameters, cell feeding and cell retention. Longer grooves impeded uniform feeding but better retained the progenies. The authors overcame this limitation by adding shallow side grooves surrounding the bacteria allowing optimal growth medium diffusion all along the channels. They created 75 μm long channels working with the sessile chains' lifestyle of the bacteria. Motile cells were recorded via the fluorescent reporter of the flagellin gene while the chains were highlighted by fluorescent reporter encoding copy of the matrix *tapA* gene. Using these combined methods, they demonstrated that the motile lifestyle is memoryless while the time spent as sessile bacteria is tightly controlled. Later, Baltekin et al. (2017) engineered the mother machine by adding an opening at the end of each narrow groove. Its size prevents bacterial exit but allows medium flow through the channels. The authors employed it to assess rapid antibiotic susceptibility of clinical samples. Thus, im-

provement of the mother machine design allows monitoring of long cell filaments and rapid detection of antibiotic susceptibility.

The narrow grooves can also have both of their ends opened toward two parallel mainstream channels (Moffitt et al. 2012, Long et al. 2013). It allows feeding and escaping of the bacterial mothers and their progenies at both sides, thus avoiding aging altogether. Actually, due to the dual opening of the grooves, bacteria including the mother cells are constantly removed, thus creating a linear microcolony of bacteria of similar age. Because the bacteria are maintained in a chemostatic environment Moffitt et al. (2012) termed their device the single cell chemostat. The chemostat was made of agarose, a porous material allowing cross microcolony communication. Using this device, the authors showed that the division time, the growth rate, and the length at division of *E. coli* remained constant throughout the lineage. The bacteria leave the grooves at a rate that increased proportionally to the distance from the center and is constant in time. Thus, the temporal limit of tracking depends amongst other parameters on the length of the grooves. They investigated the growth rates of a synthetic microbial community including two *E. coli* auxotrophs that shared amino acids in co-culture. Time-lapse microscopy analysis showed that each strain of the mixed community grew while a single community did not. Moreover, increasing the flow rate decreased the growth rate of the microcolonies. At the single-cell level all the bacteria of the mixed community grew with widely different rates. Subsequently, Long et al. (2013) developed a PDMS-based chemostat to monitor the bacterial replicative rates and validated it for track fluorescent reporters such as chromosomal loci over-time. Thus, the chemostat design improves the temporal resolution range of the narrow groove method by allowing tracking of successive lineages over 30–40 generations and avoiding bacterial aging. However, the porous agarose-based pads complicate medium changes inside the channels due to agarose saturation and are, therefore, best reserved for experiments that do not require changes in medium and microcolonies isolation.

Overall, linear 1D-restricted micropattern devices improved temporally the basic time-lapse microscopy method using 2D microcolonies monitoring (Fig. 2). The channel design allows long-term monitoring of a unique lineage from a single trapped ancestor beyond the temporal resolution range of the 2D microcolonies, which rely on the spatial limit. Besides, the mother machines allow monitoring for hundreds of generations the aging of mother cells trapped at the dead-end, as well as of their direct progenies sequentially remove from the channel. Then, chemostat design created linear colony composed of bacteria sharing similar age via constant bacterial released at both side of the channel including the mother cells. Such as the basic previously described time-lapse method, the channel design techniques impeded with end-point analysis. Moreover, the mechanical restricted linear growth allows only mother to daughter cells contact thus avoiding population direct and diverse talk using as example quorum sensing. Furthermore, it was showed that the channel spatial characteristic such as width and length interfere with the mother cell growth and replication by mechanical forces (Yang et al. 2018).

Time-lapse microscopy of individual bacteria

Elfving et al. (2004) developed a flow chamber allowing monitoring of growth and division events of the mother cells attached to a transparent solid surface via removal of any daughter cells by fluidic shear force which fed bacteria. Later, Iyer-Biswas et al. (2014) diverted the physiological properties of *Caulobacter crescentus*, which divides into two phenotypically distinct daughter cells,

one is motile, and the other is adherent. They design a strain bearing the holdfast synthesis A (*hfsA*) gene controlling the surface adhesion under an inducible promoter. Thereby, before starting monitoring, the gene was expressed in order to adhere bacteria at the glass surface. Then, the inducer is removed, and subsequent daughter cells are unable to adhere and are removed via the medium flow. This method allows monitoring of more than one hundred generation from an individual mother cell. Helped by this system, it was showed that the individual lag time, which is referred as the time required by *E. coli* and *Listeria innocua* to double its size increased respectively with the salt concentrations and sublethal heat shock (Elfving et al. 2004). Further, it was demonstrated that the bacteria divide upon reaching a critical multiple of their initial sizes and that the mean division time decreases as the temperature increases (Iyer-Biswas et al. 2014). Thus, bacterial attachment prior to shear force on solid surface allows monitoring of individuals mother cells growth and division rates.

Wakamoto et al. (2005) developed a microchamber cultivation array under fluidics flow to evaluate the length and replication time of individuals *E. coli* over generations. The micropattern is composed of four chambers connected to two ending areas allowing nutrition and discarding of the progenies via medium flow. In concept, the method which consist of repeated isolation steps is similar to that developed by Barber (1908). From a unique ancestor the four vacant microchambers were filled by progenies via optical tweezers. Then, at each replicative step, four randomly selected progenies were picked up and discarded. This method allows monitoring of four single bacteria from a unique ancestor for more than 10 generations. The authors showed that the initial and final length were correlated with those of proximal generations. In contrast, the division time had no correlation with that of the consecutive generations. Thus, microchamber pattern combines with time-lapse microscopy and manual progenies isolation allows monitoring of length and division of single successive isolated bacteria.

Overall, sequential removal of daughter cells using optical tweezers or shear force allow monitoring of growth and replication of individual isolated bacterium over respectively 10 to more than 100 generation by time-lapse microscopy (Fig. 2). It allows monitoring of bacterial parameters under various conditions such as salt concentrations and temperatures ranges. The main limitation of this method is that the tracked bacteria remain alone preventing investigation of colonies behaviors. Furthermore, isolation of single bacteria at each replicative step is tedious. On the other hand, the removal of progenies allows tracking a few individual bacteria from the same lineage or mother cells over generations under a single lifestyle.

Dyes dilution-based methods

In concept, the dyes dilution-based methods rely on the total initial bacterial content dilution by a factor of two at each replicative step between the two resulting daughter cells (Fig. 3). The different commercially available dyes separate into two main classes depending on the location where they are retained by the bacteria: (1) reactive compounds forming covalent bonds with free amines; (2) lipophilic compounds intercalating with lipids of the plasma membrane. Another class corresponding to (3) labeled artificial surface receptors involving among other fluorescent oligodeoxynucleotide (ODN) small molecule conjugates was recently tested to fit with the dyes dilution-based model. It should be noted that we present here only a selection of dyes dilutions assays, those that we felt were most suited to our comparative

analysis of this type of methodology. The subset listed in Table S2 (Supporting Information) is, therefore, not representative of the diversity of dyes available. A prerequisite to the workability of the dye staining is that the labeling employed must be neither metabolized nor otherwise removed from the bacteria during the course of the study (Flannagan and Heinrichs 2018). Indeed, only then is it safe to assume, that the dyes are diluted proportionally by a factor two at the outset of each bacterial division, relying either on total protein or cell wall synthesis and then dilution. Bacterial subsets undergoing replication should dilute the fluorescent dye equally between daughter cells at each replication step while non-dividing bacteria should retain all of their initial fluorescent labeling. Thus, the dye dilution-based methods shed light on bacterial replicative rates at the single-cell level over time. Nevertheless, this fluorescence method cannot be used to track bacterial replication over a long period of time since the signal will decrease to near background, reaching the sensitivity threshold, after only a few bacterial divisions, commonly about 4–8. A further weakness of the method is that dividing or non-dividing states that happen after a first replicative period over the limit of detection of the model cannot be recorded (Fig. 4). Furthermore, in contrast with time-lapse microscopy methods, the dyes dilution-based method did not report on bacterial growth rates at the single-cell level. The covalent binding of dyes to proteins; as well as the expression of fluorescent proteins presented later; may affect the physiological behaviors of the bacteria and lead to misinterpretation of results. Thus, as far as possible controls must be done using others approaches to corroborate the correctness of the replicative rates measured with fluorescence dilution methods.

Reactive compounds forming covalent bonds with free amines

Carboxyfluorescein succinimidyl ester

A fluorescent dye dilution-based method was developed with the carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) probe to monitor the various replicative rates of a liquid culture or intracellular bacteria at the single cell level (Ueckert et al. 1997, Atwal et al. 2016, Wong et al. 2019). The non-fluorescent compound 5- (and 6-) carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA-SE) can freely diffuse throughout the cell membrane and reach the cytoplasm (Bronner-Fraser 1985). Once intracellular, both acetate group of the CFDA-SE molecules are cleaved by esterases resulting in the highly photostable and membrane impermeable CFSE fluorescent compound. Of note, the permeability of Gram-negative bacteria was increased with EDTA or Triton X-100 to improve the staining (Diaper and Edwards 1994, Hoefel et al. 2003, Wong et al. 2019). The succinimidyl group of the CFSE compound then reacts covalently with primary amines. Successive rounds of centrifugation and resuspension with medium containing amines quenches any unreacted fluorophore. Using this approach, the decreases in CFSE dilution tend to correlate with the known division time of *Acinetobacter baumannii* and *Orientia tsutsugamushi* supporting the strength of the method to follow bacterial division at the single-cell level (Moffatt et al. 2010, Antunes et al. 2011, Giengkam et al. 2015). Interestingly, Atwal et al. (2016) showed that the CFSE and its variant CellTrace FarRed could not be properly retained by *O. tsutsugamushi* after liquid culture fixation with paraformaldehyde or acetone. However, it appeared that neither dye had any impact on the phenotypic state of the bacteria or on the infection cycle. Further, cultures of non-dividing *O. tsutsugamushi*, kept their fluorescence intensity demonstrating that as expected the dilution

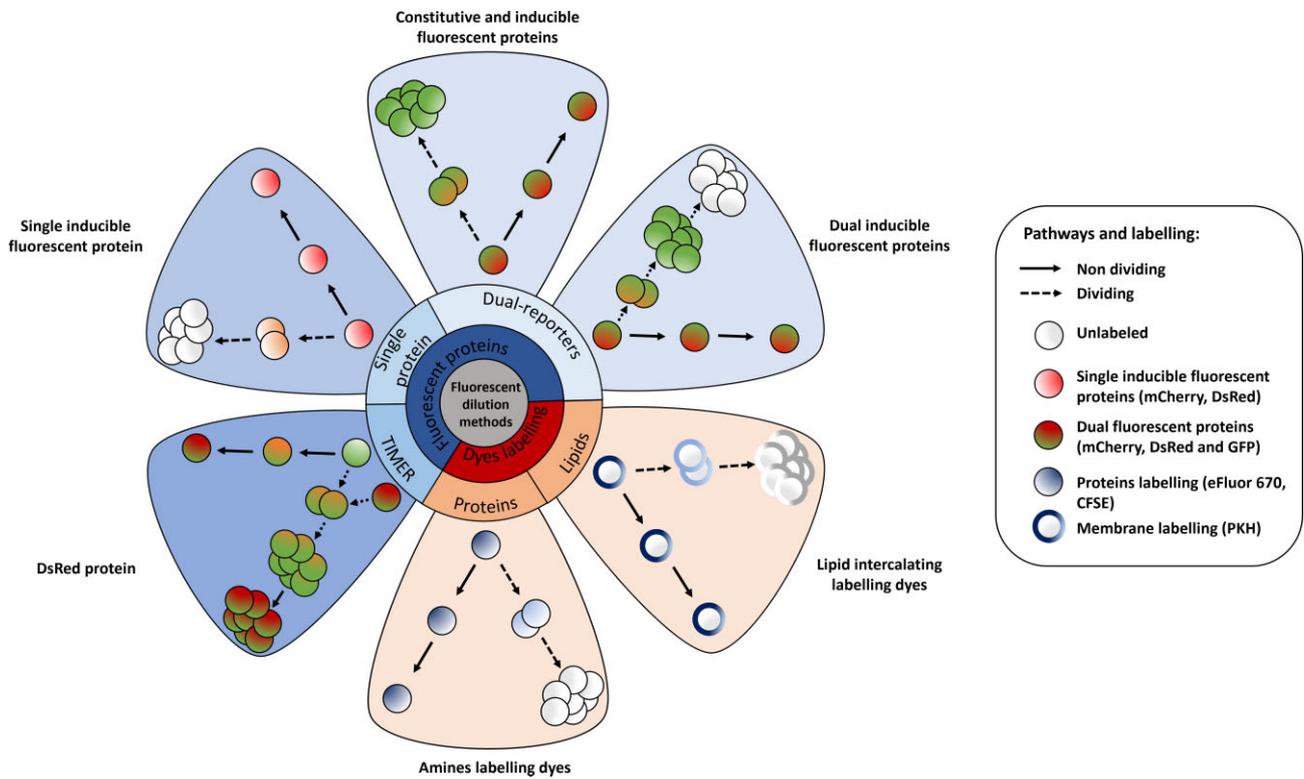


Figure 3. Principles of the different fluorescence dilutions methods to study bacterial replicative rates at the single cell level. Dyes (bottom and bottom right) either label-free amines or intercalate in the lipid membrane(s) of bacteria. At each replicative step the initially labeled content of the bacteria will be diluted by a factor two resulting in halving of the fluorescence intensity recorded. When pre-expressed, single inducible fluorescent proteins (top left) will be similarly diluted during bacterial proliferation. Meanwhile bacteria that do not undergo any replication will remain as labeled initially. Dual reporter methods combine a single inducible fluorescent protein with either a constitutive fluorescent protein (top) or another inducible fluorescent protein (top right). Dual-reporters constructed on the basis of two independently inducible fluorescent proteins improve the detection range of the method by successive removal of each inducer. The TIMER method employing mainly DsRed protein (bottom left) relies on both the global initial bacterial content reduction at each replicative step and the sequential maturing fluorescent proteins. One fluorescent protein matures faster than the other does and can, thus accumulate within the replicating bacterial population whereas, in contrast, the slower maturing cannot. Moreover, within proliferation arrested bacteria both differentially maturing proteins can accumulate. In contrast, when replicating arrested bacteria enter a replicative phase the slowly maturing protein will be diluted by a factor two at each replicative step.

of fluorescence was due to the bacterial replication state rather than caused by compromised fluorescence probes.

Since 1997, Ueckert et al. (1997) pointed out the vast interest of replicative rate measurement at the single-cell level compared to the conventional average population data. *Lactobacillus plantarum* was colabeled with CFSE and propidium iodide, a non-permeant compound that enters only inside bacteria harboring damaged membranes. A total of three replicative bacterial subsets were detected corresponding to: a non-growing state and two groups of slow-growing bacteria, having each undergone 1 or 2 cell division, respectively. After nisin treatment, an antimicrobial peptide which forms pores within the membrane, the surviving bacteria, i.e. those that were propidium iodide negative, were able to divide without a lag phase and the replicative steps were tracked for up to eight generations by flow cytometry. CFSE-labeled bacteria could be further monitored *in vitro* during the early events of cells invasion by live confocal microscopy (Atwal et al. 2016). Quantification of bacterial CFSE fluorescence intensity recorded was done by measuring the highest pixel within single bacteria. A fast decrease of the fluorescence intensity average was recorded, highlighting a population bacterial replication tendency. Of note, a small subset of bacteria was still highly fluorescent at the end of the monitoring indicating that they were non-dividing or dead. Indeed, dead bacteria are labeled if the death happens after CFSE maturation into CFSE and that CFSE is

not eliminated. The CFSE dye dilution-based method was also employed to track both the bacterial propagation and the replicative rates *in situ* of *Comamonas* sp and *Acidovorax* sp in aquifers and aquifer sediments (Mailloux and Fuller 2003). Microcosm experiments revealed that the method gave similar division rates as bacterial counting and that these rates were independent of cell concentration. Furthermore, data from a field-scale assay of *Comamonas* sp using CFSE labeling showed that a slight and consistent decrease of the recorded fluorescence intensity happened over time and distance traveled giving a doubling time of 15 days (Fuller et al. 2000, Mailloux and Fuller 2003). Recently, flow cytometry analysis of CFSE-labeled *A. baumannii* cultures allowed monitoring replications for up to 2 hours representing approximately four generations (Wong et al. 2019). Concomitantly, live and dead bacteria was assessed by propidium iodide incorporation. Rifampin alone and in combination with polymyxin-B led to a sustained non-replicating state despite some slight resumption of replication. Minimal bacterial killing was recorded suggesting that antibiotics pressure leads to drug-persistent non-replicating *A. baumannii*, which regrow upon antibiotics removal determined by CFSE dilution as the parental strain. Of note, CFSE monitoring and CFU counting were similar without antibiotics pressure but appeared largely different under antibiotic treatment, consistent with the previous finding showing that only a part of the drug-persistent bacteria are able to resume proliferation (Helaine et al.

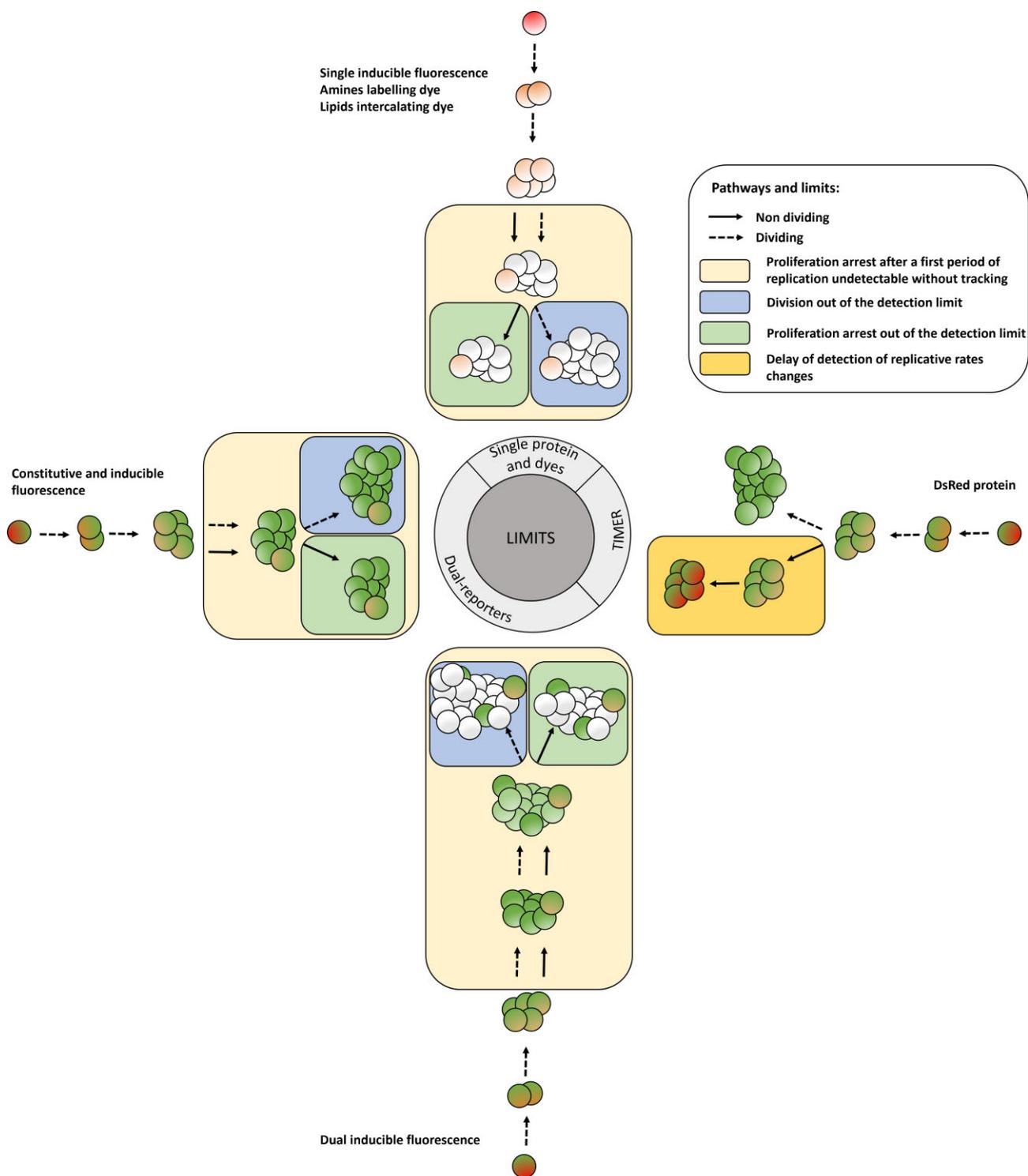


Figure 4. Limits of the fluorescence dilution methods. In total, four classes of limits are here represented: (1) a proliferation arrested phase occurring before the detection limit of the method is reached after a first period of replication cannot be detected without bacterial tracking, (2) any dividing, or (3) dividing-arrested phases outside of the dilution detection limit will not be recordable. (1), (2), and (3) represent limits of *dyes*, *single inducible fluorescent proteins*, and *dual-reporters* tools (top, left, and bottom). Finally; and specific to the *TIMER* method (right), (3) rapid dividing state changes will not be detectable due to the slow maturing protein. Amine labeling dye combined with constitutively expressed fluorescent protein as well as dual-reporter constructions carrying both a constitutive and an inducible fluorescence reporter allow bacterial tracking outside of the dilution limit via microscopy.

2014, Wong et al. 2019). This points to a serious limitation of the broadly used CFU counting method, which does not consider the VBNC bacteria.

Overall, the widespread CFSE fluorescent dilution-based method allows monitoring at the single cell level of the replicative rate of both Gram-negative and Gram-positive bacteria in liquid culture or during cell infection by live confocal microscopy and flow cytometry (Fig. 3). It is compatible with *in situ* study to relate bacterial lifestyle such as progeny travel and concomitant bacterial labeling in liquid culture, notably therefore informing on the survival upon bacterial injury (Table S2, Supporting Information). Moreover, single-cell CFSE fluorescence intensity monitoring by flow cytometry allows the distinguishing of four to eight cell divisions depending on the bacterial species until that fluorescence reaches the background level (Fig. 4). Due to the dilution of the dye out of the detection limit it cannot highlight dividing or non-dividing bacteria after a first period of proliferation. A limitation to the microscopy study is that the bacteria not colabeled with a constitutively expressed fluorescent protein, which underwent replication became undetectable over the experimental time course.

eFluor-670 cell proliferation dye

Flannagan and colleagues developed a fluorescent dilution approach based on the cell proliferation fluorophore eFluor-670 to distinguish replicating and non-dividing intracellular bacteria at the subcellular level *in vitro* (Flannagan et al. 2016, Flannagan and Heinrichs 2018). This non-specific fluorescent marker is an amine reactive compound that will, thus label any bacterial proteins or structures containing primary amines. As for CFSE, successive rounds of centrifugation and resuspension with medium containing amines quenched any unreacted fluorophore. Bacteria constitutively expressing a fluorescent reporter protein allow tracking the replicative subset beyond the dilution threshold limit. As control, labeled bacteria were rendered unable to grow by killing with paraformaldehyde fixation. Once fixed, bacteria maintained their initial staining in liquid culture and inside macrophages demonstrating that eFluor-670 dye dilution occurs only during bacterial replication.

Using this approach, *Staphylococcus aureus* was shown to begin intracellular replication within membranes vacuoles of macrophages at around 12 hours post-infection (Flannagan et al. 2016). Confocal immunofluorescence microscopy demonstrated that non-growing as well as replicating bacteria, i.e. those lacking eFluor labeling while expressing GFP, were contained either within or outside phagosomal LAMP1-positives membranes. Later, the intracellular replicative fates of *Staphylococcus lugdunensis* was investigated using the eFluor-670 fluorescent dye dilution method corroborating its effectiveness within others species (Flannagan et al. 2018). This method works with both Gram-positive and Gram-negative bacteria during cell infection as demonstrated by staining protocol adaptation toward *Yersinia pseudotuberculosis*, *Citrobacter rodentium*, and *E. coli* despite induced species variations (Flannagan and Heinrichs 2018).

Overall, eFluor-670 fluorescent dye dilution-based method allows distinction between bacterial replicative states during eukaryotic cell infection using fluorescent microscopy from fixed or live cells. Moreover, due to its compatibility with others cellular fluorescent probes it enables characterization of the bacterial subcellular localization accurately at the single cell level (Table S2, Supporting Information). However, any attempt to sort the infected eukaryotic cells depending on the intracellular replicative rate of the bacteria by flow cytometry have at this time

failed due to the various dividing rates observed within any given macrophage in such populations. Yet, analysis of the terminal stage of infected cells, which often contain only replicating or non-replicating bacteria was achieved (Saliba et al. 2017). As previously, it cannot highlight dividing states after a first period of replication although constitutively expressed fluorescent protein allows tracking bacteria beyond the dilution limit.

Lipophilic compounds intercalating with lipids of the plasma membrane

The stable lipophilic PKH fluorescent dyes, which will incorporate their aliphatic part within the exposed membrane lipid bilayer were used to monitor the bacterial replicative rates at the single-cell level (Raybourne and Bunning 1994, Sturm et al. 2011). It should efficiently work solely for Gram-negative bacteria having at their surface a lipid membrane fully accessible to the dye. Of note, Sturm et al. (2011) used the bacterial strain *wbaP*-lacking the LPS-O side chain to permit PKH efficient labeling via reducing steric hindrance. The labeling was done at the onset of the assay and the excess dye was removed with serial washing steps. A linear and inverse correlation was done between the fluorescence intensity recorded by flow cytometry, of PKH-2-labeled *S. typhimurium* and *Listeria monocytogenes*, and the CFU counting over-time, confirming the soundness of the method (Raybourne and Bunning 1994). Furthermore, viability of labeled and unlabeled bacteria was assessed demonstrating identical results. Of note, bacterial PKH dyes fixation and live microscopy compatibility were investigated during *Borrelia burgdorferi* interactions with different tick cell lines (Teixeira et al. 2016). Further, replicative penalty of *Salmonella* caused by *tss-1* virulence factor expression was highlighted by combining gene fluorescent reporter with PKH26 dye dilution method at the single-cell level (Sturm et al. 2011).

Overall, the PKH dyes fluorescence dilution-based method permits monitoring of bacterial dividing rates at the single level by flow cytometry (Fig. 3). It could be combined with another discriminant fluorescent bioreporter, itself genomically expressed (Table S2, Supporting Information). The main limitation of the method is the requirement for a fully accessible bacterial lipid bilayer.

Labeled artificial surface receptors

Lahav-Mankovski et al. (2020) developed a fluorescent dynamic artificial receptor system affecting the bacterial properties such as surface adhesion and cells interaction. To this end, a hexahistidine tag was fused to an outer membrane protein C of *E. coli* under inducible promoter. Then conjugate of ODN and trinitrilotriacetic acid-nickel (NTA) complexes incubated with the bacteria bind to the hexa-histidine tag at the surface in presence of Ni^{2+} ions via the NTA part. Of note, suitable metal chelators such as EDTA reverse the binding by chelating Ni^{2+} ions and remove the artificial receptors from the surface on demand. ODN can also be decorated with the following dyes Cy5, TAMRA, and FAM emitting respectively in far red, yellow, and green. Moreover, unlabeled attached ODN can be hybridize with a labeled complementary strand named ODN-2. The dual ODN method enable rapid strand displacement by adding a complementary strand named ODN-3 since ODN-2 bear a short overhang site. It allows, as example, the newly free unlabeled ODN to bind another ODN-2 carrying a different dye. Moreover, this method thwarts the synthetic difficulty of a single strand bearing both dyes and NTA. Using this synthetic fluorescent receptor method, the authors demonstrated by time-

lapse microscopy that the individual fluorescence of each bacteria decrease overtime while the number of labeled bacteria increases.

Overall, the labeled artificial bacterial surface receptors involving ODN-dyes conjugates allows monitoring of the bacterial dye dilution overtime at the single cell level and should, therefore, highlight the replicative rate. It could be conjugated with biomimetic synthetic receptors carrying distinct motif such as a thiol group, thus modulating bacterial adhesives properties. The initial fluorescence signal relies on the initial quantity of outer membrane protein C that needs to be tightly calibrated to avoid bacterial disturbance due to the artificial receptor's complexes.

Fluorescent proteins dilution and maturation kinetic-based methods

Fluorescent protein dilution methods are all conceptually based on the same principle as dye dilution methods (Fig. 3). The fluorescence signal intensity recorded, provides information on the historical replicative state of individual bacteria. Of note, the bacterial division time must be verified to be smaller than the half-life of the fluorescent protein. This is to ensure that the decrease of fluorescence is overwhelmingly due to the dilution generated by replication events and not to reporter protein degradation. Further, the dilution-based approach may be extended into the maturation kinetic method when the sequential maturation rate of two fluorescent proteins, one maturing faster than the other does, are analyzed in parallel (Fig. 3). The replicating bacterial subset accumulates greater level of the rapidly maturing protein whereas the other, slow maturing one, cannot sufficiently build up before the dilution induced by bacterial division. Meanwhile, the non-replicating subpopulation accumulates firstly the rapid maturing proteins before containing a mixed of both mature fluorescent proteins, i.e. the rapid and the slow maturing. Based on the same concept, a pool of preformed and constitutively expressed fluorescent proteins will be diluted at each replicative step and reaccumulates once replicating phase stops. Obviously, the fluorescence intensity must be recordable all along the experiment despite potential huge drops. For the system to work, the maturation kinetics of the slower maturing fluorescent protein must also be slower than the bacterial replicative rate. Thus, fluorescent protein dilution and differential maturation kinetics will shed light on the bacterial dividing rate at single cell level. Furthermore, in contrast with the time-lapse microscopy methods and consistent with the dyes dilutions-based method, the fluorescent proteins dilution and maturation kinetic-based methods did not report on bacterial growth rates at the single-cell level.

Dilution of a single fluorescent inducible protein

Bacterial cell division leading to dilution of a single protein was numerically formulated as part of a theoretical model of GFP accumulation within single bacterial cells (Leveau and Lindow 2001). It predicts that the initial GFP content without *de novo* synthesis will dilute from dividing cells at a rate equal to growth rate. This was supported by experimental observation in which the fluorescent protein constitutively expressed content of *Pseudomonas* cells was reduced when grown in rich medium compared to minimal medium (Stretton et al. 1998).

The single-cell inducible fluorescent protein dilution method to detect and sort bacterial subset according to dividing rates in liquid cultures was first reported by Roostalu et al. (2008). *Escherichia coli* was engineered to express the highly stable isoform, GFPmut2, under the control of homoserine lactone (HSL; Roost-

alu et al. 2008). After removal of the inducer, the fluorescent signal intensity was sequentially monitored using flow cytometry. This experimental approach demonstrated that an exponential phase culture of *E. coli* contained homogeneously dividing bacteria, while a stationary phase culture was made of homogeneously non-dividing bacteria. Furthermore, stationary phase cultures diluted in fresh medium resulted in two subsets of live cells, one replicating as observed by chromophore fluorescence intensity decreasing and one non-replicating recognized by stable chromophore fluorescence intensity. This resulting culture was then treated with ampicillin which did not affect the non-dividing subset but largely killed the dividing population. The replicative resumption kinetics from a stationary phase culture was further investigated using an *E. coli* strain expressing GFPmut2 under the control of an isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside (IPTG) inducible promoter (Jöers et al. 2010). Briefly, bacteria grown in presence of the inducer until stationary phase were diluted into either fresh rich or poor medium. As expected, the kinetics of bacterial awakening were dependent on the medium used since replicating bacteria having reduced GFPmut2 content were firstly recorded by flow cytometry within rich medium. Then, *E. coli* was engineered to carry a chromosomally inserted *T5p-mCherry* cassette under the control of IPTG, thereby eliminating plasmid copy number variation (Orman and Brynildsen 2013). The authors focused on the replicative state of drug persistent bacteria formed prior to antibiotic exposition. Interestingly, approximately 1% of sorted non-growing bacteria via FACS persisted antibiotic pressure since re-growing on LB agar plate, while approximately 0.01% of sorted dividing bacteria could do so, even when those sorted were rapidly dividing. This could be due to a non-recordable replicative arrested phase occurring after a first period of proliferation (Fig. 4). Further, it was described that sorted bacterial subset with high redox activity had more non-growing bacteria in newly fresh media and that respiration inhibition impaired formation of persisters from stationary phase (Orman and Brynildsen 2015). In the meantime, stationary phase of *E. coli* having a pool of pre-induced fluorescent GFPmut2 proteins were *de novo* cultured without inducer and challenged with serum (Putrinš et al. 2015). Interestingly, the complement system eradicated a large proportion of dividing cells without affecting the small non-dividing and rapidly replicating bacterial subsets. Of note, only the non-dividing subset survived during antibiotic challenge in combination with serum treatment. Recently, *E. coli* persists resuscitation was determined to occur within 1 hour upon transfer to fresh media regardless of antibiotic treatment times (Mohiuddin et al. 2020). Thus, the single inducible fluorescent protein dilution method allows monitoring of bacterial replicative states using flow cytometry from different growth phases. Moreover, it permits the linking of drug persistence to bacterial replication behavior or rather lack, thereof as well as the resuscitation patterns. Further, the redox activity of the different sorted replicative subsets could be concomitantly investigated using flow cytometry (Table S2, Supporting Information).

Single fluorescent protein dilution method was next extended to monitor intracellular bacterial replicative fates (Khandekar et al. 2018, Peyrusson et al. 2020). To this end, human monocytes were infected with previously opsonized *Pseudomonas aeruginosa* expressing the GFP under the control of arabinose and phagocytosis allowed for 2 hours in presence of the inducer (Khandekar et al. 2018). Infected monocytes were then incubated with antibiotics for 24 hours after arabinose removal, intracellular bacteria then gathered were analyzed by flow cytometry. For both wild-type and DnpA, part of the LPS biosynthesis cluster, mutant strains no or

only a slight decrease of fluorescence intensity was noticed using meropenem or amikacin indicating that most surviving bacteria recorded were not dividing. On the other hand, using fluoroquinolones a part of the dividing population survived and was higher with the mutant. Further, the method was extended to intracellular *S. aureus* transformed with a plasmid encoding the *gfp* gene reporter under the tetracycline-inducible promoter (Peyrusson et al. 2020). To confirm the single fluorescent protein dilution-based method, a parallel with the optical density at 600 nm of the culture was done. Identical growth curve and doubling times were recorded for five generations for both techniques. Previously opsonized *S. aureus* was internalized within eukaryotic cells for 30 minutes, the inducer was present from the overnight liquid bacterial culture until the post-phagocytosis washing step. The infected cells were incubated with antibiotics and either imaged using confocal microscopy or the intracellular bacterial content was collected and analyzed by flow cytometry. This demonstrated that intracellular *S. aureus* challenged with low antibiotic pressure gave rise to an equilibrium between killing and replication plus a subpopulation that rapidly entered a non-growing state. In contrast, high antibiotic pressure conducted to the killing of dividing *S. aureus*, leading to a homogeneous population of non-dividing, antibiotic-persistent bacteria at the end of the assay. Furthermore, the non-replicating, antibiotic-persistent bacteria could revert to a normal phenotype in terms of proliferation and antibiotics susceptibility. Thus, the single inducible fluorescent protein dilution method enables to monitor intracellular bacterial replication under antibiotics pressure using microscopy and flow cytometry (Table S2, Supporting Information).

Remus-Emsermann and Leveau then engineer a fluorescent bioreporter for individual-based microbial ecology, which they named CUSPER (reverse of REPSUC, standing for REProductive SUccess; Remus-Emsermann and Leveau 2010). They engineered two *Erwinia herbicola*—also called *Pantoea agglomerans*—to carry a chromosomal mini-Tn5-Km insertion coding for either GFPmut3 or DsRed under promoter controlled by IPTG (Remus-Emsermann and Leveau 2010, Remus-Emsermann et al. 2013). Reproductive success, i.e. bacterial replication, was monitored in a heterogeneous environment represented by the leaf surface of bean plants (Remus-Emsermann and Leveau 2010). Clear different subsets regarding replicative rates were recorded by microscopy when the bacteria were released onto the phyllosphere, supporting the notion that local conditions determine the abundance and replication dynamics of bacteria on leaf surfaces (Remus-Emsermann and Leveau 2010). Further, it was showed that pre-colonization of the leaf had an impact on the proliferation rate of a secondary bacterial immigrant using both previously described *E. herbicola* (Remus-Emsermann et al. 2013). Measurements of fluorescence intensity demonstrated that the average of the reproductive success of the second colonizer was reduced when the population level of the first colonizer increased. Thus, the use of single fluorescent proteins having different spectrum across mixed bacterial populations allows concomitant replicative rate assessment on heterogeneous substrates via dilution-based method.

Overall, the dilution of a single pre-expressed fluorescent protein allows monitoring of the bacterial replicative state at single-cell level in different niches such as the surface plant leaves or inside eukaryotic cells, by flow cytometry and microscopy, and further combined with concomitant assays (Fig. 3; Table S2, Supporting Information). However, as for the dyes dilution-based methods, it cannot be employed to track replicating bacteria over long periods of time and non-replicative state happening beyond the dilution limit (Fig. 4). Moreover, bacteria outside the resolvable

time frame of the method cannot be detected by microscopy without tracking, highlighting the needs of a second fluorescent protein constitutively expressed.

The dual-reporter fluorescent proteins dilution-based method

The protein fluorescence dilution method to detect and sort subsets of bacteria with different replicative rates was considerably enhanced by Helaine et al. (2010) with the addition of another chromophore, either expressed constitutively or induced (Fig. 3). They developed for *Salmonella* dual fluorescence reporter plasmids expressing (i) the DsRed protein under arabinose promoter and (ii) the EGFP protein either constitutively or upon induction with IPTG. Based on the dilution of the pre-induced DsRed fluorescent protein these constructs allow monitoring of bacterial replication for up to six generations. Meanwhile, the constitutively expressed EGFP fluorescence remains stable and permits bacterial tracking outside of this detectable dilution range. On the other hand, the system with both inducible fluorescent proteins improves the temporal range of bacterial replication detection up to 10 generations by sequential induction of the two promoters. However, bacterial tracking by microscopy using this last dual-reporter version is evidently lost after ten generations (Fig. 4). Results obtained with this dilution method paralleled those with CFU and allowed estimation of the number of cell replication based on the ratio of the geometric mean fluorescence intensity recorded by flow cytometry (Helaine et al. 2010). This enhanced method corroborates the previous finding of homogeneous replication in liquid culture by flow cytometry using *S. typhimurium* (Roostalu et al. 2008, Helaine et al. 2010, Peyrusson et al. 2020).

The dual-reporter method was employed to shed light on both the intracellular and *in vivo* bacterial replicative rates (Helaine et al. 2010, Figueira et al. 2013, Mouton et al. 2016). In contrast with reported studies using the single fluorescent protein dilution-based method, the inducer present in the liquid bacterial culture was not maintained during the early step of the *in cellulo* infection allowing internalization process to occur. Gathered *S. typhimurium* from infected macrophages showed heterogeneity of bacterial replication among the population by flow cytometry and confirmed by microscopy highlighting different bacterial dividing rates even in the same eukaryotic cell (Helaine et al. 2010). Of note, a large proportion of non-replicating *S. typhimurium* bacteria were monitored both *in vitro* and *in vivo* inside recovered splenic macrophages from infected mice. To gain insight into their subcellular localization, immunolabeling revealed that dividing and replicative-arrested bacteria were contained within vacuoles decorated by LAMP1. Figueira and colleagues modified the fluorescent dual-reporter construction to express mCherry, which matures faster than DsRed, under a constitutive promoter, and GFP expression was put under an arabinose inducible promoter (Shaner et al. 2004, Figueira et al. 2013). Using mutant strains carrying this dual-reporter plasmid they determined that approximately 30% of individual type III secretion effectors of the *Salmonella* pathogenicity island-2 system were implicated in intramacrophage replication of *S. typhimurium* (Figueira et al. 2013). Further, the turboFP635, a far-red protein also named Katushka, was expressed under theophylline-inducible promoter (Shcherbo et al. 2007, Mouton et al. 2016). It was assessed for its high stability even in acidic conditions, confirming its suitability to report on replicative rate inside the vacuolar environment (Mouton et al. 2016). Combined with GFP expression under a constitutive promoter, this fluorescence dilution technique allowed monitoring of

mycobacterial replication for up to five generations corroborated by CFU counting. Analysis of far-red fluorescence intensity by flow cytometry of *M. smegmatis* and *M. tuberculosis* gathered from infected macrophages, highlighted a heterogeneous mycobacterial replicative state owing to wide distribution of the far-red fluorescence intensity (Mouton et al. 2016). Thus, in contrast with dyes labeling methods, the dual-reporters method was also employed to study the bacterial replicative fates *in vivo* (Table S2, Supporting Information). Combined with mutant strains it allows determining indispensable proteins in the bacterial replicative process.

The dual-reporter method was next combined with antibiotic pressure to monitor drug-persistent behavior of bacteria (Helaine et al. 2014, Mouton et al. 2016). Mice were infected *per os* by *S. typhimurium* carrying the modified dual-reporter plasmid developed by Figueira and colleagues and treated with enrofloxacin in drinking water (Figueira et al. 2013, Helaine et al. 2014). All the gathered bacteria were non-dividing, as showed by lack of fluorescence dilution recorded by flow cytometry. The culture of this sorted population into Luria-Bertani medium indicated resumption of proliferation through reduction of green fluorescence intensity. Further, antibiotic challenged *M. tuberculosis*-infected macrophages demonstrated an enrichment of high-intensity inducible fluorescent bacteria compared to untreated condition (Mouton et al. 2016). Thus, during antibiotic challenges, dual-reporters method allows characterization of the bacterial replicative rates of survivors, *in vitro* and *in vivo*.

Saliba et al. (2017) combined the dual-reporter method with single-cell RNA-sequencing analysis. Macrophages infected by *Salmonella* were isolated by FACS depending on the intracellular bacterial replicative states, focusing on macrophages containing exclusively non-dividing or dividing bacteria (Fig. 6). As bacteria proliferate, the constitutive signal intensity of single macrophage increases while macrophage containing exclusively non-dividing bacteria display constant both inducible and constitutive intensities over time. The sorted cells were then subjected to RNA-seq analysis. These combined methods demonstrated that macrophages carrying non-dividing, bacterial bystander cells adopted a proinflammatory M1 polarization state while macrophages carrying replicating bacteria harbored anti-inflammatory, M2-like state. Later, Stapels et al. (2018) reanalyzed the single cell data showing bimodality of M1 and M2 genes expression in macrophages having non-replicating bacteria. Further, dual-RNAseq showed that *Salmonella* persists, non-dividing but metabolically active, used *Salmonella* pathogenicity island 2 type 3 secretion system to reprogram macrophages. Thus, dual-reporters-based method allows sorting of infected cells depending on the intracellular bacterial replicative status by FACS and subsequent single RNAseq or dual-RNAseq performing. This provided highly novel information on the phenotypic characteristics of drug persistent bacteria and the RNA status of host cells. Single bacterium RNAseq depending on the replicative rate could be interesting to deeply understand the persisters characteristic and point out drugs target (Imdahl and Saliba 2020).

Further, the dual-reporter plasmid thus engineered expressing both fluorescent proteins under inducible promoters allows investigation of metabolic and viability states concomitantly to replicative rates (Helaine et al. 2010, 2014; Fig. 6). Expression of the first inducible fluorescent protein at the onset of the infection informed on the replicative state while addition to the culture medium of the second inducer revealed the responsiveness of the bacteria via the second fluorescent protein expression. These concomitant analyses performed by time-lapse microscopy revealed heterogeneity of metabolic activity and viability of the non-

dividing bacterial subset at the single cell level (Helaine et al. 2010). Later, this experiment showed that 40% of drug-persistent non-dividing bacteria remaining were metabolically active. Interestingly, only 5% of them resumed intracellular proliferation when incubated with naïve macrophages, as evidenced by dilution of both fluorescent signals (Helaine et al. 2014). Thus, the dual-inducible fluorescent proteins reporter permits to monitor concomitantly the bacterial dividing rates with the bacterial viability and the metabolic activity.

Overall, the previous single fluorescent protein dilution-based method was enhanced by the expression of another fluorescent protein either under constitutive or inducible promoter (Fig. 3). Beyond the increase in monitoring range from five to six generations up to 10 brought by the dual inducible fluorescent proteins, the strongest advantage of this method is that it allows tracking of bacteria beyond dilution limit of the method via the constitutive fluorescence using real-time microscopy. Further, Gram-positive and Gram-negative bacteria carrying dual-reporter plasmid were employed successfully for both *in vitro* and *in vivo* infection with concomitant assays (Table S2, Supporting Information). Finally, dual-reporter plasmids with two inducible proteins inform concomitantly to replicative rates, on the viability and metabolic status of the bacteria. However; as for dyes and single fluorescent proteins dilution method; tracking replicative bacteria over long periods of time as well as replicative-arrested phase occurring after a first period of proliferation beyond the dilution limit cannot be recorded, highlighting the needs of the combination with maturation kinetics method (Fig. 4).

Combination of fluorescent proteins dilution and maturation kinetics: TIMER-based method

Another fluorescence approach based on both the dilution and the sequential maturation kinetics of fluorescent proteins, called TIMER, was developed to monitor the replicative rate of individual bacteria (Fig. 3). It relies on the different maturation kinetics of two fluorophores, e.g. a GFP, which matures and emits fluorescence signal faster than a red fluorescent protein that takes more time to mature and produce fluorescence. Theoretically, the dividing bacterial subset contains mostly GFPs than the red chromophore. The latter matures more slowly and cannot sufficiently accumulate before the dilution of intra-bacterial content at each replicative step. The non-replicating bacteria accumulates firstly the green chromophore and then the slowly maturing red fluorescent protein. This means that the dividing bacteria show a green fluorescence while the non-dividing present first green and then red fluorescence. Furthermore, so long as the maturation kinetics of the proteins are slower than the replicative rates, if the slower maturing fluorescent protein is presynthesized and constitutively expressed, upcoming bacterial proliferation will dilute this fluorescent protein at each replicative step. Next, if the growing bacteria enter a non-replicative state, the proteins will reaccumulate. This could overcome the main limitation of dyes, single fluorescent proteins and dual-reporters dilution methods which cannot monitor a dividing or a non-dividing state occurring outside of the detection area (Fig. 4).

TIMER-based method was employed to study the replicative rates of *S. typhimurium* at the single-cell level during macrophages and mice infections (Claudi et al. 2014). The efficiency of the method; relying on DsRed variant called TIMER^{bac} (Fig. 7); was assessed by comparison with both the plasmid dilution and the dual-reporter method (Helaine et al. 2010, Claudi et al. 2014). The thermosensitive, single copy plasmid pVE6007 cannot replicates

at 37°C and it is, thus transmitted to only one daughter bacterium at each replicative step, meaning that in effectively replicating bacterial population the plasmid dilution is higher compared to slow or non-growing bacterial subsets (Fig. 5). A close correlation was observed between the calculated bacterial replicative rates obtained from both the plasmid dilution method and the TIMER-based approach. These confirm the appropriateness of the technique to monitor and sort single bacteria depending on their specific replicative rate from a heterogeneous population. Various intracellular *Salmonella* replicative subsets with mainly low green/orange ratio representing slow and non-growing bacteria was highlighted using this method. Interestingly, a large non-dividing subset was obtained using inoculae from stationary phase culture in contrast to more homogeneous replicative rates with exponential phase culture. Besides, *in vivo* analysis demonstrated that fast dividing *Salmonella* subsets dominated during the course of the disease progression. Further, when the TIMER^{bac} method was correlated with fluoroquinolones treatment, the fluorescent proteins were retained for at least 1 hour and the intensity remained stable, thus informing on the pre-treatment replicative rate. It is due to both the slow maturation kinetics of the protein and to the mechanism of action of the antibiotic breaking double stranded DNA ultimately causing cell lysis (Hooper 2001). Within infected mice, enrofloxacin daily treatment led to a low survival of fast-growing subset while slow and non-growing better survived but were poorly represented. The large moderate growing subsets i.e., with one to four divisions per day, dominated throughout therapy. Of note, *in vitro* proteome analysis was accomplished indicating distinct proteomes for the different bacterial replicative rates subsets. Recently, Luk et al. (2021) designed a plasmid that they called *Salmonella* Intracellular Analyzer (SINA). It combines the TIMER^{bac} fluorescent reporter with promoters reporting on the subcellular localization of the bacteria, either vacuolar or cytosolic. Using this method, they highlighted a dormant persisters subset within a vesicular compartment distinct from the conventional *Salmonella*-containing vacuoles in epithelial cells. The TIMER^{bac}-based method was also adapted for *Legionella pneumophila* allowing replicative rates assessment of both intracellular and sessile lifestyle (Personnic et al. 2019, 2021). As previously, the TIMER^{bac} fluorescence intensity ratios were mathematically correlated to the bacterial dividing rates. Then, the bacterial replicative rates were highlighted within amoebae, biofilms and microcolonies showing the coexistence of various dividing rates inside eukaryotic cells and biofilms (Personnic et al. 2019). Further investigation of intracellular non-replicating *Legionella* employed fluorescent fusion protein, propidium iodide incorporation, fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) method and MitoTracker labeling, which is a staining revealing the presence of bacterial membrane potential. Besides demonstrating that the nondivers could reside within vacuole, were metabolically active and viable it accommodates the compatibility of others staining and FRAP approach with the TIMER^{bac}-based method. Further, the *Legionella* increased drug efflux or decreased drug uptake might explain the higher drug-persistence observed within the non-growing subset. To test these hypothesis, an ethidium bromide accumulation technique was performed showing that the non-growing subset accumulated lower level of compound than other subpopulation (Personnic et al. 2019, 2021). Then, using strains carrying mutants on the quorum sensing Lqs system and LvbR, a transcription factor, the authors showed that the heterogeneity of the *Legionella* replicative rates subsets was controlled by both (Personnic et al. 2019, 2021). Thus, the TIMER-based method reports on bacterial replicative rates both *in vitro* and *in vivo*. It

could be combined with several concomitant assays such as proteomes analysis of sorted bacteria, allowing in-depth characterization of the different dividing bacterial rates subpopulations (Table S2, Supporting Information).

Recently, the replicative rates of intracellular *S. typhimurium* and *in vivo* *Y. pseudotuberculosis* at the single cell level were studied using a simplified TIMER-based method (Patel et al. 2021, Schulte et al. 2021). Firstly, correlation of the dividing rates and the fluorescence dilution of a set of fluorescent proteins; displaying various maturation times; comprising DsRed, tagRFP-T, mCherry, mCherry2, or sfGFP was done using flow cytometry (Schulte et al. 2021). DsRed demonstrated the strongest growth phase-dependent reduction of x-median relative fluorescence intensity, which remained sufficiently high to monitor the bacteria and discriminate them from debris in crude-infected host cells lysates. Of note, none of the tested constitutively expressed fluorescent reporters affected proliferation, and all were sufficiently well-tolerated at the expression level used. As expected, drastic drop of the pre-expressed DsRed fluorescence intensity was noticed during the exponential phase while bacteria entering the stationary phase showed continuously increasing fluorescence intensity. Further confirming effectiveness of the method, the DsRed fluorescence intensity profile varied depending on culture conditions and mutant strains known to yield various replicative rates. This simplified TIMER-based method records only the red fluorescence of the DsRed protein putting aside the GFP fluorescence intensity to record another fluorescent reporter. To this end, plasmids were engineered to express DsRed under constitutive promoter and sfGFP under promoters of genes involved in periplasmic or cytosolic stress response. When replicating, the preformed pool of DsRed is diluted while if a stress response is engaged the sfGFP proteins will be expressed. Murine macrophages were infected by stationary phase culture of *S. typhimurium* highlighting distinct intracellular subsets showing various levels of stress response and proliferation. Over the time course of the infection, non-replicating bacteria were detected, while a replicating and a faster-replicating subsets appeared after different bacterial lag times. Interestingly, the slow-dividing and proliferation arrested bacteria had reduced responses to intracellular stress compared to the moderately fast-replicating subset. In the meantime, Patel et al. (2021) engineered a DsRed₄₂ derivative accumulating only red but not green fluorescence in stationary phase of *Y. pseudotuberculosis* and *E. coli*. It is best suited for quickly replicating bacterial species since it matures faster than the original TIMER-based method allowing investigation of slow replicating *Y. pseudotuberculosis* subset into deep tissue mouse infection model with concomitant green fluorescent stress reporter assessment. Thus, TIMER-based methods employing DsRed proteins was simplified by focusing on the red fluorescence intensity variation only. Subsequently, the green channel could be dedicated to the concomitant study of bacterial fluorescent reporter such as stress response.

Besides, the TIMER-based method was engineered with two chromosomally inserted fluorescent proteins having different maturation rates and applied to *P. aeruginosa* (Xia et al. 2018). This constitutively expressed tandem fluorescent protein is composed of sfGFP and Tdimer2, which matures more slowly. The strength of the method was assessed via modulation of the Fe³⁺ concentration; which impacts the population growth rate; and correlation with the ratio of single-cell fluorescence intensities recorded. The reported ratio was, thus linearly related with the replicative rates. This TIMER-based approach demonstrated that the subsets composed of non-dividing or slow-dividing bacteria increased dur-

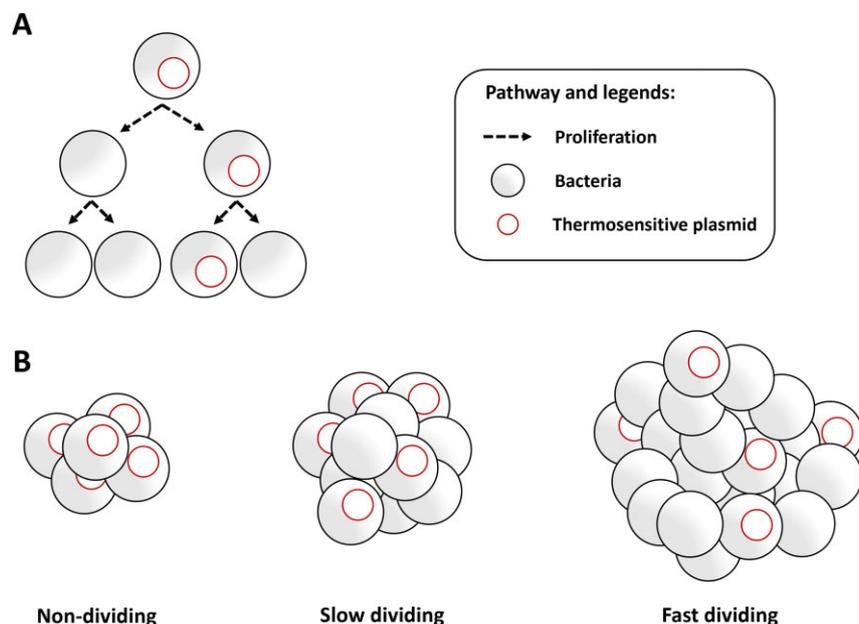


Figure 5. Thermosensitive plasmid method to analyze population-dividing rates from single cell data level. (A) Plasmid dilution principle (top) (B) Schematic representation of plasmid dilution ratio within Non-dividing, Slow dividing and Fast dividing bacterial population (bottom).

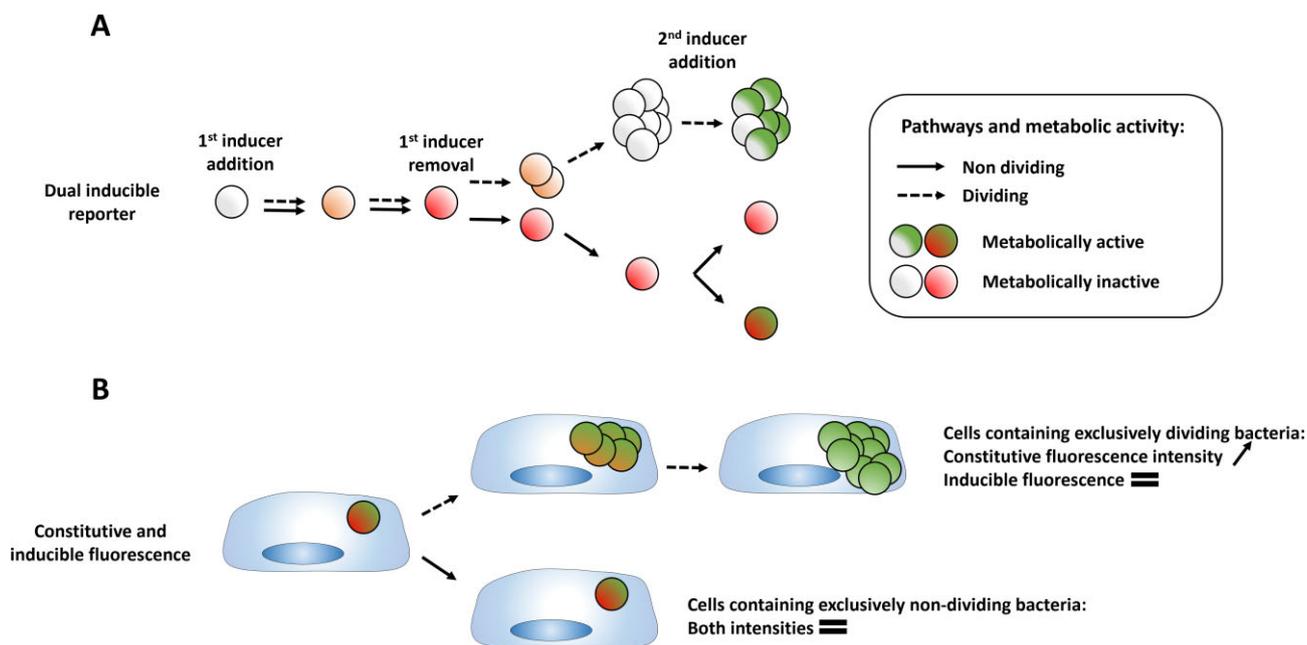


Figure 6. Dual-reporters plasmids concomitant assessment. (A) Metabolic assessment (top) and (B) host cell sorting depending on bacterial intracellular replicative content (bottom).

ing tobramycin treatment while the fast-dividing bacterial subset concomitantly diminished. Thus, TIMER-based methods were developed using tandem fluorescent proteins to monitor the bacterial replicative rates at the single-cell level. Careful to the maturing time and spectrum of the selected proteins must be done.

Overall, the combination of the dilution-based method with the sequential and slower maturation rate of fluorescent proteins allows monitoring of bacterial replicative status at the single cell level (Fig. 3). The main strength of this method resides in its long time-span resolution allowing sequential identification of a non-dividing bacterial subset happening after a first period of proliferation without inducer addition requirement. Moreover, TIMER-

based method distinguishes the different phenotypic replicative rates via microscopy and flow cytometry from *in vitro* and *in vivo* infection with concomitant assays (Table S2, Supporting Information). The recent improvement of the technique permits via focusing on the red fluorescence to release the green channel for concomitant assessment of bacterial green fluorescent reporters. The time required to detect the color change between switches from one division rate to another taking several hours; mainly due to the slow maturation rate combined with bacterial division dilution of the fluorescent proteins; evidently impede the monitoring of short-term fluctuations (Fig. 4). Moreover, the TIMER-based method does not distinguish slow replicating bacteria from

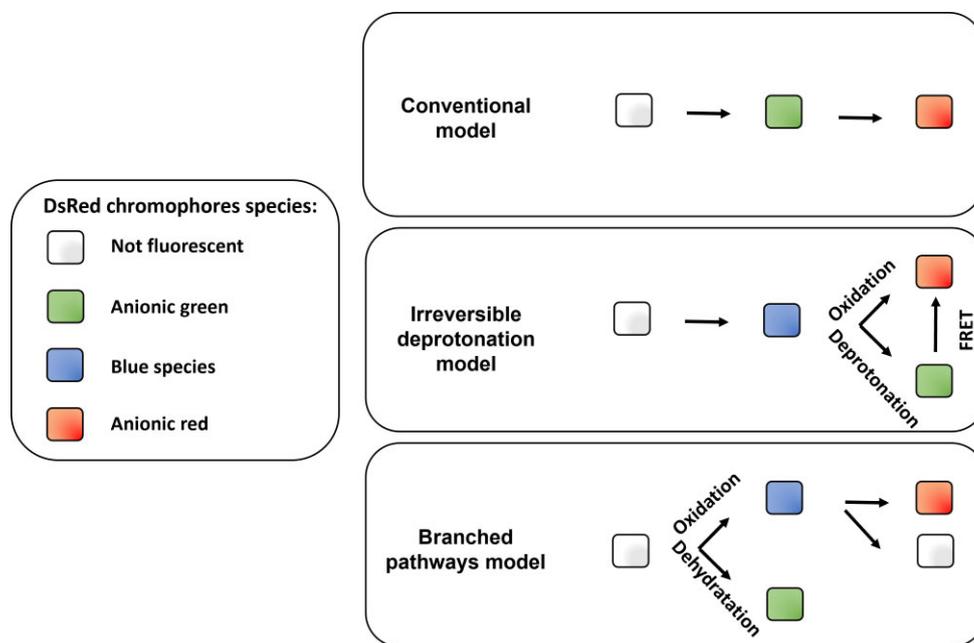


Figure 7. Models for the DsRed maturation pathways. Mutational engineering shed light on the E5 DsRed mutant regarding its fluorescence that change over time (Terskikh 2000). During the maturation kinetics, a green fluorescence appears early and declines as red fluorescence appears as shown in the *Conventional model* (Terskikh 2000; top). However, even after a prolonged period of maturation, the chromophore sample was composed of equally distributed green and red fluorescence (Garcia-Parajo et al. 2001, Gross et al. 2000), suggesting a coexistence of both chromophore, which makes null and void the *Conventional model*. The *Irreversible deprotonation model* inserts an intermediate blue species within the maturation path (Verkhusha et al. 2004; middle). It gives by competition either the green chromophore by deprotonation of the phenolic group or the red chromophore by oxidation, explaining the final coexistence of both. Of note, within the irreversible deprotonation model, intratetramer fluorescence resonance energy transfer (FRET) occurred from green to red fluorescent proteins, decreasing green fluorescence while increasing red fluorescence (Strack et al. 2010). Strack et al. (2010) proposed a novel *branched pathway model* (bottom). In this model, a branch point intermediate is the place of two competing reactions. Dehydration opens the way to the green branch, while final oxidation creates a blue species, which itself may give rise to a red and non-absorbing species.

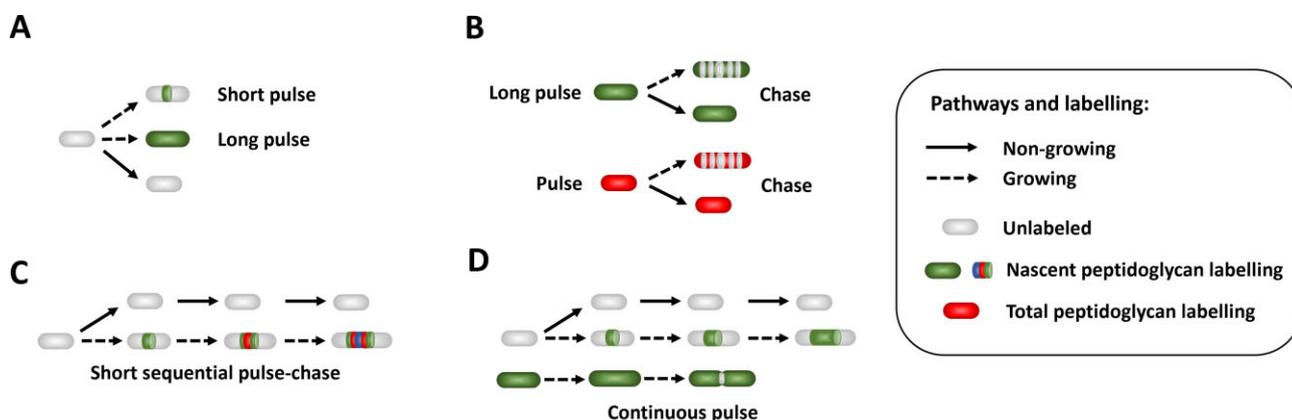


Figure 8. Principles of the peptidoglycan biosynthesis highlighting methods to monitor growth rate and dividing behavior. The nascent and total bacterial peptidoglycan regions can be labeled using antibiotics, lectins, and amino acids derivatives. (A) Peptidoglycan synthesis dyes during short pulse labeled the nascent peptidoglycan sites while long pulse uniformly labeled growing bacteria. Of note, non-growing bacterial subset remains unlabeled. (B) Bacteria uniformly labeled with either nascent peptidoglycan dyes during long pulse or total peptidoglycan dyes were incorporated unlabeled new materials during the chase period. Time-lapse microscopy monitoring allows measuring the bacterial and the subcellular growth rate based on unlabeled region extension. A non-growing bacterial subset should remain uniformly labeled at the chase time. (C) Short sequential pulse-chase using different fluorophores label the nascent peptidoglycan sites sequentially. End-point analysis creates a growing map over-time. (D) Continuous pulse enable real-time measurement of the nascent peptidoglycan sites kinetics of growing bacteria using time-lapse microscopy. Growing labeled bacteria via the recycling pathway highlight dividing step due to fluorescence intensity drop at the septum. (C) and (D) Short sequential pulse-chase and continuous pulse should, therefore, discriminate the non-growing unlabeled subset and highlighted the growth rate.

non-dividing subset, and it is not best suited for very fast replicating bacteria due to its sensitivity threshold and slow maturation time. Thus, this method is useful for a limited range of replicative rates, since it has a poor resolution of the extremes. Furthermore, *in vitro*, the O_2 concentration impacts the maturation kinet-

ics of DsRed and GFP fluorescent proteins ratio and could skew the replicative rate assessments (Strack et al. 2010). This is a major limitation of the method using DsRed as bioreporter for *in vitro* and *in vivo* study due to subcellular compartment and organ diversity regarding oxygenation levels (Liu et al. 2011).

Structural markers-based methods

The structural markers-based methods rely on the microscopic observation of fluorescently labeled bacterial structures informing on either growth or replication status at the single-cell level. Bacterial growth implies peptidoglycan synthesis; formed by glycan strands cross-linked via peptide chains; to extend the cell wall allowing elongation prior to division. Thus, illumination of nascent peptidoglycans synthesis via fluorescent derivatives of antibiotics, lectins, and amino acids or via a pulse-chase assay inform on the growth rate and actively dividing status of the bacteria (Fig. 8). Short pulse labeling using specific dyes highlights the nascent peptidoglycan regions and long pulse labeling uniformly labels growing bacterial subset with active peptidoglycan synthesis. Besides, unspecific peptidoglycan dyes label the entire peptidoglycan region of growing and non-growing bacteria. The pulse-chase method; working with uniformly labeled bacteria; identify via fluorescence intensity dilution due to new incorporation of unlabeled peptidoglycan moieties the growth rates of entire single cells and even subcellular regions. Moreover, a drop in fluorescence intensity at the septum of dividing bacteria was reported when they were labeled using fluorescent tripeptide entering the recycling pathway. Although the peptidoglycan synthesis enlightenment methods report on growth rates and division status, to our knowledge, these methods have not yet been used to identify bacterial subsets depending on growth and replicative behavior despite this being theoretically possible. Furthermore, these methods so far were mainly employed to decipher the peptidoglycan synthesis patterns rather than to study growth and replicative rates. Moreover, based on the same concept, mycomembrane synthesis enlightenment reports on the growth pattern of *Mycobacteria*.

The bacterial replication event is characterized by the creation of a ring septum composed of several known proteins at the division site. Basically, the septum allows the division of the mother cell into two daughter cells by membrane invagination. Monitoring of septum proteins fluorescently tagged over-time allows measurement of replicative rates via successive formation and dissolution of the ring structure. Besides, the regrowth-delay body is a structure forming two granular poles within bacteria in growth-arrested phase. Monitoring of the fluorescently tagged regrowth-delay body allows identification of the non-growing bacterial subset. Nevertheless, while the first method required time-lapse monitoring to measure replicative rates, the second failed to highlight growth and replicative rates, discriminating only the non-growing subset.

Septum and regrowth-delay body

Time-lapse microscopy method and fluorescent septation marker was combined to identify *M. smegmatis* division events (Santi et al. 2013). The essential late-division Wag31 protein localizes at the septum and remains associated with both newly created daughter poles. Fusion of Wag31 with GFP or mCherry allowed monitoring of the protein density over the time course of the experiment at single-cell level. The beginning of the septation was monitored via invagination of the bacterial membrane labeled with FM4-64 dye preceding Wag31-GFP structural apparition. The authors defined and monitored the interdivision time as the time ranging from the apparition of the septal Wag31-GFP structure at birth to the next apparition at the subsequent replication event. As previously described, the growth rate was measured via monitoring of the cell length over-time. Using this method, they showed that although mother cells performed asymmetric division, the

unequally sized progenies grown at similar rates and tolerate antibiotics equally well. Later, time-lapse phase contrast images and fluorescent segmentation marker were employed to study the growth and replicative rates of *E. coli* within the turbidostat device (Wallden et al. 2016). Time-course of fluorescence intensity highlighted accumulation of the cell division protein FtsQ tagged with GFP at the septum before its disassembly and vanishing at the replicative step. The division time obtained with both the phase contrast division classifier based on bacterial contours and the fluorescent segmentation marker methods was correlated with a difference of 2 minutes, thus corroborating each other. Thus, via time-lapse microscopy method, the structural segmentation markers, either Wag31 or FtsQ, allowed monitoring of the replicative rates at the single-cell level.

Further, Yu et al. (2019) fortuitously discovered a reversible subcellular structure composed of two pole-granules that they named the regrowth-delay body highlighting the non-growing bacterial subset at the single-cell level. The FtsZ cell division protein, fused with the mNeonGreen, was localized at the Z-ring structure during exponential growth phase while, interestingly, it was observed via microscopy as two bacterial pole-granules during late non-growing stationary phase of *E. coli* cultures (Ma et al. 1996, Yu et al. 2019). Moreover, a relocation of the fused protein from the regrowth-delay body of late stationary phase to the Z-ring within bacteria resuming growth in fresh medium was observed after a lag phase (Yu et al. 2019). Furthermore, older stationary phase cultures with aged regrowth-delay bodies better tolerate the selective pressure imposed by ofloxacin or ampicillin addition. Of note, during regrowth culture assay all the bacteria keeping the regrowth-delay body structures, the non-growing bacterial subset, survived the ampicillin treatment while the bacteria with dissolved pole-granules, the growing subset, died. Thus, the regrowth-delay body is a structural marker that allows monitoring of non-growing bacteria at the single-cell level as well as the bacterial lag time.

Overall, structural markers consisting of the septum and regrowth-delay body enable motoring of the non-growing subset and the replicative rate at the single-cell level. The septum kinetics required time-lapse microscopy monitoring while the regrowth-delay body can be analyzed using end-point microscopy. Antibiotic pressure combined with septum and regrowth-delay body monitoring allowed discrimination of the persistent bacterial subset based on their growth behavior. The main limitation of septum vanishing tracking is inherent to the time-lapse method, which impedes end-point measurements. The progressive formation over the cell division cycle of the regrowth-delay body impedes early-stage monitoring. Moreover, although this method allowed monitoring of the bacterial regrowth lag time it impedes growth and replicative rates measurements.

Highlighting peptidoglycan synthesis

Antibiotics-based probes

The peptidoglycan synthesis pattern of Gram-positive bacteria were probed and investigated using vancomycin and ramoplanin antibiotics fluorescent derivatives (Daniel and Errington 2003, Tiyanont et al. 2006, Kang et al. 2008, Aldridge et al. 2012). Vancomycin linked with the terminal D-alanine-D-alanine dipeptide and ramoplanin linked with the reducing end of the glycan chain at the initiation site of lipid II incorporation during peptidoglycan synthesis (Hammes and Neuhaus 1974, Tiyanont et al. 2006). Daniel and colleagues suggested the rapid protection of this terminus from vancomycin binding by processing in mature pepti-

doglycan (Höltje 1998, Daniel and Errington 2003). As a result, fluorescent derivatives of vancomycin should bind to nascent peptidoglycan precursors not yet processed and, thus highlighting the pattern of newly peptidoglycan insertion. To confirm this hypothesis, bacteria were engineered with the *murE* gene encoding UDP-N-acetylmuramyl tripeptide synthetase involves in earliest step of synthesis under IPTG promoters (Daniel and Errington 2003). As a result, lack of the inducer leads in reduction in overall staining. Of note, vancomycin fluorescent molecules also bind in a smaller proportion the mature peptidoglycan due to peptide motifs that have not been cross-linked. Further, both antibiotic fluorescent derivatives showed dose-dependent labeling and ramoplanin worked at a lower concentration than vancomycin (Tiyanont et al. 2006). Using this labeling method, the pattern of *B. subtilis* peptidoglycan insertion in the cylindrical portion of the bacteria was showed to be helical (Daniel and Errington 2003, Tiyanont et al. 2006). Besides, *Streptococcus pneumoniae* showed a middle insertion pattern while *Streptomyces coelicolor* showed nascent peptidoglycan precursors at poles (Daniel and Errington 2003). Further, vancomycin fluorescent derivative demonstrated a correlation of the nascent peptidoglycan sites with Wag31 fluorescent intensity at the poles of *M. smegmatis* (Kang et al. 2008). Later, it illustrated that the nascent peptidoglycan regions were preferentially located at the old pole over the new pole of *M. smegmatis* highlighting unipolar fashion elongating pattern (Aldridge et al. 2012).

Overall, vancomycin and ramoplanin fluorescent derivatives targeting the nascent peptidoglycan precursor combined with fluorescence microscopy allowed monitoring of the peptidoglycan synthesis pattern at the single-cell level (Fig. 8). Since nascent peptidoglycan synthesis occurs only within the growing bacterial subset, the antibiotics-based probes method should, therefore, allow distinguishing between growing labeled and non-growing unlabeled single-cell. Furthermore, the antibiotic concentration and time of treatment require precise adjustment to balance both suitable staining and avoid cell damage. Main limitation of this method is the requirement for fully accessible bacterial wall such as within Gram-positive bacteria or Gram-negative mutants with a compromised outer membrane.

Lectin wheat germ agglutinin pulse-chase-based probe

Ursell et al. (2014) investigated the subcellular growth rates, geometry and cytoskeletal organization of *E. coli* using time-lapse microscopy and pulse-chase labeling of the cell wall. The authors reasoned that if bacterial growth was heterogeneous along the surface, thus a uniform peripheral labeling would be spread apart by the addition of new unlabeled material. To this end, *E. coli* were unexpectedly labeled with a fluorescent analog of the lectin wheat germ agglutinin (fWGA) followed by excess dye removal before growth monitoring. Wheat germ agglutinin was known to label the N-acetylglucosamine motif of the peptidoglycan suggesting that fWGA diffuse through or binds to a specific component of the outer membrane. Time-lapse imaging after excess WGA removal revealed the transition from a uniform peripheral labeling to a punctate staining. Moreover, surface fractional elongation rates were calculated relying on the difference in spatial and temporal position between two adjacent fWGA fluorescence intensity peaks. Growth map computing the rate of spreading between adjacent peaks highlighted heterogeneity. Some subcellular regions had higher rates than the calculated bacterial growth rate. Concomitantly, the MreB actin-like protein, essential to maintain the bacterial rod-like shape, preferentially localized and targeted bacterial elongation; showed by negative correlation with fWGA

staining; at subcellular negative cell wall curvature regions leading to cell straightening.

Overall, the bacterial wall fWGA pulse-chase labeling combined with time-lapse microscopy allows monitoring of both subcellular and total bacterial growth rates at the single-cell level (Fig. 8). The main limitation of the pulse-chase method relies on the detection threshold of unlabeled growing regions. Actually, these regions must have been spaced far enough from the two adjacent fluorescent puncta to overcome the optical limitation of the microscope. Moreover, wheat germ agglutinin preferentially labels Gram-positive bacteria, despite some exception as presented here. This method should therefore discriminate at single-cell level between growing subset heterogeneously labeled and non-growing uniformly labeled subset.

Amino acids-based probes

The L-alanyl- γ -D-glutamyl-L-lysine tripeptide was labeled with N-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl and supplemented in the bacterial medium to investigate the peptidoglycan synthesis in *E. coli* (Olrichs et al. 2011). The authors showed that the labeled peptide reached the cytoplasm and was incorporated within the peptidoglycan via the bacterial-wall-recycling pathway. This method demonstrated that elongating bacteria were uniformly labeled while dividing bacteria had a significant decrease in fluorescence at the septum linked with the FtsZ presence and AmiC amidase elevated activity. Thus, this fluorescent tripeptide method sheds light on the peptidoglycan-recycling pathway and should, therefore, discriminate between dividing and non-dividing bacteria. However, the bacterial growth was inhibited after four generations in the presence of the labeled tripeptide, thus limiting the usefulness of the method.

Further, a series of fluorescently labeled D-amino acids responsible for the cross-link of glycan strands and thus incorporating into nascent peptidoglycan sites were engineered (Kuru et al. 2012, 2015). The fluorophores 7-hydroxycoumarin-3-carboxylic acid, 4-chloro-7-nitrobenzofurazan, 5 (and 6)-carboxytetramethylrhodamine succinimidyl ester, and FITC were linked to the 3-amino-D-alanine backbone resulting in various fluorescent D-amino acids HADA, NADA, TDL, and FDL probes, respectively. The authors validated the strengthening of the probes to incorporate and label nascent peptidoglycan sites via mass spectrometry analysis demonstrating the incorporation of the dye within peptidoglycan peptide stems. Of note, probes based on the enantiomer L-amino acids failed to label growing bacteria. As expected, long-term staining labeled uniformly the bacterial wall while short-term staining probed uniquely the peptidoglycan synthesis regions of the growing bacterial subset. Pulse-chase and time-lapse microscopy experiments combined with long-term staining highlighted the labeled growing subset while the non-growing unlabeled subset should, therefore, be distinguished. Subsequent culture without probes highlighted the growing labeled subset losing progressively, as their growth progressed, the labeling intensity via incorporation of unlabeled new materials leading to fluorescence dilution. The potentially non-growing subset after a first period of growth during the labeling pulse should retain fluorescence intensity at similar level and, therefore, be distinguished. Using this long-term method, the authors demonstrated that growing *E. coli* and *B. subtilis* $\Delta dacA$ retained signal at the mother poles and lost it at the lateral walls. The short-term method highlighted diverse patterns of peptidoglycan synthesis regions within broad species. Furthermore, sequential pulse-chase assay using different spectral D-amino acid probes allows peptidoglycan nascent sites formation tracking via end-

point microscopy informing on the chronological incorporation of the probes during their respective labeling periods. However, it required long washing steps between pulses creating a delay impeding with this highly dynamic process. Of note, the developed probes were used to label a broad array of Gram-positive and Gram-negative bacteria appearing to potentially be universal. Thus, labeled D-amino acids allowed monitoring of nascent peptidoglycan regions using short-term labeling. Pulse-chase experiments highlighted growing subsets by fluorescence dilution via new unlabeled materials incorporation and should, therefore, distinguish the non-growing uniformly labeled subset.

Click chemistry were concomitantly developed using D-amino acids probes allowing to monitor the peptidoglycan nascent region of intracellular bacteria (Kuru et al. 2012, 2015, Siegrist et al. 2013, Liechti et al. 2014). D-amino acids analogue; termed either ethynyl-D-alanine and azido-D-alanine or R-propargylglycine and R-2-amino-3-azidopropanoic acid; can be conjugated to any molecules carrying the complementary functional group as azides and alkynes fluorophores (Kuru et al. 2012, 2015, Siegrist et al. 2013). The two latter were putted in contact with growing planktonic and intracellular bacteria before reaction with azides and alkynes fluorophores, subsequent fluorescent intensities were recorded by microscopy (Siegrist et al. 2013). These methods labeled the nascent peptidoglycan regions of growing intracellular *L. monocytogenes* at septa after a short pulse. Later, Liechti et al. (2014) employed the D-alanine-D-alanine dipeptide click chemistry probes to label the peptidoglycan of intracellular *Chlamydia trachomatis*. Again, the labeling localized to the septal part of dividing subset. Thus, since the eukaryotic cells did not generally produce D-amino acids, the clickable fluorescent D-amino acids-based probes allow monitoring of nascent peptidoglycan regions of single bacteria and should, therefore, distinguish the unlabeled non-growing intracellular bacteria.

Hsu and colleagues developed a rotor-fluorogenic D-amino acids to study peptidoglycan synthesis in real-time with higher temporal resolution than the previously described sequential pulse-chase method (Kuru et al. 2012, Hsu et al. 2019). Fluorescent molecular rotors exist in two stages depending on the spatial hindrance. In low spatial hindrance, the excited molecule had a twisted intramolecular charge transfer state resulting in non-radiative relaxation. In high spatial hindrance, the twisted intramolecular charge transfer state is inhibited resulting in fluorescence emission of illuminated fluorescent molecular rotors. It was showed that the peptidoglycan environment induced sufficient spatial hindrance to activate fluorescent molecular rotors coupled with D-amino acids, thus reporting on peptidoglycan synthesis in real-time. Of note, due to the intrinsic properties of the fluorescent molecular rotors, this enables end-point analysis without washing steps. Short-pulses highlighted nascent peptidoglycan at the poles of *Streptomyces venezuelae* and long-pulses involving *B. subtilis* resulted in homogeneous labeling as previously described. Moreover, real-time imaging of *S. venezuelae* showed fluorescent signal appearing first at poles and then at the division septum. Although the labeling fit well with Gram-positive bacteria, outer membrane permeabilization of Gram-negative bacteria is mandatory. Thus, the rotor-fluorogenic D-amino acids allowed monitoring of peptidoglycan synthesis in real-time at the single level and should, therefore, distinguish non-growing bacteria.

Overall, amino acids labeling informs on the peptidoglycan life-cycle of the growing and dividing bacteria possibly intracellularly and in real-time and should, therefore, discriminate non-growing subset (Fig. 8). Of note, the D-amino acids probes developed by Kuru et al. (2012) are more broadly used due to their compat-

ibility with Gram-positive and Gram-negative bacteria as compared to others. To our knowledge amino acids labeling has not been employed to monitor any of the following: bacterial growth, replicative rate, or discrimination between both growing and non-growing bacteria despite its theoretical workability.

Mycomembrane synthesis enlightenment

Hodges et al. (2018) designed a quencher-trehalose-fluorophore (QTF) probe to report on the mycolyltransferases activity of mycobacteria in real-time. The antigen 85 complex (Ag85), which is a mycolyltransferase of *M. tuberculosis*, elaborates the mycolic acid membrane. Trehalose monomycolate is processed to trehalose dimycolate or mycolyl-arabinogalactan and inserted into the bilayer-like membrane. The developed QTF probe is an analog of the trehalose monomycolate and bears the fluorescent dye BODIPY-FL appended to the fluorescence quencher DABCYL. When QTF is processed by nucleophilic attack of Ag85, the DABCYL part is removed, thus separating the FRET pair and enabling fluorescence emission. Combination of QTF probe with time-lapse microscopy method allows monitoring of dividing *M. smegmatis* over four generations. The authors demonstrated that the resulting QTF fluorescence was localized to the septa and both poles, with higher intensity at the older poles. Of note, co-incubation with the HADA probe showed similar localization as QTF. Moreover, the three mycolyltransferases of *M. smegmatis* were fused to mCherry and colocalized with the QTF signal.

Overall, QTF probe highlights the mycomembrane synthesis by reporting the mycolyltransferase activity at the single-cell level in real-time. The QTF fluorescence intensity colocalizes with nascent peptidoglycan regions and should, therefore, discriminate between growing and non-growing subset. The main limitation of this method is that the QTF probe worked only with mycolyltransferase-producing bacteria. Actually, fluorescence was recorded at the surface of *M. smegmatis* and *C. glutamicum* in contrast to *E. coli* and *B. subtilis*.

Emerging and sporadically used methods

Some emerging and/or sporadically used methods were employed to monitor the growth and replicative rates at the single-cell level. Highly precise detection of the individual buoyant mass of bacteria over-time using a SMR combining cantilever and microfluidics informs on the bacterial growth rates (Godin et al. 2010, Cermak et al. 2016). Later, based on the bidirectional chromosomal replication pattern and initiation at a conserved bacterial sized per chromosome, *oriC:terC* ratio allows discrimination of subsets depending on growth behaviors (Haugan et al. 2018). Further, stable isotope probing report among other parameters on the anabolic activity of bacteria detected via secondary ion mass spectrometry (SIMS) or Raman spectrometry (Kopf et al. 2016, Taylor et al. 2017). The increase in mass or shift in spectra detected were translated into growth rate via empirical equations. Finally, rRNA content calculated via FISH of individual bacteria was linked to population growth rate helped by a standard curve, which must be previously carried out (Poulsen et al. 1993). Strengths and strong limitations of these methods were summarized in Table 1.

SMR measuring bacterial buoyant mass

Time-lapse microscopy-based methods previously described rely mainly on the measured cell length or area as a reporter of the cell growth. However, continuous accumulation of mass and volume measurement of a single bacteria report on the individual

creation of new biomass, also termed growth rate. Techniques involving resonating microelectromechanical system allowing measurement of bacterial buoyant mass with femtogram precision over-time were developed (Godin et al. 2010, Cermak et al. 2016). The buoyant mass of the bacteria corresponds to their own mass minus the mass of the fluid it displaces. Bacteria transit into a SMR consisting of a vacuum packed hollow cantilever beam containing an embedded fluidic microchannel. Upon bacterial detection via the SMR, fluidic flow changes its direction, thus reintroducing the bacteria within the cantilever and allowing repeated measures over-time of the same single-cell (Godin et al. 2010). A shift in the resonance frequency of the system was measured at each passage and converted into buoyant mass. Growth rate was obtained from linear fits to the buoyant mass representing increasing amplitude of the peaks. A rapid drop by a factor two of the magnitude of the frequency shifts suggest that a replication step had occurred and a progeny escaped the trap. *Escherichia coli* and *B. subtilis* could be trapped on average for 300–500 seconds, although few cells were trapped over the entire cell-cycle. Later, the method was engineered by serially connecting cantilevers, thus improving the throughput of the technique from one single bacterium at a time to 150 bacteria per hour (Cermak et al. 2016). An array of SMRs is fluidly connected in series and spaced by serpentine delay channels allowing the growth of the bacteria between each cantilever during the crossing. The design permits monitoring of several individuals' bacteria at a time during 4 minutes via a fluidic bacterial chain crossing 10–12 resonant mass sensors distributed along the length of the microfluidic. The authors demonstrated by plotting the growth rates against the initial buoyant mass that heavier bacteria grow faster than lighter ones (Godin et al. 2010). The long duration trap of *B. subtilis* covering a full cell cycle confirm the data obtained with shorter measurement via an exponential fit of the growth rates. Cermak et al. (2016) demonstrated that after kanamycin addition to an *E. coli* culture, the growth rates dropped rapidly reaching near 0 in 30 minutes showed by almost null mass accumulation. However, there is variation in the timescale of switch to growth arrest phase at the single cell level, non-growing and normally growing bacteria coexist at 20 minutes post-intoxication.

Overall, the SMR method allows monitoring of the bacterial growth rates at the single-cell level relying on high-precision buoyant mass measures over-time. This technique enables precise monitoring of growth rates notably under drugs challenges. The main limitation of this method is that in contrast to the time-lapse microscopy method the duration of measurement lasts less than the bacterial cycle covering only a short snapshot of the single-cell growth. Moreover, the bacterial replication cannot be directly recorded. Furthermore, the SMR array is currently not suitable for measuring growth of adhering bacteria. Time-lapse microscopy methods are more broadly employed than the SMR system due to its wider availability and easier operation.

Chromosomal replication monitoring via foci detection

Haugan et al. (2018) monitored, via fluorescence microscopy, chromosomal replication markers reporting on the bacterial growth status at the single-cell level. The DNA replication of the single circular chromosome of *E. coli* starts from a single origin of replication (*oriC*) and spreads bidirectionally to reach the opposite replication terminus region named *terC*, allowing the progenies to bear a unique copy of the chromosome. Under optimal conditions, few initiations of replication can occur concomitantly per division cycle

resulting in progenies with overlapping *oriC* copies at birth. Moreover, the chromosomal replication starts at a fixed cell mass per origin meaning that the cell mass increases proportionally to the *oriC* copies number. Based on this principle, the copy number ratio of *oriC* to *terC* reports on the growth behavior. A ratio of 1 reports on non-replicating bacteria with a unique *oriC* while a ratio superior to 1 reports on growing bacteria bearing at least 2 *oriC* with ongoing chromosomal replication. To this purpose, P1-ParB and pMT-ParB proteins fluorescently labeled report respectively to origins and termini via foci detection by microscopy. A clear correlation between cell size and growth behaviors, derived from the chromosomal replication marker monitoring method, support its effectiveness. Moreover, during the exponential phase of growth, a mass doubling time was deduced from the *oriC:terC* ratio and was similar to the one deduced from the population optical density measurements. Stationary phase culture diluted in fresh media presented first homogenous non-growing bacteria; with *oriC:terC* around 1; and then heterogenous growing bacteria each with staggered ongoing chromosomal replications. Later, a tendency toward growth homogeneity was detected with ratio equal to 4 until reach once again a homogenous population of non-growing bacteria. In contrast, complete cessation of chromosome replication was not observed at any point during mice infection. Later, the chromosomal replication monitoring method was employed to assess the antibiotics efficacy as a function of growth rate *in vitro* and *in vivo* (Haugan et al. 2019). Sukumar et al. (2014), based on the chromosomal replication concept monitored the replicative behavior of *in vivo M. smegmatis* via monitoring of the single stranded binding protein (SSB) component of the replisome fused to GFP. The authors showed via time-lapse microscopy that the dynamics of SSB-GFP foci defined cell cycle timing and discriminated replicating from non-replicating subsets.

Overall, the chromosomal replication monitoring method discriminates bacterial subset depending either on their growth or replicative behaviors at the single-cell level. An *oriC:terC* ratio of 1 correspond to non-growing bacteria and the higher the number of copies, the higher the size and mass. The main limitation of the method is that it requires a previous proteins labeling to highlight *oriC* and *terC* chromosomal foci. Moreover, overlapping fluorescent foci impede accurate monitoring of *oriC:terC* ratio. Furthermore, physiological dysregulation between replication and division coupling will impede interpretation. Importantly, an *oriC:terC* ratio of 1 and a lack of SSB foci may correspond either respectively to a non-growing or non-replicating bacterium, or to a growing or replicating bacterium between active stage of chromosomal replication.

Stable isotope tracer incorporation monitoring

The stable heavy water $^2\text{H}_2\text{O}$ isotope was employed to measure the anabolic activity of *S. aureus* from cystic fibrosis patient and to calculate the related growth rate and mass doubling times at the single-cell level (Kopf et al. 2016). The ^2H incorporation and removal from bacterial population are governed by the population growth rate, the turnover rate and the death/degradation rate. It was linked to the growth rate taking into account the limitation of non-instantaneous water exchange, the hydrogen metabolism of *S. aureus* and the maintenance turnover. The latter was approximately calculated from *S. aureus* chemostat culture at near null replicative rate. Thus, the authors calculated and estimated the single-cell growth rate based on a population level equation, which does not take into account known heterogeneity of growth within a population (Balaban et al. 2004, Gangwe Nana et al. 2018,

Haugan et al. 2018). To this end, expectorations of sputum were recovered and allowed to grow in presence of $^2\text{H}_2\text{O}$ before samples fixation. During the labeling period, only active cells incorporated the isotope tracers in contrast to dormant or dead bacteria. The isotopic ^2H bulk membrane mass enrichment was measured at the single-cell level via secondary ion mass spectrometry (NanoSIMS). Coupled fluorescence in situ hybridization (FISH) method allowed specific highlighting of *S. aureus* or *P. aeruginosa*. Using this method, large growth rates heterogeneity was demonstrated. The calculated mass doubling times ranged from 256 days to 6 hours and should explain antibiotic failure. Later, ^{13}C isotope tracer probing method was developed in individual photoautotrophic bacteria to calculate the growth rate via quantitative Raman spectrometric measurement (Taylor et al. 2017). Assimilation of ^{13}C -enriched dissolved inorganic carbon was quantified at the single-cell level from red shifted wavenumber in resonance Raman spectral peaks emanating from carotenoid pigments. The detected isotopic assimilation was then converted into single-cell level growth rate via an empirical relationship. Calculated *Synechococcus sp.* growth rate showed heterogeneity at the single-cell level and was similar to the instantaneous population growth rate independently measured. Further, *Synechococcus sp.* and *Thalassiosira pseudonana* growing at different rates were mixed and single-cell Raman spectrometry, combined with FISH phylogenetic identification, could distinguish among them. Recently, the method was extended to individual heterotrophic *E. coli* growing in mixed microbial assemblages on complex ^{13}C carbon sources (Weber et al. 2021). Further, ^{15}N isotope incorporation monitoring by NanoSIMS into steady state liquid culture of *E. coli* and *B. subtilis* was employed to calculate the growth rate at both population and single-cell levels (Gangwe Nana et al. 2018). The authors estimated the mass doubling times of single cell assuming conservation of nitrogen, individual exponential growth as well as no significant changes in the media throughout the assay. The population growth rate calculated based on ^{15}N isotope incorporation was similar to the one calculated with the optical density supporting the rightness of the method. Moreover, control for the basal ^{15}N isotope incorporation by a non-growing culture is missing. Otherwise, results were much less erratic, and hence appeared more trustworthy with labeling period above 32 minutes giving a mass doubling time of 65 minutes. Inter-bacterial ^{15}N isotope incorporation reflecting heterogeneity of the mass doubling times of individual bacteria was demonstrated using this method. Interestingly, asymmetric incorporation within bacteria was shown indicating an intra-bacterial growth rate heterogeneity, which was more pronounced after a labeling period covering two mass doubling times. It could be explained by the combination of the semi-conservative nature of DNA replication and the strand-specific phenotype model explaining metabolic activities segregation to one DNA strand into one resulting daughter cell (Meselson and Stahl 1958, Rocha et al. 2003).

Overall, isotope tracer incorporation reporting on the anabolic activity informed on the approximated growth rate of bacteria at the single-cell level. Strength of this method is that it does not require any prior treatment such as genetic modification, and thus report on the quasi-instantaneous growth rates of clinically isolated pathogens after a short incubation time *ex vivo*, which should not significantly disrupt the *in vivo* physiology. Combination with FISH phylogenetic identification allows highlighting of bacteria of interest within a community. Nevertheless, it is based on population empirical relationship, which does not take into account heterogeneity at the single-cell level. Further, basal incor-

poration of the isotope must be characterized from *in vitro* viable non-replicating culture.

Individual rRNA content estimating the culture-like growth rate

The correlation between the *S. typhimurium* rRNA content and the population growth rate has long been recognized (Schaechter et al. 1958). DeLong et al. (1989) developed a method based on rRNA single-cell quantification to approximate the culture derived growth rate of *E. coli*. rRNA was quantified using FISH with a universal oligonucleotide probe in media supporting different growth rates. The resulting fluorescent intensity informing of the rRNA content varies linearly with the population growth rate. Later, specific 16S rRNA fluorescent probe linked to the population growth rate showed that the average doubling time was longer in established biofilm than in young biofilm of *E. coli* (Poulsen et al. 1993). Moller et al. (1995) confirmed the workability of the method by correlating the rRNA content of individual *Pseudomonas putida* with specific culture growth rate. Further, the metachromatic dye acridine orange labeling single- and double-stranded nucleic acid in red and green fluorescence respectively showed that total DNA and RNA measure at single-cell level via flow cytometry were related with the culture growth rate. The whole-cell hybridization method were then employed to monitor the rRNA content of *E. coli* and *S. typhimurium* gathered from large intestine of streptomycin-treated mice (Poulsen et al. 1995, Licht et al. 1996). It was converted to specific culture growth rates helped by an *in vitro* standard curve showing overall high intestinal growth rate, which appeared incompatible with the size of the population and the fecal excretion colony forming unit rate. Precursor-16S rRNA probe highlighted two population coexisting with different apparent growth rates (Licht et al. 1999). Later, the FISH rRNA monitoring to decipher the correlated culture growth rate of *in vivo* individual *P. aeruginosa* was employed (Yang et al. 2008, Kragh et al. 2014). The individual rRNA bacterial level from cystic fibrosis patient mostly correlated with heterogeneous *in vitro* culture growth while few bacteria correspond to a non-growing stationary phase subset (Yang et al. 2008). Further, a negative correlation was highlighted between the neighboring polymorphonuclear leukocytes concentration and the culture-like growth rate of individual bacteria within biofilm aggregates from lungs of patients and mice (Kragh et al. 2014). It is due to induced O_2 limitation and alleviated by denitrification. Of note, at low growth rate, individual rRNA content did not linearly correlate with the optical density of the culture. Furthermore, since a correlation can return negative growth rates the authors considered that in these cases growth rate was null. Later, a weak growth of *Stenotrophomonas maltophilia* in sputum; calculated from FISH estimated ribosomal content; correlated with the inability of *S. maltophilia* isolates to perform denitrification (Hansen et al. 2014, Kolpen et al. 2015).

Overall, FISH method allowed monitoring of the bacterial rRNA content immediately after patient gathering without pretreatment requirement at the single-cell level, which correlated linearly to the global population culture growth rate. Although the method is based on single cell rRNA measurements, it correlates with population growth rate measurement methods, which does not consider growth heterogeneity within a culture. Furthermore, a weakness of the method is that it required an *in vitro* standard curve; linking rRNA content of individual bacteria with the culture growth rate; evidently obtained from distinct condition than *in vivo* samples. Moreover, considering the global rRNA content

without processing step distinction induces errors. Of note, rRNA content could be decoupled from the growth rate in some species.

Concluding remarks

Over a century ago, heterogeneity of growth and replicative rates within a bacterial population was first hypothesized and then studied thanks to technological innovations. Among the diversity of the tools available to determine the bacterial replicative rate at the single-cell level, fluorescence dilution methods are becoming increasingly used because they almost exclusively overcome limitations, such as mandatory tracking, by giving insight into replicative history. It allows very rapid sequential analyses of single cells using flow cytometry from *in vitro*, *in situ*, and *in vivo* samples although requiring pre-treatment such as dyes labeling. A less costly method is based on colony monitoring on agar plates, but it reports only on the ability of an individual bacteria to perform at least one replicative step with its associated bacterial lag time. The bacterial growth rate at the single-cell level was broadly analyzed using time-lapse microscopy methods notably due to the lack of alternative user-friendly methods. It allows concomitantly monitoring of the replicative rate and required constant tracking making it impractical for historical or instantaneous evidence, especially from *in vivo* samples. Furthermore, *in vitro* structural markers-based methods such as peptidoglycan synthesis and regrowth-delay bodies enable mainly end-point monitoring of inter- and intra-bacterial growth or replicative behavior, but the corresponding rates rely on time-lapse microscopy methods. Strength of this method as well as stable isotope probing technique is that it reports on intracellular growth pattern. Moreover, the sporadically used buoyant mass monitoring via SMR calculates precisely the growth rate for a few minutes, and hence mismatch with replicative rate monitoring. Furthermore, chromosomal replication marker-based methods enable only to distinguish single-cell bacteria depending on their growing behavior. Some others emerging and/or sporadically used approaches such as stable isotope probing and rRNA content monitoring allow calculation of the instantaneous growth rate of individual bacteria gathered directly from patient. However, the apparent growth rate was either empirically based on a population equation with short incubation time *ex vivo* or based on standard curve linking single-cell measurement to population growth rate. Furthermore, these two latest methods cannot be used to monitor concomitantly the replicative rate. Thus, there is an urge need for a precise end-point method combining both growth and replicative single-cell historical rates monitoring from *in vitro*, *in situ* and especially *in vivo* samples which could allow better understanding on the underlying mechanism of both rates *in vivo* potentially implicated to therapeutic treatment failures.

The methods presented in this review are in constant evolution with fluorescent proteins and dyes advances as well as monitoring device resolution increase. Therefore, these methods should continue to increase our knowledge and understanding on single bacteria growth and replicative rates within broad conditions from a heterogeneous and/or drugs challenged *in vitro* population to clinical isolates for years to come.

Authors' contributions

F.M. discussed and planned the manuscript with F.L., J.J., and A.B.; F.M. did all the bibliography and wrote, then revised the manuscript; J.J. and A.B. each reviewed and edited the manuscript.

Funding

F.M. holds a CIFRE PhD fellowship cofunded by the French ANRT and EVOTEC ID Lyon (convention no. 2019/0813); F.L. is a full-time employee of UCBL1 and HCL; J.J. is a full-time employee of UCBL1; and A.B. is a part-time employee of EVOTEC ID Lyon.

References

- Adams KN, Takaki K, Connolly LE. *et al.* Drug tolerance in replicating mycobacteria mediated by a macrophage-induced efflux mechanism. *Cell* 2011;**145**:39–53.
- Aldridge BB, Fernandez-Suarez M, Heller D. *et al.* Asymmetry and aging of mycobacterial cells lead to variable growth and antibiotic susceptibility. *Science* 2012;**335**:100–4.
- Antunes LCS, Imperi F, Carattoli A. *et al.* Deciphering the multifactorial nature of *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *PLoS ONE* 2011;**6**:10.
- Arnoldini M, Vizcarra IA, Peña-Miller R. *et al.* Bistable expression of virulence genes in *Salmonella* leads to the formation of an antibiotic-tolerant subpopulation. Balaban N (ed.). *PLoS Biol* 2014;**12**:e1001928.
- Atwal S, Giengkam S, VanNieuwenhze M. *et al.* Live imaging of the genetically intractable obligate intracellular bacteria *Orientia tsutsugamushi* using a panel of fluorescent dyes. *J Microbiol Methods* 2016;**130**:169–76.
- Austerjost J, Marquard D, Raddatz L. *et al.* A smart device application for the automated determination of *E. coli* colonies on agar plates. *Eng Life Sci* 2017;**17**:959–66.
- Balaban NQ, Merin J, Chait R. *et al.* Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* 2004;**305**:1622–5.
- Balteskin Ö, Boucharin A, Tano E. *et al.* Antibiotic susceptibility testing in less than 30 min using direct single-cell imaging. *Proc Natl Acad Sci* 2017;**114**:9170–5.
- Bamford RA, Smith A, Metz J. *et al.* Investigating the physiology of viable but non-culturable bacteria by microfluidics and time-lapse microscopy. *BMC Biol* 2017;**15**:121.
- Bär J, Boumasmoud M, Kouyos RD. *et al.* Efficient microbial colony growth dynamics quantification with ColTapp, an automated image analysis application. *Sci Rep* 2020;**10**:16084.
- Barber MA. A new method of isolating micro-organisms. *J Kans Med Soc* 1904;**4**:487.
- Barber MA. A study by the single cell method of the influence of homologous antipneumococcal serum on the growth rate of pneumococcus. *J Exp Med* 1919;**30**:569–87.
- Barber MA. The rate of multiplication of *Bacillus coli* at different temperatures. *J Infect Dis* 1908;**5**:379–400.
- Bergmiller T, Andersson AMC, Tomasek K. *et al.* Biased partitioning of the multidrug efflux pump AcrAB-TolC underlies long-lived phenotypic heterogeneity. *Science* 2017;**356**:311–5.
- Bewes JM, Suchowerska N, McKenzie DR. Automated cell colony counting and analysis using the circular Hough image transform algorithm (CHiTA). *Phys Med Biol* 2008;**53**:5991–6008.
- Bigger JW. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *Lancet North Am Ed* 1944;**244**:497–500.
- Bronner-Fraser M. Alterations in neural crest migration by a monoclonal antibody that affects cell adhesion. *J Cell Biol* 1985;**101**:610–7.
- Cai Z, Chattopadhyay N, Liu WJ. *et al.* Optimized digital counting colonies of clonogenic assays using ImageJ software and customized macros: comparison with manual counting. *Int J Radiat Biol* 2011;**87**:1135–46.

- Camsund D, Lawson MJ, Larsson J. et al. Time-resolved imaging-based CRISPRi screening. *Nat Methods* 2020;**17**:86–92.
- Cermak N, Olcum S, Delgado FF. et al. High-throughput measurement of single-cell growth rates using serial microfluidic mass sensor arrays. *Nat Biotechnol* 2016;**34**:1052–9.
- Choudhry P. High-throughput method for automated colony and cell counting by digital image analysis based on edge detection. Simpson MJ (ed.). *PLoS ONE* 2016;**11**:e0148469.
- Clarke ML, Burton RL, Hill AN. et al. Low-cost, high-throughput, automated counting of bacterial colonies. *Cytometry Part A* 2010;**77A**:790–7.
- Claudi B, Spröte P, Chirkova A. et al. Phenotypic variation of *Salmonella* in host tissues delays eradication by antimicrobial chemotherapy. *Cell* 2014;**158**:722–33.
- Daniel RA, Errington J. Control of cell morphogenesis in bacteria: two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell* 2003;**113**:10.
- Delong EF, Wickham GS, Pace NR. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* 1989;**243**:1360–3.
- Diaper JP, Edwards C. The use of fluorogenic esters to detect viable bacteria by flow cytometry. *J Appl Bacteriol* 1994;**77**:221–8.
- Elfving A, LeMarc Y, Baranyi J. et al. Observing growth and division of large numbers of individual bacteria by image analysis. *Appl Environ Microbiol* 2004;**70**:675–8.
- Figueira R, Watson KG, Holden DW. et al. Identification of *Salmonella* pathogenicity island-2 Type III secretion system effectors involved in intramacrophage replication of *S. enterica* Serovar Typhimurium: implications for rational vaccine design. Sansonetti PJ (ed.). *mBio* 2013;**4**:e00065–13.
- Flannagan RS, Heinrichs DE. A fluorescence based-proliferation assay for the identification of replicating bacteria within host cells. *Front Microbiol* 2018;**9**:3084.
- Flannagan RS, Heit B, Heinrichs DE. Intracellular replication of *Staphylococcus aureus* in mature phagolysosomes in macrophages precedes host cell death, and bacterial escape and dissemination: *S. aureus* replicates in mature phagolysosomes in macrophages. *Cell Microbiol* 2016;**18**:514–35.
- Flannagan RS, Watson DW, Surewaard BGJ. et al. The surreptitious survival of the emerging pathogen *Staphylococcus lugdunensis* within macrophages as an immune evasion strategy. *Cell Microbiol* 2018;**20**:e12869.
- Fuller ME, Stieger SH, Rothmel RK. et al. Development of a vital fluorescent staining method for monitoring bacterial transport in subsurface environments. *Appl Environ Microbiol* 2000;**66**:4486–96.
- Gangwe Nana GY, Ripoll C, Cabin-Flaman A et al. Division-based, growth rate diversity in bacteria. *Front Microbiol* 2018;**9**:849.
- Garcia-Parajo MF, Koopman M, van Dijk EMHP. et al. The nature of fluorescence emission in the red fluorescent protein DsRed, revealed by single-molecule detection. *Proc Natl Acad Sci* 2001;**98**:14392–7.
- Geissmann Q. OpenCFU, a new free and open-source software to count cell colonies and other circular objects. Merks RMH (ed.). *PLoS ONE* 2013;**8**:e54072.
- Giengkam S, Blakes A, Utsahajit P. et al. Improved quantification, propagation, purification and storage of the obligate intracellular human pathogen *Orientia tsutsugamushi*. Walker DH (ed.). *PLoS Negl Trop Dis* 2015;**9**:e0004009.
- Gill WP, Harik NS, Whiddon MR. et al. A replication clock for *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Med* 2009;**15**:11.
- Godin M, Delgado FF, Son S. et al. Using buoyant mass to measure the growth of single cells. *Nat Methods* 2010;**7**:387–90.
- Goormaghtigh F, Van Melderen L. Single-cell imaging and characterization of *Escherichia coli* persister cells to ofloxacin in exponential cultures. *Sci Adv* 2019;**5**:eaav9462.
- Gross LA, Baird GS, Hoffman RC. et al. The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci* 2000;**97**:11990–5.
- Hammes WP, Neuhaus FC. On the mechanism of action of vancomycin: inhibition of peptidoglycan synthesis in *Gafrica homari*. *Antimicrob Agents Chemother* 1974;**6**:722–8.
- Hansen N, Rasmussen AKI, Fiandaca MJ. et al. Rapid identification of *Stenotrophomonas maltophilia* by peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization. *New Microbes New Infect* 2014;**2**:79–81.
- Haugan MS, Charbon G, Fridodt-Møller N. et al. Chromosome replication as a measure of bacterial growth rate during *Escherichia coli* infection in the mouse peritonitis model. *Sci Rep* 2018;**8**:14961.
- Haugan MS, Løbner-Olesen A, Fridodt-Møller N. Comparative activity of ceftriaxone, ciprofloxacin, and gentamicin as a function of bacterial growth rate probed by *Escherichia coli* chromosome replication in the mouse peritonitis model. *Antimicrob Agents Chemother* 2019;**63**:13.
- Helaine S, Cheverton AM, Watson KG. et al. Internalization of *Salmonella* by macrophages induces formation of non-replicating persisters. *Science* 2014;**343**:204–8.
- Helaine S, Thompson JA, Watson KG. et al. Dynamics of intracellular bacterial replication at the single cell level. *Proc Natl Acad Sci* 2010;**107**:3746–51.
- Hildebrand EM. Techniques for the isolation of single microorganisms. *Botan Rev* 1938;**4**:627–64.
- Hobby GL, Meyer K, Chaffee E. Observations on the mechanism of action of penicillin. *Exp Biol Med* 1942;**50**:281–5.
- Hodges HL, Brown RA, Crooks JA. et al. Imaging mycobacterial growth and division with a fluorogenic probe. *Proc Natl Acad Sci* 2018;**115**:5271–6.
- Hoefel D, Grooby WL, Monis PT. et al. A comparative study of carboxyfluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester as indicators of bacterial activity. *J Microbiol Methods* 2003;**52**:10.
- Höltje JV. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;**62**:181–203.
- Hooper DC. Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* 2001;**32**:S9–15.
- Hsu Y-P, Hall E, Booher G. et al. Fluorogenic d-amino acids enable real-time monitoring of peptidoglycan biosynthesis and high-throughput transpeptidation assays. *Nat Chem* 2019;**11**:335–41.
- Imdahl F, Saliba A-E. Advances and challenges in single-cell RNA-seq of microbial communities. *Curr Opin Microbiol* 2020;**57**:102–10.
- Iyer-Biswas S, Wright CS, Henry JT. et al. Scaling laws governing stochastic growth and division of single bacterial cells. *Proc Natl Acad Sci* 2014;**111**:15912–7.
- Jöers A, Kaldalu N, Tenson T. The frequency of persisters in *Escherichia coli* reflects the kinetics of awakening from dormancy. *J Bacteriol* 2010;**192**:3379–84.
- Kang C-M, Nyayapathy S, Lee J-Y. et al. Wag31, a homologue of the cell division protein DivIVA, regulates growth, morphology and polar cell wall synthesis in mycobacteria. *Microbiology* 2008;**154**:725–35.
- Kelly CD, Rahn O. The growth rate of individual bacterial cells. *J Bacteriol* 1932;**23**:147–53.
- Khan A ul M, Torelli A, Wolf I. et al. AutoCellSeg: robust automatic colony forming unit (CFU)/cell analysis using adaptive image segmentation and easy-to-use post-editing techniques. *Sci Rep* 2018;**8**:7302.

- Khandekar S, Liebens V, Fauvart M. et al. The putative de-N-acetylase DnpA contributes to intracellular and biofilm-associated persistence of *Pseudomonas aeruginosa* exposed to fluoroquinolones. *Front Microbiol* 2018;**9**:1455.
- Kiviet DJ, Nghe P, Walker N. et al. Stochasticity of metabolism and growth at the single-cell level. *Nature* 2014;**514**:376–9.
- Kohram M, Vashistha H, Leibler S. et al. Bacterial growth control mechanisms inferred from multivariate statistical analysis of single-cell measurements. *Curr Biol* 2021;**31**:955–964.e4.
- Kolpen M, Kragh KN, Bjarnsholt T. et al. Denitrification by cystic fibrosis pathogens - *Stenotrophomonas maltophilia* is dormant in sputum. *Int J Med Microbiol* 2015;**305**:1–10.
- Kopf SH, Sessions AL, Cowley ES. et al. Trace incorporation of heavy water reveals slow and heterogeneous pathogen growth rates in cystic fibrosis sputum. *Proc Natl Acad Sci* 2016;**113**:E110–6.
- Kragh KN, Alhede M, Jensen PØ. et al. Polymorphonuclear leukocytes restrict growth of *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of cystic fibrosis patients. McCormick BA (ed.). *Infect Immun* 2014;**82**:4477–86.
- Kuru E, Hughes HV, Brown PJ. et al. In situ probing of newly synthesized peptidoglycan in live bacteria with fluorescent D-amino acids. *Angew Chem Int Ed Engl* 2012;**51**:12519–23.
- Kuru E, Tekkam S, Hall E. et al. Synthesis of fluorescent D-amino acids and their use for probing peptidoglycan synthesis and bacterial growth in situ. *Nat Protoc* 2015;**10**:33–52.
- Lahav-Mankovski N, Prasad PK, Oppenheimer-Low N. et al. Decorating bacteria with self-assembled synthetic receptors. *Nat Commun* 2020;**11**:1299.
- Leveau JHJ, Lindow SE. Predictive and interpretive simulation of green fluorescent protein expression in reporter bacteria. *J Bacteriol* 2001;**183**:11.
- Levin-Reisman I, Gefen O, Fridman O. et al. Automated imaging with ScanLag reveals previously undetectable bacterial growth phenotypes. *Nat Methods* 2010;**7**:737–9.
- Licht TR, Krogfelt KA, Cohen PS. et al. Role of lipopolysaccharide in colonization of the mouse intestine by *Salmonella typhimurium* studied by in situ hybridization. *Infect Immun* 1996;**64**:3811–7.
- Licht TR, Tolker-Nielsen T, Holmstrom K. et al. Inhibition of *Escherichia coli* precursor-16S rRNA processing by mouse intestinal contents. *Environ Microbiol* 1999;**1**:23–32.
- Liechti GW, Kuru E, Hall E. et al. A new metabolic cell-wall labelling method reveals peptidoglycan in *Chlamydia trachomatis*. *Nature* 2014;**506**:507–10.
- Liu S, Shah SJ, Wilmes LJ. et al. Quantitative tissue oxygen measurement in multiple organs using ¹⁹F MRI in a rat model. *Magn Reson Med* 2011;**66**:1722–30.
- Long Z, Nugent E, Javer A. et al. Microfluidic chemostat for measuring single cell dynamics in bacteria. *Lab Chip* 2013;**13**:947.
- Luk CH, Valenzuela C, Gil M. et al. Salmonella enters a dormant state within human epithelial cells for persistent infection. *Cell J* (ed.). *PLOS Pathog* 2021;**17**:e1009550.
- Ma X, Ehrhardt DW, Margolin W. Colocalization of cell division proteins FtsZ and FtsA to cytoskeletal structures in living *Escherichia coli* cells by using green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;**93**:12998–3003.
- Mailloux BJ, Fuller ME. Determination of in situ bacterial growth rates in aquifers and aquifer sediments. *Appl Environ Microbiol* 2003;**69**:3798–808.
- Manina G, Dhar N, McKinney JD. Stress and host immunity amplify *Mycobacterium tuberculosis* phenotypic heterogeneity and induce non-growing metabolically active forms. *Cell Host Microbe* 2015;**17**:32–46.
- Mannik J, Driessen R, Galajda P. et al. Bacterial growth and motility in sub-micron constrictions. *Proc Natl Acad Sci* 2009;**106**:14861–6.
- Mannik J, Wu F, Hol FJH. et al. Robustness and accuracy of cell division in *Escherichia coli* in diverse cell shapes. *Proc Natl Acad Sci* 2012;**109**:6957–62.
- Manuse S, Shan Y, Canas-Duarte SJ. et al. Bacterial persisters are a stochastically formed subpopulation of low-energy cells. Bollenbach T (ed.). *PLOS Biol* 2021;**19**:e3001194.
- Meselson M, Stahl FW. The replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* 1958;**44**:12.
- Michel J-B, Yeh PJ, Chait R. et al. Drug interactions modulate the potential for evolution of resistance. *Proc Natl Acad Sci* 2008;**105**:14918–23.
- Moffatt JH, Harper M, Harrison P. et al. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;**54**:7.
- Moffitt JR, Lee JB, Cluzel P. The single-cell chemostat: an agarose-based, microfluidic device for high-throughput, single-cell studies of bacteria and bacterial communities. *Lab Chip* 2012;**12**:1487.
- Mohiuddin SG, Kavousi P, Orman MA. Flow-cytometry analysis reveals persister resuscitation characteristics. *BMC Microbiol* 2020;**20**:202.
- Moller S, Kristensen CS, Poulsen LK. et al. Bacterial growth on surfaces: automated image analysis for quantification of growth rate-related parameters. *Appl Environ Microbiol* 1995;**61**:741–8.
- Mouton JM, Helaine S, Holden DW. et al. Elucidating population-wide mycobacterial replication dynamics at the single-cell level. *Microbiology* 2016;**162**:966–78.
- Myhrvold C, Kotula JW, Hicks WM. et al. A distributed cell division counter reveals growth dynamics in the gut microbiota. *Nat Commun* 2015;**6**:10039.
- Norman TM, Lord ND, Paulsson J. et al. Memory and modularity in cell-fate decision making. *Nature* 2013;**503**:481–6.
- Olricks NK, Aarsman MEG, Verheul J. et al. A novel in vivo cell-wall labeling approach sheds new light on peptidoglycan synthesis in *Escherichia coli*. *ChemBioChem* 2011;**12**:1124–33.
- Orman MA, Brynildsen MP. Dormancy is not necessary or sufficient for bacterial persistence. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;**57**:10.
- Orman MA, Brynildsen MP. Inhibition of stationary phase respiration impairs persister formation in *E. coli*. *Nat Commun* 2015;**6**:7983.
- Ørskov J. Method for the isolation of bacteria in pure culture from single cells and procedure for the direct tracing of bacterial growth on a solid medium. *J Bacteriol* 1922;**7**:537–49.
- Patel P, O'Hara BJ, Aunins E. et al. Modifying TIMER to generate a slow-folding DsRed derivative for optimal use in quickly-dividing bacteria. Helaine S (ed.). *PLOS Pathog* 2021;**17**:e1009284.
- Personnic N, Striednig B, Hilbi H. Quorum sensing controls persistence, resuscitation, and virulence of *Legionella* subpopulations in biofilms. *ISME J* 2021;**15**:196–210.
- Personnic N, Striednig B, Lezan E. et al. Quorum sensing modulates the formation of virulent *Legionella* persisters within infected cells. *Nat Commun* 2019;**10**:5216.
- Peyrusson F, Varet H, Nguyen TK. et al. Intracellular *Staphylococcus aureus* persisters upon antibiotic exposure. *Nat Commun* 2020;**11**:2200.
- Poulsen LK, Ballard G, Stahl DA. Use of rRNA fluorescence in situ hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Appl Environ Microbiol* 1993;**59**:1354–60.
- Poulsen LK, Licht TR, Rang C. et al. Physiological state of *Escherichia coli* BJ4 growing in the large intestines of streptomycin-treated mice. *J Bacteriol* 1995;**177**:5840–5.

- Putrins M, Kogermann K, Lukk E. et al. Phenotypic heterogeneity enables uropathogenic *Escherichia coli* to evade killing by antibiotics and serum complement. *Infect Immun* 2015;**83**:12.
- Raybourne RB, Bunning VK. Bacterium-host cell interactions at the cellular level: fluorescent labeling of bacteria and analysis of short-term bacterium-phagocyte interaction by flow cytometry. *Infect Immun* 1994;**62**:665–72.
- Reichenbach H. Die Absterbeordnung der Bakterien und ihre Bedeutung für Theorie und Praxis der Desinfektion. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten* 1911;**69**:171–222.
- Remus-Emsermann MN, Leveau JH. Linking environmental heterogeneity and reproductive success at single-cell resolution. *ISME J* 2010;**4**:215–22.
- Remus-Emsermann MNP, Kowalchuk GA, Leveau JHJ. Single-cell versus population-level reproductive success of bacterial immigrants to pre-colonized leaf surfaces. *Environ Microbiol Rep* 2013;**5**:387–92.
- Rocha EPC, Fralick J, Vedyappan G. et al. A strand-specific model for chromosome segregation in bacteria. *Mol Microbiol* 2003;**49**:895–903.
- Roostalu J, Jöers A, Luidalepp H. et al. Cell division in *Escherichia coli* cultures monitored at single cell resolution. *BMC Microbiol* 2008;**8**:14.
- Saliba A-E, Li L, Westermann AJ. et al. Single-cell RNA-seq ties macrophage polarization to growth rate of intracellular *Salmonella*. *Nat Microbiol* 2017;**2**:16206.
- Santi I, Dhar N, Bousbaine D. et al. Single-cell dynamics of the chromosome replication and cell division cycles in mycobacteria. *Nat Commun* 2013;**4**:2470.
- Schaechter M, Maaloe O, Kjeldgaard NO. Dependency on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced growth of *Salmonella typhimurium*. *J Gen Microbiol* 1958;**19**:592–606.
- Schulte M, Olschewski K, Hensel M. Fluorescent protein-based reporters reveal stress response of intracellular *Salmonella enterica* at level of single bacterial cells. *Cell Microbiol* 2021;**23**:e13293.
- Shah NA, Laws RJ, Wardman B. et al. Accurate, precise modeling of cell proliferation kinetics from time-lapse imaging and automated image analysis of agar yeast culture arrays. *BMC Syst Biol* 2007;**1**:3.
- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA. et al. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 2004;**22**:1567–72.
- Shcherbo D, Merzlyak EM, Chepurnykh TV. et al. Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. *Nat Methods* 2007;**4**:741–6.
- Siegrist MS, Whiteside S, Jewett JC. et al. Amino acid chemical reporters reveal peptidoglycan dynamics of an intracellular pathogen. *ACS Chem Biol* 2013;**8**:500–5.
- Stapels DAC, Hill PWS, Westermann AJ. et al. *Salmonella* persists under host immune defenses during antibiotic treatment. *Science* 2018;**362**:1156–60.
- Strack RL, Strongin DE, Mets L. et al. Chromophore formation in DsRed occurs by a branched pathway. *J Am Chem Soc* 2010;**132**:8496–505.
- Stretton S, Techkarnjanaruk S, McLennan AM. et al. Use of green fluorescent protein to tag and investigate gene expression in marine bacteria. 1998;**64**:7.
- Sturm A, Heinemann M, Arnoldini M. et al. The cost of virulence: retarded growth of *Salmonella typhimurium* cells expressing type III secretion system 1. Ausubel FM (ed.). *PLoS Pathog* 2011;**7**:e1002143.
- Sukumar N, Tan S, Aldridge BB. et al. Exploitation of *Mycobacterium tuberculosis* reporter strains to probe the impact of vaccination at sites of infection. Salgame P (ed.). *PLoS Pathog* 2014;**10**:e1004394.
- Takeuchi R, Tamura T, Nakayashiki T. et al. Colony-live — a high-throughput method for measuring microbial colony growth kinetics— reveals diverse growth effects of gene knockouts in *Escherichia coli*. *BMC Microbiol* 2014;**14**:171.
- Tanouchi Y, Pai A, Park H. et al. A noisy linear map underlies oscillations in cell size and gene expression in bacteria. *Nature* 2015;**523**:357–60.
- Taylor GT, Suter EA, Li ZQ. et al. Single-cell growth rates in photoautotrophic populations measured by stable isotope probing and resonance Raman microspectrometry. *Front Microbiol* 2017;**8**:1449.
- Teixeira RC, Baêta BA, Ferreira JS. et al. Fluorescent membrane markers elucidate the association of *Borrelia burgdorferi* with tick cell lines. *Braz J Med Biol Res* 2016;**49**:9.
- Terskikh A. “Fluorescent Timer”: Protein That Changes Color with Time. *Science* 2000;**290**:1585–8.
- Tyanont K, Doan T, Lazarus MB. et al. Imaging peptidoglycan biosynthesis in *Bacillus subtilis* with fluorescent antibiotics. *Proc Natl Acad Sci* 2006;**103**:11033–8.
- Ueckert JE, Nebe von-Caron G, Bos AP. et al. Flow cytometric analysis of *Lactobacillus plantarum* to monitor lag times, cell division and injury. *Lett Appl Microbiol* 1997;**25**:295–9.
- Ullman G, Wallden M, Marklund EG. et al. High-throughput gene expression analysis at the level of single proteins using a microfluidic turbidostat and automated cell tracking. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 2013;**368**:20120025.
- Ursell TS, Nguyen J, Monds RD. et al. Rod-like bacterial shape is maintained by feedback between cell curvature and cytoskeletal localization. *Proc Natl Acad Sci* 2014;**111**:E1025–34.
- Verkhusha VV, Chudakov DM, Gurskaya NG. et al. Common Pathway for the Red Chromophore Formation in Fluorescent Proteins and Chromoproteins. *Chem Biol* 2004;**11**:845–54.
- Wakamoto Y, Dhar N, Chait R. et al. Dynamic persistence of antibiotic-stressed mycobacteria. *Science* 2013;**339**:6.
- Wakamoto Y, Ramsden J, Yasuda K. Single-cell growth and division dynamics showing epigenetic correlations. *Analyst* 2005;**130**:7.
- Wallden M, Fange D, Lundius EG. et al. The synchronization of replication and division cycles in individual *E. coli* Cells. *Cell* 2016;**166**:729–39.
- Wang P, Robert L, Pelletier J. et al. Robust growth of *Escherichia coli*. *Curr Biol* 2010;**20**:1099–103.
- Weber F, Zaliznyak T, Edgcomb VP. et al. Using stable isotope probing and Raman microspectroscopy to measure growth rates of heterotrophic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2021;**87**:e0146021.
- Wilson GS. The proportion of viable bacteria in young cultures with especial reference to the technique employed in counting. *J Bacteriol* 1922;**7**:405–46.
- Wong C-F, Yeo JY, Gan SK-E. APD colony counter app: using watershed algorithm for improved colony counting. *Nat Methods Appl Notes* 2016;1–3.
- Wong FH-S, Cai Y, Leck H. et al. Determining the development of persisters in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* upon exposure to polymyxin B-based antibiotic combinations using flow cytometry. *Antimicrob Agents Chemother* 2019;**64**:e01712–19.

Xia A, Han J, Jin Z. *et al.* Dual-color fluorescent timer enables detection of growth-arrested pathogenic bacterium. *ACS Infect Dis* 2018;**4**:1666–70.

Yang D, Jennings AD, Borrego E. *et al.* Analysis of factors limiting bacterial growth in PDMS mother machine devices. *Front Microbiol* 2018;**9**:871.

Yang L, Haagensen JAJ, Jelsbak L. *et al.* In situ growth rates and biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* populations in chronic lung infections. *J Bacteriol* 2008;**190**:2767–76.

Yu J, Liu Y, Yin H. *et al.* Regrowth-delay body as a bacterial subcellular structure marking multidrug-tolerant persisters. *Cell Discov* 2019;**5**:8.

3.5.2. Méthodes sélectionnées pour l'étude de la dynamique de réplication intracellulaire

Dans le cadre des travaux de recherche présentés dans ce manuscrit, l'étude de la dilution d'un marqueur fluorescent a été combinée à l'étude de la surface bactérienne afin de déterminer la dynamique de réplication de *S. aureus* au sein des ostéoblastes.

La méthode de dilution de fluorescence a été présentée dans l'article de revue ci-dessus. Dans le principe, la méthode de dilution d'un marqueur fluorescent est basée sur la dilution d'un facteur 2 à chaque étape répliative du contenu bactérien initial³²⁸⁻³³¹. Le marquage de tout ou partie de ce contenu initial permet de suivre l'état répliatif de la bactérie. En effet, les populations non répliatives ne vont pas diluer leur contenu initial et l'intensité de fluorescence restera constante. A l'inverse, les populations répliatives vont diluer leur contenu initial par 2 à chaque étape répliative diluant ainsi le marqueur fluorescent et réduisant l'intensité de fluorescence de chaque bactérie d'autant. Cette méthode permet de suivre entre 4 et 8 générations bactériennes par cytométrie et microscopie avant que le signal du marqueur n'atteigne le bruit de fond. L'addition d'une protéine fluorescente constitutive permet de suivre la bactérie au cours du temps par microscopie. Cette dernière permet également l'application de la méthode liée à la surface bactérienne.

La méthode de mesure de la surface bactérienne est basée sur le principe suivant : la surface occupée d'une population bactérienne est fonction du nombre d'individu de sa population. Ainsi, au sein d'une cellule hôte, la mesure de la surface bactérienne, à l'aide d'un marqueur fluorescent bactérien, permet de rendre compte sur la dynamique de réplication de la population^{245,289,302,303,332,333}. En effet, si la surface de pixels bactériens reste constante au cours du temps alors la cellule hôte comporte des bactéries exclusivement non-répliatives. A l'inverse, lorsque la surface de pixels bactériens augmente alors la cellule hôte est le lieu d'une réplication et d'un accroissement de la population. La diminution de la surface bactérienne partielle ou totale suggère l'élimination ou l'échappement des bactéries intracellulaires. L'étude de la surface bactérienne peut se faire au niveau de la cellule eucaryote unique ou au niveau d'une population de cellules couvrant un champ observé.

En complément, la méthode de dénombrement des CFU a également été employée dans le cadre de ces travaux de recherche. Cette méthode informe sur la quantité de bactéries capables de former des colonies sur gélose d'agar et permet lorsqu'effectuée en parallèle de la microscopie ou de la cytométrie de mettre en évidence la population de bactéries viables mais non cultivables. La charge bactérienne retrouvée par dénombrement des CFU englobe la dynamique de réplication de la population ainsi que l'élimination des bactéries par la cellule ou l'agent antimicrobien dans le milieu extracellulaire à la suite du relargage des bactéries dans ce dernier.

Tandis que la méthode de dilution de fluorescence permet le suivi de la dynamique de réplication à l'échelle de la bactérie unique, la méthode de surface bactérienne permet le suivi de la dynamique de réplication d'une population bactérienne au sein d'une cellule hôte unique. La méthode de dénombrement des CFU informe sur la charge d'une population bactérienne au sein d'une population de cellules hôtes.

Il est à noter que l'étude en microscopie électronique peut suggérer l'état répliatif de *S. aureus* intracellulaire notamment via l'analyse des septums et de la charge bactérienne au cours du temps.

Notons également que l'analyse par cytométrie de flux de l'intensité de fluorescence de *S. aureus* au sein de cellules eucaryotes permet de définir le taux de bactéries présentes par cellules²⁴⁵. L'analyse séquentielle permet de rendre compte de l'évolution de l'état répliatif des bactéries intracellulaires. De plus, le dénombrement par microscopie des bactéries intracellulaires au cours du temps permet d'étudier la dynamique de réplication de la population au sein d'une cellule hôte unique³³⁴.

3.6. Dynamique de réplication de *S. aureus* dans les cellules phagocytaires non-professionnelles

La dynamique de réplication intracellulaire de *S. aureus* n'a été étudiée qu'au sein de cellules épithéliales et endothéliales par microscopie en temps réel à ma connaissance. Le nombre de ces études est limité.

La dynamique de réplication de *S. aureus* au sein de cellules endothéliales a été étudiée par microscopie en temps réel qualitative (Fig. 13a,b)³⁰². Celle-ci a démontré la capacité de *S. aureus* à se répliquer pendant les 3 premiers jours de l'infection intracellulaire. A la suite de ces 3 jours, une réduction progressive du nombre de bactéries intracellulaires a été détectée faisant face à l'augmentation du nombre de bactéries mortes. Une analyse par microscopie électronique a confirmé qu'à 3 jours post-infection, seulement 23% des bactéries présentaient une morphologie intacte. Ce nombre a diminué à quelques bactéries 7 jours post-infection. A l'échelle de la cellule eucaryote 3 possibilités pour la population intracellulaire de *S. aureus* ont été mises en évidence : (i) Dans la majorité des cas, *S. aureus* se multiplie durant les 48 premières heures conduisant à la lyse de la cellule hôte et au relargage des bactéries dans le milieu ; (ii) *S. aureus* peut rester intracellulaire sans réplication durant toute l'observation d'une durée de 7 jours ; (iii) suite à une phase transitoire de croissance, la cellule hôte peut contenir la population en éliminant partiellement les bactéries. Après 7 jours post-infection, plus aucune réplication n'a été détectée. Les bactéries non-répliatives résiduelles ont la capacité de s'échapper de la niche intracellulaire, se multiplier dans le milieu et

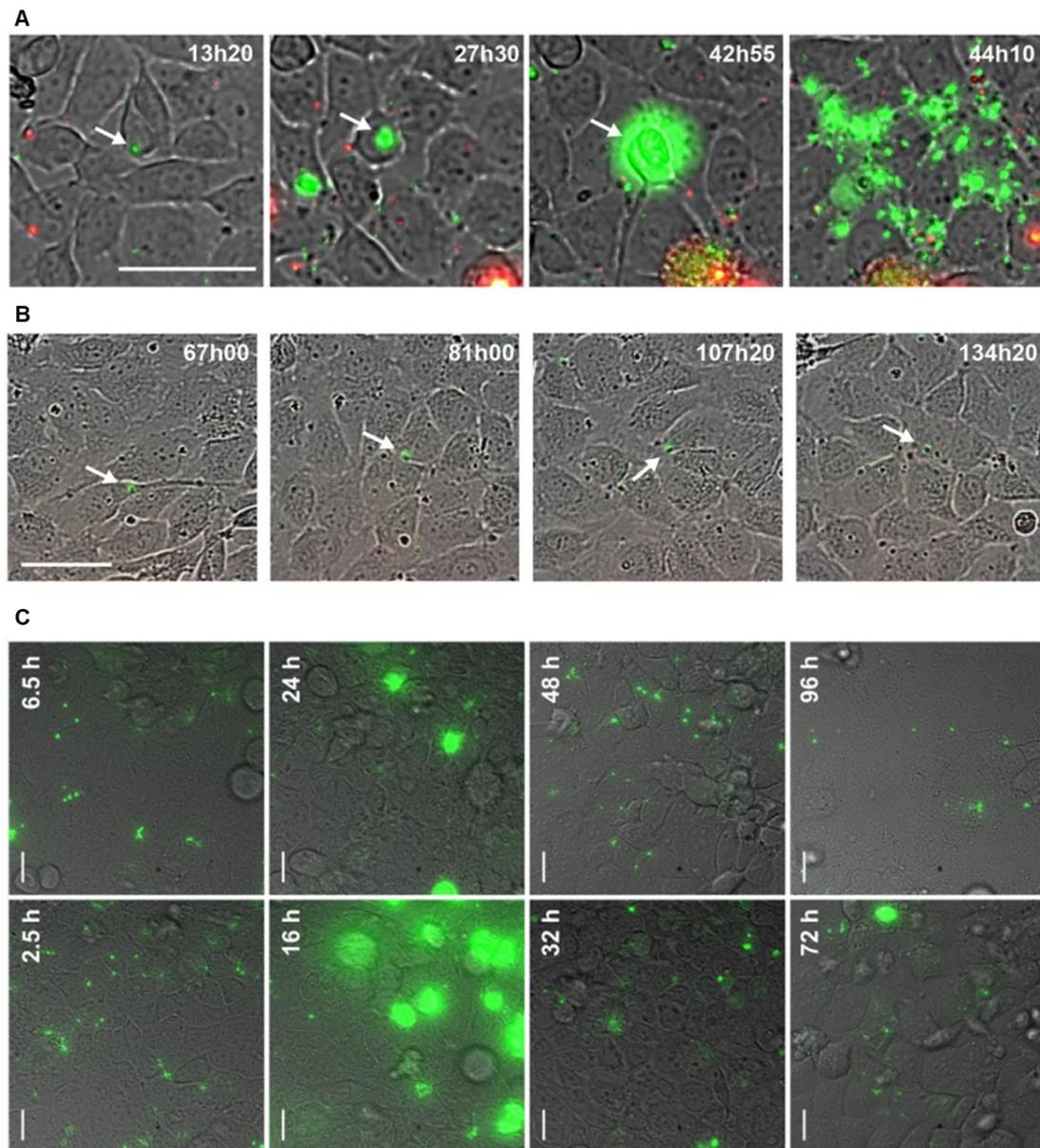


Figure 13 : Dynamique de réplication de *S. aureus* au sein de cellules endothéliales et épithéliales. Analyse par microscopie automatisée à fluorescence de la dynamique de réplication de *S. aureus* au sein de cellules endothéliales (A, B) et épithéliales (C), de manière qualitative (A, B) et quantitative (C). *S. aureus* répliquatifs en (A) et survivant non répliquatif à long terme en (B). (C) Dynamique de réplication analysée à l'échelle d'un champ d'observation regroupant une population de cellules eucaryotes. Modifiée d'après Rollin et al., Palma Medina et al. avec permission.

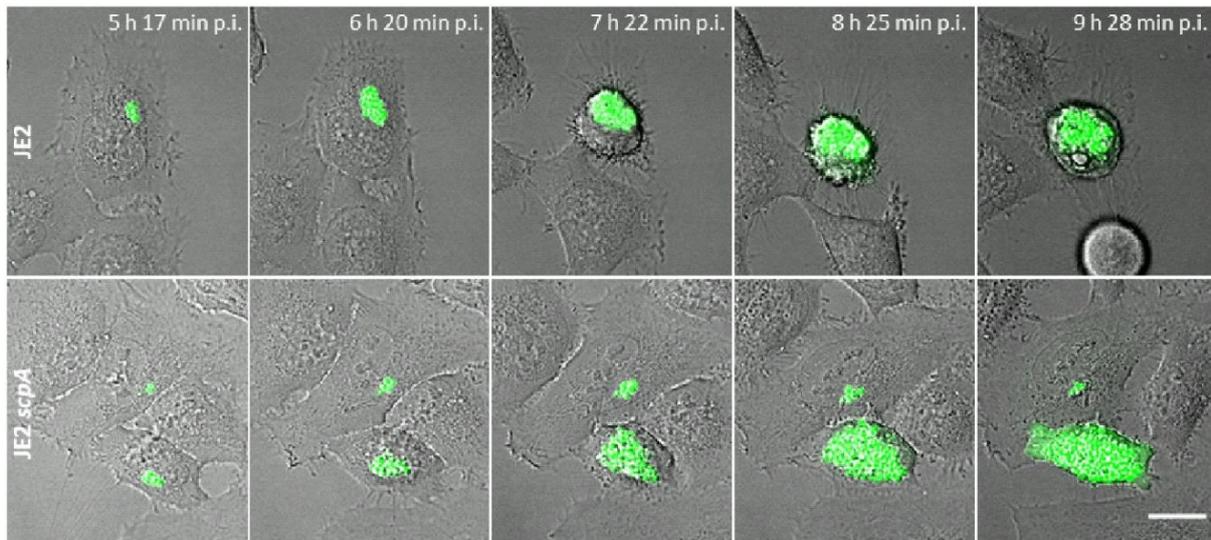


Figure 14 : Impact de l'expression de la staphopaine A sur la dynamique de réplication de *S. aureus* au sein de cellules épithéliales. Analyse par microscopie automatisée à fluorescence qualitative. D'après Stelzner et al. Reproduit avec permission.

éventuellement infecter les cellules adjacentes lors du retrait du traitement antibiotique du milieu extracellulaire.

L'utilisation d'une souche mutante $\Delta hemDBL$ présentant un phénotype SCV stable a démontré une absence de réplication bactérienne et de détachement des cellules infectées durant l'infection.

La dynamique de réplication de *S. aureus* au sein de cellules épithéliales, mis en lumière par une étude quantitative, suit celle décrite précédemment pour les cellules endothéliales (Fig. 13c)³⁰³. Notons ici que l'analyse globale d'une population de cellules eucaryotes infectées ne permet pas de distinguer les sous-populations cellulaires hôtes en fonction de la dynamique de réplication des bactéries en leur sein. L'analyse d'une population de cellules endothéliales infectées a démontré que *S. aureus* est resté non répliatif durant les 8 premières heures de l'infection. Puis, la plupart des bactéries sont sorties de la quiescence, engageant une phase répliatif qui a conduit à la lyse de la cellule hôte et au relargage des bactéries dans le milieu. Après 30 heures post-infection (hpi), des bactéries non-répliatif ont survécu dans les cellules hôtes et ce durant toute l'observation d'une durée de 4 jours. Le pourcentage de cellules infectées a diminué graduellement passant de 27% à 2,5 hpi à 13% à 4 jours post-infection. Corroborant ces résultats, une étude préliminaire a analysé qualitativement la dynamique de réplication de *S. aureus* au sein d'une cellule épithéliale²⁸⁹. La réplication dans cette cellule a débuté à 9 hpi, la morphologie de la cellule hôte s'est modifié à 13,5 hpi. En effet, il a été observé plusieurs fois que la multiplication intracellulaire de *S. aureus* s'est accompagné de la contraction de la cellule hôte, d'une perte d'adhérence, et d'une lyse apoptotique induisant le relargage des bactéries dans le milieu extracellulaire^{245,289,302,303}. Ce phénotype n'est observé que plus

tard durant l'infection pour des mutants $\Delta scpA$ n'exprimant pas la staphopaine A alors que la réplication intracellulaire n'est pas impactée (Fig. 14)²⁴⁵. La survenue tardive de la modification morphologique de la cellule hôte ainsi que de sa lyse confère à *S. aureus* $\Delta scpA$ une niche dans laquelle il peut s'y multiplier plus longtemps. Cette différence d'impact sur le phénotype de la cellule hôte se retrouve dans la méthode des CFU. En effet, un plus grand nombre de colonies ont été retrouvées chez le mutant corroborant ainsi le maintien d'une niche intracellulaire favorisant la multiplication.

3.7. Localisation intracellulaire et dynamique de réplication de *S. aureus*

Classiquement, il a été suggéré que *S. aureus* se répliquait dans le cytosol des CPNP après échappement de sa vacuole^{290,335}. Tandis que dans les cellules phagocytaires professionnelles hôtes la réplication des survivants aurait lieu dans les vacuoles. Un faisceau d'indices tend à démontrer qu'au sein des CPNP, *S. aureus* est doué de réplication dans l'ensemble des niches où il se trouve. Des résultats similaires ont été obtenus au sein de cellules phagocytaires professionnelles où la réplication de *S. aureus* a été observée au sein de vacuoles, phagolysosomes ou dans le cytosol³³⁶⁻³³⁸.

3.7.1. Evidence pour une multiplication cytosolique

L'étude du nombre de bactéries intracellulaires capables de former des colonies sur gélose d'agar au cours du temps a mis en évidence la capacité de réplication de *S. aureus* au sein de cellules épithéliales ayant un phénotype de mucoviscidose tandis que dans les cellules complémentées *S. aureus* serait non répliatif²⁹⁹. Dans les cellules épithéliales ayant un phénotype de mucoviscidose, *S. aureus* se retrouve majoritairement en groupe cytosolique tandis que dans les cellules complémentées il est décoré de marqueurs membranaires. L'échappement vacuolaire a ainsi été défini comme un prérequis pour la réplication de *S. aureus*. A l'inverse le maintien dans la vacuole contraindrait le phénotype non répliatif de *S. aureus*.

Une étude qualitative par microscopie en temps réel et quantitative par cytométrie combinée à la méthode de dénombrement des CFU a suggéré que l'échappement de la vacuole de résidence de *S. aureus* est suivi par sa multiplication dans le cytosol²⁴⁵. L'échappement vacuolaire et la multiplication ont été étudiés dans des expériences indépendantes. La dynamique d'échappement coïncidant avec la dynamique de réplication les auteurs ont émis l'hypothèse que la réplication de *S. aureus* a eu lieu dans le cytosol. Toutefois il ne peut être exclu que la multiplication s'est déroulée dans les vacuoles avant ou pendant l'échappement en l'absence de mesure directe.

Une étude par microscopie en temps réel a mis en lumière la réplication de la souche SH1000 intracellulaire n'étant pas décoré par le LC3²⁸⁷. L'analyse par microscopie électronique a démontré la présence de *S. aureus* cytosolique présentant des sillons de divisions^{280,287}. Toutefois, au sein de la même étude, *S. aureus* présentant des sillons de divisions a été retrouvé détourné soit par une large vacuole à simple membrane soit par un système multi-membranaire²⁸⁰.

3.7.2. Evidence pour une multiplication vacuolaire

Contrastant avec les résultats précédents, d'autres études ont démontré la capacité de *S. aureus* à promouvoir l'autophagie, inhiber la maturation de l'autophagosome en autophagolysosome et de s'y loger et s'y multiplier^{284,285}. Un traitement à la rapamycine, activateur de l'autophagie, a démontré un doublement du contenu bactérien intracellulaire par la méthode des CFU²⁸⁴. Tandis qu'un traitement à la wortmannin, inhibiteur de l'autophagie, a impacté la croissance de *S. aureus* intracellulaire. Parallèlement, l'infection de cellules eucaryotes déficientes ou non pour l'Atg5 et l'étude du contenu bactérien par la méthode de dénombrement des CFU ont suggéré l'importance de l'autophagie dans la réplication²⁸⁵. Notons qu'ici, les études ayant été conduite par la méthode de dénombrement des CFU en point final il ne peut être déterminé si la réplication a eu lieu dans les vésicules d'autophagie ou si elle a été facilitée de manière cytosolique par l'apport de nutriment.

Une analyse par immunofluorescence a démontré la localisation de la population bactérienne répliquative au sein de vacuoles décorées par Lamp1 ou LC3 dans des cellules épithéliales³⁰³. Tandis que des bactéries isolées ou en petits groupes ont été retrouvées dans le cytosol dès 2,5 hpi. La fréquence des bactéries cytosoliques a augmenté au cours de l'infection pour représenter la plupart des bactéries non répliquatives à 96 hpi. Ces résultats ont été confirmés par microscopie électronique démontrant la localisation de bactéries répliquatives au sein de vacuoles claires ou sombres durant les 48 premières heures de l'infection. Puis, à 72 hpi et à 96 hpi, toutes les bactéries retrouvées ont été cytosoliques. Le parallèle avec la dynamique de réplication observée en microscopie en temps réel suggère que les populations non répliquatives survivent dans le cytosol de manière quiescente durant plusieurs jours.

Subséquentement, une analyse en microscopie électronique a démontré la localisation de groupes bactériens dans de larges structures vacuolaires notamment à 1 hpi et 7 hpi coïncidant avec le pic de réplication des souches employées^{280,339}. A l'inverse, la souche HG001 a été retrouvée en petits groupes dans des petites vacuoles sombres dès 2 hpi. Enfin, des bactéries présentant des sillons de divisions, suggérant une réplication active ou passée, ont été retrouvées par microscopie électronique dans des vacuoles multi-membranaires²⁸⁰.

Ainsi, la dynamique de réplication de *S. aureus* au sein de cellules hôtes n'a été que très peu étudiée en temps réel par microscopie. Aucune étude n'a investigué la dynamique de réplication de *S. aureus* intracellulaire *in vivo*. L'analyse quantitative au niveau de la cellule unique est manquante et l'impact d'antibiotique sur la dynamique de réplication n'a pas été investigué en dehors des travaux de recherche présentés dans ce manuscrit à ma connaissance. De plus, des études complémentaires sont nécessaires pour élucider la dynamique de réplication de *S. aureus* intracellulaire en fonction de sa localisation, vacuolaire ou non, de manière directe. L'avancée des techniques de microscopies, notamment photoniques par la découverte des protéines fluorescentes, permet de suivre la dynamique de réplication et la localisation intracellulaire en temps réel. Une multitude d'informations peuvent être obtenues, cartographiant ainsi l'infection, par une seule approche de microscopie.

3.8. **Activité intraostéoblastique des antibiotiques contre *S. aureus***

Tel qu'exposé dans cette introduction, *S. aureus* est le pathogène prédominant des IOA. Il est associé à un fort risque de rechute et de chronicité pouvant être dû à sa capacité d'internalisation et de survie dans les cellules osseuses phagocytaires non-professionnelles telles que les ostéoblastes. Ce réservoir intracellulaire protège *S. aureus* de l'action du système immunitaire et de la plupart des antibiotiques. A ce jour, la stratégie antimicrobienne des IOA est basée principalement sur les tests standards de susceptibilité, la pénétration osseuse des antibiotiques et leurs capacités à cibler les biofilms.

Malgré le rôle potentiel des *S. aureus* intracellulaires dans la chronicisation et la rechute des IOA, la capacité des antibiotiques à cibler le réservoir intraostéoblastique n'est pas pris en compte dans le choix thérapeutique alors qu'elle peut représenter une clef du succès.

A la lumière de ces éléments, l'article de revue « *In vitro antibiotic activity against intraosteoblastic Staphylococcus aureus : a narrative review of the literature* » publiée dans le « *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* » a pour but de donner une vue d'ensemble de la pharmacocinétique intracellulaire de molécules anti-staphylococciques utilisées dans le traitement des IOA ainsi que leur capacité à cibler *S. aureus* intraostéoblastique *in vitro*. Cette revue établit également une vue d'ensemble des modèles d'infections ostéoblastiques *in vitro*.

Malgré des différences notables dans les modèles intraostéoblastiques utilisés, tels que les temps d'incubations et les souches bactériennes, les rifamycines et les fluoroquinolones sont les deux classes d'antimicrobiens les plus efficaces pour traiter les *S. aureus* intraostéoblastiques. Cela est en adéquation avec la supériorité de cette combinaison en clinique pour traiter les infections à *S. aureus* sur matériels orthopédiques. Cependant, il est important de noter que l'éradication complète de la

charge bactérienne intraostéoblastique *in vitro* n'a jamais été atteinte quel que soit l'antibiotique et sa concentration utilisée. Ce réservoir peut ainsi être une source potentielle de rechute et de chronicité des infections osseuses.

Article de revue page suivante

In vitro antibiotic activity against intraosteoblastic *Staphylococcus aureus*: a narrative review of the literature

Florian C. Marro^{1,2,3,*†}, Lélia Abad^{1,3,4,†}, Ariel J. Blocker², Frédéric Laurent^{1,3,4,5}, Jérôme Josse^{1,3,5,‡} and Florent Valour^{1,3,5,6,‡}

¹CIRI—Centre International de Recherche en Infectiologie, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Univ Lyon, F-69007 Lyon, France; ²Evotec ID Lyon, In Vitro Biology, Infectious Diseases and Antibacterials Unit, Gerland, 69007 Lyon, France; ³Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France; ⁴Laboratoire de bactériologie, Institut des Agents Infectieux, French National Reference Center for Staphylococci, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France; ⁵Centre de Référence pour la prise en charge des Infections ostéo-articulaires complexes (CRIOAc) Lyon, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France; ⁶Service des maladies infectieuses et tropicales, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

*Corresponding author. E-mail: florian.marro@evotec.com

†These authors contributed equally to this work.

‡These authors contributed equally to this work.

Staphylococcus aureus – a major aetiological agent of bone and joint infection (BJI) – is associated with a high risk of relapse and chronicity, in part due to its ability to invade and persist in non-professional phagocytic bone cells such as osteoblasts. This intracellular reservoir protects *S. aureus* from the action of the immune system and most antibiotics. To date, the choice of antimicrobial strategies for BJI treatment mostly relies on standard susceptibility testing, bone penetration of antibiotics and their ‘antibiofilm’ activity. Despite the role of intracellular persistent *S. aureus* in the development of chronic infection, the ability of antibiotics to target the *S. aureus* intraosteoblastic reservoir is not considered in therapeutic choices but might represent a key determinant of treatment outcome. This review provides an overview of the intracellular pharmacokinetics of antistaphylococcal drugs used in the treatment of BJI and of their ability to target intraosteoblastic *S. aureus*. Thirteen studies focusing on the intraosteoblastic activity of antibiotics against *S. aureus* were reviewed, all relying on *in vitro* models of osteoblast infection. Despite varying incubation times, multiplicities of infection, bacterial strains, and the types of infected cell lines, rifamycins and fluoroquinolones remain the two most potent antimicrobial classes for intraosteoblastic *S. aureus* eradication, consistent with clinical data showing a superiority of this combination therapy in *S. aureus* orthopaedic device-related infections.

Introduction

Bone joint infections (BJI) are polymorphic infections, ranging from native joint septic arthritis to difficult-to-treat chronic osteomyelitis and orthopaedic device-related infections. Apart from the risk of functional sequelae, a major concern are chronic and/or device-associated infections, resulting in a rate of relapse approaching 20% despite complex and costly medical and surgical management.^{1–3} Implicated in up to 30% of cases,^{4,5} *Staphylococcus aureus* is associated with particularly difficult-to-treat BJI, due to persistent phenotypes facilitating chronic infection and relapse.⁶ Among these, internalization and persistence in non-professional phagocytic cells such as osteoblasts represent a well-described interaction of *S. aureus* with its human host.^{6,7} After an active cellular process controlled by the actin cytoskeleton, bacteria are found in an endosome from which they can escape before lysosomal fusion or survive within the phagolysosome,^{8–14} and multiply in the

cytoplasm or vacuoles.^{12,14,15} *S. aureus* infection can also induce osteoblast death, due to intracellular expression of virulence factors such as phenol-soluble modulins (PSMs) or protein A.^{16–18} In addition to participating in bone destruction, cell lysis allows bacterial release into the extracellular medium, and thus the infection of new host cells and persistence of the infection.^{10,13} Additionally, *S. aureus* phenotype switching to small colony variants (SCVs) and persists, morphotypes associated with better intracellular persistence due to their reduced virulence, have been observed intracellularly.^{9,19,20}

This intracellular reservoir allows bacteria to escape the action of the host’s immune system and most antibiotics. Consequently, the intrinsic antistaphylococcal activity, antibiofilm efficacy and bone/joint penetration of antimicrobials might not be sufficient to predict their efficacy in BJI: their ability to eradicate the intracellular bacterial reservoirs could represent an essential determinant of treatment outcome. After the description of intracellular

pharmacokinetics parameters, we present a review of the *in vitro* intraosteoblastic activities of antibiotics against *S. aureus*.

The *in vitro* model of osteoblast infection

Antibiotic activity against intraosteoblastic *S. aureus* has mostly been studied using a conserved lysostaphin/gentamicin protection assay presented in Figure 1. The specific details of the co-culture model design vary slightly among the different studies reviewed. Hence, each step is subject to adaptations that might influence the recorded results (Figure 1, Table 1). Briefly, confluent eukaryotic cells (mostly human osteoblastic primary cells or osteoblastic cell lines) are infected with *S. aureus* (mostly MSSA laboratory strains) at a defined inoculum [multiplicity of infection (moi) ranging from 0.5–500 bacteria per cell, 100:1 being the most frequent]. After a variable co-incubation time allowing bacterial adhesion and internalization, a non-permeant drug—either gentamicin or lysostaphin—is added to the culture medium to exclusively kill the remaining extracellular bacteria. Extracellular pressure with lysostaphin or gentamicin can then be maintained to prevent bacteria released by cell lysis infecting neighbouring cells.¹⁰ Tested antibiotics are then added into the culture medium for a determined period. Time before treatment—defining ‘acute’ (early treatment after cell infection) or ‘chronic’ (treatment delayed for several days) infection models—is an important parameter, as bacterial wall modifications after long-term intracellular persistence can affect antimicrobial efficacy.²¹ Importantly, the tested doses are mostly multiples of the MIC to allow comparisons, or the clinical bone concentration, but cellular pharmacokinetic/

pharmacodynamic (PK/PD) assessments are lacking (except in one study²²), limiting interpretation of results. Finally, remaining intracellular bacteria are enumerated by plating cell lysates, and compared with untreated infected cells. Of note, this technique cannot account for viable but non-growing bacteria, despite the phenotypical heterogeneity of the surviving intracellular bacterial population.^{23,24} To overcome this limitation, flow cytometry or microscopy assays have been proposed. Furthermore, monitoring the delay in appearance and the size of colonies helps to evaluate the ratio of SCV in the surviving population.^{25–27} Infection-induced cytotoxicity can also be recorded by MTT reduction, propidium iodide incorporation or lactate dehydrogenase (LDH)-release assays.^{26,28–31} One study additionally investigated the impact of antimicrobials on intraosteoblastic PSM secretion.³¹

Pharmacokinetics and intraosteoblastic activity of antistaphylococcal antibiotics

Knowing both the intraosseous and intracellular PK parameters of antibiotics is a prerequisite to understanding their potential activity against *S. aureus* subcellular reservoirs. All PK parameters relevant for the interpretation of intraosteoblastic activity of antimicrobials are reported in Table 2.

Bone concentrations of antimicrobials achieved in clinical practice are unclear, due to the absence of standardized conditions for PK parameter measurement (dose, number of administrations before sampling), the heterogeneity of antimicrobial penetration between cancellous and cortical bone, and impact of local

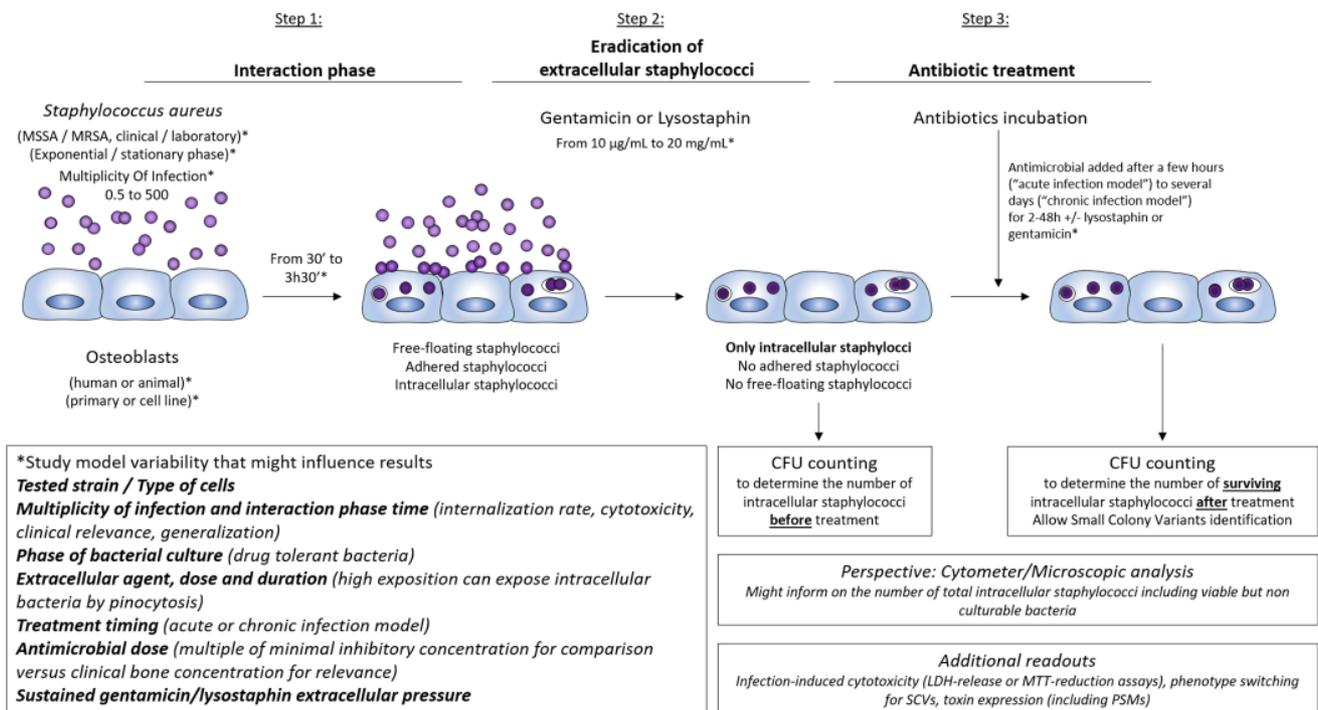


Figure 1. Principles of the gentamicin/lysostaphin assays evaluating the efficacy of antimicrobials against intraosteoblastic *S. aureus* eradication, focusing on experimental variable conditions. This figure appears in colour in the online version of *JAC* and in black and white in the print version of *JAC*.

Table 1. Summary of the reviewed studies focusing on the experimental parameters influencing the assessment of intraosteoblastic activity of antimicrobials

Reference	Eukaryotic model	Prokaryotic strain				Bacterial state	Extracellular killing agent/ concentration and time	Time of co-incubation and extracellular killing before antibiotics addition (37°C)	Antibiotic MIC (mg/L)	Concentration (clinically mimicking)	Time of antibiotic incubation (h)
		MSSA	MRSA	Multiplicity of infection ^a	Multiplicity of infection ^a						
Ellington 2006 ²¹	Clonetics normal human NHOst and primary mouse osteoblasts	UAMS-1 (ATCC 49230, CDC 587)		125	Stationary phase	Gentamicin 25 mg/L (Sustained)	3.75 h or 15.75 h	Erythromycin (8) Rifampicin (20) Clindamycin (4)	1×MIC	12, 24 and 48	
Lemaire 2010 ²²	Clonetics normal human osteoblasts NHOst		SA238 SA238L	0.5	Exponential phase	Gentamicin (Not specified)	2 h	Linezolid (2 and 16) Radezolid (0.5–1 and 2)	0.01 to 100 mg/L	24	
Kreis 2013 ²⁴	Primary human osteoblast	Cowan I (ATCC 12598, NCTC 8530) Septic arthritis isolate UAMS-1 (ATCC 49230, CDC 587) Chronic osteomyelitis isolate		100	Stationary phase	Lysostaphin 20 mg/L (Not specified)	30 min at RT then 3 h	Tigecycline (ND) Gentamicin (ND) Rifampicin (ND)	10 mg/L 10 mg/L 7 mg/L (serum and tissue)	20 and 40	
Noore 2013 ⁴⁴	Rat osteoblastic cell line UMR-106 (CRL-1661)	One Clinical isolate (ampicillin, cefoxitin and penicillin resistant)		500	Exponential phase	Lysostaphin 50 mg/L (Not sustained, 2 h)	4 h	Clindamycin (ND) Cefazolin (ND)	45 mg/L for both (not specified)	2	
Mohamed 2014 ⁷⁴	SAOS-2 osteoblast-like cell line	EDCC5055 Wound infection isolate Cowan I (ATCC 12598, NCTC 8530)		30	Exponential phase	Lysostaphin 2 × 10 ⁶ mg/L (Not sustained, time not specified)	30 min	Gentamicin (ND) Rifampicin (ND)	30, 100 and 200 mg/L 7.5 mg/L (serum and tissue)	4 and 24	
Sanchez 2015	Primary human osteoblast		SAMMC-58 Clinical isolate (Pulse field type BAMC type 15)	50	Not specified	Gentamicin 200 mg/L (Not sustained, 1 h)	30 min at 4°C then 2 h	Gentamicin (ND) Vancomycin (ND) Rifampicin (ND) Rifabutin (ND) Rifapentine (ND) Rifaximin (ND)	200 mg/L 128 mg/L 32 mg/L 32 mg/L 32 mg/L (not specified)	4 and 24	
Valour 2015 ²⁶	Human osteoblastic cell line MG63 (CRL-1427)	HG001 (NCTC8325, rsBU+) Sepsis isolate		100	Stationary phase	Lysostaphin 10 mg/L (Sustained)	30 min at 4°C then 3 h	Oxacillin (0.094) Ceftaroline (0.19) Clindamycin (0.032) Fosfomycin (2) Vancomycin (1.5) Teicoplanin (1.5) Daptomycin (0.19) Linezolid (1) Ofloxacin (0.5) Rifampicin (0.004) Tigecycline (0.125)	8, 2, 6 and 0.3 mg/L respectively. Concentrations 3 times higher and lower were also investigated. (intraosseous)	10, 4, 4, 6, 3, 5, 24	
Tuchscheer 2015 ²⁵	Primary human osteoblast	6850 SH1000 Two clinical osteomyelitis isolates		50	Stationary phase	Lysostaphin 20 mg/L (Sustained)	3.5 h or 7 days	Cefuroxime (ND) Vancomycin (ND) Rifampicin (ND) Moxifloxacin (ND) Flucloraxacin (ND)	40 mg/L 50 mg/L 20 mg/L 10 mg/L 30 mg/L	48	

Continued

Table 1. Continued

Reference	Eukaryotic model	Prokaryotic strain			Bacterial state	Extracellular bacterial killing agent/ concentration and time	Time of co-incubation and extracellular killing before antibiotics addition (37°C)	Antibiotic MIC (mg/L)	Concentration (clinically mimicking)	Time of antibiotic incubation (h)
		MSSA	MRSA	Multiplicity of infection ^a						
Dupieux 2017 ⁴⁰	Human osteoblastic cell line MG63 (CRL-1427)	<i>meCA::kana</i> LUG359 (COL)	LUG359 (COL)	100	Stationary phase	Lysostaphin 10 mg/L (Sustained)	3 h	Linezolid (ND) Daptomycin (ND) Clindamycin (ND) Fosfomycin (ND) Gentamicin (ND) Daptomycin (0.064 and 0.19 at pH 7) Oxacillin (0.25 and >256 at pH 7) Ceftazoline (0.125 and 0.25 at pH 7) Linezolid (1.5) Tedizolid (0.25)	20 mg/L 60 mg/L 20 mg/L 250 and 500 mg/L 20 and 140 mg/L (serum) 5 mg/L 10 mg/L 4 mg/L (intraosseous)	24
Abad 2018 ³⁰	Human osteoblastic cell line MG63 (CRL-1427)	6850 Two clinical isolates	/	100	Stationary phase	Lysostaphin 10 mg/L (Sustained)	3 h	Rifampicin (0.016, 0.012, 0.008, 0.008, 0.008, 0.012, 0.008, 0.008, 0.012 respectively) Levofloxacin (0.19, 0.19, 0.13, 0.19, 0.25, 0.13, 0.19, 0.13, 0.19, 0.25, respectively) Rifabutin (0.031, 0.031, 0.062 respectively) Rifapentin (0.062, 0.031, 0.062) Rifampicin (0.016, 0.008, 0.031)	2.5, 10 and 40×MIC for both (intraosseous and plasma) 2.5 and 5 mg/L 3 and 6 mg/L (cortical and cancellous intraosseous)	24
Mendez 2019 ²⁷	Human osteoblastic cell line MG63 (CRL-1427)	Ten clinical isolate (117-1, 116-1, 804-1, 221-1, 111-1, 806-1, 201-1, 401-1, 203-1, 104-1) Seattle 1945 (ATCC 25923)		100		Lysostaphin 10 mg/L (Sustained)	3 h			
Abad 2020 ³¹	Human osteoblastic cell line MG63 (CRL-1427)	6850 Two clinical isolates		100	Stationary phase	Lysostaphin 10 mg/L (Sustained)	3 h or 7 days		0.1, 1, 10 and 100× MIC for all (intraosseous)	24
Yu 2020 ²⁸	RFP-labelled mouse osteoblast cell line MC3T3-E1		GFP-labelled USA300 (ATCC BAA-171)	10	Exponential phase	Not treated	3 h		10 mg/L 100 mg/L 100 mg/L 50 mg/L 4 mg/L (arbitrary from studies investigating concentration range)	1 to 14

ND, not defined.

^aMultiplicity expressed as number of bacteria per osteoblast.

Table 2. Pharmacokinetics parameters and intraosteoblastic activity of the main antistaphylococcal antimicrobials used in bone and joint infection

Class/ antibiotic	C_{bone}/C_{plasma}	C_{bone} (mg/L)	CE	Sub-cellular localization	Intraosteoblastic bacterial load decreased (C_{used})	Intraosteoblastic activity ^a	Intraosteoblastic activity in 'chronic' model	Small Colony Variant phenotype switching
β -Lactams								
Penicillins								
Oxacillin	0.17 ²⁶	4–10 ^{26,33}	<1 ^{34,36,38,62}	Cytosol ^{83,84}	24%–43% (10 mg/L)	Moderate	–	Decreased
Flucloxacillin	0.12–1.2 ³²	7.2–89.5 ^{33,85,86}			75% (30 mg/L)	Moderate	Lost	Not affected
Cephalosporins								
Ceftaroline	0.19 ²⁶	4 ²⁶			30% (4 mg/L)	Moderate	–	Decreased
Cefazolin	0.18 ³²	75.4 ³³			2% (45 mg/L)	Low	–	–
Cefuroxime	0.04–0.08 ³²	–			50% (40 mg/L)	Moderate	Lost	Not affected
Macrolides								
Erythromycin	0.18–0.28 ³²	–	2–13.3 ^{38,53,59}	2/3 Lysosomes	0% (8 mg/L)	None	Lost	–
Azithromycin	2.5–6.3 ³²	–	90–140 ^{59,60}	1/3 Cytosol ^{52,87}	–	–	–	–
Fluoroquinolones								
Levofloxacin	0.36–1.0 ³²	4.6–10 ³³	4–10 ^{55,68–71}	Cytosol ⁷⁰	>99% (3 mg/L)	Good	–	–
Moxifloxacin	0.33–1.05 ³²	2.8 ³³			75% (30 mg/L)	Moderate	Conserved	–
Ofloxacin	0.09–1.04 ³²	2 ²⁶			>99.9% (2 mg/L)	Good	–	Decreased
Aminoglycosides								
Gentamicin	0.17–33 ⁸⁵	1.6–4.6 ⁸⁵	<1–4 ^{38,53}	Lysosomes ⁵³	0%–99% (10–200 mg/L)	Moderate	Conserved	Increased
Lincosamides								
Clindamycin	0.21–0.45 ³²	6.9 ³³	5–20 ^{35,38,61}	Lysosomes Cytosol ^{64,88}	23%–99.9% (1.33–42 mg/L)	Good (variable de- pending on the studies)	Lost	Increased
Cyclines								
Tigecycline	0.35–1.95 ³²	0.3 ²⁶	64 ⁶⁶	–	99.9% (0.3 mg/L)	Good	–	Decreased
Rifamycins								
Rifampicin	0.08–0.56 ³²	1.3–6.5 ³³	2–10 ^{62,72}	Probably phagosomes ⁸⁹	60%–99.9% (0.8–32 mg/L)	Good	Conserved	Increased/Decreased (variable depending on the studies)
Rifapentine	–	–	60–87 ⁷³		45%–85% (3.1×10^{-2} –32 mg/L)	Moderate	Conserved	Increased
Rifabutin	–	–	–		55%–95% (3.1×10^{-3} –32 mg/L)	Good	Conserved	Increased
Glycopeptides								
Vancomycin	0.05–0.67 ³²	3.8–4.5 ³³	1.22–>10 ^{49,50}	Lysosomes ⁴⁵	0%–75% (6–128 mg/L)	Moderate	Conserved	Not affected
Teicoplanin	0.05–0.85 ³²	3 ²⁶	3.9–60 ^{46,49,50}		0% (3 mg/L)	None	–	–
Oxazolidinones								
Linezolid	0.4–0.51 ³²	6.3–9.1 ⁹⁰	1 ⁶⁷	Lysosomes, cytosol ⁸¹	0%–99.9% (2.67–20 mg/L)	Good	Conserved	Decreased/Not affected (variable depending on the studies)
Tetrazolid	–	–	–		0%–56% (0.625–10 mg/L)	Moderate	–	–
Radezolid	–	–	9.7 ²²		50% (1 mg/L)	Moderate	–	–

Continued

Table 2. Continued

Class/antibiotic	$C_{\text{bone}}/C_{\text{plasma}}$	C_{bone} (mg/L)	C/E	Sub-cellular localization	Intraosteoblastic bacterial load decreased (C_{used})	Intraosteoblastic activity ^a	Intraosteoblastic activity in 'chronic' model	Small Colony Variant phenotype switching
Other								
Fosfomycin	0.13–0.45 ³²	4 ²⁶	1.8 ⁴⁸	-	>99% (4 mg/L)	Good	Lost	Increased/Decreased (Variable depending on the studies)
Daptomycin	0.08 ⁹²	3.3–3.4 ⁹²	<1 ^{49,50}	-	0%–75% (1.7–60 mg/L)	Moderate	Lost	Decreased/Not affected (Variable depending on the studies)

^aThe intraosteoblastic activity was categorized as follow depending on the intraosteoblastic bacterial load reduction: none (0%), low (<15%), moderate (15%–90%), good (>90%).

inflammation/infection on final tissue concentrations.^{32,33} Values proposed here represent the best estimates presented to date.^{32,33}

Almost all studies of cellular pharmacokinetics of antibiotics have been conducted on professional phagocytic cells in *in vitro* models, generally using fluorescently labelled molecules. Results are expressed by the ratio between cellular and extracellular drug concentration (C/E), which defines low (C/E < 1), intermediate (C/E = 1) and good (C/E > 1) cellular penetration. Again, values presented here constitute estimates, but actual cellular accumulation may vary according to the antimicrobial PK profile, including linearity of drug accumulation over time and according to extracellular concentration, protein binding, and possible active influx/efflux transporters.

Antibiotics targeting the bacterial wall

β -Lactams

Penicillins diffuse weakly into eukaryotic cells (C/E < 1),^{34–38} with the exception of cloxacillin with a C/E of 4.7.³⁹ Oxacillin showed bactericidal activity and decreased the intracellular load of MSSA.⁴⁰ Surprisingly, it also reduced MRSA intraosteoblastic load, possibly due to local conditions. Indeed, low pH in intracellular organelles allows a conformational change of PBP2a, restoring the activity of β -lactams against MRSA.^{41–43} Of note, a total loss of flucloxacillin activity was observed in a chronic infection model.²⁵ Similarly impeded by a low C/E ratio, cefazolin showed a weak intracellular activity,⁴⁴ and cefuroxime lost its activity on long-term intracellular-persisting bacteria.²⁵ Among new generation anti-MRSA cephalosporins, ceftaroline exhibited bacteriostatic intraosteoblastic activity and reduced the intracellular bacterial load by 30%.^{26,40}

Glycopeptides and lipoglycopeptides

Vancomycin shows slow and modest accumulation in macrophages.⁴⁵ Teicoplanin, a more lipophilic compound, has a higher and faster accumulation (C/E = 60).⁴⁶ However, they were both ineffective or only bacteriostatic toward intraosteoblastic *S. aureus* at clinically relevant concentrations.^{26,28} At higher concentrations, vancomycin was shown to be efficacious, including in a chronic infection model.^{25,29} Dalbavancin decreases intraosteoblastic load by 50% at intraosseous concentrations, with no difference compared with vancomycin.⁴⁷

Fosfomycin

Fosfomycin displays a moderate intracellular accumulation, with a reported C/E ratio of 1.8.⁴⁸ It exhibited bactericidal activity with a significant intracellular load decrease within osteoblasts but lost its activity in the chronic infection model, even at high concentrations.^{25,26}

Daptomycin

Daptomycin penetrates weakly in eukaryotic cells (C/E = 0.7),^{49,50} and was poorly effective against MSSA and MRSA intracellular load at clinical concentrations during short incubation periods.^{26,40} Daptomycin was however more efficient when used at

higher concentration during 24 h or 48 h of incubation,²⁶ and lost its activity in the chronic infection model.²⁵

Antibiotics acting on bacterial protein synthesis

Aminoglycosides

Aminoglycosides have often been described as extracellular antimicrobials ($C/E < 1$).^{34,51,52} However, studies on macrophages and fibroblasts have shown that prolonged cell exposure allowed an increase in the aminoglycosides' C/E ratio up to 2 to 4.⁵³ A time-dependent activity of gentamicin at 10 mg/L on *S. aureus* intracellular load was consequently highlighted,⁵⁴ sustained in the chronic model.²⁵ Because gentamicin is not able to diffuse into cells, its ability to target intracellular *S. aureus* could be due to infection-related pinocytosis allowing gentamicin to penetrate concomitantly in the same subcellular compartment as the bacteria. If aminoglycosides are not used in the long-term treatment of BJI, these results do not support the use of gentamicin for extracellular bacteria killing in these models—and especially not as sustained extracellular antibiotic pressure.

Macrolides

Macrolides show high C/E ratios in most cell types.^{55–58} However, the ratio varies considerably depending on molecules, from 4 for erythromycin to 140 for azithromycin. The absorption and efflux of macrolides is generally rapid (3 to 15 min), with the notable exception of azithromycin.^{59,60} Erythromycin showed a bacteriostatic activity in an acute infection model, but rapidly lost its activity against persisting bacteria.²¹

Lincosamides

Clindamycin accumulated well in eukaryotic cells, with $C/E > 5$.^{35,38,61} Clindamycin used at relevant clinical concentrations impeded the growth of intraosteoblastic *S. aureus* when added early after infection, while no effect was recorded later.²¹ However, conflicting results have been observed, probably due to differences between the models.^{25,26,44}

Cyclines

The ability of tetracyclines to accumulate in eukaryotic cells is moderate ($C/E = 1–7$),^{62–65} with a superiority of tigecycline and minocycline, with C/E s up to 64.⁶⁶ Tigecycline allowed a significant decrease of intraosteoblastic *S. aureus* load,²⁶ enhanced by prolonged exposure time.⁵⁴

Oxazolidinones

Linezolid has been shown to reach poor intracellular concentrations ($C/E \sim 1$).^{22,67} Used at bone or human serum concentration, linezolid significantly reduced the intraosteoblastic bacterial load and maintained its activity in 'chronic' infection models.^{25,26} Additionally, linezolid and tedizolid displayed a strain-dependent activity against intraosteoblastic *S. aureus*, as highlighted in different clinical isolates despite similar MICs.³⁰ Of note, radezolid, a more lipophilic oxazolidinone, has better intracellular accumulation ($C/E = 11$) and was more potent than linezolid against intraosteoblastic bacteria, making it a promising alternative in BJI treatment.²²

Antibiotics acting on nucleic acid production

Fluoroquinolones

Cellular concentrations of fluoroquinolones are generally 4 to 10 times higher than in extracellular environment.^{55,68–71} Used at clinical concentrations, ofloxacin and levofloxacin had bactericidal activity with a decrease of $>99.5\%$, while moxifloxacin reduced the intracellular load of *S. aureus* by 75%.^{25–27} Moxifloxacin remained active in chronic infection models, with about 90% decrease of the intraosteoblastic bacterial load.²⁵

Rifamycins

They represent the most potent antimicrobials to eradicate intraosteoblastic *S. aureus*. Rifampicin accumulates intracellularly with a C/E ranging from 2 to 10, while rifapentine has higher C/E ratios from 60 to 80.^{62,72,73} In the acute infection model, rifampicin killed more than 99.9% of intraosteoblastic bacteria in a time-dependent manner after 20–48 h,^{21,26,54,74} even though less-impressive results have been reported in another study.²⁷ In the study by Ellington *et al.*,²¹ efficacy of rifampicin rapidly decreased as the bacterial intracellular persistence time increased. However, maintained rifampicin efficacy in the chronic infection model has been reported.²⁵ Some studies compared rifampicin with the other members of the rifamycin family (rifabutin, rifapentine and rifaximin) showing similar excellent efficacy.^{29,31} Further, rifabutin was the only rifamycin able to significantly decrease the intraosteoblastic bacterial load at low concentration ($0.1 \times \text{MIC}$) in the 'acute' and 'chronic' models.³¹ This higher activity is probably due to its 100-fold higher oil/water partition coefficient compared with rifampicin and it might be a clinical alternative to rifampicin in the BJI setting.

Inter-class comparison

The main challenge when aiming to compare the intraosteoblastic activity of antibiotics from different classes against *S. aureus* lies in the choice of tested concentrations. Indeed, clinical concentrations (i.e. intraosseous or plasma concentrations for example) are sometimes very different. The use of multiple of MICs that include clinically relevant concentrations appears to be the more relevant for direct comparison. Additionally, the possible inter-strain variability and other variable experimental conditions discussed above make comparisons even more difficult. Nevertheless, a trend of antibiotic activity against intraosteoblastic *S. aureus* may be extrapolated (Figure 2, Table 2). Daptomycin and vancomycin appeared to be the least-potent drugs, having at best a bacteriostatic effect with concentrations similar to the clinical intraosseous one. Cefazolin, ceftaroline and teicoplanin have bacteriostatic activity at osseous concentrations. Drugs having significant bactericidal activity toward intraosteoblastic *S. aureus* at clinically relevant concentration are fosfomycin, oxazolidinones, tigecycline, fluoroquinolones, rifamycins and clindamycin. Among these, rifamycins, fluoroquinolones and clindamycin were the most efficient with activity recorded even at the minimal concentration tested, including against long-term persisting *S. aureus* for rifampicin and moxifloxacin.

Antibiotic combinations

Given that combination therapies—and especially rifampicin-based ones^{75,76}—have shown a clinical superiority in the treatment of *S. aureus* BJI, the evaluation of antimicrobials alone or in combination with regard to their intraosteoblastic activity against *S. aureus* appears relevant.

Rifampicin has been evaluated in combination with levofloxacin, tigecycline and vancomycin, with no clear advantages of combinations.^{27,28,54} This observation might be due to the already optimal activity of rifampicin alone in this model.

Despite the unclear clinical application, gentamicin has been evaluated in combination with tigecycline, vancomycin and cefalexin, showing no clear benefits.^{28,54}

Combination of daptomycin with oxacillin was significantly more potent than either antibiotic alone against MSSA and MRSA isolates. Moreover, the combination of daptomycin and ceftaroline was significantly more effective than daptomycin alone against MSSA (but not MRSA) to eradicate intraosteoblastic bacteria.⁴⁰

Antibiotics and osteoblast survival

Beyond the ability of antimicrobials to eradicate intracellular *S. aureus*, their capacity to prevent infection-induced cytotoxicity represents another important specific effect in BJI.

First, few studies assessed the toxicity of antibiotics themselves toward uninfected osteoblasts. Using an LDH release assay, Valour *et al.*²⁶ tested a large panel of antistaphylococcal molecules, and found no antibiotic-induced cytotoxicity at high concentration (3× the clinical bone concentration). Conversely, rifampicin, rifabutin,

rifapentine and rifaximin induced >40% cell death after 24 h but used at doses largely above bone concentrations (≥ 64 mg/L) using an MTT-reduction assay.²⁹ Also based on MTT cleavage, linezolid and tedizolid had no significant impact on osteoblast viability.³⁰

Regarding the impact of antimicrobials on osteoblast infection-induced cytotoxicity, these studies showed that molecules reducing the intracellular *S. aureus* load consequently decreased infection-induced cellular damage.^{28,30} The greatest reduction in cytotoxicity was observed with vancomycin and rifampicin in combination.

Surprisingly, antimicrobial treatment was sometimes associated with an increase of viable cells even in conditions where no impact was observed on intracellular bacterial counts, as for rifapentine at $0.1 \times \text{MIC}$ or both linezolid and tedizolid,^{30,31} suggesting an impact on intracellular toxin secretion. This hypothesis was further investigated for rifamycins, highlighting an antibiotic-driven reduction of the intracellular expression of PSMs.³¹ However, there is no doubt that such protein-synthesis-inhibiting antimicrobials impede other intracellular toxin secretions and thus prevent infection-induced cytotoxicity. Rifabutin had the highest preventing effect compared with both rifapentine and rifampicin and this effect was already maximal at $0.1 \times \text{MIC}$.³¹

Antibiotics and intracellular formation of drug-tolerant bacteria

Prolonged intracellular persistence of *S. aureus* led to a decrease in efficacy of some antibiotics, as highlighted in the chronic infection models. The specific physiology of the bacteria at chronic stages

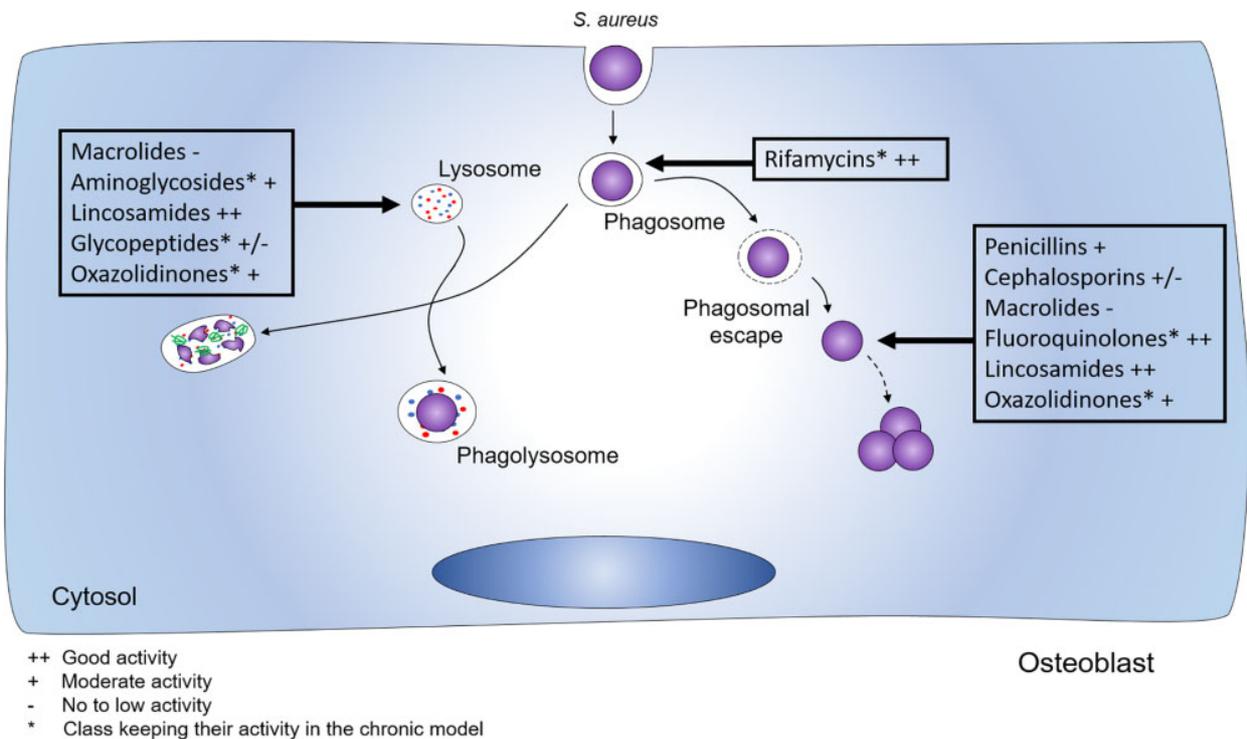


Figure 2. Intraosteoblastic activity of antistaphylococcal drugs. This figure appears in colour in the online version of *JAC* and in black and white in the print version of *JAC*.

might consequently impede the efficacy of antibiotics. Of note, none of the tested drugs eradicated the entire intracellular *S. aureus* population under any of the tested conditions within either the 'acute' or 'chronic' models.

While all the antibiotics tested using human serum concentrations were significantly effective in reducing the intracellular bacterial load using the 'acute' cell infection model, only rifamycins, gentamicin, moxifloxacin, linezolid and vancomycin retained this ability in the 'chronic' stage.²⁵ In contrast, cefuroxime, flucloxacillin, daptomycin, fosfomycin, erythromycin and clindamycin lost their ability to kill long-term intraosteoblastic-persisting *S. aureus* becoming antibiotic specifically drug-tolerant.²⁵ Using a transmission electron microscopy approach, Ellington *et al.*²¹ showed that the cell surface of intraosteoblastic *S. aureus* was altered compared with extracellular bacteria. Actually, the thickness of the bacterial surface increased after intraosteoblastic passage, depending on intracellular life duration, since the proportion of the bacterial population possessing this altered capsular material increased with exposure time. This phenotypic change might explain the appearance of drug-tolerance.

A significant emergence of SCVs in the 'chronic' cell infection model was observed in the absence of treatment.²⁵ Challenging infected cells with ofloxacin, rifampicin and daptomycin at bone concentrations significantly reduced the percentage of SCVs. Likewise, oxacillin, ceftaroline, linezolid, fosfomycin, and tigecycline decreased the emergence of SCVs only at the highest concentration used.²⁶ In contrast, gentamicin, fosfomycin at 500 mg/L and clindamycin significantly enhanced the emergence of intraosteoblastic SCVs after 48 h of treatment.²⁵ Moreover, a significant increase of SCV formation after treatment with rifapentine, rifabutin and rifampicin alone or in combination with levofloxacin at cortical and cancellous bone concentrations was demonstrated.^{27,31}

The increase of drug-tolerance during the 'chronic' stage appears to be drug-dependent and further investigations remain to be performed to elucidate its underlying mechanism.

Conclusions

This review provides the first comparative analysis of the available literature regarding antimicrobial ability to eradicate the intraosteoblastic reservoir of *S. aureus*, which might represent a key determinant of BJI treatment outcome, given the importance of bacterial internalization within bone cells for BJI chronicity and relapse. The heterogeneity of experimental conditions—especially moi, duration of intracellular bacterial persistence before treatment and antimicrobial concentrations used—advocates for a more standardized approach, using clinically relevant settings. These results emphasize that beyond cellular penetration of antimicrobials, intraosteoblastic activity has more complex and multifactorial determinants, including their subcellular distribution and impact of local biochemical conditions (pH).

Among the antimicrobials used in the clinical setting, rifamycins (and especially rifabutin) and fluoroquinolones appear to be the more potent drugs for intraosteoblastic *S. aureus* reservoir eradication, reflecting the superiority of these combinations in the treatment of orthopaedic device-associated infections.^{76–78} However, total eradication of intracellular bacteria is never achieved. Bacterial colonies are observed on agar plates when lysates from antibiotic-challenged osteoblasts are seeded, highlighting the

presence of drug-tolerant intracellular bacteria that could participate in infection relapse. Among those, SCVs and persisters can emerge, for which results are more controversial due to the absence of consensual definitions of these phenotypes, and to the balance between antimicrobial efficacy against these phenotypes and their emergence under antimicrobial pressure. Combination therapies might limit these potential sources of infection persistence, but rifampicin-based combination therapies failed to show superiority compared with rifampicin alone, probably due to the already optimal activity of rifampicin alone in the experimental conditions. On the contrary, the weak intracellular activity of daptomycin might be enhanced by its combination with a β -lactam antibiotic, especially oxacillin. Another striking aspect is the ability of antimicrobials to reduce infection-induced cytotoxicity. The reduction of osteoblast damage induced by protein synthesis inhibitors (and especially rifamycins and oxazolidinones), even in the absence of antibacterial activity, suggests their impact on intracellular bacterial toxin secretion.

Finally, some innovative approaches have been suggested to improve antibiotic efficacy intracellularly. For example, the use of bacterial efflux pump inhibitors can be considered for vancomycin.⁷⁹ Given the impact of the intracellular vacuole acidic pH on antibiotic activity, alkalinizing agents can also be promising, as shown for coxiellosis.^{80,81} For example, an antibody-antibiotic conjugate allowing release of drugs after opsonized *S. aureus* internalization by intracellular proteases is also under investigation.⁸²

Funding

This study was carried out as part of our routine work.

Transparency declarations

None to declare.

References

- Grammatico-Guillon L, Baron S, Gettner S *et al.* Bone and joint infections in hospitalized patients in France, 2008: clinical and economic outcomes. *J Hosp Infect* 2012; **82**: 40–8.
- Laurent E, Gras G, Druon J *et al.* Key features of bone and joint infections following the implementation of reference centers in France. *Med Mal Infect* 2018; **48**: 256–62.
- Weston V, Jones A, Bradbury N *et al.* Clinical features and outcome of septic arthritis in a single UK Health District 1982–1991. *Ann Rheum Dis* 1999; **58**: 214–9.
- Titécát M, Senneville E, Wallet F *et al.* Épidémiologie bactérienne des infections ostéo-articulaires dans un centre de référence: étude sur 10 ans. 2013. *Rev Chir Orthopédique Traumatol* 2013; **99**: 543–9.
- Triffault-Fillit C, Ferry T, Laurent F *et al.* Microbiologic epidemiology depending on time to occurrence of prosthetic joint infection: a prospective cohort study. *Clin Microbiol Infect* 2019; **25**: 353–8.
- Josse J, Velard F, Gangloff SC. *Staphylococcus aureus* vs. osteoblast: relationship and consequences in osteomyelitis. *Front Cell Infect Microbiol* 2015; **5**: 85.
- Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E *et al.* *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev* 2015; **28**: 603–61.

- 8 Giese B, Dittmann S, Paprotka K et al. Staphylococcal alpha-toxin is not sufficient to mediate escape from phagolysosomes in upper-airway epithelial cells. *Infect Immun* 2009; **77**: 3611–25.
- 9 Schröder A, Kland R, Peschel A et al. Live cell imaging of phagosome maturation in *Staphylococcus aureus* infected human endothelial cells: small colony variants are able to survive in lysosomes. *Med Microbiol Immunol* 2006; **195**: 185–94.
- 10 Ellington JK, Harris M, Webb L et al. Intracellular *Staphylococcus aureus*. A mechanism for the indolence of osteomyelitis. *J Bone Joint Surg Br* 2003; **85**: 918–21.
- 11 Hudson MC, Ramp WK, Nicholson NC et al. Internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured osteoblasts. *Microb Pathog* 1995; **19**: 409–19.
- 12 Kubica M, Guzik K, Koziel J et al. A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS One* 2008; **3**: e1409.
- 13 Jubrail J, Morris P, Bewley MA et al. Inability to sustain intraphagolysosomal killing of *Staphylococcus aureus* predisposes to bacterial persistence in macrophages. *Cell Microbiol* 2016; **18**: 80–96.
- 14 Flannagan RS, Heit B, Heinrichs DE. Intracellular replication of *Staphylococcus aureus* in mature phagolysosomes in macrophages precedes host cell death, and bacterial escape and dissemination. *Cell Microbiol* 2016; **18**: 514–35.
- 15 Olivier AC, Lemaire S, Van Bambeke F et al. Role of rsbU and staphyloxanthin in phagocytosis and intracellular growth of *Staphylococcus aureus* in human macrophages and endothelial cells. *J Infect Dis* 2009; **200**: 1367–70.
- 16 Rasigade J-P, Trouillet-Assant S, Ferry T et al. PSMs of hypervirulent *Staphylococcus aureus* act as intracellular toxins that kill infected osteoblasts. *PLoS One* 2013; **8**: e63176.
- 17 Davido B, Saleh-Mghir A, Laurent F et al. Phenol-soluble modulins contribute to early sepsis dissemination not late local USA300-osteomyelitis severity in rabbits. *PLoS One* 2016; **11**: e0157133.
- 18 Claro T, Widaa A, O'Seaghda M et al. *Staphylococcus aureus* protein A binds to osteoblasts and triggers signals that weaken bone in osteomyelitis. *PLoS One* 2011; **6**: e18748.
- 19 Tuchscher L, Heitmann V, Hussain M et al. *Staphylococcus aureus* small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. *J Infect Dis* 2010; **202**: 1031–40.
- 20 Peyrusson F, Varet H, Nguyen TK et al. Intracellular *Staphylococcus aureus* persists upon antibiotic exposure. *Nat Commun* 2020; **11**: 2200.
- 21 Ellington JK, Harris M, Hudson MC et al. Intracellular *Staphylococcus aureus* and antibiotic resistance: implications for treatment of staphylococcal osteomyelitis. *J Orthop Res* 2006; **24**: 87–93.
- 22 Lemaire S, Kosowska-Shick K, Appelbaum PC et al. Cellular pharmacodynamics of the novel biarylloxazolidinone radezolid: studies with infected phagocytic and nonphagocytic cells, using *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes*, and *Legionella pneumophila*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 2549–59.
- 23 Helaine S, Cheverton AM, Watson KG et al. Internalization of salmonella by macrophages induces formation of nonreplicating persisters. *Science* 2014; **343**: 204–8.
- 24 Manina G, Dhar N, McKinney JD. Stress and host immunity amplify *Mycobacterium tuberculosis* phenotypic heterogeneity and induce nongrowing metabolically active forms. *Cell Host Microbe* 2015; **17**: 32–46.
- 25 Tuchscher L, Kreis CA, Hoerr V et al. *Staphylococcus aureus* develops increased resistance to antibiotics by forming dynamic small colony variants during chronic osteomyelitis. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 438–48.
- 26 Valour F, Trouillet-Assant S, Riffard N et al. Antimicrobial activity against intraosteoblastic *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 2029–36.
- 27 Meléndez-Carmona MÁ, Muñoz-Gallego I, Viedma E et al. Intraosteoblastic activity of levofloxacin and rifampin alone and in combination against clinical isolates of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* causing prosthetic joint infection. *Int J Antimicrob Agents* 2019; **54**: 356–60.
- 28 Yu K, Song L, Kang HP et al. Recalcitrant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection of bone cells: intracellular penetration and control strategies. *Bone Joint Res* 2020; **9**: 49–59.
- 29 Sanchez CJ, Shiels SM, Tennent DJ et al. Rifamycin derivatives are effective against staphylococcal biofilms in vitro and elutable from PMMA. *Clin Orthop Relat Res* 2015; **473**: 2874–84.
- 30 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. *J Antimicrob Chemother* 2019; **74**: 625–32.
- 31 Abad L, Josse J, Tasse J et al. Antibiofilm and intraosteoblastic activities of rifamycins against *Staphylococcus aureus*: promising in vitro profile of rifabutin. *J Antimicrob Chemother* 2020; **75**: 1466–73.
- 32 Landersdorfer CB, Bulitta JB, Kinzig M et al. Penetration of antibacterials into bone: pharmacokinetic, pharmacodynamic and bioanalytical considerations. *Clin Pharmacokinet* 2009; **48**: 89–124.
- 33 Thabit AK, Fatani DF, Bamakhrama MS et al. Antibiotic penetration into bone and joints: an updated review. *Int J Infect Dis* 2019; **81**: 128–36.
- 34 Jacobs RF, Wilson CB. Intracellular penetration and antimicrobial activity of antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1983; **12** Suppl C: 13–20.
- 35 Hand WL, King-Thompson NL. Uptake of antibiotics by human polymorphonuclear leukocyte cytoplasm. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; **34**: 1189–93.
- 36 Koga H. High-performance liquid chromatography measurement of antimicrobial concentrations in polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; **31**: 1904–8.
- 37 Hand WL, King-Thompson N, Holman JW. Entry of roxithromycin (RU 965), imipenem, cefotaxime, trimethoprim, and metronidazole into human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; **31**: 1553–7.
- 38 Prokesch RC, Hand WL. Antibiotic entry into human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; **21**: 373–80.
- 39 Barcia-Macay M, Seral C, Mingeot-Leclercq M-P et al. Pharmacodynamic Evaluation of the Intracellular Activities of Antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a Model of THP-1 Macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 841–51.
- 40 Dupieux C, Trouillet-Assant S, Camus C et al. Intraosteoblastic activity of daptomycin in combination with oxacillin and ceftaroline against MSSA and MRSA. *J Antimicrob Chemother* 2017; **72**: 3353–6.
- 41 Lemaire S, Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq M-P et al. Role of acidic pH in the susceptibility of intraphagocytic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains to meropenem and cloxacillin. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 1627–32.
- 42 Lemaire S, Fuda C, Van Bambeke F et al. Restoration of susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to β -lactam antibiotics by acidic pH: role of penicillin-binding protein PBP 2a. *J Biol Chem* 2008; **283**: 12769–76.
- 43 Baudoux P, Bles N, Lemaire S et al. Combined effect of pH and concentration on the activities of gentamicin and oxacillin against *Staphylococcus aureus* in pharmacodynamic models of extracellular and intracellular infections. *J Antimicrob Chemother* 2007; **59**: 246–53.

- 44 Noore J, Noore A, Li B. Cationic antimicrobial peptide LL-37 is effective against both extra- and intracellular *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 1283–90.
- 45 Beauchamp D, Gourde P, Simard M et al. Subcellular localization of tobramycin and vancomycin given alone and in combination in proximal tubular cells, determined by immunogold labeling. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; **36**: 2204–10.
- 46 Maderazo EG, Breaux SP, Woronick CL et al. High teicoplanin uptake by human neutrophils. *Chemotherapy* 1988; **34**: 248–55.
- 47 Chauvelot P, Dupieux-Chabert C, Abad L et al. Intraosteoblastic activity of dalbavancin during treatment of *Staphylococcus aureus* bone and joint infection. *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Paris, France, 2020*. Abstract P2440.
- 48 Höger PH, Seger RA, Schaad UB et al. Chronic granulomatous disease: uptake and intracellular activity of fosfomycin in granulocytes. *Pediatr Res* 1985; **19**: 38–44.
- 49 Van der Auwera P, Matsumoto T, Husson M. Intraphagocytic penetration of antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1988; **22**: 185–92.
- 50 Van der Auwera P, Prinz G, Petrikos G. Activity of intracellular antibiotics. *Infection* 1991; **19** Suppl 4: S216–223.
- 51 Vaudaux P, Waldvogel FA. Gentamicin antibacterial activity in the presence of human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 1979; **16**: 743–9.
- 52 Carlier MB, Zenebergh A, Tulkens PM. Cellular uptake and subcellular distribution of roxithromycin and erythromycin in phagocytic cells. *J Antimicrob Chemother* 1987; **20** Suppl B: 47–56.
- 53 Tulkens P, Trouet A. The uptake and intracellular accumulation of aminoglycoside antibiotics in lysosomes of cultured rat fibroblasts. *Biochem Pharmacol* 1978; **27**: 415–24.
- 54 Kreis CA, Raschke MJ, Roßlenbroich SB et al. Therapy of intracellular *Staphylococcus aureus* by tigecyclin. *BMC Infect Dis* 2013; **13**: 267.
- 55 Carryn S, Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq M-P et al. Comparative intracellular (THP-1 macrophage) and extracellular activities of β -lactams, azithromycin, gentamicin, and fluoroquinolones against *Listeria monocytogenes* at clinically relevant concentrations. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 2095–103.
- 56 Tyteca D, Van Der Smissen P, Mettlen M et al. Azithromycin, a lysosomotropic antibiotic, has distinct effects on fluid-phase and receptor-mediated endocytosis, but does not impair phagocytosis in J774 macrophages. *Exp Cell Res* 2002; **281**: 86–100.
- 57 Tyteca D, Van Der Smissen P, Van Bambeke F et al. Azithromycin, a lysosomotropic antibiotic, impairs fluid-phase pinocytosis in cultured fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 2001; **80**: 466–78.
- 58 Ouadrhiri Y, Scoreaux B, Sibille Y et al. Mechanism of the Intracellular Killing and Modulation of Antibiotic Susceptibility of *Listeria monocytogenes* in THP-1 Macrophages Activated by Gamma Interferon. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**: 1242–51.
- 59 Montenez JP, Van Bambeke F, Piret J et al. Interactions of macrolide antibiotics (Erythromycin A, roxithromycin, erythromyclamine [Dirithromycin], and azithromycin) with phospholipids: computer-aided conformational analysis and studies on acellular and cell culture models. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; **156**: 129–40.
- 60 Van Bambeke F, Gerbaux C, Michot JM et al. Lysosomal alterations induced in cultured rat fibroblasts by long-term exposure to low concentrations of azithromycin. *J Antimicrob Chemother* 1998; **42**: 761–7.
- 61 Easmon CS, Crane JP. Cellular uptake of clindamycin and lincomycin. *Br J Exp Pathol* 1984; **65**: 725–30.
- 62 Hand WL, Corwin RW, Steinberg TH et al. Uptake of antibiotics by human alveolar macrophages. *Am Rev Respir Dis* 1984; **129**: 933–7.
- 63 Najar I, Oberti J, Teyssier J et al. Kinetics of the uptake of rifampicin and tetracycline into mouse macrophages. In vitro study of the early stages. *Pathol Biol (Paris)* 1984; **32**: 85–9.
- 64 Laufen H, Wildfeuer A. Kinetics of the uptake of antimicrobial agents by human polymorphonuclear leucocytes. *Arzneimittelforschung* 1989; **39**: 233–5.
- 65 Walters JD. Characterization of minocycline transport by human neutrophils. *J Periodontol* 2006; **77**: 1964–8.
- 66 Ong CT, Babalola CP, Nightingale CH et al. Penetration, efflux and intracellular activity of tigecycline in human polymorphonuclear neutrophils (PMNs). *J Antimicrob Chemother* 2005; **56**: 498–501.
- 67 Pascual A. Uptake and Intracellular Activity of Linezolid in Human Phagocytes and Nonphagocytic Cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 4013–5.
- 68 García I, Pascual A, Ballesta S et al. Uptake and intracellular activity of ofloxacin isomers in human phagocytic and non-phagocytic cells. *Int J Antimicrob Agents* 2000; **15**: 201–5.
- 69 Memin E, Panteix G, Revol A. Is the uptake of pefloxacin in human blood monocytes a simple diffusion process? *J Antimicrob Chemother* 1996; **38**: 787–98.
- 70 Carlier MB, Scoreaux B, Zenebergh A et al. Cellular uptake, localization and activity of fluoroquinolones in uninfected and infected macrophages. *J Antimicrob Chemother* 1990; **26** Suppl B: 27–39.
- 71 Seral C, Carryn S, Tulkens PM et al. Influence of P-glycoprotein and MRP efflux pump inhibitors on the intracellular activity of azithromycin and ciprofloxacin in macrophages infected by *Listeria monocytogenes* or *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2003; **51**: 1167–73.
- 72 Höger PH, Vosbeck K, Seger R et al. Uptake, intracellular activity, and influence of rifampin on normal function of polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; **28**: 667–74.
- 73 Pascual A, Tsukayama D, Kovarik J et al. Uptake and activity of rifapentine in human peritoneal macrophages and polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Clin Microbiol* 1987; **6**: 152–7.
- 74 Mohamed W, Sethi S, Domann E et al. Intracellular proliferation of *S. aureus* in osteoblasts and effects of rifampicin and gentamicin on *S. aureus* intracellular proliferation and survival. *Eur Cell Mater* 2014; **28**: 258–68.
- 75 Lora-Tamayo J, Murillo O, Iribarren JA et al. A large multicenter study of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infections managed with implant retention. *Clin Infect Dis* 2013; **56**: 182–94.
- 76 Senneville E, Joulie D, Legout L et al. Outcome and predictors of treatment failure in total hip/knee prosthetic joint infections due to *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2011; **53**: 334–40.
- 77 Puhto A-P, Puhto T, Niinimäki T et al. Predictors of treatment outcome in prosthetic joint infections treated with prosthesis retention. *Int Orthop* 2015; **39**: 1785–91.
- 78 Becker A, Kreitmann L, Triffaut-Fillit C et al. Duration of rifampin therapy is a key determinant of improved outcomes in early-onset acute prosthetic joint infection due to *Staphylococcus* treated with a debridement, antibiotics and implant retention (DAIR): a retrospective multicenter study in France. *J Bone Joint Infect* 2020; **5**: 28–34.
- 79 Dusane DH, Kyrouac D, Petersen I et al. Targeting intracellular *Staphylococcus aureus* to lower recurrence of orthopaedic infection. *J Orthop Res* 2018; **36**: 1086–92.
- 80 Maurin M, Benoliel AM, Bongrand P et al. Phagolysosomal alkalization and the bactericidal effect of antibiotics: the *Coxiella burnetii* paradigm. *J Infect Dis* 1992; **166**: 1097–102.

- 81** 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. *Clin Microbiol Infect* 2021; S1198-743X(21)00218-4.
- 82** Lehar SM, Pillow T, Xu M *et al.* Novel antibody-antibiotic conjugate eliminates intracellular *S. aureus*. *Nature* 2015; **527**: 323-8.
- 83** Carryn S, Chanteux H, Seral C *et al.* Intracellular pharmacodynamics of antibiotics. *Infect Dis Clin North Am* 2003; **17**: 615-34.
- 84** Tulkens PM. Intracellular distribution and activity of antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; **10**: 100-6.
- 85** Torkington MS, Davison MJ, Wheelwright EF *et al.* Bone penetration of intravenous flucloxacillin and gentamicin as antibiotic prophylaxis during total hip and knee arthroplasty. *Bone Joint J* 2017; **99-B**: 358-64.
- 86** Parsons R, Beavis J, Laurence M *et al.* Plasma, bone, hip capsule and drain fluid concentrations of ampicillin and flucloxacillin during total hip replacement after intravenous bolus injection of magnapen. *Br J Clin Pharmacol* 1978; **6**: 135-43.
- 87** Carlier MB, Garcia-Luque I, Montenez JP *et al.* Accumulation, release and subcellular localization of azithromycin in phagocytic and non-phagocytic cells in culture. *Int J Tissue React* 1994; **16**: 211-20.
- 88** Klemmner MS, Styrt B. Clindamycin uptake by human neutrophils. *J Infect Dis* 1981; **144**: 472-9.
- 89** Solberg CO, Halstensen A, Digraanes A *et al.* Penetration of antibiotics into human leukocytes and dermal suction blisters. *Clin Infect Dis* 1983; **5**: S468-73.
- 90** Lovering AM. Penetration of linezolid into bone, fat, muscle and haematoma of patients undergoing routine hip replacement. *J Antimicrob Chemother* 2002; **50**: 73-7.
- 91** Lemaire S, Tulkens PM, Van Bambeke F. Cellular pharmacokinetics of the novel bicyclic oxazolidinone radezolid in phagocytic cells: studies with macrophages and polymorphonuclear neutrophils. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 2540-8.
- 92** Montange D, Berthier F, Leclerc G *et al.* Penetration of daptomycin into bone and synovial fluid in joint replacement. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 3991-6.



4. Staphylococcus aureus et les persisters

4.1. Découverte et définitions

4.1.1. Aux origines de la découverte

4.1.1.1. Découverte *in vitro*

L'observation de bactéries persistantes à un traitement antibiotique a été rapportée pour la première fois en 1944 par Joseph Bigger³⁴⁰ qui introduisit le terme de « persisters ».

Durant l'étude du mécanisme d'action de la pénicilline contre *Staphylococcus pyogenes*, il a remarqué l'occurrence d'un petit nombre de survivants. Ces survivants étaient distribués de manière aléatoire selon les expériences avec un taux d'apparition de rarement plus d'un par million. Il a qualifié ces survivants de persisters « *to denote their power of surviving in the presence of sufficient penicillin to be lethal for the normal forms* ». Bigger a distingué les bactéries résistantes des persistantes par le fait que les descendants de ces dernières, qui ont survécu un premier contact à la pénicilline, présentaient un taux similaire de persisters. Il a donc défini les persisters comme des « *cocci with no greater resistance to penicillin than normal but which happen to be, when exposed to it, in a phase in which they are insusceptible to its action* ».

Afin d'étudier le mécanisme d'action de la pénicilline, des cultures ont été traitées à cette dernière et incubées à 4°C, à température ambiante, ou à 37°C. Bigger a ainsi démontré que la diminution de température augmentait le nombre de colonies retrouvées. En parallèle, il a traité à la pénicilline des cultures de *S. pyogenes* rendues présumément non répliquatives et a démontré l'absence de réduction du contenu bactérien. Deux ans auparavant, Hobby avait traité à la pénicilline ou non une phase stationnaire de streptocoque hémolytique qu'il avait incubé à 4°C, 18°C ou 37°C durant 48 heures³⁴¹. Il a ainsi démontré que le nombre de bactéries n'augmentait pas dans le contrôle ni ne diminuait dans la condition traitée à la pénicilline. Il a répété l'expérience avec des cultures diluées contenant moins de bactéries. A 4°C les résultats ont été identiques à la première expérience. Cependant, à 18°C, il a noté une faible croissance dans le contrôle et une activité modérée de la pénicilline visible par une diminution du contenu bactérien. A 37°C, la multiplication a été rapide dans le contrôle et l'action antibactérienne de la pénicilline a été marquée. Il conclut donc que la pénicilline était capable d'éliminer les bactéries uniquement en présence d'une répllication active. Les résultats ont été similaires avec de l'acide carbolique. Bigger définit ces expériences comme soutenant l'hypothèse suivante, sans toutefois pouvoir la démontrer : les persisters de *S. aureus* sont des bactéries qui survivent à un traitement de pénicilline par un état de dormance et non répliquatif³⁴⁰.

Ce n'est que 60 ans plus tard, avec les progrès techniques de la microscopie et de la fluorescence, qu'une sous-population de persisters non répliatifs a été mise en lumière chez une autre espèce bactérienne : *Escherichia coli*³⁴². Toutefois, seulement une partie des bactéries non répliatives ont survécu au traitement antibiotique. Ceci suggère donc que l'absence de répliation chez *E. coli* pourrait être nécessaire mais non suffisante pour persister à un traitement d'ampicilline. Notons également que dans cette étude les persisters ont été définis comme ayant la capacité de se diviser au retrait du traitement antibiotique. Ceci masque donc la sous-population de persisters viable et non répliatifs qui après l'arrêt du traitement antibiotique restent non répliatifs pendant le temps d'observation.

Bigger a démontré que lorsque la pénicilline est détruite, par l'action de la pénicillinase, la majorité des persisters se développent normalement, bien que dans certains cas ils restent quiescents sur plusieurs jours. Les populations répliatives résultantes ont présenté les mêmes caractéristiques de sensibilité que les populations initiales.

Il a de plus émis l'hypothèse que malgré la présence de pénicilline, l'urgence biologique de se multiplier pourrait contraindre les persisters à sortir de leur dormance devenant ainsi susceptibles à l'action de la pénicilline.

4.1.1.2. Suggestion d'applications cliniques

Pendant la période contemporaine de Bigger, les IOA étaient habituellement traitées à l'aide de pénicilline pendant 7 à 8 jours. Cependant à la fin du traitement et dans la plupart des cas l'infection redevenait active. Il émit l'hypothèse que ces rechutes étaient dues à la présence de persisters se multipliant de nouveau après l'arrêt du traitement antibiotique³⁴⁰.

Il a donc suggéré l'application d'un traitement antibiotique continu à long terme permettant l'élimination des persisters. Le traitement s'étendant sur plusieurs semaines permettrait de couvrir la sortie de quiescence stochastique de l'ensemble des persisters malgré la présence de pénicilline les rendant ainsi sensible à cette dernière. Parallèlement, il a proposé un traitement antibiotique séquentiel consistant en une succession de période de traitement antibiotique et de période sans traitement. Durant la première phase de traitement les bactéries sensibles seraient éliminées tandis que les persisters survivraient. La succession d'une phase sans traitement permettrait aux persisters de sortir de leur état de quiescence et donc de devenir sensible à la pénicilline lors de la période de traitement antibiotique suivante. Bigger a proposé un planning dans lequel, des phases de traitement antibiotique et des phases de repos se succèdent pendant 19 jours. Enfin, il a noté que malgré

l'utilisation de pénicilline, l'assistance d'interventions chirurgicales pour collecter les pus, réservoirs de persisters, ne devait pas être négligés.

4.1.2. Une palette de définitions

Il existe une palette de définitions des persisters, celles-ci sont majoritairement dépendantes des laboratoires de recherches et est une source d'un intense débat³⁴³⁻³⁴⁶. Ces définitions incluent le plus souvent la ou les caractéristiques phénotypiques de la sous-population étudiée. Par exemple, selon les études, un persister est non répliatif ou répliatif^{342,347-350}, dormant ou non^{343,351}. Dans le prisme des travaux de recherche présentés dans ce manuscrit, la définition de persisters correspond à la définition première qui en a été faite par Bigger à savoir que les persisters représentent une sous-population de bactéries, initialement présentes dans une population clonale, qui lorsqu'exposée à un antibiotique bactéricide sont dans une phase, probablement de dormance et non répliative, les rendant insensibles à son action. Leurs descendants présentent un taux de persisters similaire à la population initiale³⁴⁰. En l'absence de biomarqueurs des persisters, seule un traitement antibiotique permet de les mettre en lumière. Notons que les *small colony variants* (SCV), reliés aux IOA chroniques, sont définis notamment d'après leur caractéristique phénotypique sur gélose d'agar via la formation de colonies de tailles réduites. Ainsi, un SCV peut être ou non un persister selon qu'il persiste ou non à un traitement antibiotique sans transmettre cette persistance à sa descendance.

Afin d'appréhender au mieux la notion de persistance nous devons la mettre en regard aux notions de résistance, hétérorésistance et de tolérance (Fig. 15)^{344,345}. Une bactérie résistante est une bactérie capable de survivre à un traitement antibiotique en concentration bactéricide à l'aide de facteurs de résistance obtenus notamment par modifications génétiques d'après un ancêtre non résistant. Une population résistante se caractérise par sa capacité à se multiplier à des concentrations d'antibiotiques normalement bactéricides. La résistance est principalement obtenue par l'expression de pompe d'efflux ou de modification de la cible de l'antibiotique. Ainsi, la résistance est héréditaire et généralement spécifique à une classe ou une molécule unique.

L'hétérorésistance, aussi appelée résistance phénotypique, définit la capacité d'une sous-population de bactéries à survivre et proliférer lors d'un traitement antibiotique par l'apparition hétérogène de facteurs de résistance au sein d'une population clonale sensible. *In vitro* l'hétérorésistance se caractérise par une courbe en rebond lors d'un traitement antibiotique. Les bactéries de la population sensible vont être éliminées par le traitement antibiotique tandis que les bactéries hétérorésistantes vont survivre tout en se multipliant. L'hétérorésistance peut se maintenir pendant plusieurs

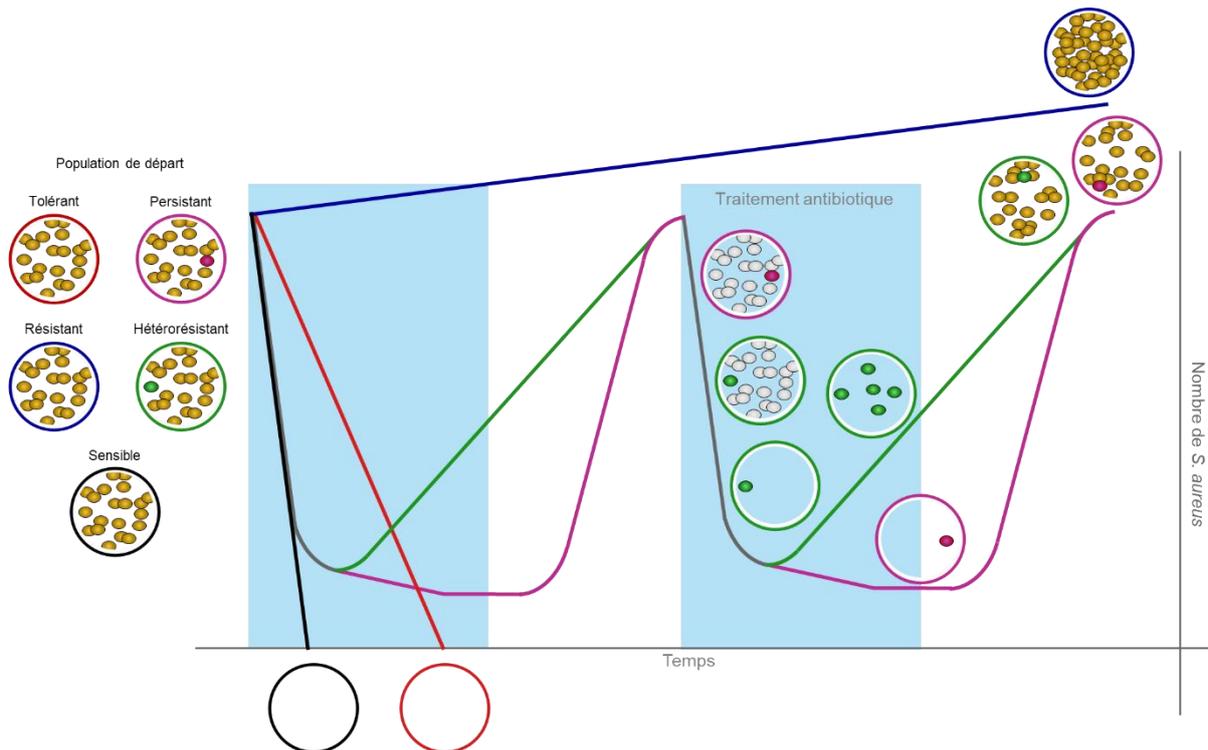


Figure 15 : Résistance, hétérorésistance, tolérance, et persistance aux antibiotiques.

générations jusqu'à former des colonies sur géloses. Cependant, puisque ce type de résistance est intrinsèquement instable, elle est fréquemment perdue au retrait du traitement antibiotique et la fréquence des bactéries hétérorésistantes retourne donc à la normale. Les descendants sont alors composés d'individus sensibles et d'hétérorésistants. Comme la résistance, l'hétérorésistance est spécifique d'une classe ou d'une molécule unique. Puisque la majorité des individus de la population de départ sont sensibles à l'antibiotique, la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la population est comparable à celle d'une population sensible.

Une bactérie tolérante est une bactérie capable de survivre à un traitement antibiotique bactéricide plus longtemps qu'une bactérie sensible. Pour qu'une population soit considérée comme tolérante il faut que l'ensemble de ses individus soit tolérant à l'antibiotique. La tolérance peut être le résultat d'un taux de croissance ralenti par des facteurs environnementaux, ou d'une mutation auxotrophe. En théorie, un long traitement antibiotique devrait éradiquer l'ensemble de la population. La tolérance d'une population se caractérise par l'augmentation de la durée minimale d'éradication, autrement dit un taux de mortalité bactérienne plus faible, tandis que généralement la CMI est identique à la population sensible.

Comme défini précédemment, une bactérie persistante est une bactérie non ou lentement répliquative capable de survivre à un traitement antibiotique en concentration bactéricide sans facteur de résistance et sans transmission de la persistance aux générations futures au sein d'une population

clonale sensible. Au niveau de la population et *in vitro*, la persistance se caractérise par une courbe dite biphasique lors d'un traitement antibiotique. Les bactéries sensibles de la population vont être tuées par le traitement antibiotique tandis que la sous-population de persisters va survivre. La réversion de la persistance au cours du traitement antibiotique va éliminer les révertants devenus sensibles jusqu'à atteindre un plateau, seuil auquel les persisters restant ne révertent plus. A l'arrêt du traitement antibiotique, les persisters restant vont donner naissance à une nouvelle population hétérogène contenant des bactéries sensibles et des persisters. Le taux de persisters est stable au fil des générations et son phénotype est transitoire.

4.2. Etat de l'art

Bien que la découverte et la définition des persisters a été faite chez le genre *Staphylococcus*, seulement quelques études ont été conduites chez *S. aureus* comparativement à celles effectuées chez d'autres espèces telles que *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, ou encore *Mycobacterium tuberculosis*. Les persisters ont été retrouvés communément au sein de différentes espèces^{344,345}.

4.2.1. Persisters de *S. aureus in vitro*

4.2.1.1. Persisters planctoniques

Ce n'est que 60 ans plus tard, à la suite des travaux de Bigger, que l'étude des persisters de *S. aureus* a connu un rebond. Les antibiotiques suivants ont permis de mettre en évidence des persisters de *S. aureus* en culture liquide : rifampicine, ciprofloxacine, flucloxacilline, tobramycine, daptomycine, pénicilline, gentamicine, vancomycine, clindamycine, ampicilline, linézolide, céfoxitine, céfazoline, minocycline, pristinaamycine, acide fusidique, méropénème, imipénème, triméthoprime, tétracycline, cloxacilline, oxacilline³⁵²⁻³⁶⁰. Il a été démontré que la phase de croissance, la souche, le génotype, et

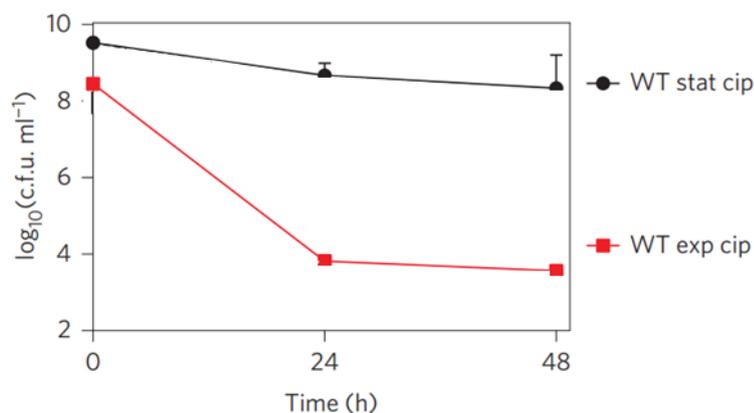


Figure 16 : Persisters de *S. aureus* à la ciprofloxacine en phase exponentielle ou stationnaire de culture planctonique. Modifiée d'après Conlon et al. avec l'autorisation de Springer Nature.

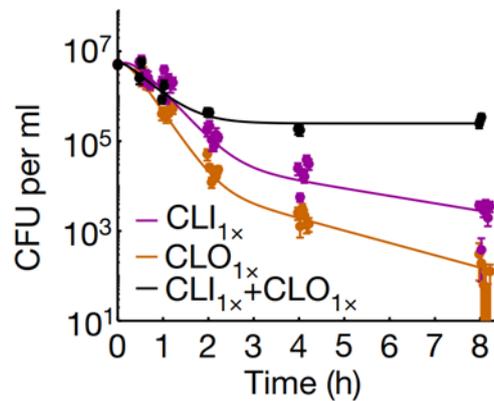


Figure 17 : Effet antagoniste d'antibiotiques sur l'éradication d'une population de *S. aureus* planctonique en phase exponentielle de croissance. (CLI : Clindamycine, CLO : Cloxacilline). D'après Lazar et al. Reproduit avec l'autorisation de Springer Nature.

l'antibiotique ainsi que sa concentration ont un impact sur le taux de persisters de *S. aureus* en culture planctonique^{352,353,356,358,359,361}. Ce taux augmente entre la phase exponentielle et la phase stationnaire de croissance sans regard à la souche et l'antibiotique utilisé (Fig. 16)^{352,353,356}. De plus, selon la souche et l'antibiotique employé, le taux de persisters en phase stationnaire peut correspondre à une proportion variable de la population. En effet, certaines souches traitées en phase stationnaire de croissance à la ciprofloxacine, tobramycine, ou daptomycine vont suivre une courbe biphasique et présenter une partie négligeable de la population persistante à l'antibiotique³⁵⁶. Tandis que d'autres souches vont présenter un taux de bactéries insensibles à l'antibiotique plus élevé voire proche de l'ensemble de la population (Fig. 16)^{353,358}. Notons ici, qu'alors que la phase exponentielle présente une courbe biphasique avec une population de persisters, la phase stationnaire n'en présente pas et se rapporte ainsi à la définition de tolérance. Toutefois, au niveau de la bactérie unique nous pouvons supposer qu'il s'agit d'un mécanisme d'enrichissement de persisters à l'entrée de la phase stationnaire. De plus, selon la souche et l'antibiotique employé, un effet synergique des antibiotiques peut avoir lieu et le maintien du traitement antibiotique peut conduire à l'éradication de l'ensemble des persisters³⁵³. Notons en premier lieu, comme exemple, la souche SA113 en phase stationnaire qu'un traitement de ciprofloxacine a stérilisé en 21 jours. Puis, alors que la daptomycine n'a pas éradiqué la population de persisters et que la tobramycine a eu un effet négligeable tardif, la combinaison des deux a éradiqué les persisters en phase stationnaire³⁵³. Notons également qu'une combinaison d'antibiotiques peut avoir des effets antagonistes sur l'élimination à long terme et que cet effet augmente au plus le nombre d'antibiotiques combinés augmente³⁶⁰. Par exemple, la clindamycine en combinaison avec la cloxacilline a présenté un taux de persisters supérieur à chacun des deux antibiotiques employés seuls (Fig. 17).

La persistance croisée, définie comme la capacité d'un persister à survivre à au moins deux traitements antibiotiques successifs de classes différentes, a été observée par exemple pour la

tobramycine suivie de la ciprofloxacine³⁶¹. Notons enfin que les analyses en point final, c'est-à-dire comparant un taux de CFU initial à un taux après traitement, ne permettent pas d'accéder à la nature biphasique de la courbe et ne peuvent donc pas différencier la persistance de la tolérance.

4.2.1.2. Persisters en biofilms

Tandis qu'un traitement à l'oxacilline, le céfotaxime, la ciprofloxacine, ou la vancomycine d'une culture planctonique en phase stationnaire diluée a éradiqué l'ensemble de la population en 48 heures à forte concentration, le traitement d'un biofilm aux mêmes antibiotiques a mis en lumière une population de bactéries toujours viables à 48 heures même aux plus fortes concentrations en point final³⁶². A l'inverse des antibiotiques précédents, une partie de la population a survécu à un traitement à l'amikacine en culture et en biofilm.

Deux autres études ont démontré la présence de persisters au sein de biofilms à la suite d'un traitement à la ciprofloxacine, la gentamicine, la daptomycine, et la tobramycine se caractérisant par une courbe biphasique^{356,363}. Ici, l'application d'un traitement de vancomycine n'a pas montré d'effet en culture et en biofilm et la ciprofloxacine a mis en lumière des persisters en phase stationnaire. Les différences observées par rapport à la première étude pourraient être le fait des variations de protocole, notamment la dilution de la phase stationnaire concomitante à l'initiation du traitement.

Notons également qu'une étude a démontré que la clindamycine, la gentamicine, et la flucloxacilline n'ont pas d'impact sur la survie des bactéries du biofilm provenant d'isolats cliniques³⁶⁴. Cependant, la lévofloxacine à haute concentration et la rifampicine ont éliminé la majorité des staphylocoques. Les survivants à la rifampicine ont présenté un délai de croissance augmenté sur gélose d'agar et un taux de persisters à la flucloxacilline en culture liquide accru dans 3 isolats sur 4. Un prétraitement à la flucloxacilline n'ayant pas eu d'impact sur la survie bactérienne n'en a pas eu non plus sur le délai de croissance et le taux de persisters de la culture planctonique résultante. Le délai d'action des antibiotiques employés entre la phase planctonique et le biofilm suggère une protection mécanique conférée par la structure de ce dernier.

Ainsi, la présence de persisters de *S. aureus* au sein de biofilms pourrait contribuer à la difficulté de leur éradication complète.

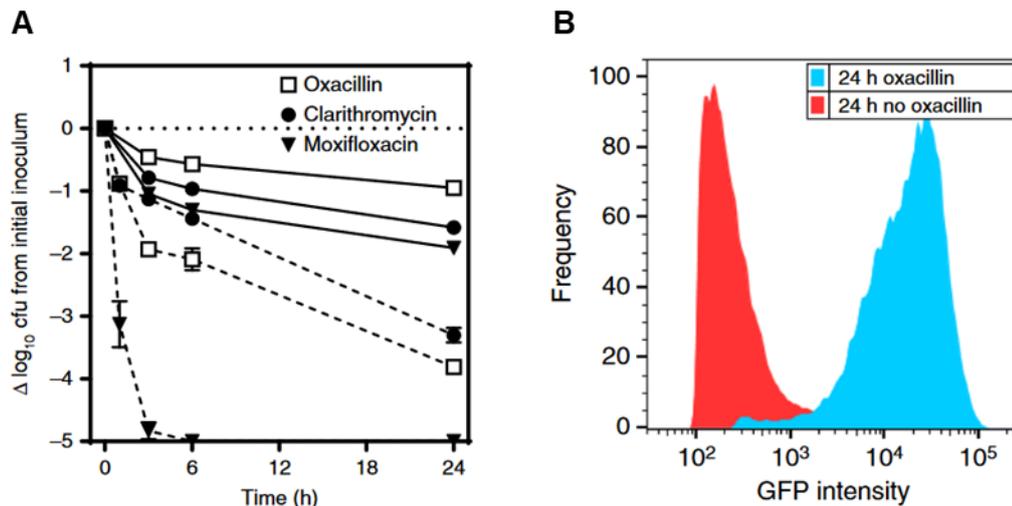


Figure 18 : Persisters non répliatifs de *S. aureus* en culture planctonique et intracellulaires. (A) Courbes biphasiques obtenues par dénombrement des CFU démontrant la présence de persisters en culture planctonique (traits pleins) ou au sein de macrophage (traits discontinus) à l'oxacilline, la clarithromycine, et la moxifloxacine à 50 fois la CMI. (B) Analyse par cytométrie de flux de l'intensité de fluorescence de la GFP de *S. aureus* provenant de macrophages traités à l'oxacilline à 50 fois la CMI (bleu) puis remis en culture pendant 24 heures (rouge). Basé sur le principe de dilution de fluorescence, l'intensité de la GFP, dont l'expression a été induite avant l'infection, présentée en bleu démontre un taux de réplication ralenti à nul tandis que la réduction de l'intensité de la GFP présentée en rouge démontre qu'une réplication a eu lieu. D'après Peyrusson et al. Reproduit avec autorisation.

4.2.2. Persisters de *S. aureus* in cellulo

Lors d'un traitement par l'oxacilline, la clarithromycine, ou la moxifloxacine, les *S. aureus* internalisés dans les macrophages humains ou murins et provenant d'une phase stationnaire de croissance ont présenté une courbe de survie biphasique obtenue par CFU démontrant la présence de persisters (Fig. 18a)^{365,366}. Les persisters retrouvés 48 hpi ont été majoritairement non répliatifs, suite à une analyse en point final, et capable de croître lors d'une remise en culture (Fig. 18b)^{365,366}. Cette culture présente à nouveau une courbe biphasique démontrant ainsi le caractère non héritable de la persistance³⁶⁶. Il est à noter qu'au retrait du traitement antibiotique, les persisters non répliatifs se sont divisés spontanément au sein des cellules hôtes. Ces persisters ont été retrouvés dans des cellules épithéliales, des monocytes, des ostéoblastes et des kératinocytes.

Les persisters intracellulaires retrouvés présentent un profil transcriptomique particulier avec une réduction des gènes impliqués dans le processus métabolique dont certains sont associés à la prolifération tels que la phosphorylation oxydative³⁶⁶. De manière concomitante, l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du galactose pourrait indiquer une altération du réseau métabolique des persisters. De plus, le profil transcriptomique des persisters a démontré un métabolisme actif adapté à la production d'ATP. De manière intéressante, les persisters obtenus par traitement à l'oxacilline ont présenté une persistance croisée à la moxifloxacine, la clarithromycine, et

la gentamicine. Ceci suggère ainsi la présence de multiples mécanismes de persistance induit intracellulairement par l'oxacilline. Les persisters de *S. aureus* intracellulaires ont été accompagnés par l'activation de réponses aux stress telles que la réponse stringente, SOS, et de choc thermique pouvant expliquer cette persistance croisée.

La comparaison du nombre de CFU avec l'énumération par cytométrie de l'ensemble des persisters viables récupérés a permis de mettre en évidence ceux ne formant pas de colonies sur gélose d'agar en 24 heures³⁶⁵. Ce sous-groupe de persisters a été retrouvé en plus forte proportion dans les cellules ayant une production d'espèce radicale de l'oxygène (ROS) accrue. Ils possèdent également un niveau d'ATP plus faible qui est ramené à la normale en traitant les cellules infectées par des antioxydants. Cette déletion d'ATP à la suite du stress oxydatif a conduit à la formation d'agrégats protéiques sombres qui ont été reliés à un défaut de transcription conduisant elle-même à l'augmentation du délai de croissance des persisters sur gélose d'agar. Les persisters présentant un délai de croissance augmenté ont faiblement été retrouvés au sein des monocytes, des cellules épithéliales ainsi que des ostéoblastes de la ligné MG63. Ceci est en adéquation avec leurs faibles propensions à produire des ROS. Les persisters provenant d'environnements intracellulaires ayant une forte production de ROS ont eu la capacité de réinfecter des cellules eucaryotes mais également d'y proliférer en l'absence de traitement antibiotique. La formation d'agrégats protéiques impliqués dans la transcription, la traduction et la production d'énergie a été retrouvé chez les persisters d'une seconde étude³⁶⁷.

Le taux et la dynamique de réplication des persisters de *S. aureus* intracellulaires en temps réel sous traitement antibiotique à concentration clinique est un mécanisme restant à élucider.

4.2.3. Persisters de *S. aureus* *in vivo* et isolats cliniques

Les persisters de *S. aureus* ont également été mis en lumière à l'aide d'étude *in vivo* ainsi qu'utilisant des isolats cliniques *in vitro*.

Des staphylocoques isolés à partir d'un abcès dans un modèle murin et exposés à un traitement de flucloxacilline ou de ciprofloxacine ont présenté un taux de survivant en point final supérieur à une culture en phase stationnaire à pH neutre³⁵⁵. Il n'y a pas eu de différences observées avec un pH acide. Ainsi, un environnement acide pourrait mimer l'environnement rencontré par la bactérie au cours de l'infection.

Parallèlement, l'infection d'un modèle d'abcès murin avec un isolat clinique ou une souche de laboratoire a démontré des différences³⁶⁷. En effet, l'isolat clinique a présenté une plus forte proportion de SCV non stable dû à un retard à la première division et un taux de survivant accru à un

traitement antibiotique *in vitro* et *in vivo*. La caractérisation de la croissance de colonies sur gélose d'agar directement après récupération d'échantillons de patients a démontré une hétérogénéité dans l'apparition et la taille de ces dernières^{364,367}. Les plus forts degrés d'hétérogénéité sont associés à un traitement du patient à la rifampicine ou la vancomycine. De plus, l'hétérogénéité dans l'apparition des colonies corrèle avec une augmentation du nombre de bactéries survivantes à un traitement antibiotique. D'autres études sont requises afin de corréler l'hétérogénéité observée avec le taux de persisters *in situ* et le devenir du patient.

Une étude utilisant des souches cliniques de *S. aureus* a démontré que le taux de survivants est dépendant des souches employées et que ces derniers sont également non réplicatifs *in cellulo*³⁶⁸. Notons également que cette étude a mis en lumière une corrélation entre le taux de persisters de la souche et le développement de résistance à l'antibiotique utilisé.

L'étude de la dynamique de croissance de colonies sur gélose d'agar après traitement antibiotique permet de mettre en évidence la population de persisters d'après les méthodes REPSIS et TDtest (Fig. 19)^{369,370}. Dans le principe, un traitement antibiotique sur gélose d'agar éradique la population sensible de bactéries tandis que la population de persisters non-répliquative survit. L'apparition de colonies dans la zone d'inhibition de l'antibiotique lors du traitement est due au phénomène d'hétérorésistance. Au retrait du traitement antibiotique les persisters sont capables de quitter la quiescence et de former des colonies dans la zone d'inhibition. Le retrait du traitement antibiotique peut-être effectué de deux manières. Soit directement sur la gélose d'agar par le changement des disques de diffusions chargés en antibiotiques contre des disques de diffusion chargés en nutriments. Soit par transfert des bactéries sur une gélose d'agar fraîche sans antibiotique et chargée en nutriments. Le taux de persisters de *S. aureus* a été défini à partir d'isolats cliniques de patients atteints de diverses infections, sans précision sur la proportion d'IOA³⁷¹. Il est à noter que cette étude a permis de mettre en évidence l'application de cette méthode en routine de diagnostic microbiologique dans un contexte hospitalier. Le taux de la sous-population de persisters ainsi étudiée a été relativement élevé pour les antibiotiques ciblant la synthèse des protéines. Il a été faible pour ceux ciblant d'autres fonctions bactériennes telles que la réplication et la transcription de l'ADN. A l'exception de la rifampicine, ainsi que des isolats de patients

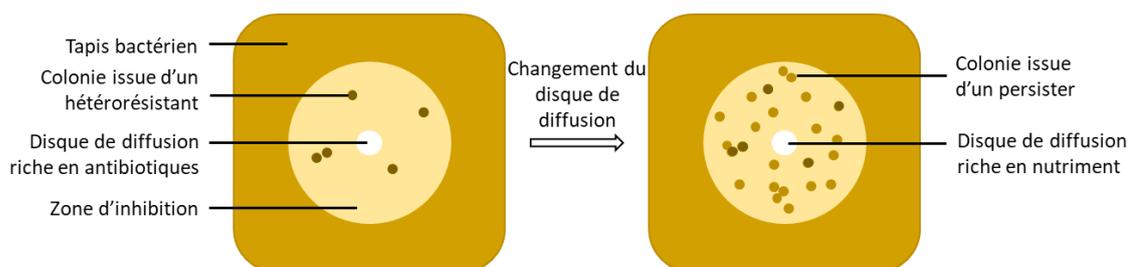


Figure 19 : Principe de la méthode TDtest permettant de mettre en lumière les persisters sur géloses d'agar.

immunodéprimés et ceux résistant à la méticilline. De futures études sont requises pour juger de l'importance de ce diagnostic dans la stratégie thérapeutique. Il est important de noter que ces méthodes ne permettent pas d'énumérer la sous-population de persisters restant en quiescence à l'arrêt du traitement antibiotique et ne formant donc pas de colonies pendant le temps d'incubation.

4.2.4. Mécanismes de la persistance

La capacité de *S. aureus* à tolérer ou persister à un traitement antibiotique serait le fait, au moins en partie, de stress acides, thermiques, osmotiques, et oxydatifs ; de l'activité de l'uréase (*UreG*) ; de la force proton motrice et du TCA (opéron *sdhCAB*, *acnA*, *citC*, *sucA*, *sucB*, *sucC*, *fumC*, *gudA*, *gltA*) ; du niveau d'ATP ; de la biosynthèse des purines et de l'hème (*purB*, *purM*, *hemA*, *hemB*) ; de l'import du glycérol (*glpF*) ; et de l'absence de réplication³⁷²⁻³⁷⁴.

4.2.4.1. Stress environnementaux

Les stress environnementaux peuvent être impliqués dans la capacité d'une bactérie à persister à un stress antibiotique et le stress environnemental lui-même. Les stress environnementaux peuvent être des stress thermiques, acides, osmotiques, et oxydatifs.

Lors d'un stress thermique court d'une culture en phase stationnaire, la présence de persisters à ce stress a été mis en évidence par une courbe biphasique^{372,373,375}. Les mutations $\Delta UreG$, $\Delta SdhA$, $\Delta SdhB$, $\Delta purB$, $\Delta purM$, $\Delta hemA$, et $\Delta hemB$ ont diminué le taux de persisters à ce stress et les complémentations ont restauré en partie les phénotypes de la souche parentale.

Le pH influence également le taux de persisters, notamment contre la flucloxacilline³⁵⁵. En effet, un prétraitement à pH acide a induit une plus grande proportion de persisters en phase exponentielle survivant plus longtemps. A l'inverse il a été démontré que le pH n'a pas d'influence sur la formation de persisters de souches mutantes pour le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA)³⁵⁷. Des mutants $\Delta UreG$, $\Delta SdhA$, $\Delta SdhB$, $\Delta purB$, $\Delta purM$, $\Delta hemA$, et $\Delta hemB$ ont présenté un taux de persisters réduit en stress acide ainsi qu'en stress antibiotiques à la lévofloxacine pour les trois premiers, à la rifampicine et la gentamicine pour les mutants de la synthèse des purines, ainsi qu'à la ciprofloxacine pour les deux derniers mutants^{372,373,375}. Les complémentations ont restauré en partie les phénotypes des souches parentales. Notons que pour les mutants $\Delta UreG$, $\Delta SdhA$, $\Delta SdhB$, en stress acide et oxydatif, l'absence de courbe biphasique indique un mécanisme de tolérance³⁷².

L'application d'un stress osmotique, par l'ajout de 10% de NaCl dans le milieu, a augmenté la proportion de persisters de *S. aureus* à la ciprofloxacine et la gentamicine³⁵⁹.

Un stress oxydatif appliqué par le paraquat, herbicide appartenant à la famille des ammoniums quaternaires et produisant des espèces réactives de l'oxygène, sur une culture planctonique n'a pas eu d'effet sur le taux de persisters dans la population³⁵⁹. Tandis que les mutants $\Delta hemA$ et $\Delta hemB$ ont présenté un taux de persisters réduit sous stress oxydatif par l'ajout de peroxyde d'hydrogène³⁷⁵. Les complémentations ont restauré en partie les phénotypes des souches parentales. De plus, il a été démontré *in cellulo*, que le stress oxydatif par la production de ROS augmente le taux de persisters dont le phénotype se caractérise par l'incapacité à former des colonies en 24 heures sur gélose d'agar³⁶⁵. L'expression de *sigB* bien qu'augmentée sous stress osmotique et oxydatif ainsi que sous traitement antibiotique ne semble pas corrélérer avec le taux de persisters dans la population³⁵⁹.

Ainsi, le métabolisme des purines, la synthèse de l'hème, l'uréase, et le TCA semble être impliqués dans la persistance. De la même manière, un stress thermique, acide, osmotique, et oxydatif met en lumière les persisters et augmente la proportion de ces derniers à un stress antibiotique.

4.2.4.2. Systemes énergétiques

Les systèmes énergétiques de la bactérie tels que l'import de glucose, le TCA, et le niveau d'ATP ont été étudiés afin de déterminer leurs implications dans la persistance.

Une culture en phase stationnaire du mutant $\Delta glpF$ a été plus sensible à l'ampicilline et à la norfloxacine après plusieurs jours de traitement, la complémentation a restauré le phénotype parental³⁷⁴. L'absence de courbe biphasique indique une perte de la tolérance des mutants plutôt que de la persistance.

Une culture en phase stationnaire des mutants du TCA ($\Delta acnA$, $\Delta citC$, $\Delta sucA$, $\Delta sucB$, $\Delta sdhA$, et $\Delta sdhB$) traitée à la ciprofloxacine ou à l'oxacilline a présenté un taux de survivant, mesuré en point final, accru par rapport à la souche parentale³⁵⁷. Une culture en phase stationnaire de la souche parentale traitée à l'oxacilline a présenté une courbe biphasique alors qu'une culture des mutants $\Delta sucA$ et $\Delta sucB$ est devenue plus tolérante avec 1 log de réduction après 7 jours contre 5 log pour la souche parentale. Notons que ces résultats ont été observés pour différentes souches de *S. aureus*. Tel que précédemment, les mutants ne présentent pas de courbe biphasique, ils se rapportent donc à la définition de tolérance. Cependant, le caractère biphasique de la souche parentale laisse à penser à un enrichissement de persisters entre les conditions. De manière similaire, des mutants du TCA ($\Delta gltA$, $\Delta gudB$, $\Delta sucA$, $\Delta sucC$, $\Delta fumC$) ont démontré un taux de survivants en phase exponentielle tardive

supérieur à la souche sauvage à la suite d'un traitement à la ciprofloxacine, à l'oxacilline, et à la gentamicine³⁷⁶. Les mutants $\Delta sucA$ et $\Delta fumC$ ont présenté le plus fort taux de persisters atteignant 10% de la population totale. Tandis que des courbes biphasiques sont distinguables en ciprofloxacine et oxacilline signe de persistance, sous un traitement à la gentamicine un mécanisme de tolérance a été mis en évidence.

Le niveau d'ATP a été mis en évidence comme impliqué dans le taux de survie en phase exponentielle intermédiaire ou tardive^{358,376}. En effet, un traitement à l'arséniate d'une culture en phase exponentielle a démontré un accroissement du taux de survivants à un traitement à la ciprofloxacine³⁵⁸. L'inhibition de la transcription par la rifampicine n'a pas impacté le taux de survivant à l'arséniate indiquant que la réponse transcriptionnelle n'a pas été requise dans la survie. A l'inverse, un milieu riche en glucose favorisant la production d'ATP a réduit le taux de survivants. L'expression des promoteurs *Pcap5A* et *ParcA* est un marqueur du niveau d'ATP. Celle-ci a été augmentée avec l'arséniate ainsi qu'en phase stationnaire, ces promoteurs ont donc été supposés des biomarqueurs des persisters. Toutefois, la réduction du niveau d'ATP pourrait expliquer l'augmentation de la survie sous traitement de ciprofloxacine puisque son activité est ATP dépendante. Parallèlement, les mutants $\Delta gudB$, $\Delta sucA$, $\Delta sucC$, $\Delta fumC$ présentant un taux accru de persisters ont eu un niveau d'ATP plus faible que la souche sauvage³⁷⁶. Notons également, qu'un niveau d'ATP et d'aconitase réduit a été retrouvé chez des persisters d'une autre étude, niveau revenant à la normal suite à l'arrêt du traitement antibiotique³⁶⁷. Ceci a été remis en question par une étude montrant qu'un mutant de l'ATP synthase ($\Delta atpA$) présente un taux surprenant de survivant accru d'environ 1000 fois à la ciprofloxacine par rapport à la souche parentale tandis que les niveaux d'ATP sont similaires³⁵⁷. Malgré la délétion de l'ATP synthase inhibant la phosphorylation oxydative, le niveau d'ATP est maintenu par la phosphorylation au niveau du substrat³⁷⁷. De plus, des persisters intracellulaires n'ont pas montré de différence dans leur contenu en ATP³⁶⁶. Parallèlement, il a été observé *in cellulo*, que les persisters en condition de stress oxydatif fort ont un niveau d'ATP faible qui est ramené à la normal par le traitement d'antioxydant³⁶⁵. Ainsi, l'implication du niveau d'ATP bactérien dans le mécanisme de la persistance n'est à ce jour pas élucidé aux vues des résultats contradictoires obtenus.

En phase stationnaire, la réduction de la force proton motrice (PMF) pourrait être un mécanisme caractéristique des persisters³⁵⁷. En effet, un inhibiteur de cette dernière, le carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone a augmenté le taux de survivants à un traitement antibiotique. De plus, des mutants du TCA et de l'ATP synthase ont présenté une PMF réduite en phase stationnaire et un taux de survivants accru.

Ainsi, ces résultats suggèrent que les composants énergétiques et un métabolisme ralenti de la bactérie pourraient être impliqués dans les mécanismes de la persistance.

4.2.4.3. Modules toxines-antitoxines et réponse stringente

L'implication des modules de toxine-antitoxines (TA) et de la réponse stringente dans le phénotype persisters de *S. aureus* n'est pas clair. Dans une première étude, des mutants du système TA ($\Delta TA3$) et de la réponse stringente (Δrsh et $\Delta codY$) ont suivi les mêmes courbes biphasiques que la souche sauvage lors d'un traitement en phase exponentielle de croissance à la ciprofloxacine et/ou à la rifampicine et à la vancomycine³⁵⁸. Notons ici qu'en phase stationnaire, l'absence de courbes biphasiques se rapporte à la définition de tolérance de la population. Tandis que dans une seconde étude, les gènes *mazF*, *relE1*, *relE2*, et *sprG* du système TA de type 1 et 2 ont été plus exprimés sous traitement antibiotique à la gentamicine et la ciprofloxacine. Ils pourraient donc être impliqués dans la persistance³⁶³. De plus, l'ARN SprF1, une antitoxine de type 1, a été démontré comme impliqué dans la formation de persisters de *S. aureus*, en phase exponentielle de croissance, à la ciprofloxacine et à la vancomycine par la réduction de la traduction *via* la liaison aux ribosomes³⁷⁸. Notons également que des mutants Δrsh et $\Delta codY$ ont présenté *in cellulo* un taux de survivants plus faible que la souche sauvage à l'oxacilline, la clarithromycine, et à la moxifloxacine. Ce taux est variable selon l'antibiotique employé.

4.2.4.4. Divers mécanismes

Les mutants des transporteurs sodiques $\Delta phoU1$ et $\Delta phoU2$ ont présenté un taux de persisters réduit en phase stationnaire après un traitement à la vancomycine et à la lévofloxacine³⁷⁹. A l'inverse, le mutant $\Delta saoB$, antagoniste de SoaC un facteur de transcription sensible au déficit nutritif contribuant à la suppression du métabolisme et l'atténuation de la virulence, a présenté une fraction de survivant à un traitement à la pénicilline 4 fois supérieur à la souche sauvage d'après une mesure en point final³⁸⁰.

Comme défini précédemment, le métabolisme des purines serait un mécanisme impliqué dans la persistance³⁷³. Ceci a été de nouveau retrouvé récemment à l'aide d'un mutant $\Delta purN$ ³⁸¹. Ce dernier a eu en phase exponentielle tardive un taux de persisters réduit à l'ampicilline, la vancomycine, la gentamicine, et la lévofloxacine. La complémentation a restauré le phénotype de la souche sauvage.

Ensuite, il a été démontré que les PSM α ajoutés de manière exogène à une culture en phase exponentielle ou stationnaire ainsi qu'à un biofilm ont réduit le taux de survivants à un traitement de ciprofloxacine par une analyse en point final^{382,383}. Le mécanisme par lequel les PSMs induisent une réduction des survivants reste à élucider. Parallèlement, un mutant pour le gène *agrC* a démontré le même taux de survivants à un traitement antibiotique que la souche sauvage³⁶⁷.

Enfin, une analyse par spectrométrie de masse a révélé que la population de persisters présentait des protéines négativement régulées, impliquées dans la virulence, la détection du quorum, la réplication et la recombinaison de l'ADN, ainsi que la synthèse de la paroi³⁶⁷. A l'inverse les protéines HemE, PurA, et PknB ont été positivement régulées suggérant à nouveau un métabolisme qui n'est pas complètement inactif.

4.2.4.5. Etat réplicatif

Il est admis dans la grande majorité de la communauté scientifique qu'un persister est non ou lentement réplicatif³⁴⁵. Ceci est en adéquation avec les mécanismes d'actions des principaux antibiotiques bactéricides ciblant des bactéries réplicatives.

Bigger a en 1944 définit les persisters d'après l'étude du genre *Staphylococcus* et émis l'hypothèse qu'il s'agit d'une sous-population de staphylocoques dormants et non réplicatifs survivant à un traitement antibiotique au sein d'une population clonale sensible³⁴⁰. En adéquation avec ces hypothèses, des expériences de microscopie ont permis de mettre en lumière la mort sous traitement de flucloxacilline de certains *S. aureus* à leur premier cycle de réplication³⁵⁵. Le délai de ces bactéries à effectuer le premier cycle de réplication a été augmenté en présence de l'antibiotique. Ainsi, l'application d'un traitement antibiotique augmenterait le temps de survie des persisters par l'accroissement de leur durée en quiescence. Des expériences de remise en culture de persisters traitée à la ciprofloxacine, tobramycine, ou daptomycine ont démontré que le délai avant la reprise de croissance était dépendant de la durée et de la classe d'antibiotique utilisées³⁶¹. Parallèlement, il a été démontré *in cellulo* que les persisters de *S. aureus* sont non réplicatifs, métaboliquement actif et présentent des délais de croissance sur gélose d'agar hétérogènes dépendant notamment du stress oxydatif^{365,366}. Ainsi, ces résultats tendent à confirmer que les persisters de *S. aureus* en culture planctonique et *in cellulo* peuvent persister à un traitement antibiotique à l'aide d'une dynamique de réplication ralentie à nulle.

Cependant, puisqu'en phase stationnaire de croissance il est possible de n'observer seulement qu'une partie de la population comme persistante, selon la souche et l'antibiotique utilisés, l'absence de

réplication ne semble pas être une condition suffisante pour qualifier la persistance dans ces cas précis. L'enrichissement du taux de persisters entre différents mutants, notamment du TCA, et la souche parentale associée en phase stationnaire conforte l'hypothèse que la dynamique de réplication ralentie à nulle peut être une condition nécessaire mais non suffisante dans la persistance.

Ces résultats obtenus suggèrent que les persisters de *S. aureus* peuvent se caractériser au moins en partie par une réplication ralentie à nulle. Les mécanismes de la persistance sont variés et semblent être dépendants des conditions et des souches utilisées. Des études complémentaires sont requises pour relier et hiérarchiser les mécanismes de la persistance notamment pour en obtenir des biomarqueurs. L'analyse de la dynamique de réplication des persisters de *S. aureus*, notamment *in cellulo*, en temps réel n'a à ce jour pas été investiguée en dehors des travaux de recherche présentés dans ce manuscrit.

OBJECTIFS DE LA THESE DE DOCTORAT



Les récentes découvertes présentées dans l'introduction de ce manuscrit de thèse de doctorat tendent à démontrer l'implication de *S. aureus* intracellulaire dans la pathogénicité et la chronicité des infections osseuses. Toutefois, aucune étude n'a actuellement évalué en temps réel et à l'échelle de la cellule hôte unique la dynamique de réplication et la localisation de *S. aureus* au sein de ces niches intracellulaires ainsi que l'impact d'antibiotiques classiquement utilisés dans le traitement des IOA sur ces derniers. **Cette thèse de doctorat a donc pour objectif de développer un modèle d'étude *in cellulo* afin de déchiffrer la dynamique de réplication et la localisation intraostéoblastique de *S. aureus* ainsi que l'impact d'antibiotiques à concentrations cliniques.**

Dans cette optique, les méthodes de dilution de fluorescence et de la surface bactérienne intracellulaire, toutes deux informant sur la dynamique de réplication, ont été combinées. L'analyse par microscopie automatisée à fluorescence a ainsi pu informer sur la dynamique de réplication intraostéoblastique de *S. aureus* à l'échelle de la cellule eucaryote. La mise en place du modèle et les résultats associés obtenus sont présentés au sein du premier axe des travaux de recherche.

Dans le cadre des IOA, les rifamycines telles que la rifampicine, sont le traitement de choix. Classiquement, elles sont administrées en combinaison avec une fluoroquinolone afin de prévenir l'apparition de résistance bactérienne chez le patient. Ainsi, l'efficacité de la rifampicine et de la ciprofloxacine seule ou en combinaison à concentrations cliniques a été étudiée. La dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique résultante a également été investiguée. Les résultats obtenus sont présentés au sein du second axe des travaux de recherche.

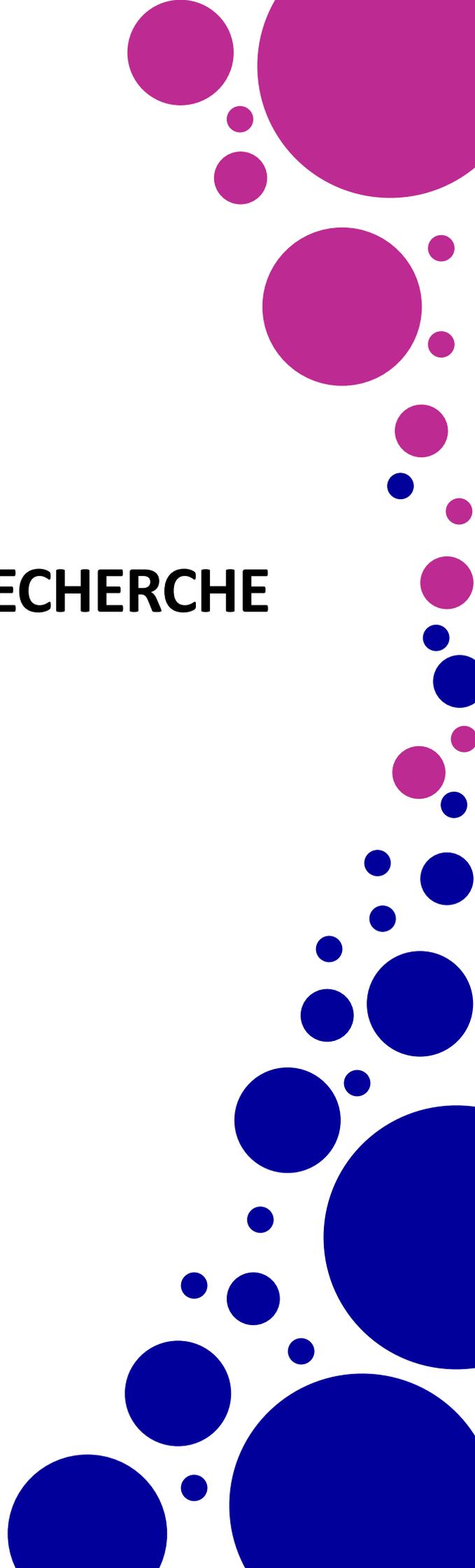
L'impact de la souche employée sur la dynamique de réplication et la présence de persisters, mis en lumière par l'action de la rifampicine, a ensuite été étudié à l'aide de souches de laboratoire et d'isolats cliniques. Les résultats obtenus sont présentés au sein du troisième axe des travaux de recherche.

Enfin, dans l'objectif de corrélérer la localisation intraostéoblastique de *S. aureus* à sa dynamique de réplication sous traitement antibiotique ou non, la microscopie électronique à transmission et la microscopie corrélative ont été employées. Les résultats exploratoires obtenus sont présentés au sein du quatrième axe des travaux de recherche.

Ainsi, ce manuscrit de thèse de doctorat présente la première étude quantitative de la dynamique de réplication intraostéoblastique de *S. aureus* sous traitement ou non d'antibiotiques à concentrations cliniques, en temps réel et à l'échelle de la cellule eucaryote.

L'ensemble de ces travaux de recherche s'insèrent dans la compréhension globale de la physiopathologie des IOA *via* l'étude conjointe de la dynamique de réplication et de la persistance de *S. aureus* intracellulaire aux antibiotiques couramment utilisés en clinique.

TRAVAUX DE RECHERCHE



Avant-propos

Les travaux de recherches présentés dans ce manuscrit de thèse ont été réalisés au sein des laboratoires du Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), équipe « Pathogénies des staphylocoques » et d'Evotec ID Lyon. Ils ont également été conduit au sein des plateformes de microscopie de la structure fédérative de recherche (SFR) Bioscience à savoir le PLATIM (acronyme de « Plateau Technique Imagerie/Microscope ») et le CIQLE (acronyme de « Centre d'Imagerie Quantitative Lyon Est »).

J'ai pu bénéficier au cours de mon doctorat des différents supports et expertises de chacune de ces structures. Notamment de l'expertise sur le modèle d'infection intraostéoblastique à *S. aureus* analysé par dénombrement sur gélose de l'équipe « Pathogénies des staphylocoques » du CIRI.

La combinaison de ce modèle d'infection intracellulaire avec mon expérience de suivi par microscopie d'infection extra-cellulaire m'ont permis de développer les méthodes de microscopie utilisées au cours de ce doctorat notamment le suivi de la dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique et des paramètres d'infection en temps réel.

Les expériences présentées dans ce manuscrit ont été conceptualisées avec le concours des directeurs et des responsables scientifiques de cette thèse, à savoir les Dr. BLOCKER Ariel J., Dr. DUBARRY Nelly, Dr. JOSSE Jérôme et Pr. LAURENT Frédéric. Ces expériences ont été réalisées, analysées et interprétées par mes uniques soins à l'exception de celles listées ci-après qui ont été conceptualisées, réalisées et analysées en collaboration.

Les souches bactériennes utilisées ont été transformé avec le plasmide pCN47::GFP par CARA Andréa et FAURE Allison de l'équipe « Pathogénie des staphylocoques » du CIRI.

L'analyse des images de microscopie photonique à fluorescence en temps réel a été effectuée à l'aide d'une macro développé en collaboration avec BROCARD Jacques du PLATIM.

Les images de microscopie électronique et corrélative ont été prises d'après mes échantillons par ERRAZURIZ-CERDA Elisabeth et la Dr. LUCCARDINI Camilla du CIQLE.

Les cinétiques de survie bactérienne en culture planctonique ainsi que l'étude de la concentration minimale inhibitrice de la rifampicine ont été réalisées et analysées par CANONNE-DESBIOLLES Laurie et MONLONG Chantal d'Evotec ID Lyon.

La réalisation et l'analyse des expériences de spectrométrie de masse, d'après mes échantillons, ont été conduites par la Dr. CONRAUX Laurence et JAFFRELOT Laura d'Evotec ID Lyon.

Travaux de recherche

Les infections suivies par dénombrement de CFU et présentées au sein de l'axe 3 ont été réalisées et analysées par FAURE Allison et SION Angélique de l'équipe « Pathogénie des staphylocoques » du CIRI.

Enfin, un séquençage d'ARN de *S. aureus* intraostéoblastique a été réalisé mais n'est pas présenté dans ce manuscrit puisqu'il est en cours d'analyse et d'interprétation. Sa conceptualisation, sa réalisation et son analyse ont été réalisées d'après mes échantillons avec le concours du Dr. BOUCINHA Lilia, de DECHAUD Corentin, du Dr. FONTANA Célia et de HIREL Johanna d'Evotec ID Lyon.



AXE 1. Dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique

1.1. Introduction

Bien que la capacité de *S. aureus* à envahir les CPNP, notamment les ostéoblastes au cours d'IOA, a été mise en évidence, la dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique à l'échelle de la cellule unique n'a pas été investiguée. Cette compréhension permettrait de mieux appréhender l'implication de *S. aureus* intraostéoblastique dans la physiopathologie des IOA et les mécanismes de chronicisation et de rechute.

Dans l'objectif d'élucider la vie répliquative intraostéoblastique de *S. aureus*, un modèle *in cellulo* a été développé en combinant les avantages des méthodes d'analyses par microscopie photonique de la surface bactérienne et de la dilution de fluorescence informant toutes deux sur la dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique.

1.2. Méthodes

1.2.1. Culture cellulaire

Les cellules eucaryotes employées dans le cadre de ces travaux de recherche sont les ostéoblastes de la lignée MG63. Ces dernières ont été cultivées dans du milieu de culture DMEM (acronyme de « *Dulbecco's modified Eagle's medium* ») contenant 1 g/L de D-glucose ainsi que de la L-glutamine et du pyruvate (Gibco, 31885023). Ce milieu de culture a été supplémenté en sérum de veau fœtal à hauteur de 10% (Gibco, 42F457LK), et pénicilline et streptomycine à hauteur de 1% (Gibco, 15140122). Les cellules eucaryotes ont été maintenues à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO₂.

Pour les expériences d'infections, les cellules eucaryotes ont été cultivées soit à 18000 cellules/cm² pour une densité éparsée soit à 73000 cellules/cm² pour une densité à confluence. Cette dernière densité a été utilisée lorsque précisé en légende.

1.2.2. Souches bactériennes

La souche de *S. aureus* utilisée dans cette section est SH1000 et SH1000-GFP. Elle est curée de trois prophages et réparée pour le système RsbU d'après l'ancêtre NCTC8325³⁸⁴. La souche SH1000-GFP arbore un plasmide pCN47::GFP portant un gène *erm* de résistance à l'érythromycine pour la sélection et un gène codant pour la GFP dont l'expression constitutive est sous le contrôle du promoteur *pblaZ*.

S. aureus a été cultivé en milieu Luria Betani (LB) à 37°C avec rotation à 240 rotations par minute (rpm). Lorsque approprié, le milieu de culture a été supplémenté avec 10 µg/mL d'érythromycine (Sigma, E5389). Les souches ont été conservées en cryotubes à -80°C.

1.2.3. Marquages moléculaires bactérien et cellulaire

1.2.3.1. Marquage cellulaire

A la suite d'un lavage unique avec du DPBS (acronyme de « *Dulbecco's Phosphate Buffer Saline* ») sans calcium ni magnésium (GIBCO, 14190-094 ; nommé « DPBS -/- »), les ostéoblastes ont été marqués par le CellTracker™ Red CMTPX (Thermo Fisher Scientific, C34552) à 10 µM dans du milieu de culture DMEM contenant 1 g/L de D.glucose, du pyruvate et sans L-glutamine et rouge de phénol (Gibco, 11880-028, nommé « DMEM(-) »). Les cellules ont été incubées 1h30 à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO₂ et protégées de la lumière. Afin de retirer l'excès de marqueur, un unique lavage avec du DPBS -/- à 37°C a été effectué. Les cellules ainsi marquées ont été infectées selon les procédures définies ci-après.

1.2.3.2. Marquage bactérien

Le marquage de *S. aureus* avec le marqueur « *eBioscience™ Cell Proliferation Dye eFluor™ 450* » (Thermo Fisher Scientific, 65-0842-85, nommé « eFluor 450 ») a été réalisé comme précédemment décrit avec le marqueur eFluor 670 *modulo* des modifications mineures³³⁰. Une culture sur la nuit de *S. aureus* a été centrifugée à 15000 rcf pendant 5 minutes à 37°C. Après retrait du surnageant, le culot a été suspendu dans le même volume de DPBS contenant du calcium et du magnésium (Gibco, 14040-091, nommé « DPBS +/+ ») à 37°C. La suspension ainsi obtenue a été centrifugée à 15000 rcf pendant 2,5 minutes à 37°C. Ces étapes ont été répétées deux fois. Puis, le culot résultant a été suspendu avec le même volume de DPBS +/+ contenant soit 10 µM soit 25 µM d'eFluor 450 à 37°C pour les expériences en cultures planctoniques et d'infections, respectivement. La suspension ainsi obtenue a été incubée à température ambiante et protégée de la lumière durant 5 minutes. A la suite de cette incubation, la suspension a été centrifugée à 15000 rcf pendant 2,5 min à 37°C. Le culot résultant a été suspendu dans le même volume de milieu LB à 37°C, pour retirer tout marqueur libre, puis incubé à température ambiante et protégé de la lumière durant 3 minutes. Puis, la suspension a été lavée une fois avec du DPBS +/+ à 37°C et le culot résultant a finalement été suspendu dans le même volume de DPBS +/+ à 37°C. La suspension ainsi obtenue a été protégée de la lumière.

Enfin, la densité optique à 600 nm (OD_{600nm}) de la suspension bactérienne ainsi marquée a été ajustée à une valeur définie pour laquelle la concentration bactérienne de chacune des souches est connue. Ceci permet d'infecter les cellules eucaryotes à la multiplicité d'infection appropriée.

1.2.4. Cytométrie de flux

Une culture sur la nuit de SH1000-GFP a été marquée à l'eFluor 450 comme décrit précédemment puis diluée dans du milieu LB frais à $OD_{600nm} = 0,05$. Cette culture a été cultivée à 37°C dans une atmosphère humide avec rotation à 240 rpm. Toutes les 30 minutes, excepté pour le dernier point temps représentant un délai d'1 heure, des échantillons de la culture ont été prélevés et immédiatement analysés par cytométrie de flux via un cytomètre de flux Attune™ NxT (Thermo Fisher Scientific). Les intensités de fluorescence de la GFP et de l'eFluor 450 ont été mesurées avec des lasers à 488 nm et 405 nm pour l'excitation ainsi qu'avec des filtres à bandes passantes de 530/30 nm ou 440/50 nm pour la détection, respectivement. SH1000-GFP non marquée à l'eFluor 450 a servi de contrôle négatif.

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Flowjo (v10.5.3, Treestar Inc.). Les bactéries négatives à la GFP ont été retirées de l'analyse à l'aide de l'examen de la FSC-A (acronyme de « *forward-scatter area* ») versus l'intensité de fluorescence de la GFP. Ensuite, les bactéries endommagées ou en amas ont été retirées de l'analyse à l'aide de l'examen de la FSC-A versus FSC-H (acronyme de « *forward-scatter heigh* ») ainsi qu'à l'aide de l'examen de la SSC-A (acronyme de « *side-scatter area* ») versus SSC-H (acronyme de « *side-scatter heigh* »).

Dans le même temps, la densité optique à 600 nm des échantillons a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre.

Le nombre de générations, N , obtenu d'après chacune des deux méthodes, a été calculé d'après la formule $F = 2^N$, où F correspond au ratio Y_0/Y_t (Y étant le mode de l'intensité de fluorescence de l'eFluor 450 ou l' OD_{600nm} à chaque temps)^{366,385}. Les temps de doublements ont été calculés entre 30 minutes et 2 heures de remise en culture.

1.2.5. Infections intraostéoblastiques

Des ostéoblastes ont été cultivés en plaques 24 puits (Falcon, 353047 pour le de dénombrement des CFU ou 4TITUDE, 4TI-0241 pour la microscopie) 24 heures avant l'infection. Les cellules eucaryotes ont été marquées en vue des infections suivies par microscopie tel que décrit précédemment. Des cultures sur la nuit de *S. aureus* SH1000-GFP ont été marquées ou non à l'eFluor 450 tel que décrit précédemment. Les infections ont été effectuées à une multiplicité d'infection de 8 (ou de 0,1 ; 1 ; 4 ;

8 ; 10 ; 100 lorsque indiqué) en utilisant du milieu de culture DMEM(-) supplémenté en sérum de veau foetal à hauteur de 10% (Gibco, 42F457LK) et ainsi nommé « milieu d'infection ». Les infections ont été conduites avec SH1000, SH1000-GFP et SH1000-GFP marquées ou non à l'eFluor 450.

Après 2 heures de co-incubation, à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO₂, les bactéries extracellulaires restantes ont été éliminées par le remplacement du milieu avec un milieu d'infection frais contenant 10 µg/mL de lysostaphine, un antimicrobien qui permet d'éliminer uniquement les *S. aureus* extracellulaires puisqu'il est non-perméant (Sigma, L7386). Ceci marque le début de l'infection et du décompte horaire.

Lorsque indiqué, à 1hpi et 24 hpi, les ostéoblastes infectés ont été lavés une fois avec du DPBS -/- puis récupérés à l'aide de l'action de la trypsine. Ils ont ensuite été dénombré à l'aide d'une lame de Malassez et d'un marquage au bleu de Trypan.

1.2.6. Expériences de dénombrement sur gélose

A 1 hpi et 24 hpi, les cellules ont été lavées une fois avec du DPBS -/-. Ensuite, les cellules ont été lysées avec de l'eau afin d'en récupérer le contenu bactérien intracellulaire. Les lysats cellulaires résultants ont été dilués lorsque requis et déposés sur gélose TSA (acronyme de « Trypcase Soy Agar »), (Biomérieux), en utilisant un ensemenceur de plaque automatique (Interscience, EasySpiral Dilute). Les géloses ont été incubées à 37°C durant 16h30. Les colonies ont par la suite été énumérées en utilisant un compteur automatique de colonies (Interscience, Scan 1200).

1.2.7. Microscopie confocale en temps réel

Des ostéoblastes MG63 ont été marqués au CellTracker™ Red CMTPX et infectés par SH1000-GFP marquée à l'eFluor 450 tel que décrit précédemment.

A la suite de l'ajout du milieu d'infection frais contenant 10 µg/mL de lysostaphine (Sigma, L7386), les cellules infectées ont été incubées à l'intérieur du microscope confocal photonique automatisé (Yokogawa, CQ1) à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO₂ et protégées de la lumière. L'acquisition des images de fluorescence a débuté 15 minutes après le transfert de la plaque dans le microscope, permettant l'harmonisation de la température. Ceci marque le début de l'infection et du décompte horaire.

1.2.8. Acquisition des images de fluorescence et analyse

Les images de fluorescence ont été acquises toutes les heures durant 24 hpi avec un microscope photonique (Yokogawa, CQ1) automatisé confocal de type *spinning disk (dual wide Nipkow disk)* équipé d'une caméra sCMOS (2560x2160 pixels) et d'une lentille d'objectif 40x (UPLSAPO, 40x/0,95, WD 0,18 mm, Olympus). Les sondes fluorescentes CellTracker™ Red CMTPX, GFP et eFluor 450, ont été respectivement excitées avec des lasers de 561 nm, 488 nm et 405 nm. Les filtres d'émissions à bandes passantes utilisés pour leur détection sont dans l'ordre : 617/73 nm, 525/50 nm, et 447/60 nm.

L'analyse des images a été effectuée à l'aide d'une macro semi-automatique développée pour ce projet et fonctionnant sous le logiciel Fiji (v1.53t, NIH). Les ostéoblastes ont été suivis à l'aide du plugin « TrackMate » d'après l'intensité de fluorescence du CellTracker™ Red CMTPX³⁸⁶. Les cellules bordantes (qui ne sont pas intégralement présentes dans le champ d'observation) ont été exclues de l'analyse. Ensuite, à chaque temps, les nombres de pixels de GFP et d'eFluor 450 supérieurs à un seuil défini par ostéoblaste ont été extraits. Chaque donnée extraite pour chaque cellule a été vérifiée manuellement. Les tableaux de données résultants ont été analysés à l'aide d'une macro automatisée développée pour ce projet fonctionnant sous le logiciel Excel (v2211, Office, Microsoft).

Dans un premier temps, les ostéoblastes ont été classés en deux catégories : (i) « non-infectés » si aucun pixel de GFP n'est détecté et (ii) « infectés » si des pixels de GFP ont été détectés.

Ensuite, les ostéoblastes infectés ont été distingués en trois sous-catégories en fonction de la dynamique d'incrémentation des pixels de GFP. La première sous-catégorie correspond aux ostéoblastes comportant exclusivement des bactéries non-réplicatives (I). Elles sont définies par un niveau constant du nombre de pixels de GFP au cours de la période pendant laquelle l'ostéoblaste est infecté. La seconde sous-catégorie correspond aux ostéoblastes comportant des phases répliques lentes (II). Elles sont définies par l'augmentation progressive du nombre de pixels de GFP par 100 ou au moins d'un facteur 1,33 et maintenu durant au moins 2 temps successifs. La troisième sous-catégorie correspond aux ostéoblastes comportant des phases répliques rapides classiques (IIIa). Elles sont définies par l'augmentation du nombre de pixels de GFP d'au moins 100 durant au moins deux temps successifs suivi par une chute drastique et soudaine du nombre de pixels de GFP d'un facteur 1,33 au moins. Le devenir des ostéoblastes infectés à la fin de la phase réplique a été manuellement observé. Les phases répliques rapides (IIIa) conduisent à l'explosion de l'ostéoblaste et au relargage total ou partiel des *S. aureus* dans le milieu. Au sein des sous-catégories II et III, les ostéoblastes peuvent comporter de manière concomitante des bactéries non-réplicatives visibles par le maintien d'une intensité de fluorescence de l'eFluor 450. Ces cas ont été manuellement détectés et énumérés. Les sous-catégorisations des ostéoblastes infectés ont été manuellement vérifiées.

Les quantifications ont été effectués d'après 3 champs par puits et 3 puits par expérience.

1.2.9. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel GraphPad Prism (v9.1.0, GraphPad software). Les données ont été analysées soit par le test de student non-apparié soit par le test « one-way ANOVA » suivi par le test de comparaisons multiples de Dunnett ou de Tukey.

1.3. Validation du modèle

Le premier objectif de ces travaux de recherche a été de développer un modèle d'étude *in cellulo* afin d'étudier les paramètres d'infection et la dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique.

1.3.1. Description du modèle

Des ostéoblastes à confluence ou éparses sont co-incubés avec *S. aureus* provenant d'une phase stationnaire de croissance à une multiplicité d'infection (ratio de bactéries par cellule) d'intérêt durant 2 heures. A la suite de cette période, le milieu d'infection est remplacé par un milieu frais contenant de la lysostaphine. Non-perméante, cette dernière permet d'éliminer les *S. aureus* extracellulaires résiduels. Ceci marque le début de l'infection et du décompte horaire.

Les infections peuvent être suivies par la méthode de dénombrement des CFU, informant sur la charge bactérienne intraostéoblastique, ou par microscopie photonique, informant sur la dynamique de réplication intraostéoblastique de *S. aureus* fluorescents.

1.3.2. Multiplicité d'infection : charge bactérienne et cytotoxicité

Afin d'optimiser le nombre d'événements observés par microscopie photonique, une gamme de multiplicité d'infection a été investiguée. L'objectif est de maximiser la charge bactérienne intraostéoblastique tout en minimisant la cytotoxicité induite sur les ostéoblastes.

Dans cette optique, des ostéoblastes MG63 à confluence ont été co-incubés avec *S. aureus* SH1000 à une multiplicité d'infection de 0,1 ; 1 ; 10 ; et 100. A 1 heure post-infection (hpi) et 24 hpi le nombre d'ostéoblaste et de CFU ont été énumérés (Fig. I-1).

La charge intracellulaire bactérienne a augmenté significativement en fonction de la multiplicité d'infection et a été plus faible à 24 hpi qu'à 1 hpi (Fig. I-1a). Cette différence pourrait refléter une

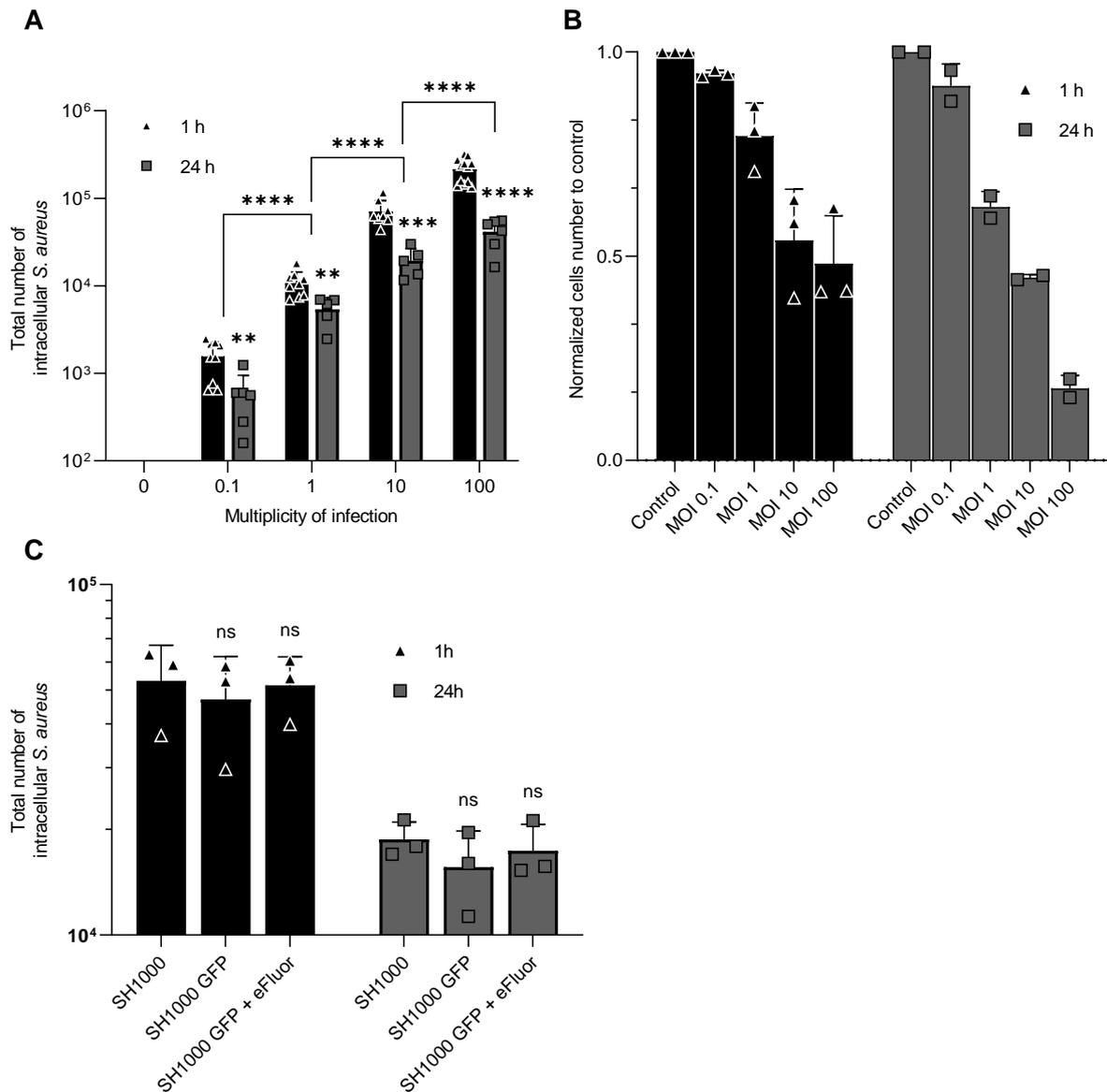


Figure I-1 : Impact de la multiplicité d'infection, de l'expression de la GFP et du marquage à l'eFluor sur la charge bactérienne intraostéoblastique et l'intégrité des ostéoblastes. Des ostéoblastes à (a, b) confluence ou (c) éparses ont été infectés par (a, b) *S. aureus* SH1000 à une gamme de multiplicité d'infection (MOI) et (c) *S. aureus* SH1000 et SH1000-GFP à MOI 8 marquée ou non par le « cell proliferation dye eFluor 450 » (nommé eFluor 450 par la suite) à 25 μ M. A 1 hpi et 24 hpi, les cellules ont été lysées, les bactéries intracellulaires récupérées et déposées sur géloses d'agar. Les colonies résultantes ont été monitorées après 16h30 d'incubation. (a) Quantification du nombre de CFU totaux. (b) Quantification du nombre d'ostéoblastes normalisé. (c) Quantification du nombre de CFU totaux. (a - c) Représentent la moyenne \pm SD de trois répliquas biologiques indépendants, excepté pour le temps 24 heures présenté en (a), dans trois puits par condition et par répliqua. La significativité statistique a été déterminée par (a) le test de student non-apparié et (b) le test « one-way ANOVA » suivi par le test de comparaisons multiples de Dunnett (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ **** $P < 0.0001$).

potentielle élimination effectuée par l'ostéoblaste entre les temps 1 hpi et 24 hpi ou un échappement des bactéries depuis l'environnement intracellulaire jusqu'au milieu bactéricide d'infection.

L'énumération des ostéoblastes a démontré leur réduction croissante en fonction de la multiplicité d'infection dès 1 hpi (Fig. I-1b). L'observation visuelle par microscopie photonique a mis en lumière une rupture de la couche cellulaire pour les multiplicités d'infection de 10 et 100.

La charge bactérienne totale à une multiplicité d'infection de 1 et 10 à 1 hpi était d'environ 1×10^4 et 7×10^4 bactéries par puit, respectivement (Fig. I-1a). Tandis que la réduction du nombre d'ostéoblastes était d'environ 20% et 55%, respectivement (Fig. I-1b).

Ainsi, une gamme de multiplicité d'infection comprise entre 1 et 10 permettrait d'obtenir un compromis entre une cytotoxicité modérée et une charge bactérienne optimale. Une gamme de multiplicité d'infection resserrée de 2, 4, et 8 a été investiguée sur cellules éparses par microscopie photonique (Fig. I-5). La multiplicité d'infection de 8 a été retenue car maximisant le nombre d'événement suivi en microscopie photonique sans pour autant affecter le taux de cytotoxicité observée aux plus faibles multiplicités d'infections.

1.3.3. Impact de la GFP et de l'eFluor 450 sur la charge bactérienne

Dans l'objectif d'étudier la dynamique de réplication intraostéoblastique, les souches de *S. aureus* employées ont été transformées avec le plasmide pCN47::GFP et marquées avec l'eFluor 450. Les impacts potentiels de l'expression de la GFP ainsi que du marquage moléculaire sur la charge bactérienne intraostéoblastique ont été investigués par dénombrement de CFU à 1 hpi et 24 hpi.

La charge bactérienne intraostéoblastique n'a pas été affectée par l'expression de la GFP ainsi que par le marquage moléculaire à l'eFluor 450 à 1 hpi et 24 hpi. Ceci soutient donc leur emploi dans les méthodes d'analyses décrites ci-dessous.

1.3.4. Méthode d'analyse de dilution de fluorescence

Dans le principe, la méthode de dilution de fluorescence est basée sur la dilution d'un facteur 2, à chaque étape répliative, du contenu bactérien initial³²⁸⁻³³¹. Le marquage d'une partie de ce contenu ou l'expression d'une protéine fluorescente en amont permet de suivre l'état répliatif de la bactérie par microscopie photonique ou cytométrie de flux. En effet, les populations non répliatives ne vont pas diluer leur contenu initial et l'intensité de fluorescence restera constante. A l'inverse, l'intensité

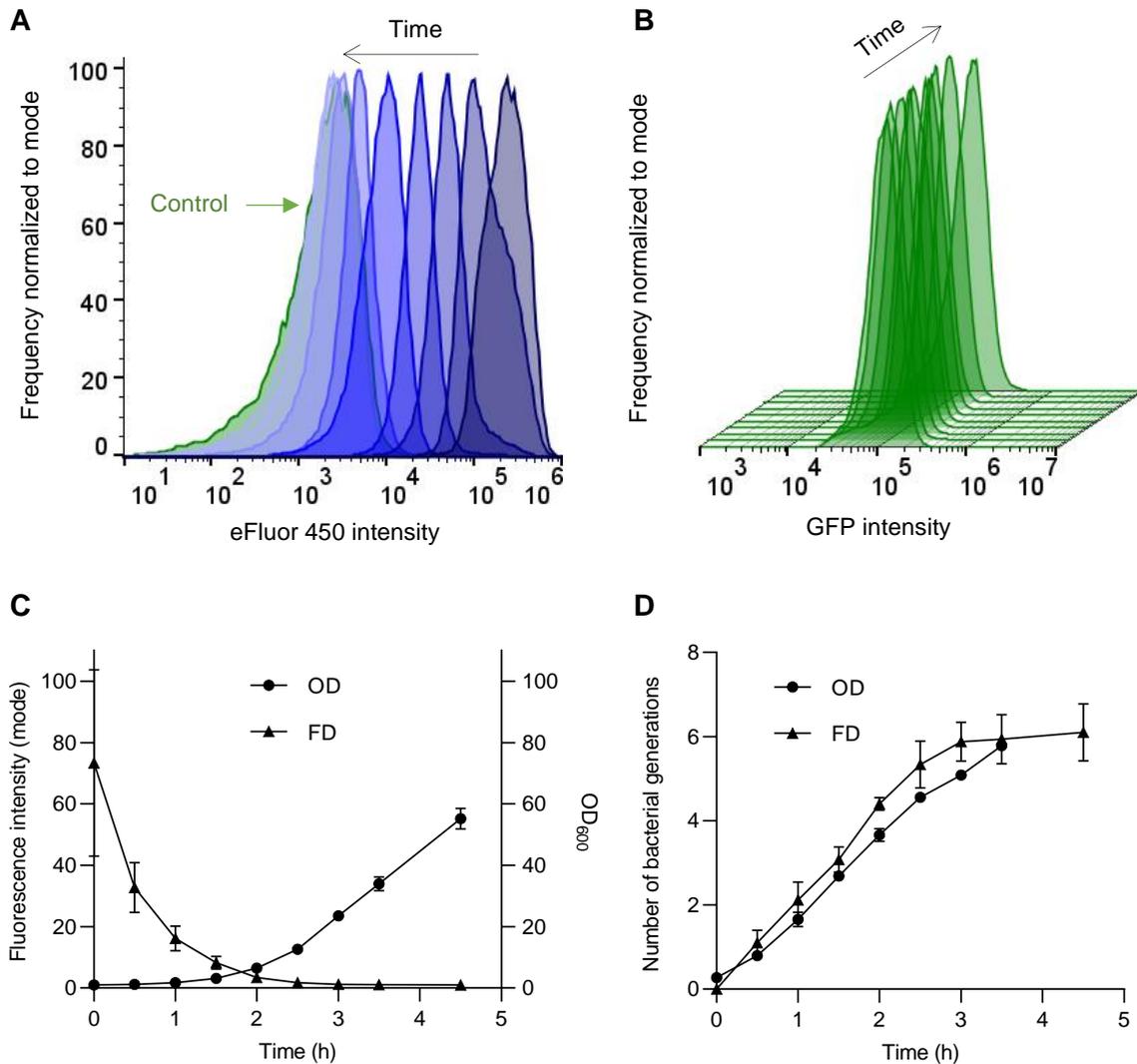


Figure I-2 : Le marquage moléculaire « cell proliferation dye eFluor 450 » permet de suivre l'état répliatif de *S. aureus* jusqu'à 6 générations. Une culture de *S. aureus* SH1000-GFP en phase stationnaire a été marquée à l'eFluor à 10 μ M. La culture ainsi marquée a été diluée à une densité optique de 0,05 et remise en culture. A intervalles réguliers de 30 minutes, les intensités de fluorescences de (a) l'eFluor 450 et de la (b) GFP ont été mesurées par cytométrie de flux. De manière concomitante, la densité optique de la culture a été mesurée à 600 nm. (c) Courbes cinétiques représentant le mode de l'intensité de fluorescence de l'eFluor 450 normalisé par le dernier temps et la densité optique à 600 nm normalisée par le premier temps. (d) Courbes représentant le nombre de générations bactériennes suivies par la méthode de dilution de fluorescence (FD) et par la méthode de densité optique (OD) normalisées par la formule $FD_{(tn)} = OD_{(tn+1)}$. (a, b) Sont représentatifs d'un répliquas biologique sur trois, $n > 15500$ évènements par temps. (c, d) Représentent la moyenne \pm SD de trois répliquas biologiques indépendants.

de fluorescence des bactéries répliquatives est divisée de moitié à chaque étape de réplication par dilution du contenu initial entre les deux descendants.

Dans un premier temps, la création d'un plasmide double rapporteur a été investiguée. Dans le principe, un plasmide double rapporteur exprime de manière concomitante une protéine fluorescente constitutive et une seconde induite. La première permet de suivre la bactérie par microscopie photonique tandis que la seconde permet de qualifier son état répliquatif. Tandis que l'expression de la protéine fluorescente constitutive telle que la GFP sous le promoteur Cap1A était optimale ; celle-ci n'a jamais pu être exprimé à des taux suffisants de manière concomitante avec la protéine fluorescente induite telle que la mCherry sous le promoteur TetA. Ainsi, une seconde méthode dite de marquage moléculaire a été investiguée.

Bien qu'une précédente étude ait démontré la validité de la méthode avec l'eFluor 670 en point unique chez *S. aureus*, la validité de la dilution de fluorescence de l'eFluor 450 comme marqueur bactérien de la dynamique de réplication, notamment en temps réel n'a pas été rapportée^{330,336}.

Une gamme de concentration d'eFluor 450 a été investiguée. La concentration de 10 μM a été retenue pour le marquage des bactéries en vue des expériences de cytométrie de flux. Cette concentration a été augmentée à 25 μM pour l'ensemble des autres expériences afin de s'ajuster à une configuration différente d'excitation et d'émission des appareils de microscopie.

La propriété des bactéries répliquatives à diluer l'eFluor 450 a été investiguée par cytométrie de flux. Des cultures en phase stationnaire de *S. aureus* SH1000-GFP ont été marquées à l'eFluor 450 avant dilution dans un milieu de culture frais. A intervalles réguliers de 30 minutes, l'intensité de fluorescence et la densité optique de la culture ont été mesurées. Une réduction homogène et séquentielle par un facteur 2 de l'intensité de fluorescence de l'eFluor 450 a été observée durant les premiers temps et ce jusqu'à 2h30 avant d'atteindre le bruit de fond (Fig I-2a, c). A chaque temps nous pouvons observer une distribution unimodale de l'intensité de fluorescence démontrant l'homogénéité de la culture (Fig I-2a). Parallèlement, la densité optique de la culture a augmenté séquentiellement et inversement à l'intensité de fluorescence de l'eFluor 450 (Fig I-2c). Ceci suggère que la réduction de l'intensité de fluorescence de l'eFluor 450 est due à la croissance de la culture et par extension à la réplication de ses composants. Les méthodes de dilution de fluorescence et de densité optique concordent avec un nombre maximal de générations suivies de 6 et un temps de doublement de 27,6 minutes et 31,2 minutes, respectivement (Fig I-2d).

La propriété des bactéries non répliquatives intraostéoblastiques à maintenir un niveau constant d'intensité de fluorescence de l'eFluor 450 a été investiguée par microscopie photonique en temps

réel (Fig. I-3a). Notons également que la diminution d'intensité de fluorescence de l'eFluor 450 a été reliée au caractère réplcatif de *S. aureus* par microscopie photonique (Fig. I-3c).

En parallèle du marquage à l'eFluor 450, les bactéries utilisées ont été transformées avec le plasmide pCN47::GFP afin d'exprimer de manière constitutive la GFP. Cette dernière permet le suivi des bactéries réplcatives par microscopie au-delà de la zone d'action de l'eFluor 450, après 6 générations. L'expression homogène de la GFP au sein de la population et à des niveaux optimums au cours du temps a été investiguée par microscopie photonique et par cytométrie de flux (Fig I-2b).

Ainsi, le marquage moléculaire à l'eFluor 450 est un rapporteur de la dynamique de réplication de *S. aureus*. L'expression constitutive de la GFP permet le suivi des bactéries au-delà de la zone de résolution de la dilution de fluorescence de l'eFluor 450.

1.3.5. Méthode d'analyse de la surface bactérienne

La méthode de mesure de la surface bactérienne est basée sur le principe suivant : la surface occupée d'une population est fonction du nombre d'individu de sa population^{245,289,302,303,332,333}. Ainsi, afin de suivre la surface occupée par la population de *S. aureus* intraostéoblastique en microscopie photonique, cette dernière a été transformée pour exprimer constitutivement la GFP. Au plus le nombre de pixel de GFP intraostéoblastique est élevé, au plus le nombre de bactéries présentes dans l'ostéoblaste est élevé. Le suivi du nombre de pixel de GFP au cours du temps permettrait donc d'informer sur la dynamique de réplication d'une population de *S. aureus* intraostéoblastique. Si le nombre de pixel de GFP reste constant, la surface reste constante et de ce fait la cellule hôte comporte des bactéries exclusivement non réplcatives. A l'inverse, lorsque le nombre de pixel de GFP augmente, la surface augmente et de ce fait la cellule hôte est le lieu d'une réplication et d'un accroissement de la population. Ici, la présence concomitante de *S. aureus* non ou lentement réplcatifs ne peut pas être mise en évidence. La diminution du nombre de pixel de GFP partielle ou totale suggère la perte de fluorescence, l'élimination, ou l'échappement des bactéries intracellulaires. L'efficacité de la méthode d'analyse de la surface bactérienne via le nombre de pixel de GFP pour rendre compte de la dynamique de réplication d'une population de *S. aureus* intraostéoblastique a été confirmée par microscopie photonique *via* une macro développée lors de cette thèse et fonctionnant sur le logiciel Fiji (Fig I-3).

La méthode d'analyse de la surface bactérienne permet de suivre la dynamique de réplication à l'échelle d'une population de *S. aureus* au sein d'un ostéoblaste unique sans contrainte temporelle. En principe, la méthode d'analyse de la dilution de fluorescence permet l'étude au niveau d'une bactérie unique intraostéoblastique jusqu'à 6 générations. Dans le cadre de ces travaux de recherche, la résolution temporelle a été privilégiée et l'analyse de la surface bactérienne a été utilisée. Toutefois,

la méthode de dilution de fluorescence a été employée en parallèle afin de mettre en évidence la présence d'individus non ou lentement répliatifs au sein d'un ostéoblaste étant le lieu d'une réplication rapide concomitante.

Ainsi, les avantages des méthodes d'analyses de dilution de fluorescence et de surface bactérienne ont été combinés afin de déchiffrer la dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique.

1.4. Etude de la dynamique de réplication intraostéoblastique

1.4.1. Dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique

Le second objectif de ces travaux de recherche a été de déchiffrer la dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique sur 24 hpi à l'aide du modèle d'étude *in cellulo* développé.

Il est important de noter que les *S. aureus* utilisés pour infecter les ostéoblastes provenaient d'une phase stationnaire de croissance. En principe, ils ont ainsi été intégralement non ou lentement répliatifs au début de la période de co-incubation.

Les ostéoblastes suivis ont été classés en deux catégories selon qu'ils ont été (i) « non-infectés » ou (ii) « infectés » d'après la présence de pixel de GFP.

En fonction de la dynamique de réplication des *S. aureus* qu'ils comportaient, différents profils des ostéoblastes infectés ont pu être mis en évidence. Ces derniers peuvent être sous-catégorisés selon qu'ils comportaient sur la période d'acquisition soit un ou des *S. aureus* exclusivement non répliatifs (I) soit au moins un *S. aureus* sortant de son état de quiescence et conduisant à une phase répliatique lente (II) ou rapide dite classique (IIIa), (Fig. I-3a,b,c). Les ostéoblastes infectés par des *S. aureus* exclusivement non répliatifs (I) sont définis par un niveau constant du nombre de pixels de GFP au cours de la période pendant laquelle l'ostéoblaste a été infecté (Fig. I-3a,d). Ceux infectés par des *S. aureus* lentement répliatifs (II) sont définis par l'augmentation progressive du nombre de pixels de GFP maintenue pendant tout ou partie de la cinétique (Fig. I-3b,e). Enfin, ceux présentant des phases répliatiques rapides classique (IIIa) sont définis par l'augmentation drastique du nombre de pixels de GFP, soutenue pendant au moins deux temps successifs, et suivie par une chute rapide, totale ou partielle, du nombre de pixels de GFP (Fig. I-3c,f). Cette chute s'accompagne obligatoirement par l'explosion de l'ostéoblaste et le relargage, total ou partiel, des bactéries dans le milieu extracellulaire bactéricide (Fig. I-3c). Dans le cas d'un relargage partiel, les bactéries restantes dans l'agrégat ostéoblastique peuvent être retrouvées jusqu'à la fin de l'acquisition et sont qualifiées de charge bactérienne résiduelle. Par exemple, au sein de l'ostéoblaste infecté représenté en figure I-3c,

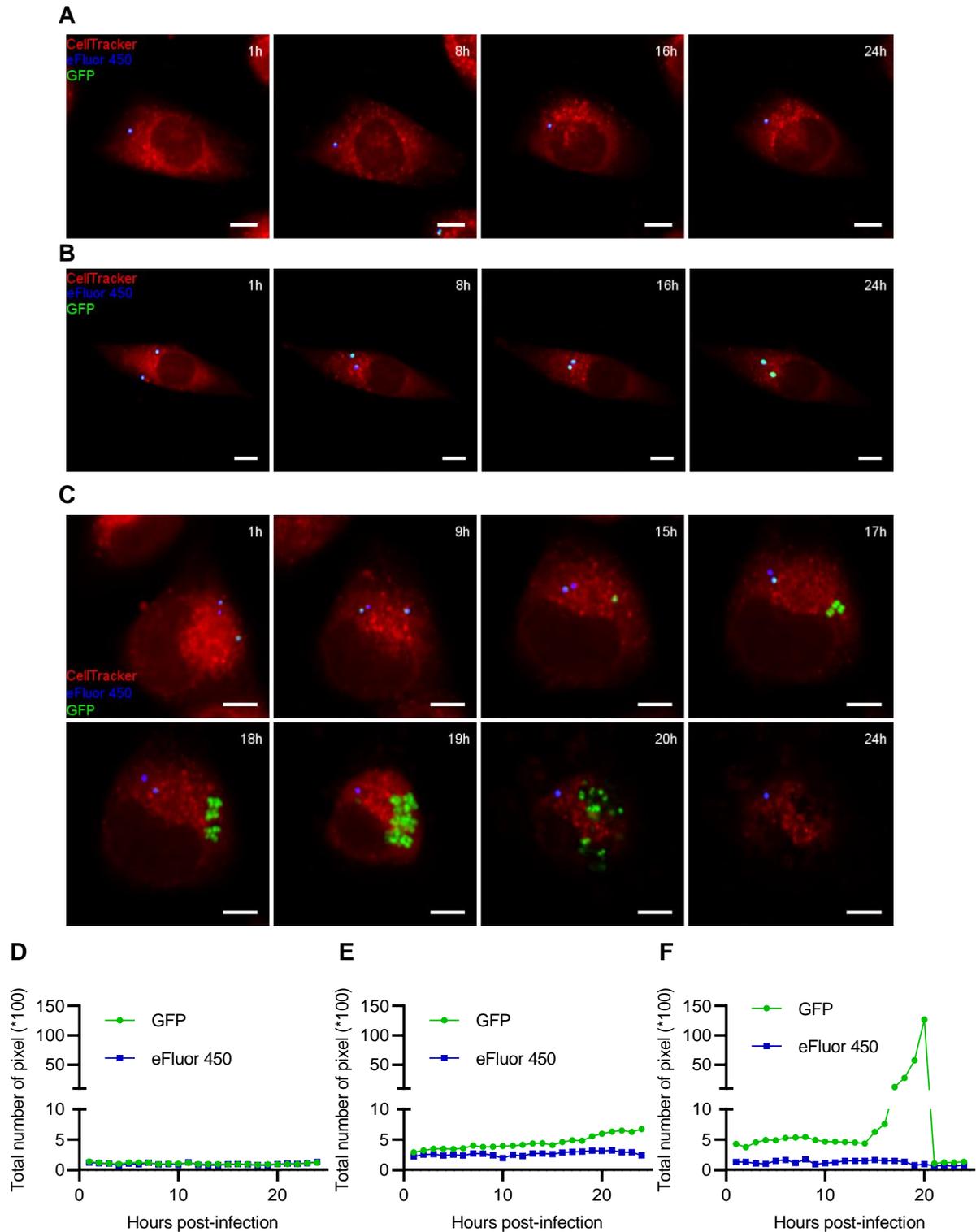


Figure I-3 : Illustration de la dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique. Des ostéoblastes ont été marqués au « CellTracker Red CMTPIX » et infectés, à MOI 8, avec *S. aureus* SH1000-GFP et marquée à l'eFluor 450 avant le début de l'infection. L'infection a été suivie par microscopie photonique confocale automatisée durant 24 heures à intervalles réguliers d'1 heure. Images de microscopie photonique en temps réel montrant un ostéoblaste infecté par *S. aureus* (a) exclusivement non réplcatifs, effectuant une phase réplcative (b) lente ou (c) rapide classique. Les barres d'échelles représentent 10 μm . (d - f) Quantification du nombre total de pixels de GFP et d'eFluor 450 relatif aux images de microscopie (a - c), respectivement.

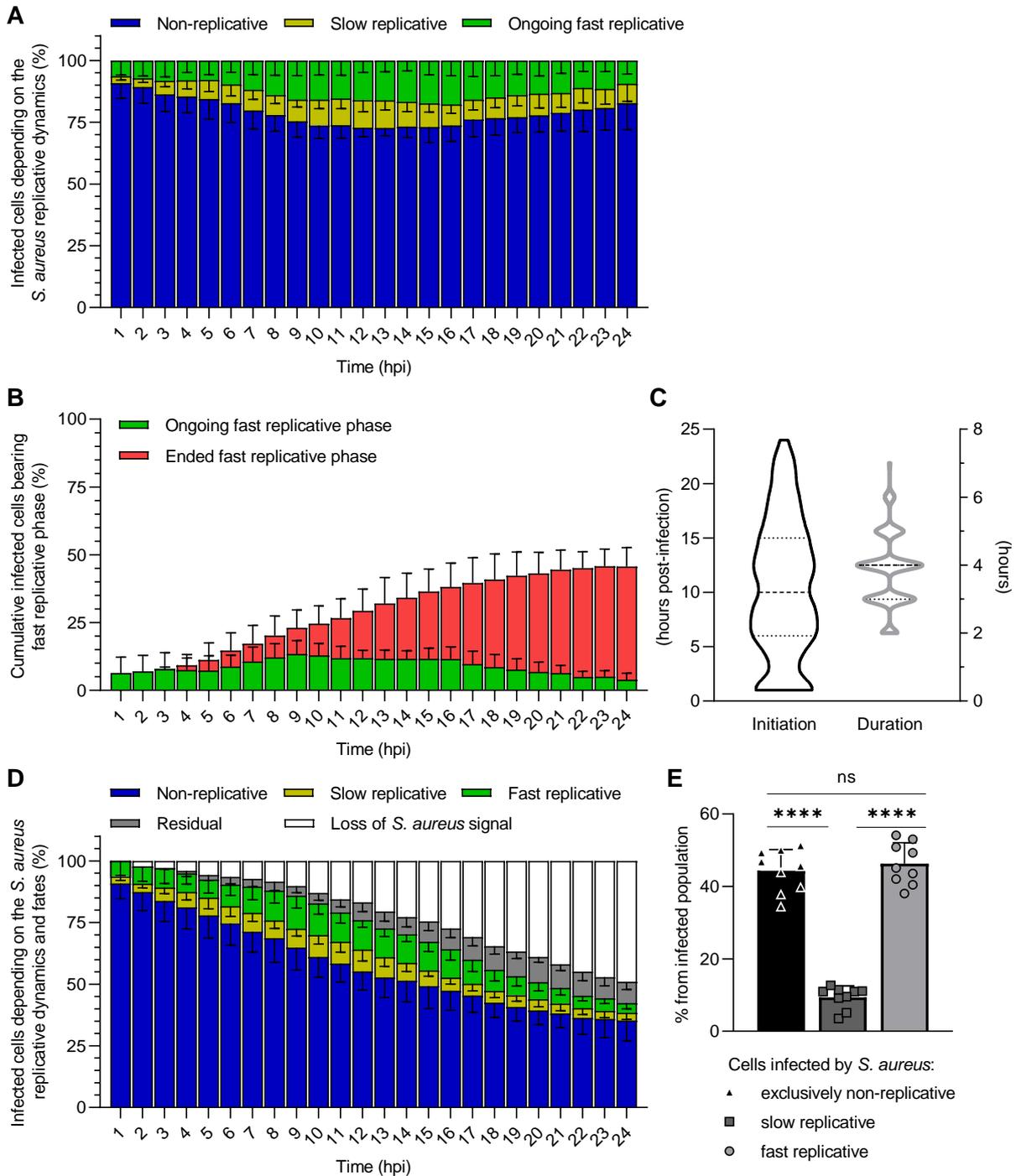


Figure I-4 : Légende page suivante

un *S. aureus* ne s'étant jamais répliqué a été retrouvé maintenu dans l'agrégat ostéoblastique après l'éclatement de la cellule hôte et ce jusqu'à la fin de l'acquisition (Fig. I-3c,f).

Les phases répliquatives (IIla) se sont réparties tout au long de la cinétique dû à une sortie de quiescence de *S. aureus* séquentielle (Fig. I-4b,c). Il est important de noter que des phases répliquatives (IIla) ont été enregistrées dès 1 hpi, début de l'analyse. Celles-ci étaient dans une étape précoce de la phase répliquative dû à une sortie de quiescence s'étant effectuée pendant la période de co-incubation de

Figure I-4 : Quantification de la dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique. Des ostéoblastes ont été marqués au « CellTracker Red CMTPX » et infectés, à MOI 8, avec *S. aureus* SH1000-GFP marquée à l'eFluor 450 avant le début de l'infection. L'infection a été suivie par microscopie confocale automatisée durant 24 heures à intervalles réguliers d'1 heure. (a) Quantification du pourcentage de cellules infectées en fonction de la dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique au cours du temps. Les ostéoblastes infectés sont catégorisés en trois sous-population : (1) Toutes les bactéries sont exclusivement non-réplicatives tout au long de la cinétique ou au moins une bactérie conduit à une phase répliative (2) lente ou (3) rapide classique. (b) Quantification du pourcentage de cellules infectées subissant une phase répliative rapide classique en cours ou révolue au cours du temps. (c) Quantification de l'initiation et de la durée des phases répliatives rapides. (d) Quantification du pourcentage de cellules infectées en fonction de la dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique ainsi que de son devenir au cours du temps. (e) Quantification du pourcentage de cellules infectées en fonction de la dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique sur la période d'acquisition. (a- e) Représentent la moyenne \pm SD de neuf répliatas biologiques indépendants dans trois puits par condition et par répliat a. (a, d, e) $n = 1675$ cellules suivies dont 840 étaient infectées à 1 hpi. (b, c) $n = 369$ cellules infectées comportant une phase répliative rapide classique dont 344 révolues. La significativité statistique a été déterminé par le test « one-way ANOVA » suivi par le test de comparaisons multiples de Tukey (**** $P < 0.0001$).

2 heures ou d'infection de 0 hpi à 1 hpi. Corroborant cette observation, des charges bactériennes résiduelles à la suite de l'éclatement de l'ostéoblaste à la fin de la phase répliative rapide n'ont été observées qu'à partir de 4 hpi. 84,43% des phases répliatives rapides classiques ont eu une durée comprises entre 3h et 5h (Fig. I-4a,b). A 24 hpi, $41,77\% \pm 6,87$ des cellules hôtes ont subi une phase répliative (IIIa) complète, jusqu'à l'éclatement de l'ostéoblaste (Fig. I-4a).

Les sous-catégories (I), (II), et (IIIa) ont représenté $90,85\% \pm 6,2$; $2,8\% \pm 1,6$; et $6,36\% \pm 5,89$ des ostéoblastes infectés à 1 hpi, respectivement (Fig. I-4a). L'augmentation graduelle de la sortie de quiescence et ainsi du taux d'ostéoblastes comportant des phases répliatives (II) et (IIIa) en cours à inversement conduit à la réduction du pourcentage d'ostéoblastes infectés par *S. aureus* exclusivement non répliatifs (I). Une phase de plateau a été atteinte dont les sous-catégories (IIIa) en cours et (I) représentaient respectivement $15,82\% \pm 6,03$ et $73,71\% \pm 5,3$ des ostéoblastes infectés à 9 hpi et à 10 hpi respectivement. A 16 hpi, une rupture de ce plateau a eu lieu avec la diminution du taux des phases répliatives (IIIa) en cours et l'augmentation du taux d'ostéoblastes comportant des *S. aureus* exclusivement non répliatifs (I) jusqu'à $9,43\% \pm 5,47$ et $82,79\% \pm 10,76$ respectivement à 24 hpi.

Au cours de la cinétique, le pourcentage d'ostéoblastes infectés a diminué progressivement jusqu'à atteindre $48,97\% \pm 8,61$ de réduction à 24 hpi (Fig. I-4d). La perte de signal bactérien d'une partie des sous-catégories (I) et (II) lors de la cinétique, notamment à la suite de la mort de l'ostéoblaste, rentre en compte dans cette réduction. Le relargage total du contenu bactérien lors des phases répliatives (IIIa) alimente immédiatement cette réduction. Un relargage partiel conduit à une charge résiduelle

bactérienne pouvant se maintenir tout au long de la cinétique ou bien disparaître et ainsi alimenter d'autant la réduction du pourcentage d'ostéoblastes infectés.

Ainsi, sur l'intégralité de la période d'acquisition, $44,32\% \pm 5,87$ des ostéoblastes infectés ont comporté des *S. aureus* exclusivement non réplicatifs (I), $9,4\% \pm 3,08$ des phases réplicatives lentes (II) et $46,29\% \pm 5,77$ des phases réplicatives rapides classiques (IIIa) (Fig. I-4a). Au sein de la sous-catégorie (IIIa), les ostéoblastes ont pu comporter de manière concomitante des bactéries non-répliquatives, visibles par le maintien de l'intensité de fluorescence de l'eFluor 450, à hauteur de $63,71\% \pm 11,03$ (Fig. I-3c,f). Ainsi, $73,8\%$ des ostéoblastes infectés ont été la niche soit exclusive (I) soit partagée (IIIa) de *S. aureus* non réplicatifs.

1.4.2. Impact de la multiplicité d'infection

Tandis que la diminution de la multiplicité d'infection par un facteur 2 ou 4 a significativement réduit le pourcentage d'ostéoblastes infectés, le nombre de pixel de GFP par cellule à 1 hpi et donc par extension la charge bactérienne initiale n'a pas été impactée (Fig. I-5a,b). Ainsi, la sortie de quiescence pourrait avoir le même taux de chance de se produire par ostéoblaste dans l'hypothèse où celle-ci serait stochastique.

La dynamique de réplication de *S. aureus* n'a pas été impactée par la diminution de la multiplicité d'infection (Fig. I-5c).

Les phases réplicatives (IIIa) se sont réparties séquentiellement au cours de la cinétique avec une durée moyenne de 4h sans différence entre les multiplicités d'infections employées (Fig. I-5d,e).

1.5. Conclusions et perspectives

1.5.1. Validation du modèle

Ainsi, l'ensemble de ces résultats ont permis d'attester l'efficacité de la méthode développée pour suivre la dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique par microscopie photonique à l'aide de l'analyse de la surface bactérienne et de la dilution de fluorescence à une multiplicité d'infection optimale de 8.

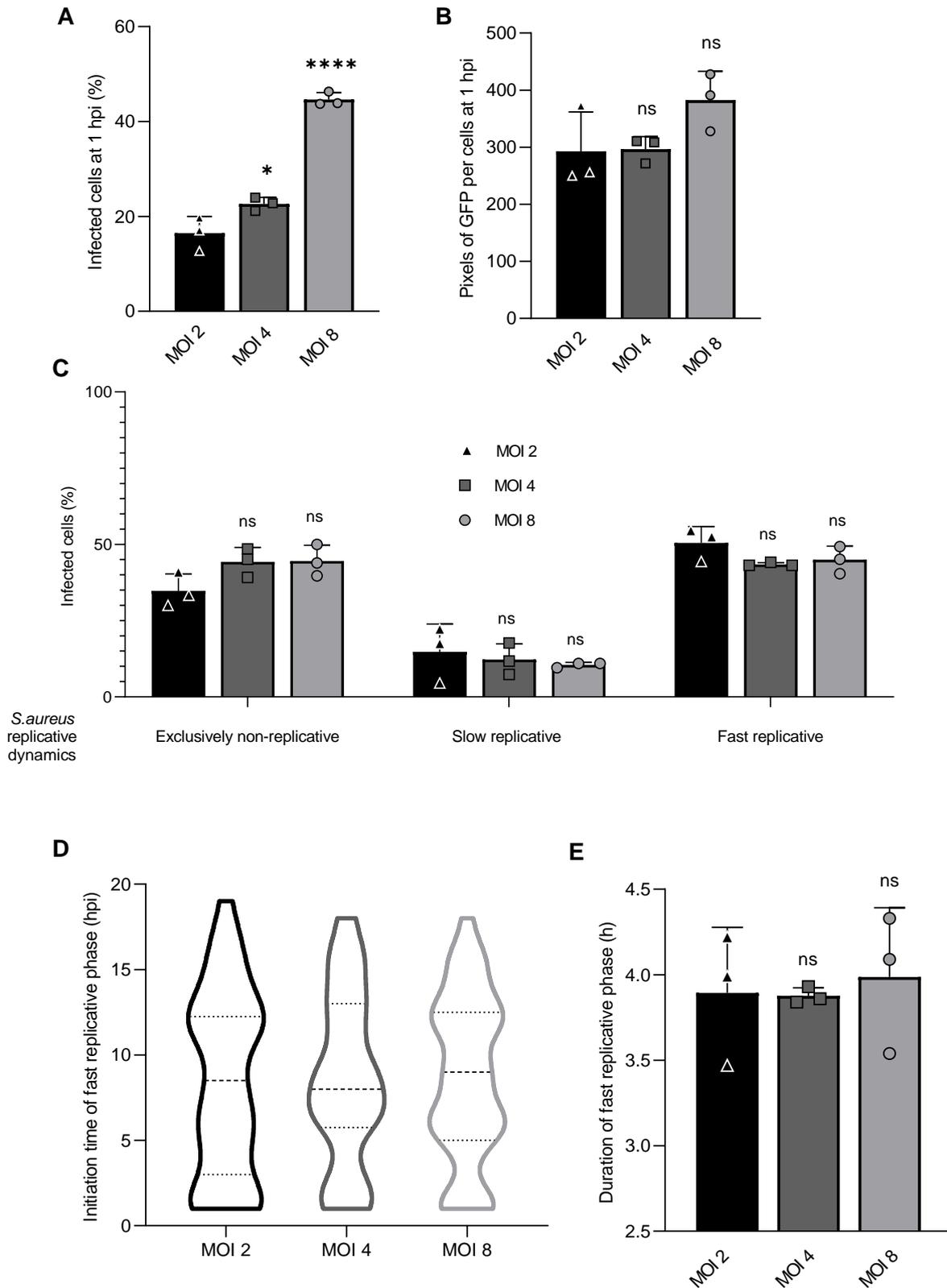


Figure I-5 : Légende page suivante

Figure I-5 : Dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique et paramètres d'infection en fonction de la multiplicité d'infection. Des ostéoblastes ont été marqués et infectés, à une gamme de multiplicité d'infection, avec *S. aureus* SH1000-GFP marquée à l'eFluor 450 comme indiqué précédemment dans la figure I-3. L'infection a été suivie par microscopie confocale automatisée durant 24 heures à intervalles réguliers d'1 heure. Quantification du (a) pourcentage de cellules et du (b) nombre de pixels de GFP par cellules à 1 hpi. (c) Quantification du pourcentage de cellules infectées en fonction de la dynamique de réplication de *S. aureus* intracellulaire. Quantification de (d) l'initiation ou de la (e) durée des phases réplcatives rapides. (a - e) Représentent la moyenne \pm SD de trois répliquas biologiques indépendants dans trois puits par condition et par répliqua. (a - c) n = 1906 cellules suivies dont 601 étaient infectées à 1 hpi. (d, e) n = 209 cellules infectées comportant une phase réplcative complète. (a - c) La significativité statistique a été déterminé par le test « one-way ANOVA » suivi par le test de comparaisons multiples de Dunnett (*P<0.05, ****P<0.0001).

1.5.2. Dynamique de réplication intraostéoblastique

Ainsi, l'ensemble de ces résultats ont mis en lumière une dynamique de réplication hétérogène de *S. aureus* intraostéoblastique durant 24 hpi.

Les ostéoblastes infectés contiennent soit (I) des *S. aureus* exclusivement non réplcatifs dans 44,32% \pm 5,87 des cas, soit (II) des phases réplcatives lentes dans 9,4% \pm 3,08 des cas, soit (IIIa) des phases réplcatives rapides classiques dans 46,29% \pm 5,77 des cas.

Les phases réplcatives rapides classiques (IIIa) se répartissent sur l'ensemble de la cinétique dues une sortie de la quiescence de *S. aureus* séquentielle. Un maximum d'événements est enregistré de 9 hpi à 16 hpi. La majorité de ces phases réplcatives (IIIa) dure entre 3 heures et 5 heures et elles conduisent inévitablement à l'éclatement de l'ostéoblaste et au relargage de tout ou partie du contenu bactérien.

Au cours de la cinétique, la sous-catégorie (I) représente la majorité des ostéoblastes infectés atteignant son plus bas niveau à 13 hpi à 72,7% \pm 3,17 coïncidant avec le maximum de phases réplcatives en cours.

Les ostéoblastes contenant des phases réplcatives rapides classiques (IIIa) contiennent également des staphylocoques non réplcatifs dans 63,71% \pm 11,03 des cas, augmentant ainsi le taux global de cellules hôtes comportant au moins un *S. aureus* non réplcatif à 73,8%.

La présence dès le début de l'analyse, à 1 hpi de phases réplcatives (II) et (IIIa) s'explique par une sortie de la quiescence précoce s'effectuant durant la période s'étendant de la co-incubation jusqu'à 1 hpi. Il est important de noter que les *S. aureus* ont vraisemblablement infecté les ostéoblastes de manière séquentielle. Ceci pourrait en partie expliquer l'apparition graduelle des phases réplcatives, au moins dans les premiers temps de l'infection.

S. aureus intraostéoblastique peut se retrouver confronter à un traitement antibiotique dans le cadre d'infections osseuses, notamment une combinaison de rifamycines et de fluoroquinolones. Ainsi,

l'efficacité des traitements de rifampicine et/ou de ciprofloxacine à concentrations cliniques à éradiquer *S. aureus* intraostéoblastique a été investiguée dans l'axe 2 de ces travaux de recherche. La dynamique de réplication des survivants a été étudiée de manière concomitante.



AXE 2. Impact d'antibiotiques à concentrations cliniques

2.1. Introduction

Nous avons pu démontrer au sein de l'axe précédent l'hétérogénéité de la dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique. Celle-ci comporte des phases réplcatives rapides classiques (IIIa) conduisant inévitablement à l'éclatement de l'ostéoblaste et au relargage des bactéries dans le milieu extracellulaire bactéricide. Toutefois, la majorité des ostéoblastes infectés comporte au moins un *S. aureus* non réplcatif tout au long de la période d'infection de la cellule hôte.

L'objectif de cet axe 2 est d'investiguer la dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique sous un traitement d'antibiotiques à concentrations cliniques ainsi que l'efficacité de ces derniers à éradiquer la charge bactérienne. Pour ce faire un traitement de rifampicine et de ciprofloxacine à concentrations cliniques, seules ou en combinaison, a été implémenté dans le modèle d'étude et maintenue dès début de l'infection.

2.2. Méthodes

2.2.1. Cultures et marquages bactériens et cellulaires

Les cultures et marquages de SH1000-GFP et des ostéoblastes MG63 ont été effectués tel que décrit précédemment (Axe 1 – 1.2.).

2.2.2. Infections, CFU et microscopie photonique en temps réel

Les infections ont été effectuées tel que décrit précédemment (Axe 1 – 1.2.). Toutefois, après 2 heures de co-incubation, à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO₂, les bactéries extracellulaires restantes ont été éliminées par le remplacement du milieu avec un milieu d'infection frais contenant 10 µg/mL de lysostaphine (Sigma, L7386) avec ou sans antibiotiques. La rifampicine a été utilisée à concentration clinique osseuse de 6 µg/mL (Sigma, R3501). La ciprofloxacine a été utilisée à concentration clinique osseuse de 2 µg/mL, à concentration clinique plasmatique de 10 µg/mL ainsi qu'à une concentration intermédiaire de 5 µg/mL (Sigma, 17850). La combinaison de la rifampicine avec la ciprofloxacine à concentration clinique osseuse a également été utilisée. Les infections ont été conduites avec la souche SH1000-GFP à une multiplicité d'infection de 8.

Une nouvelle catégorie d'ostéoblastes infectés a été mise en lumière. Il s'agit d'ostéoblastes comportant une phase répliquative rapide non-conventionnelles (IIIb). Elles sont définies par l'augmentation du nombre de pixels de GFP d'au moins 100 durant au moins deux temps successifs suivi par un maintien du nombre de pixels de GFP maximal durant au moins trois temps successifs. Le devenir des ostéoblastes infectés à la fin de la phase répliquative a été manuellement observé. La phase répliquative rapide non-conventionnelle conduit au maintien de bactéries répliquatives ou s'étant répliquées dans une structure circulaire au sein d'un ostéoblaste au phénotype intact.

Les expériences de dénombrement de CFU sur gélose, de microscopie photonique confocale en temps réel, l'acquisition des images ainsi que leur analyse ont été effectuées tel que décrit précédemment (Axe 1 – 1.2.).

2.2.3. Aire des colonies sur gélose

Les géloses comportant les colonies obtenues d'après les lysats cellulaires ont été photographiées en utilisant un compteur de colonies automatique (Interscience, Scan 1200). L'analyse des images a été effectuée à l'aide d'une macro automatique développée pour ce projet et fonctionnant sous le logiciel Fiji (v1.53t, NIH). A la suite de l'exclusion des colonies bordantes n'apparaissant pas intégralement dans la zone d'intérêt, la segmentation des images basée sur un seuillage de type « isodata » a été effectuée. Subséquemment, les colonies, notamment leurs aires ont été mesurées à l'aide de l'outil « analyze particles » avec une ségrégation faite sur la taille (0-400) et la circularité (0,9-1).

Les SCV ont été définis comme des colonies dont l'aire est au moins 5 fois plus petite que l'aire médiane des colonies de la condition contrôle sans traitement antibiotique.

2.2.4. Concentration minimale inhibitrice

La concentration minimale inhibitrice (CMI) de la rifampicine et de la ciprofloxacine a été déterminée par la méthode de microdilution de bouillon en suivant les recommandations du « Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne PA »^{387,388}. Brièvement, la CMI a été déterminée contre SH1000-GFP en LB ou en milieu d'infection en plaque 96 puits (Falcon, 351172). Les inocula ont été réalisés par suspension saline à partir de colonies isolées sur gélose d'agar avec 10 µg/mL d'érythromycine (Sigma, E5389) et ajusté à une turbidité de 0.5 McFarland. Les suspensions ont été diluées dans les milieux pour atteindre une concentration finale de $2,5 \times 10^5$ CFU/mL dans les puits. Des puits de contrôles de croissance et de stérilité ont été ajoutés. Les CMI ont été définies comme les plus faibles concentrations de rifampicine inhibant complètement la croissance des cultures de *S. aureus*. La

croissance est mesurée par turbidité en lecteur de plaque à 600 nm après 20 heures d'incubation à 37°C.

2.2.5. Courbe de survie

Les courbes de survie ont été effectuées en milieu LB supplémenté ou non de rifampicine à 4, 8, 16, 1000, et 10000 fois la CMI (Sigma, R3501). A partir de colonies isolées sur gélose d'agar avec 10 µg/mL d'érythromycine (Sigma, E5389), SH1000-GFP a été cultivée en LB avec 10 µg/mL d'érythromycine, à 37°C avec rotation à 240 rpm durant 7 heures et 17 heures afin d'obtenir des cultures en phases exponentielle et stationnaire, respectivement. Les inocula ont été préparés d'après les phases exponentielles avec 5×10^5 CFU/mL ou directement d'après les cultures en phase stationnaire. Les inocula ont été traités aux différentes concentrations de rifampicine et incubés à 37°C avec rotation à 240 rpm. A différents temps (0 heure, 2 heures, 4 heures, 6 heures, et 24 heures), des échantillons des cultures ont été prélevés et déposés sur géloses TSA (Biomérieux). Après 14 à 18 heures d'incubation à 37°C, les colonies ont été énumérées à l'aide d'un compteur de colonies automatique (Interscience, Scan 4000).

2.2.6. Spectrométrie de masse

Des ostéoblastes MG63 ont été cultivés à confluence en plaque 24 puits (Falcon, 353047) pendant 24 heures. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec de la rifampicine (Sigma, R3501) à concentration clinique osseuse de 6 µg/mL, ou de la ciprofloxacine à différentes concentrations (2 µg/mL, 5 µg/mL, et 10 µg/mL) dans du milieu d'infection et incubées à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO₂. Concernant la rifampicine, à 6 heures post-traitement, les cellules ont été lavées trois fois ou non avec du DPBS -/- à 37°C pour retirer le traitement de rifampicine du milieu. Les cellules ont de nouveau été incubées dans du milieu d'infection frais. A 6 heures et 5 minutes, 8 heures, 11 heures et 24 heures post-traitement, les cellules ont été lavées avec du PBS -/- à 37°C puis collectées. Concernant la ciprofloxacine, à 5 minutes, 1 heure, 6 heures, et 24 heures post-traitement, les cellules ont été lavées avec du PBS -/- à 37°C puis collectées. Les suspensions cellulaires ont ensuite été centrifugées à 490 rcf à 4°C durant 5 minutes. Les culots résultants ont par la suite été lavés avec du PBS -/- à 4°C. Cette étape a été répétée 3 fois. Les culots résultants ont été suspendus dans 50 µL de PBS -/- à 37°C et transférés dans des tubes à faible liaison. La concentration cellulaire a été mesurée à l'aide d'un compteur automatique. 50 µL d'acétonitrile ont été ajoutés par tube et les suspensions cellulaires ont été incubées durant 5 minutes à température ambiante après un mélange délicat. Les

échantillons ont été stockés à -80°C jusqu'à l'analyse par spectrométrie de masse. Les cellules non traitées ont été utilisées pour la préparation des courbes standards de calibration.

L'analyse qualitative a été effectuée à l'aide d'une colonne « Waters ACQUITY UHPLC HSS T3 » ($1.8\ \mu\text{m}\ 50 \times 2.1\text{mm}$) à température ambiante et un flux de phase mobile réglé à $0,5\ \text{mL}/\text{min}$. La phase mobile consistait en (A) $0,1\%$ d'acide formique dans de l'eau, et (B) $0,1\%$ d'acide formique dans 95% d'acétonitrile et 5% d'eau. Un programme d'élution linéaire graduelle a été appliqué comme suit : 0 à 1 minutes : $0\text{-}100\%$ B ; 1 à 1,3 minutes : 100% B ; 1,3 à 1,4 minutes : $100\text{-}0\%$ B ; 1,4 à 2,2 minutes : 0% B. Le volume d'injection des échantillons était de $2\ \mu\text{L}$. La spectrométrie de masse a été réalisée à l'aide d'un spectromètre de masse TSQ Quantiva (Thermo Fisher Scientific) avec un système UltiMate 3000 XRS UHPLC (Thermo Fisher Scientific). Les données ont été traitées à l'aide de Trace Finder version 3.3 (Thermo Fisher Scientific). La détection de spectrométrie de masse a été effectuée en mode d'ion positif. Les antibiotiques ont été quantifiés avec une réaction sélectionnée mesurant la transition (temps dwell $\sim 50\text{ms}$) : $m/z\ 823,371$ à $791,236$ pour la rifampicine et $332,141$ à $287,986$ pour la ciprofloxacine. Les détails des valeurs de la collision d'énergie et de la lentille RF sont présentés dans le tableau II-1.

Ion source	Ciprofloxacine	Rifampicine
Spray Voltage Positive Ion (V)	3400	
Sheath Gas (Arb)	25	
Auxiliary Gas (Arb)	5	
Sweep Gas (Arb)	1	
Ion transfer Tube Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	350	
Vaporizer Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	400	
SRM		
Collision Energy (V)	18	15
Dwell Time (ms)	50	
RF lens (V)	75	91
Q1 Resolution (FWHM)	0,7	
Q3 Resolution (FWHM)	0,7	
CID Gas (mTorr)	1,5	

Tableau II-1 : Détails des valeurs de la collision d'énergie et de la lentille RF des expériences de spectrométrie de masse.

2.2.7. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées tel que décrit précédemment (Axe 1 – 1.2.).

2.3. Etude de l'impact d'antibiotiques à concentrations cliniques osseuses

2.3.1. Paramètres d'infection

Le premier objectif de cet axe a été d'étudier les paramètres d'infections sous un traitement antibiotique à concentration clinique osseuse.

L'application d'un traitement de rifampicine et/ou de ciprofloxacine n'a pas impacté le pourcentage d'ostéoblastes infectés ni le nombre de pixel de GFP par ostéoblaste, se rapportant à la charge bactérienne, à 1 hpi (Fig. II-1a,b). Toutefois, les cinétiques d'infection, se rapportant au pourcentage de cellules infectées au cours du temps, ont été hétérogènes selon les conditions (Fig. II-1c). En effet, la cinétique d'infection sans traitement antibiotique a présenté un aspect décroissant biphasique avec un changement de pente à 9 hpi. L'application d'un traitement de ciprofloxacine a décalé ce changement de pente à 13 hpi. L'application d'un traitement de rifampicine, seule ou en combinaison avec la ciprofloxacine, a modifié la cinétique d'infection présentant ainsi un aspect triphasique. Elle a consisté en une première phase de réduction rapide du pourcentage d'ostéoblastes infectés jusqu'à 6 hpi avec $12,33\% \pm 2,52$ de réduction avant d'atteindre une phase de plateau. Cette phase a été maintenue jusqu'à 11 hpi avant de laisser place à une seconde phase de réduction conduisant à une diminution globale de $34\% \pm 3,61$ du pourcentage d'ostéoblastes infectés sous traitement de rifampicine.

Ainsi, les modifications observées dans la cinétique d'infection suggèrent un impact des traitements antibiotiques sur la dynamique de réplication et la cytotoxicité.

2.3.2. Dynamique de réplication

Le second objectif de cet axe a été d'étudier la dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique sous un traitement antibiotique à concentrations cliniques osseuses.

2.3.2.1. Rifampicine et *S. aureus* non réplicatifs

L'application d'un traitement de rifampicine, seule ou en combinaison avec la ciprofloxacine, a significativement impacté la dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique (Fig. II-2a). En effet, les ostéoblastes comportant des phases réplcatives rapides classiques (IIIa) n'ont pas été observés sous traitement de rifampicine. Le pourcentage d'ostéoblastes possédant des *S. aureus* lentement réplcatifs (II) au cours de la cinétique a significativement diminué passant de $10,59\% \pm 1,24$ dans la condition contrôle à $3,25\% \pm 0,99$ sous un traitement de rifampicine. A l'opposé, le pourcentage d'ostéoblastes, niches de *S. aureus* exclusivement non réplcatifs (I), a significativement augmenté

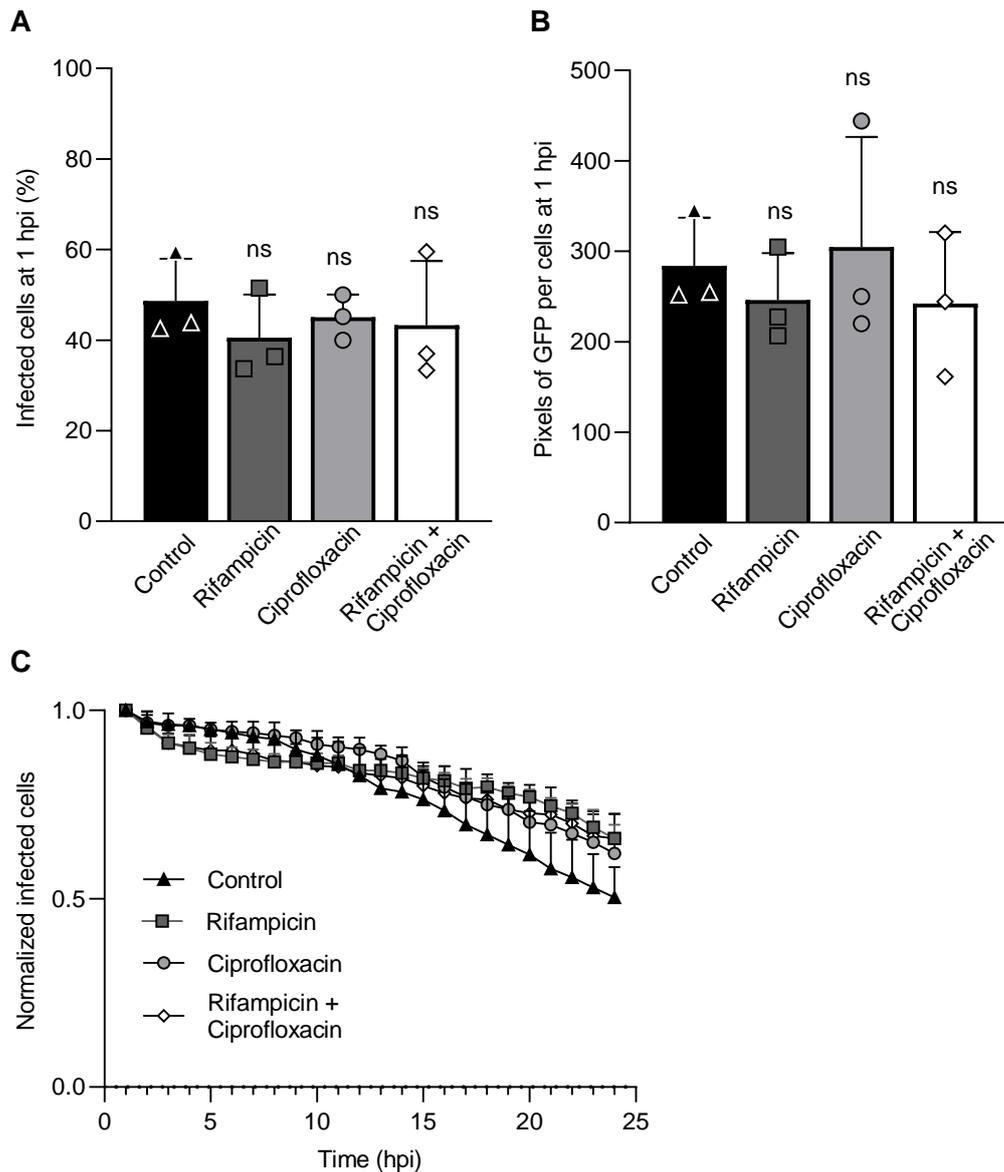


Figure II-1 : Paramètres d'infection sous traitement de rifampicine et/ou ciprofloxacine à concentrations cliniques osseuses. Des ostéoblastes ont été marqués et infectés, à MOI 8, avec *S. aureus* SH1000-GFP marquée à l'eFluor 450 comme indiqué précédemment dans la figure I-3. Les cellules infectées ont été traitées ou non à la rifampicine et/ou à la ciprofloxacine à concentrations cliniques osseuses. Les paramètres d'infections ont été suivis par microscopie confocale automatisée durant 24 heures à intervalles réguliers d'1 heure. Quantification du (a) pourcentage de cellules et du (b) nombre de pixels de GFP par cellules à 1 hpi. (c) Quantification de la cinétique de cellules infectées au cours du temps. (a - c) Représentent la moyenne \pm SD de trois répliquas biologiques indépendants dans trois puits par condition et par répliqua, $n = 2972$ cellules suivies dont 1301 étaient infectées à 1 hpi. (a, b) La significativité statistique a été déterminée par le test « one-way ANOVA » suivi par le test de comparaisons multiples de Dunnett.

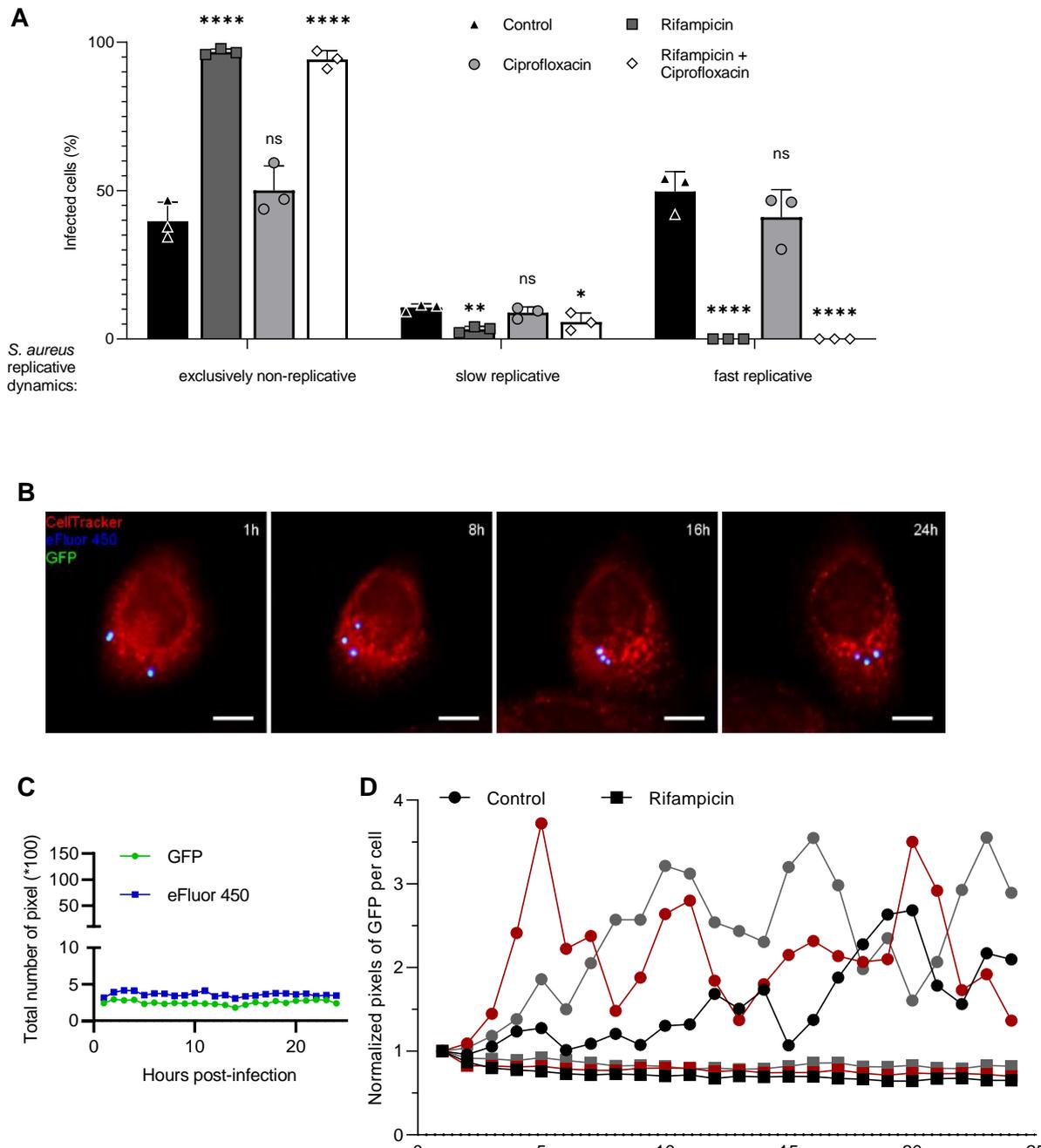


Figure II-2 : Légende page suivante

passant de $39,67\% \pm 6,42$ à $96,75\% \pm 0,99$ sous un traitement de rifampicine (Fig. II-2a-c). L'addition de ciprofloxacine à concentration clinique osseuse n'a pas impacté la dynamique de réplication retrouvée sous un traitement de rifampicine seule (Fig. II-2a). Il est important de noter que des phases répliquatives rapides ont été observées à 0 hpi visible par l'agrégation de *S. aureus* et l'absence de marquage à l'eFluor 450. Sous un traitement de rifampicine, l'ensemble de ces observations n'ont plus été retrouvées dès 1 hpi. Le nombre de pixels de GFP moyen par ostéoblastes infectés, se rapportant à la charge bactérienne, a présenté un aspect biphasique sous traitement de rifampicine (Fig. II-2d). En effet, une diminution rapide a eu lieu durant les deux premières heures post-infection passant de 1 à

Figure II-2 : Dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique sous un traitement de rifampicine et/ou ciprofloxacine à concentrations cliniques osseuses. Des ostéoblastes ont été marqués et infectés, à MOI 8, avec *S. aureus* SH1000-GFP marquée à l'eFluor 450 comme indiqué précédemment dans la figure I-3. Les cellules infectées ont été traitées aux antibiotiques et suivies par microscopie comme indiqué précédemment dans la figure II-1. (a) Quantification du pourcentage de cellules infectées en fonction de la dynamique de réplication de *S. aureus* intracellulaire. Les ostéoblastes infectés sont catégorisés en trois sous-population : (1) Toutes les bactéries sont exclusivement non répliquatives tout au long de la cinétique ou au moins une bactérie conduit à une phase répliquative (2) lente ou (3) rapide. (b) Images de microscopie en temps réel montrant un ostéoblaste infecté par *S. aureus* exclusivement non répliquatif sous un traitement de rifampicine. Les barres d'échelles représentent 10 μm . (c) Quantification du nombre total de pixels de GFP et d'eFluor 450 relatif aux images de microscopie présentés en (b). (d) Quantification du nombre total de pixels de GFP par cellules infectées. Chaque couleur représente un répliquas biologique indépendant provenant de trois puits. (a) Représente la moyenne \pm SD de trois répliquas biologiques indépendants dans trois puits par condition et par répliqua, $n = 2972$ cellules suivies dont 1301 étaient infectées à 1 hpi. La significativité statistique a été déterminée par le test « one-way ANOVA » suivi par le test de comparaisons multiples de Dunnett (* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, **** $P < 0.0001$).

$0,87 \pm 0,04$. Puis une seconde diminution lente et progressive a eu lieu tout au long des 22 heures restantes de la cinétique conduisant à une réduction de $0,87 \pm 0,04$ à $0,72 \pm 0,09$. Ainsi à 24 hpi une réduction globale du nombre de pixels de GFP par ostéoblastes infectés de $27,73\% \pm 8,69$ s'est produite. A l'inverse, le nombre de pixels de GFP par ostéoblastes infectés dans la condition contrôle a présenté un aspect en dent de scie avec des augmentations et réductions successives. Ces profils ont été dépendants de l'expérience. En effet, les phases d'augmentation ont coïncidé avec les maximums de phases répliquatives rapides classiques (IIIa) en cours qui eux-mêmes ont été variable entre expériences. Les réductions rapides du nombre de pixels de GFP par ostéoblastes infectés ont correspondu avec la durée moyenne des phases répliquatives rapides classiques (IIIa) conduisant à l'éclatement de l'ostéoblaste et au relargage de tout ou partie du contenu bactérien. Notons ici que le traitement de rifampicine a réduit le nombre de pixels de GFP moyen par ostéoblaste par rapport à la condition contrôle dès 1 hpi. Il est important de noter que des *S. aureus* sortant de la quiescence ont été observés au cours de la cinétique avant d'être éliminés dès le temps d'acquisition suivant, probablement par l'action de la rifampicine.

Ainsi, un traitement de rifampicine a modifié significativement la dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique en réduisant ou inhibant les phases répliquatives lentes (II) et rapides classiques (IIIa), respectivement. La quasi-totalité des *S. aureus* intraostéoblastiques survivants ont de ce fait présenté un phénotype non répliquatif, l'autre partie minoritaire étant lentement répliquatif.

2.3.2.2. Ciprofloxacine et phases réplcatives rapides non-conventionnelles

L'application d'un traitement de ciprofloxacine à concentration clinique osseuse n'a pas impacté la répartition des ostéoblastes infectés en fonction de la dynamique de réplication de *S. aureus* (Fig. II-2a). Ceci est en contradiction avec la variation de la cinétique d'infection qui suggère l'hétérogénéité de la dynamique de réplication entre conditions (Fig. II-1c). Un regard sur les phases réplcatives rapides classiques (IIIa), a démontré que l'initiation et la durée de celles-ci n'ont pas été impactées par le traitement de ciprofloxacine (Fig. II-3a,b). Elles n'ont donc pas été impliquées dans la variation de la cinétique d'infection.

Toutefois, une nouvelle sous-catégorie de phases réplcatives rapides dites non-conventionnelles (IIIb) a été mise en lumière sous traitement de ciprofloxacine (Fig. II-3c,d). Ces phases réplcatives rapides non-conventionnelles (IIIb) ont représenté $30,75\% \pm 2,7$ des phases réplcatives rapides totales (III) soit $11,71\% \pm 3,09$ des ostéoblastes infectés. Celles-ci se sont caractérisées par une augmentation drastique du nombre de pixel de GFP avant d'atteindre une phase de plateau pouvant se maintenir jusqu'à la fin de l'acquisition (Fig. II-3d). A la différence des phases réplcatives rapides classiques (IIIa) les phases réplcatives rapides non-conventionnelles (IIIb) ne conduisent pas à l'éclatement de l'ostéoblaste et donc au relargage des bactéries. Les *S. aureus* réplcatifs des phases (IIIb) ont été exclusivement retrouvés sous forme contrainte dans une structure circulaire (Fig. II-3c).

L'analyse du nombre de pixels de GFP par ostéoblastes infectés, se rapportant à la charge bactérienne, a démontré la présence de ces phases réplcatives rapides non-conventionnelles (IIIb) au sein de la population. En effet, le nombre de pixel de GFP par ostéoblastes infectés a augmenté progressivement d'un facteur 3 jusqu'à atteindre une phase de plateau à 18 hpi et se maintenant jusqu'à la fin de l'acquisition. Le profil du nombre de pixels de GFP en dent de scie dans la condition contrôle est ainsi masqué dans la condition ciprofloxacine par les phases (IIIb) maintenant une charge bactérienne élevée dans au moins $30,75\% \pm 2,7$ des phases réplcatives rapides totales (III).

Ainsi, le traitement de ciprofloxacine à concentration clinique osseuse n'a pas impacté la répartition des ostéoblastes infectés en fonction de la dynamique de réplication de *S. aureus*. Toutefois, le traitement de ciprofloxacine a induit $30,75\% \pm 2,7$ de schémas non-conventionnels (IIIb) parmi les phases réplcatives rapides totales (III), caractérisés par l'absence d'éclatement de la cellule hôte et le maintien des *S. aureus* réplcatifs dans une structure circulaire.

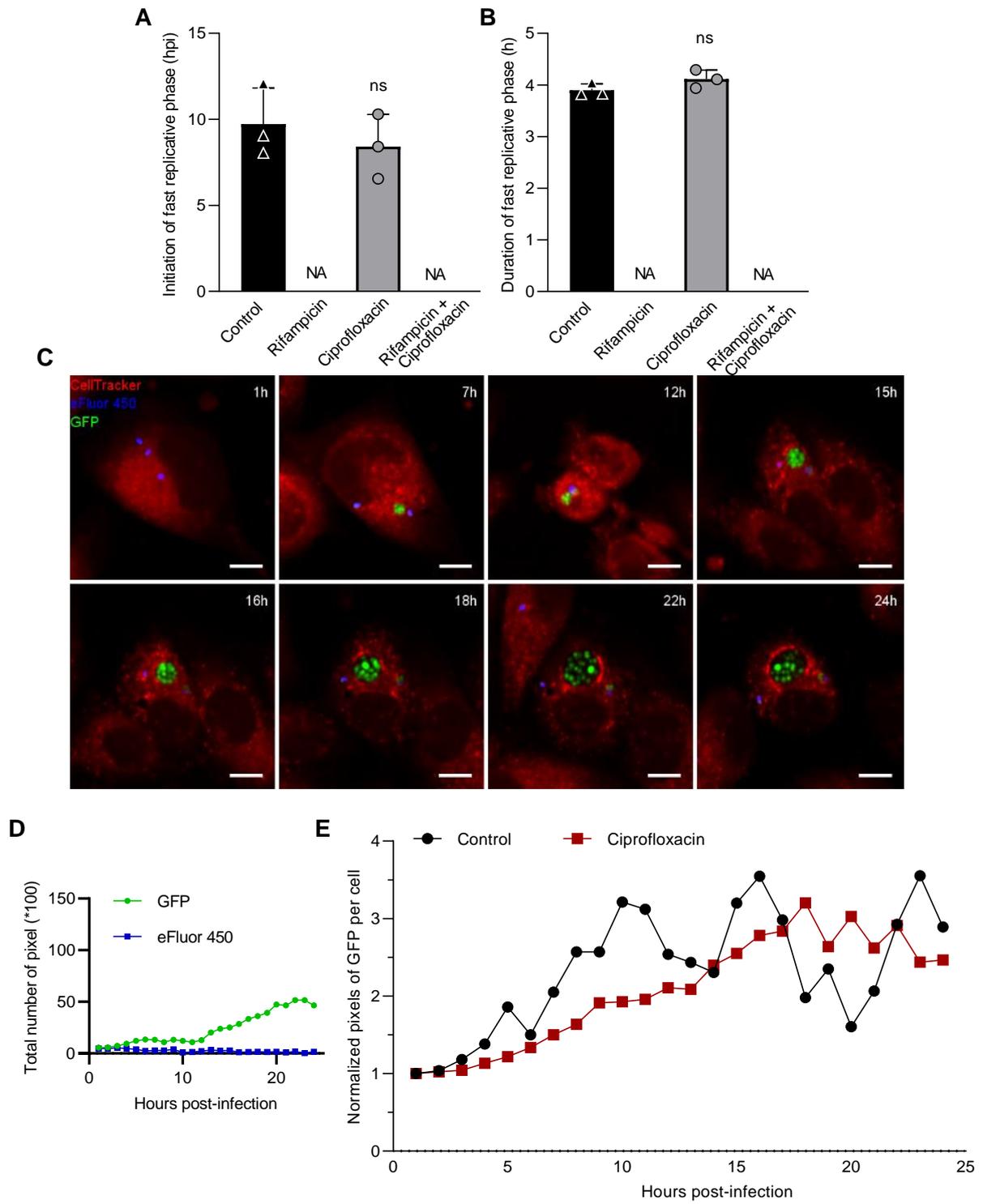


Figure II-3 : Légende page suivante

Figure II-3 : Un traitement de ciprofloxacine à concentration clinique osseuse induit des phases réplicatives non-conventionnelles. Des ostéoblastes ont été marqués et infectés, à MOI 8, avec *S. aureus* SH1000-GFP marquée à l'eFluor 450 comme indiqué précédemment dans la figure I-3. Les cellules infectées ont été traitées à la ciprofloxacine et suivies par microscopie comme indiqué précédemment dans la figure II-1. Quantification de (a) l'initiation ou de la (b) durée des phases réplicatives rapides. (a, b) Représentent la moyenne \pm SD de trois répliquas biologiques indépendants dans trois puits par condition et par répliqua. La significativité statistique a été déterminée par le test de student non-apparié. (c) Images de microscopie en temps réel montrant une phase répllicative non-conventionnelle sous un traitement de ciprofloxacine. Les barres d'échelles représentent 10 μ m. (d) Quantification du nombre total de pixels de GFP et d'eFluor 450 relatif aux images de microscopie présentés en (c). (e) Quantification du nombre total de pixels de GFP par cellules infectées. Représente un répliqua biologique indépendant sur trois.

2.3.3. Croissance sur gélose et *small colony variants*

La viabilité des *S. aureus* intraostéoblastiques sous traitement antibiotique a été investiguée par la mesure de la croissance de colonies sur gélose d'agar. De manière concomitante, la proportion de SCV a été étudiée.

2.3.3.1. Croissance sur gélose et viabilité

L'application d'un traitement de rifampicine ou de ciprofloxacine, seule ou en combinaison, à concentration clinique osseuse n'a pas impacté le nombre de CFU à 1 hpi (Fig. II-4a). Ainsi, le taux de *S. aureus* intraostéoblastiques viables et ayant la capacité de former des colonies sur géloses d'agar a été identique entre les conditions à 1 hpi. Cependant et de manière surprenante, la charge bactérienne intraostéoblastique ayant la capacité de former des colonies sur gélose d'agar à 24 hpi a été significativement plus élevée lors de l'application d'un traitement de rifampicine (Fig. II-4a). Le traitement de ciprofloxacine seule n'a pas impacté ce taux.

La différence du nombre de colonies retrouvées sur gélose d'agar entre les conditions contrôle et traitée à la rifampicine pourrait être due à la différence de dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique entre ces conditions. En effet, les phases réplicatives rapides classiques (IIIa), conduisant à l'éclatement de l'ostéoblaste hôte, ne sont pas retrouvées dans la condition traitée à la rifampicine et pourraient être ainsi incriminées. Dans les temps précédant l'éclatement de la cellule hôte, le phénotype de l'ostéoblaste est modifié par la charge bactérienne. Il devient sphérique et se détache du support (Fig. I-3c). L'étape de lavage nécessaire au retrait du traitement antibiotique précédant la récupération des *S. aureus* pourrait retirer les ostéoblastes endommagés. L'analyse par microscopie photonique des ostéoblastes infectés avant et après l'étape de lavage à 24 hpi a confirmé cette hypothèse (Fig. II-4b). Les images de microscopie en figure II-4b montrent un ostéoblaste infecté

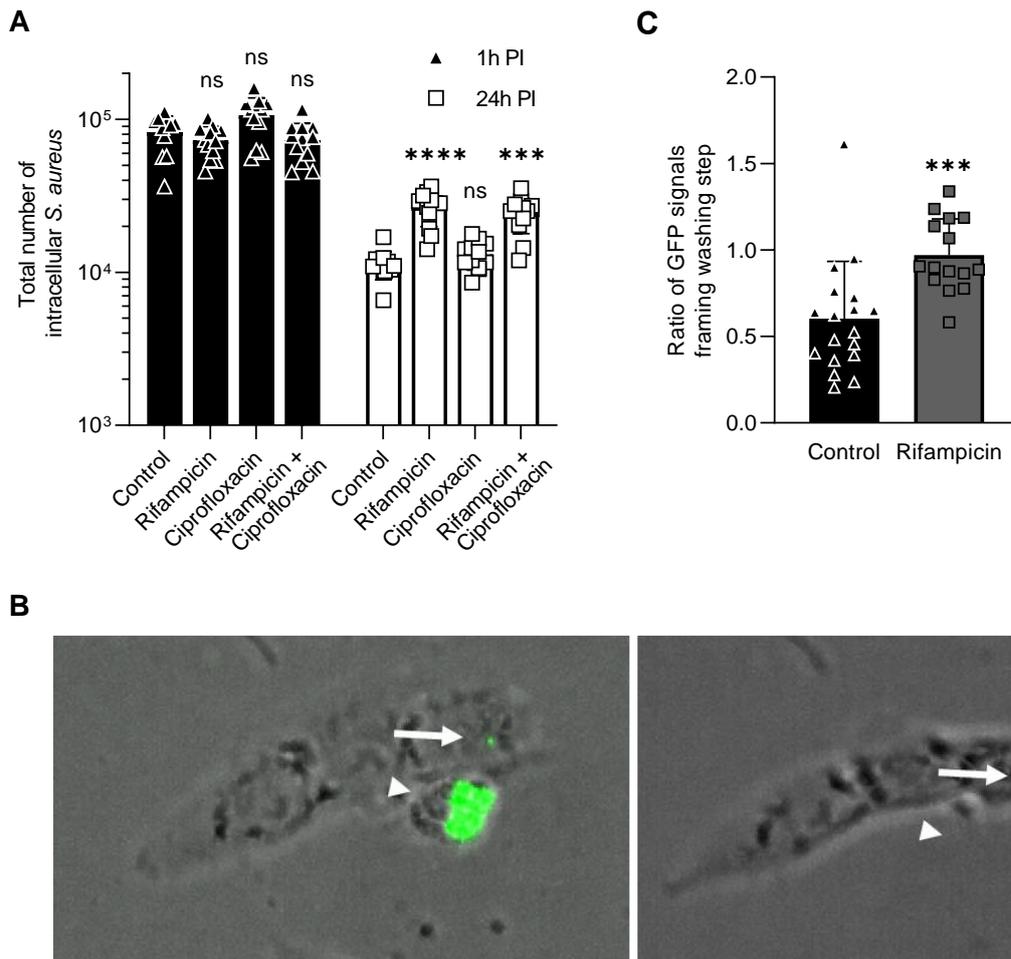


Figure II-4 : Impact de la rifampicine et/ou de la ciprofloxacine à concentration clinique osseuse sur la capacité de *S. aureus* intraostéoblastique à former des colonies sur géloses d'agar. Des ostéoblastes ont été marqués et infectés, à MOI 8, avec *S. aureus* SH1000-GFP marquée à l'eFluor 450 comme indiqué précédemment dans la figure I-3. (a) Quantification du nombre de CFU totaux. Les cellules infectées ont été traitées aux antibiotiques comme indiqué précédemment dans la figure II-1. A 1 hpi et 24 hpi, les cellules ont été lysées, les bactéries intracellulaires récupérées et déposées sur géloses d'agar. Les colonies résultantes ont été monitorées après 16h30 d'incubation. (b) Images de microscopie d'ostéoblastes infectés par *S. aureus* SH1000-GFP répliatifs ou non, (gauche) avant et (droite) après l'étape de lavage. (c) Quantification, par microscopie, du signal de GFP bornant une étape de lavage au PBS à 24 hpi. (a, c) Représente la moyenne \pm SD de (a) quatre ou (b) deux répliquas biologiques indépendants dans trois puits par condition et par répliqua. La significativité statistique a été déterminée par (a) le test « one-way ANOVA » suivi par le test de comparaisons multiples de Dunnett ou (c) le test de student non-apparié (**P<0.001, ****P<0.0001).

par une phase répliative rapide (III) qui a été retiré par le lavage tandis qu'un ostéoblaste infecté par un *S. aureus* non répliatif (I) s'est maintenu sur le support à 24 hpi. Le signal de GFP global, se rapportant à la charge bactérienne, bornant l'étape de lavage a été réduit de moitié environ dans la condition contrôle tandis qu'il est resté stable sous traitement de rifampicine (Fig. II-4c).

Le traitement à la rifampicine a réduit le nombre de CFU totaux entre les temps 1 hpi et 24 hpi de $0,44 \log \pm 0,03$.

Ainsi, les méthodes d'analyse nécessitant la récupération de la charge bactérienne intraostéoblastique après une étape de lavage présentent un biais en sous-estimant la population rapidement répliative (III). Les conditions traitées à la rifampicine ne présentent pas de phases répliatives rapides (III) et n'ont donc pas ce biais. La présence de colonies sur gélose d'agar dans l'ensemble des conditions à 1 hpi et 24 hpi a démontré la viabilité de *S. aureus* et ce malgré les traitements antibiotiques appliqués dans les milieux d'infection. Ceci démontre également la capacité de *S. aureus* à sortir de son état de quiescence pour former des colonies sur gélose d'agar à la suite de l'extraction de sa niche intraostéoblastique et de l'arrêt concomitant du traitement de rifampicine.

2.3.3.2. *Small colony variants*

Tout en prenant en considération le biais de la méthode de mesure de colonies sur gélose d'agar, le pourcentage de SCV au sein des différentes conditions a été étudié.

Les pourcentages de SCV sur gélose d'agar après un passage intraostéoblastique avec ou sans traitement antibiotique ont été similaires à 1 hpi (Fig. II-5a). Ces pourcentages ont été significativement augmentés pour chacune des conditions entre les temps 1 hpi et 24 hpi passant par exemple de $1,12\% \pm 1,38$ à $6,62\% \pm 2,9$ pour la condition contrôle. L'application d'un traitement de ciprofloxacine à concentration clinique osseuse n'a pas impacté les taux de SCV par rapport au contrôle. Cependant, le traitement de rifampicine, seule ou en combinaison avec la ciprofloxacine, a significativement augmenté le pourcentage de SCV à 24 hpi atteignant $11,57\% \pm 2$. A l'image de la dynamique de réplication, la combinaison de la rifampicine et de la ciprofloxacine n'a pas impacté le taux de SCV par rapport au traitement de rifampicine seule.

Les aires des colonies de chaque condition à 1 hpi ont présenté une fréquence de distribution se répartissant de manière homogène (Fig. II-5b). Toutefois, à 24 hpi, les fréquences de distributions des aires se sont réparties de manière hétérogène entre les conditions (Fig. II-5c). Les aires des colonies résultantes d'un environnement intraostéoblastique soumis à un traitement de rifampicine ont été plus petites par rapport au contrôle.

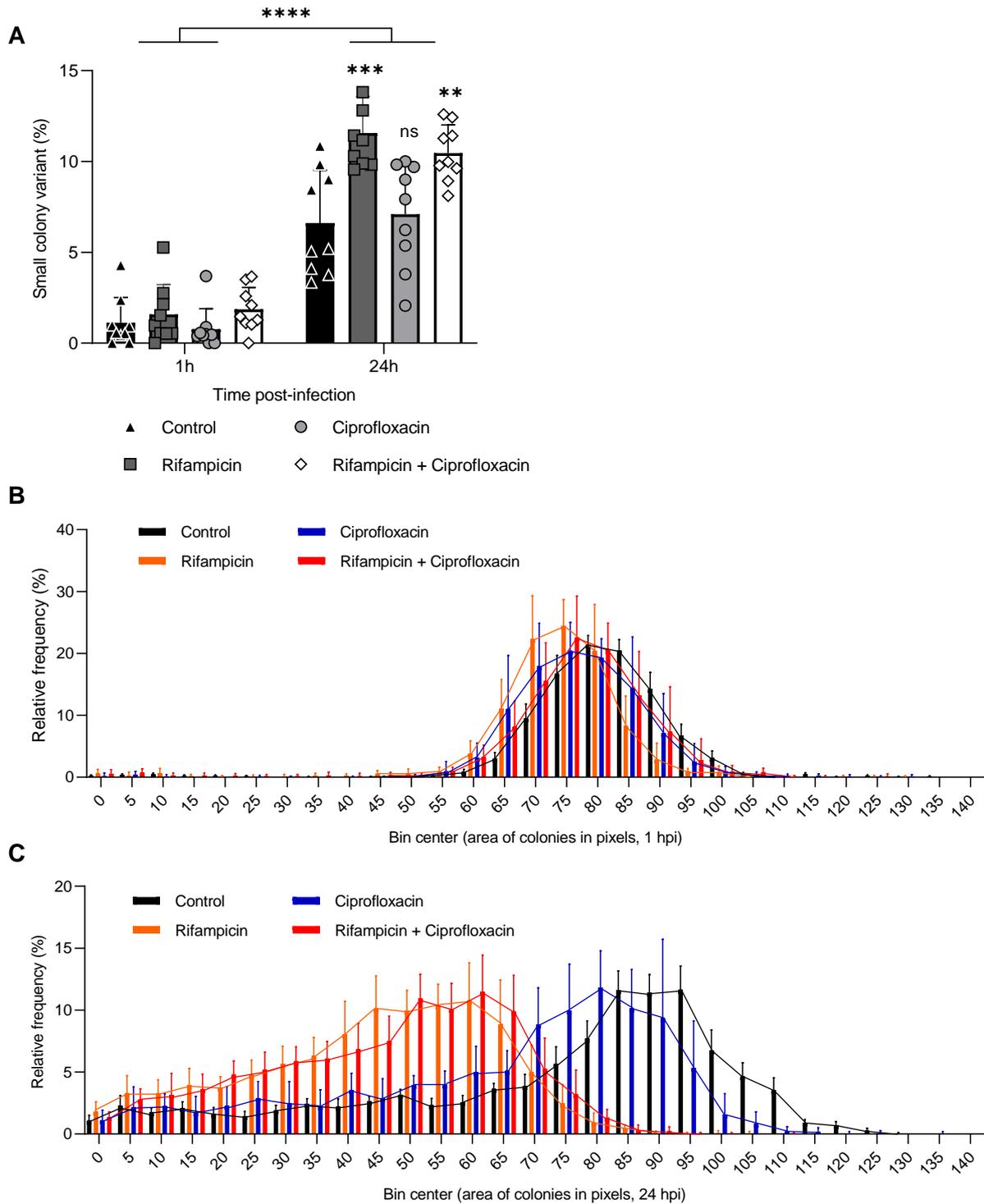


Figure II-5 : Légende page suivante

L'application d'un traitement de ciprofloxacin intraostéoblastique n'a pas impacté l'aire des colonies résultantes par rapport au contrôle. La combinaison de la rifampicine et de la ciprofloxacin n'a pas impacté l'aire des colonies sur gélose d'agar par rapport à la rifampicine seule.

Ainsi, un passage intraostéoblastique prolongé de 24 hpi accroît le pourcentage de SCV par rapport à 1 hpi. L'application d'un traitement de rifampicine, seule ou en combinaison avec la ciprofloxacin à

Figure II-5 : Impact de la rifampicine et/ou de la ciprofloxacine à concentration clinique osseuse sur le taux de *small colony variants*. Des ostéoblastes ont été marqués et infectés, à MOI 8, avec *S. aureus* SH1000-GFP marquée à l'eFluor 450 comme indiqué précédemment dans la figure I-3. Les cellules infectées ont été traitées aux antibiotiques comme indiqué précédemment dans la figure II-1. A 1 hpi et 24 hpi, les cellules ont été lysées, les bactéries intracellulaires récupérées et déposées sur géloses d'agar. L'aire des colonies résultantes a été mesurées après 16h30 d'incubation à l'aide d'une macro faite maison sur le logiciel Fiji. (a) Quantification du pourcentage de SCV. Fréquence de distribution de l'aire des colonies à (b) 1 hpi et (c) 24 hpi. (a - c) Représentent la moyenne \pm SD de trois répliquas biologiques indépendants dans trois puits par condition et par répliqua. La significativité statistique a été déterminée par le test « one-way ANOVA » suivi par le test de comparaison multiple de Dunnett pour chaque temps ou un test de student non-apparié pour chaque condition (**P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001).

concentration clinique osseuse induit une augmentation du taux de SCV et une réduction globale de l'aire des colonies sur gélose d'agar.

2.3.4. Croissance intraostéoblastique

S. aureus sous un traitement intraostéoblastique de rifampicine, seule ou en combinaison avec la ciprofloxacine, possède un phénotype majoritairement non répliatif. Lors de l'arrêt du traitement antibiotique et l'extraction du milieu intraostéoblastique, *S. aureus* à la capacité de sortir de son état de quiescence pour former des colonies sur gélose d'agar avec un taux de SCV accru et une aire globale des colonies réduite.

Ainsi, la capacité de *S. aureus* à sortir de la quiescence et à se multiplier directement dans son environnement intraostéoblastique à la suite du retrait du traitement de rifampicine a été investiguée par microscopie photonique.

Le traitement de rifampicine a été retiré par trois lavages successifs à 6 hpi, début de la phase de plateau de la cinétique d'infection (Fig. II-1c). Préalablement, la capacité de cette étape de lavage à retirer le traitement intraostéoblastique de rifampicine a été étudiée par spectrométrie de masse. Tandis que la concentration de rifampicine intraostéoblastique entre 6 hpi et 24 hpi est supérieur à la concentration minimale inhibitrice (CMI), les étapes de lavage l'ont réduit drastiquement (Fig. II-6a,b). En effet, 5 minutes post-lavages, la concentration de rifampicine a été diminuée d'un facteur 2. Dès 2 heures post-lavages, cette dernière n'a plus été détectée par la méthode employée. Ces résultats suggèrent un retrait efficace du traitement de rifampicine intraostéoblastique par les étapes de lavage.

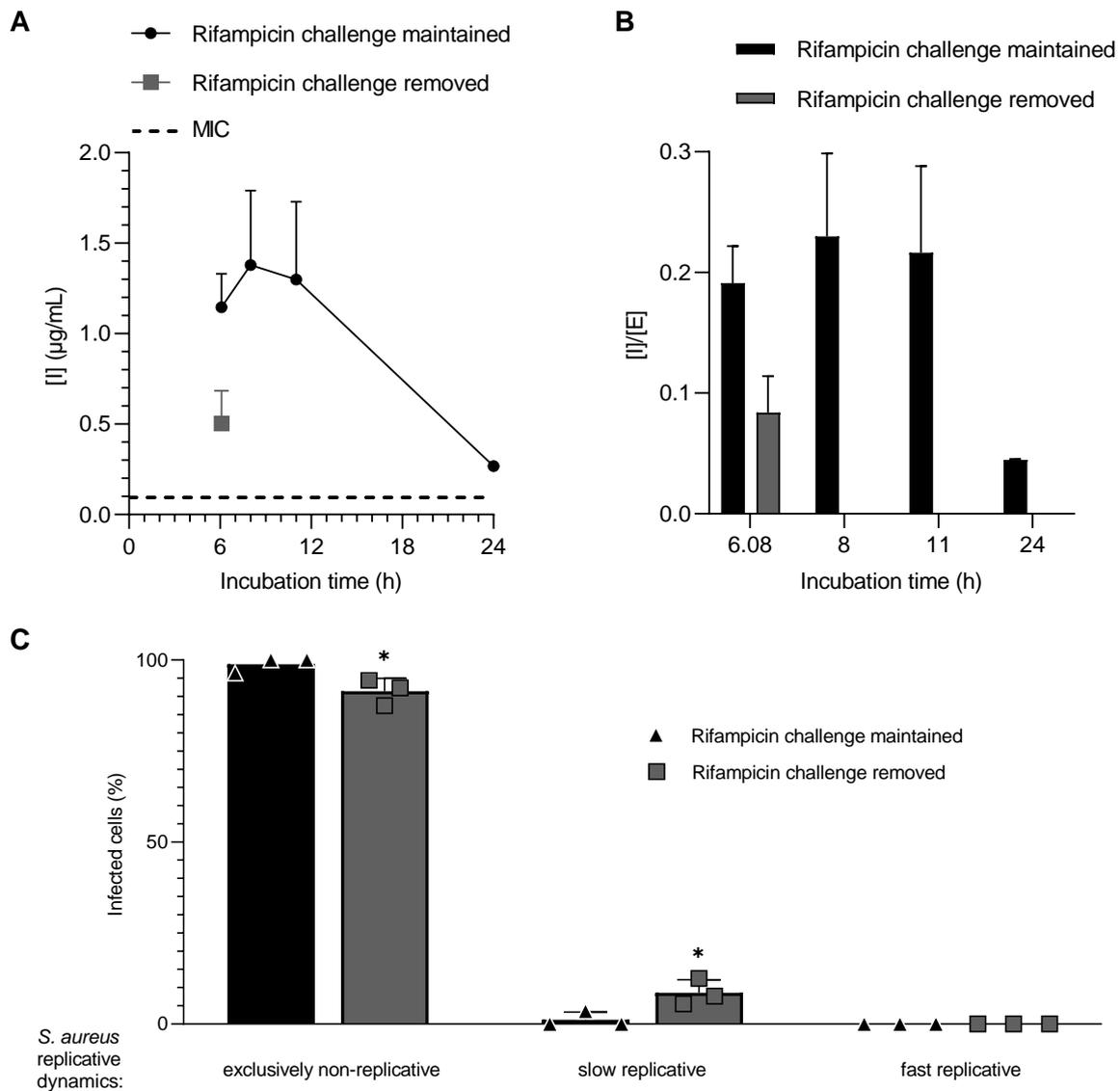


Figure II-6 : Dosage de la rifampicine intraostéoblastique et dynamique de réplication intraostéoblastique après retrait du traitement antibiotique.

Des ostéoblastes à confluence ont été traités à la rifampicine dans du milieu d'infection à concentration clinique osseuse. A 6h post-traitement, les ostéoblastes ont été lavés ou non par du PBS et incubés avec du milieu frais. Subséquemment, les ostéoblastes ont été récupérés après lavage à différents temps. La concentration intracellulaire de rifampicine a été mesurée par spectrométrie de masse. (a) Quantification de la concentration intraostéoblastique (I) par cellule. (b) Ratio de la concentration intraostéoblastique (I) et extracellulaire (E) de rifampicine. (a, b) Représentent la moyenne \pm SD de deux répliquas biologiques indépendants dans six puits par condition et par répliqua.

Des ostéoblastes ont été marqués et infectés, à MOI 8, avec *S. aureus* SH1000-GFP marquée à l'eFluor 450 comme indiqué précédemment dans la figure I-3. Les cellules infectées ont été traitées à la rifampicine et suivies par microscopie comme indiqué précédemment dans la figure II-1, après lavage ou non des cellules par du PBS. (c) Quantification du pourcentage de cellules infectées en fonction de la dynamique de réplication de *S. aureus* intracellulaire. Représentent la moyenne \pm SD de trois répliquas biologiques indépendants dans trois puits par condition et par répliqua, $n = 1059$ cellules suivies dont 165 étaient infectées à 6,5 hpi. La significativité statistique a été déterminée par le test de student non-apparié (* $P < 0.05$).

Le retrait du traitement de rifampicine du milieu d'infection à 6 hpi a conduit à une augmentation discrète mais significative du pourcentage d'ostéoblastes infectés comportant une phase réplivative lente (II). Inversement, le pourcentage d'ostéoblastes infectés, niches de *S. aureus* exclusivement non réplivatifs (I) a diminué passant de $98,81\% \pm 2,06$ à $91,42\% \pm 3,55$ entre 6 hpi et 24 hpi. Il est à noter qu'aucune phase réplivative rapide n'a été observée.

Ainsi, au retrait du traitement de rifampicine, une faible proportion significative de *S. aureus* a été capable de sortir de son état de quiescence pour effectuer une phase réplivative lente (II).

2.4. Etude de l'impact de la ciprofloxacine à concentration clinique plasmatique

L'application d'un traitement de ciprofloxacine à concentration clinique osseuse dans le milieu d'infection a créé des phases réplivatives rapides non-conventionnelles (IIIb) et une modification de la cinétique d'infection. Toutefois, ce traitement n'a pas eu d'impact sur la répartition des ostéoblastes infectés en fonction de la dynamique de réplication à l'inverse de la rifampicine. Afin de déterminer si ces paramètres sont dépendants de la concentration employée, celle-ci a été augmentée jusqu'à atteindre la concentration clinique plasmatique de $10 \mu\text{g/mL}$.

2.4.1. Concentration intraostéoblastique de ciprofloxacine

Préalablement, la concentration intraostéoblastique de ciprofloxacine en fonction du temps et de la dose dans le milieu d'infection a été investiguée par spectrométrie de masse. Les profils de concentrations intraostéoblastiques en fonction du temps ont été similaires pour l'ensemble des doses utilisées (Fig. II-7a). L'absorption maximale de ciprofloxacine a été observée à 1 heure post-traitement, celle-ci a augmenté avec la dose utilisée et a été suivie par une diminution au cours du temps. Des rapports similaires entre les concentrations intracellulaires et extracellulaires ont été obtenus aux différentes doses employées (Fig. II-7b). La concentration de ciprofloxacine intraostéoblastique a été supérieure à la CMI en milieu d'infection tout au long de la cinétique lors d'un traitement à concentration clinique plasmatique de $10 \mu\text{g/mL}$ (Fig. II-7a). A concentration clinique osseuse de $2 \mu\text{g/mL}$, la concentration intraostéoblastique n'a été supérieure à la CMI qu'à 1 heure post-traitement. A la concentration intermédiaire de $5 \mu\text{g/mL}$, la concentration intraostéoblastique a été supérieure à la CMI de 1 heure à 6 heures post-traitement uniquement.

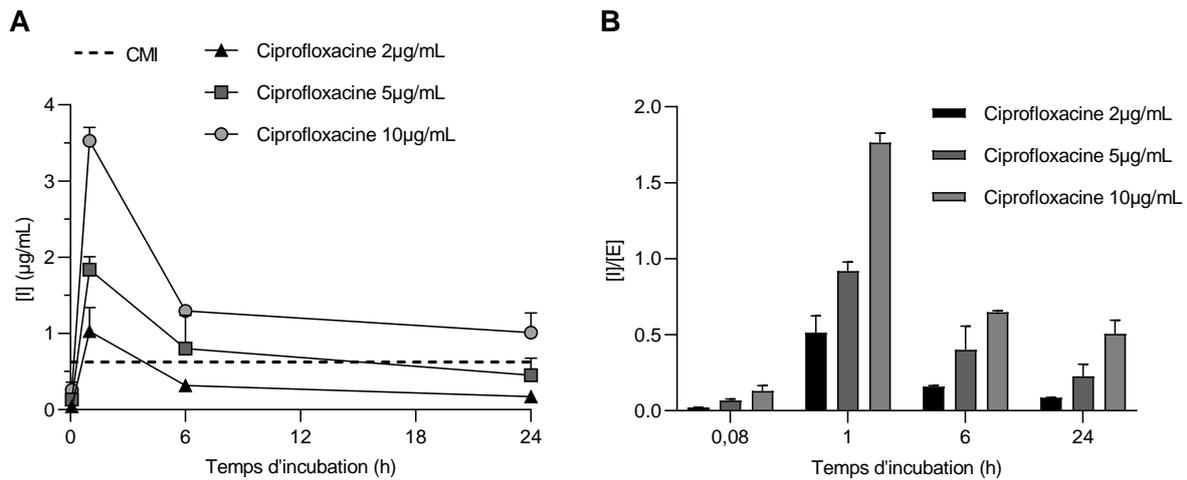


Figure II-7 : Dosage intraostéoblastique d'une gamme de ciprofloxacine. Des ostéoblastes ont été traités à la ciprofloxacine dans du milieu d'infection à 2 µg/mL, 5 µg/mL, et 10 µg/mL. A différents temps post-traitement, les ostéoblastes ont été récupérés après lavage. Subséquemment, la concentration intracellulaire de ciprofloxacine a été mesurée par spectrométrie de masse. (a) Quantification de la concentration intraostéoblastique (I) par cellule. (b) Ratio de la concentration intraostéoblastique (I) et extracellulaire (E) de ciprofloxacine. (a, b) Représentent la moyenne \pm SD de deux répliquas biologiques indépendants dans six puits par condition et par répliqua.

2.4.2. Paramètres d'infection

L'application d'une gamme de concentrations de ciprofloxacine jusqu'à la concentration clinique plasmatique n'a pas impacté le pourcentage d'ostéoblastes infectés ni le nombre de pixel de GFP, se rapportant à la charge bactérienne, à 1 hpi (Fig. II-8a,b).

Cependant, les cinétiques d'infections, se rapportant au pourcentage de cellules infectées au cours du temps, ont été hétérogènes (Fig. II-8c). En effet, les augmentations de concentration de ciprofloxacine ont diminué les pentes de réduction du pourcentage d'ostéoblastes infectés au cours du temps. De plus, bien que l'aspect biphasique ait été conservé entre les conditions, un délai avant les premières réductions a été observé pour les fortes concentrations.

Ainsi, l'augmentation de la concentration de ciprofloxacine n'a pas impacté le pourcentage d'ostéoblastes infectés et le nombre de pixel de GFP à 1 hpi. Toutefois, les cinétiques d'infections sont hétérogènes. L'augmentation de la concentration semble accroître le maintien des ostéoblastes infectés.

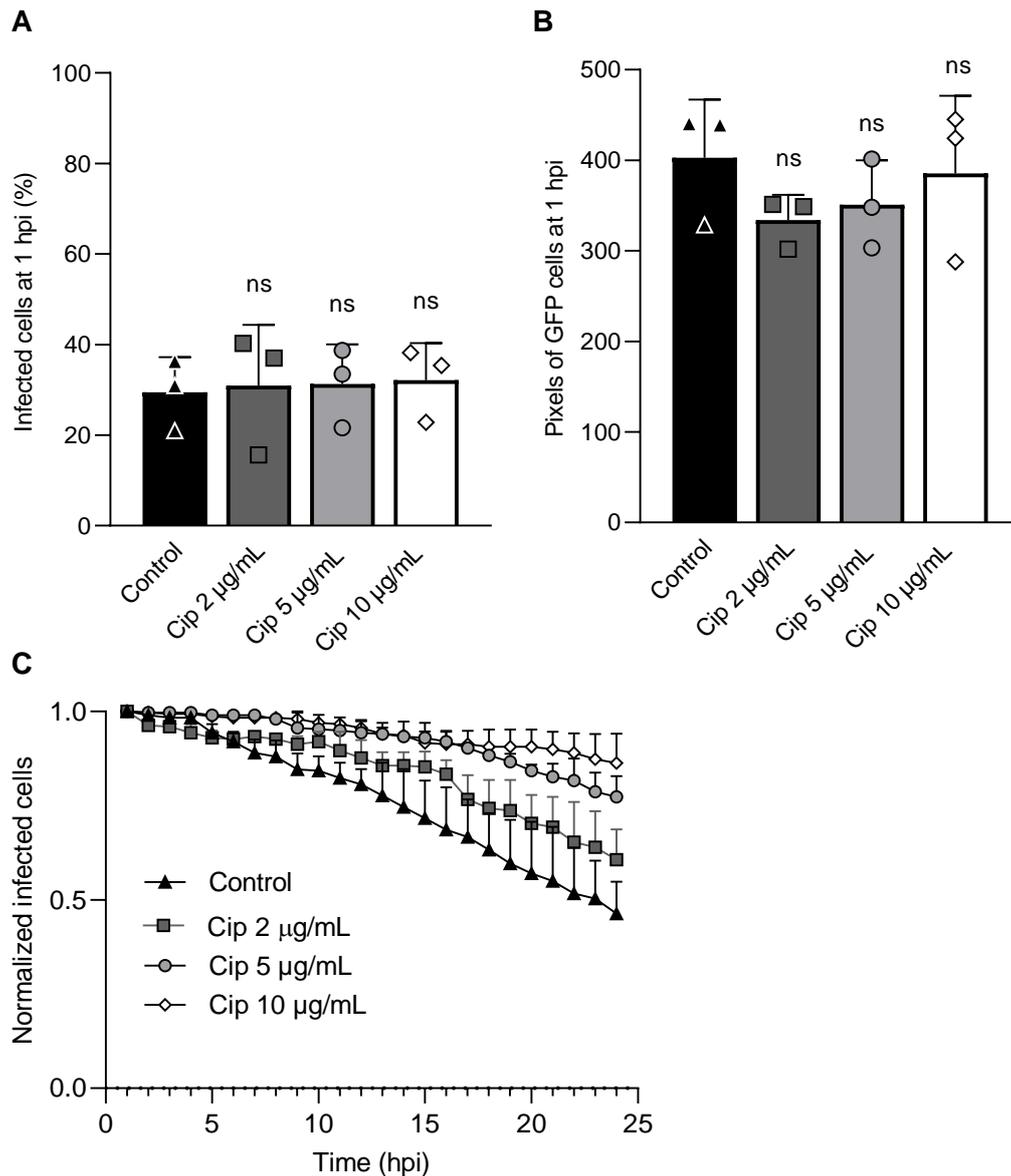


Figure II-8 : Paramètres d'infection sous traitement de ciprofloxacine à différentes concentrations.

Des ostéoblastes ont été marqués et infectés, à MOI 8, avec *S. aureus* SH1000-GFP marquée à l'eFluor 450 comme indiqué précédemment dans la figure I-3. Les cellules infectées ont été traitées ou non à différentes concentrations de ciprofloxacine. Les paramètres d'infections ont été suivis par microscopie confocale automatisée durant 24 heures à intervalles réguliers d'1 heure. Quantification du (a) pourcentage de cellules et du (b) nombre de pixels de GFP par cellules à 1 hpi. (c) Quantification de la cinétique de cellules infectées au cours du temps. (a - c) Représentent la moyenne \pm SD de trois répliquas biologiques indépendants dans trois puits par condition et par répliqua, $n = 2359$ cellules suivies dont 743 étaient infectées à 1 hpi. (a, b) La significativité statistique a été déterminée par le test « one-way ANOVA » suivi par le test de comparaisons multiples de Dunnett.

2.4.3. Dynamique de réplication

L'application d'un traitement de ciprofloxacine à concentration clinique osseuse n'a pas impacté la répartition des ostéoblastes infectés en fonction de la dynamique de réplication de *S. aureus* (Fig. II-9a). L'augmentation de cette concentration à 5 µg/mL n'a également pas impacté cette répartition. Notons tout de même, la diminution discrète mais significative du pourcentage d'ostéoblastes possédant une phase répliative rapide (III). Celle-ci n'a pas été retrouvée par l'augmentation significative des autres sous-catégories d'ostéoblastes infectés. A l'inverse, l'augmentation du traitement jusqu'à la concentration clinique plasmatique a significativement impacté la répartition des ostéoblastes infectés en fonction de la dynamique de réplication de *S. aureus*. Les sous-catégories (I) et (II) ont été significativement augmentés passant de 45,09% ± 3,2 à 65,39% ± 1,61 et de 5,88% ± 4,18 à 16,01% ± 0,88, respectivement. Tandis que la sous-catégorie (III) a été significativement réduite passant de 49,02% ± 6,93 à 18,59% ± 1,71.

Les phases réplivatives rapides non-conventionnelles (IIIb) ont été significativement augmentées entre la concentration clinique osseuse et la concentration intermédiaire passant de 5,52% ± 3,33 à 14,82% ± 4,66 des ostéoblastes infectés (Fig. II-9b). Toutefois, celles-ci n'ont pas été significativement différentes à concentration clinique plasmatique par rapport aux deux autres doses employées et ont représenté une valeur intermédiaire de 10,58% ± 3,32 des ostéoblastes infectés. Les phases réplivatives rapides non-conventionnelles (IIIb) représentent 14,53% ± 9,06 ; 47,16% ± 0,85 ; 60,04% ± 20,47 des phases réplivatives totales (III) pour les concentrations de 2 µg/mL, 5 µg/mL, et 10 µg/mL, respectivement (Fig. II-9c).

Ainsi, la cinétique d'infection, la dynamique de réplication, et le taux des phases réplivatives rapides non-conventionnelles (IIIb) sont dépendants de la concentration de ciprofloxacine employée sans toutefois rejoindre l'impact de la rifampicine à concentration clinique osseuse.

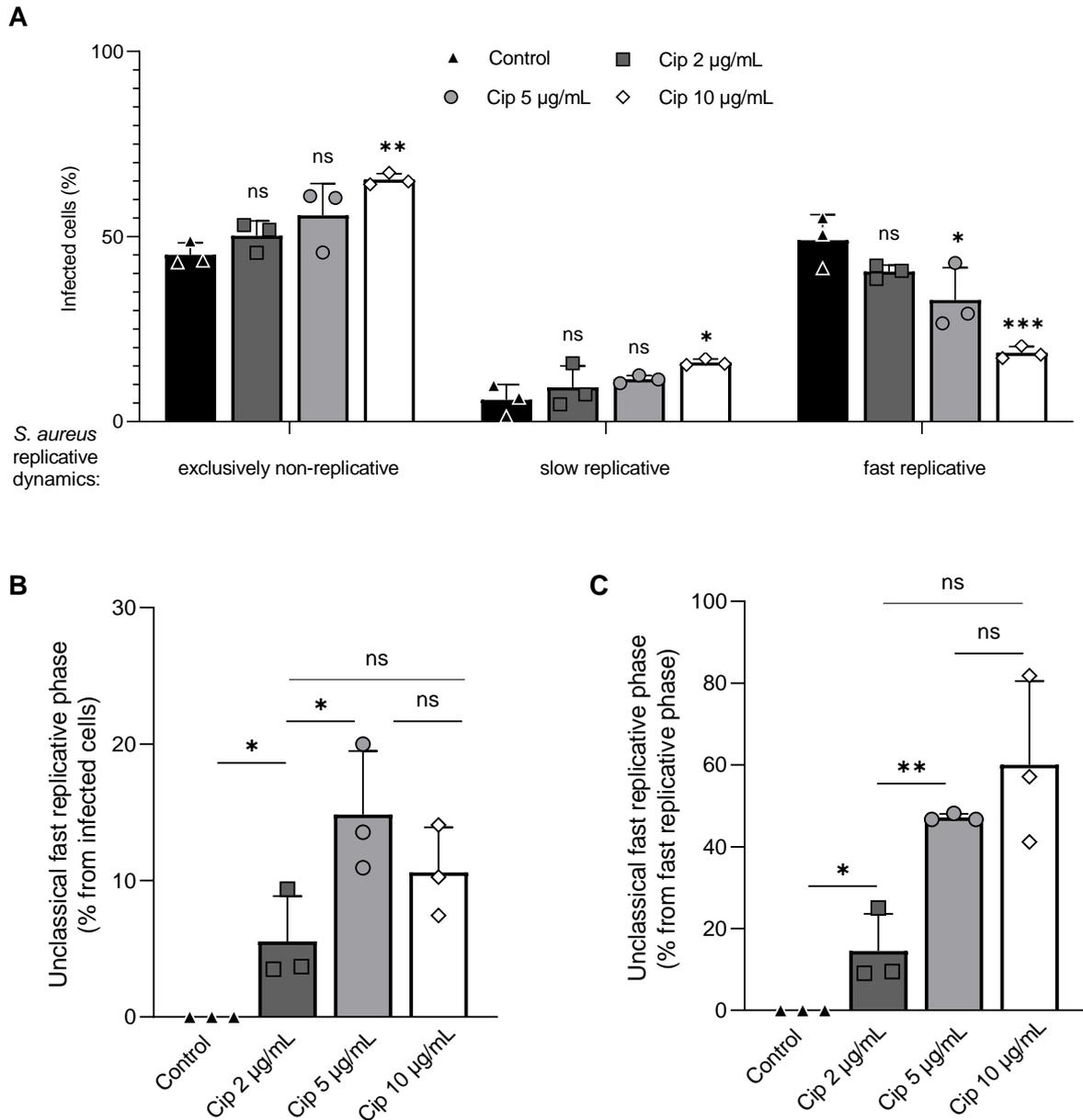


Figure II-9: Dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique sous traitement de ciprofloxacine à différentes concentrations. Des ostéoblastes ont été marqués et infectés, à MOI 8, avec *S. aureus* SH1000-GFP marquée à l'eFluor 450 comme indiqué précédemment dans la figure I-3. Les cellules infectées ont été traitées ou non à différentes concentrations de ciprofloxacine. L'infection a été suivie par microscopie comme indiqué précédemment dans la figure II-1. (a) Quantification du pourcentage de cellules infectées en fonction de la dynamique de réplication de *S. aureus* intracellulaire. (b) Quantification du pourcentage de phases répliquatives rapides non-conventionnelles. (a, b) Représentent la moyenne \pm SD de trois répliquas biologiques indépendants dans trois puits par condition et par répliqua, $n = 2359$ cellules suivies dont 743 étaient infectées à 1 hpi. (a) La significativité statistique a été déterminée par le test « one-way ANOVA » suivi par le test de comparaisons multiples de Dunnett. (b) La significativité statistique a été déterminée par le test de student non-apparié (* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$).

2.5. Persistants, tolérants ou hétérorésistants planctoniques

Afin d'investiguer la présence de *S. aureus* tolérants et persistants précédant la vie intraostéoblastique, des cultures planctoniques en phases exponentielle et stationnaire de croissance ont été traitées à la rifampicine. Ici, la rifampicine étant un meilleur candidat à l'identification des persisters intraostéoblastique à concentration clinique, celle-ci a été privilégiée à la ciprofloxacine.

En phase exponentielle de croissance, un délai de 4 heures a été observé avant la réduction du nombre de CFU pour l'ensemble des concentrations investiguées (Fig. II-10a). Passé ce délai, plusieurs devenir sont possibles pour la culture. Sous les plus faibles concentrations, 4, 8, et 16 fois supérieures à la CMI en milieu d'infection, une diminution du nombre de CFU d'environ 95% a été observée jusqu'à 8 heures post-traitement. Puis, soit la charge bactérienne est similaire à 24 heures post-traitement, à 16 fois la CMI, soit elle est augmentée démontrant ainsi l'apparition de résistance ou d'hétérorésistance. Aux plus fortes concentrations de 1000 et 10000 fois la CMI, l'élimination complète de la culture a été obtenue après 6 heures de traitement.

A l'inverse, en phase stationnaire de croissance, aucun impact n'a été observé sur le taux de bactérie de la culture capable de former des colonies sur gélose d'agar et ce malgré l'emploi d'une concentration 1000 fois supérieure à la CMI telle qu'utilisée lors des infections (Fig. II-10b).

Ainsi, les plus faibles concentrations ont induit l'apparition de résistance ou d'hétérorésistance tandis qu'à de plus fortes, l'élimination complète de la culture a été observée. A une concentration intermédiaire de 16 fois la CMI, l'absence de mesure entre 8 heures et 24 heures ne permet pas de définir les survivants entre persistants ou hétérorésistants. A l'inverse, l'ensemble de la population de *S. aureus* en phase stationnaire a survécu à un traitement de rifampicine jusqu'à 1000 fois supérieur à

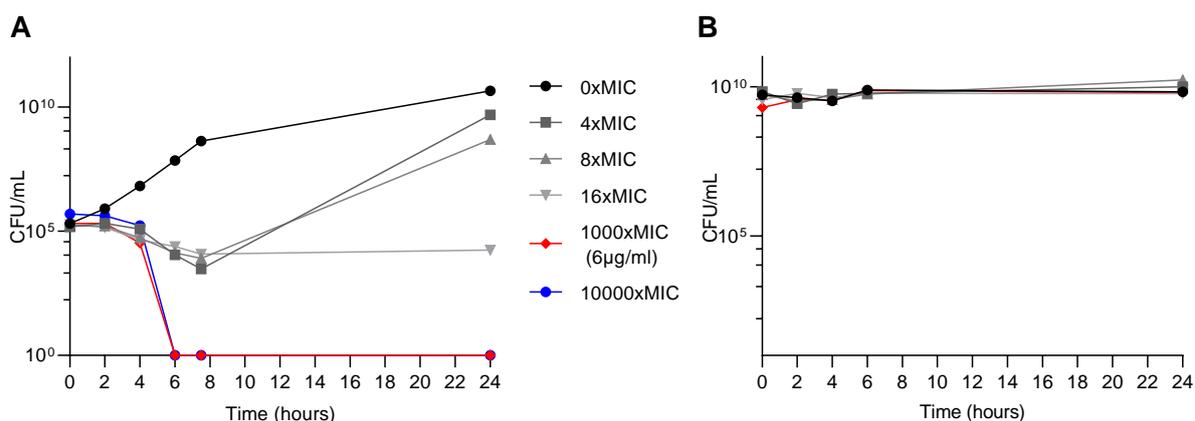


Figure II-10 : Cinétique de survie d'une culture planctonique sous traitement de rifampicine. *S. aureus* SH1000-GFP a été cultivée en (a) phase exponentielle ou (b) phase stationnaire en milieu LB puis traitée à différentes concentrations de rifampicine. Des échantillons de cultures ont été prélevés à différents temps, dilués et déposés sur géloses d'agar pour énumérer les CFU. (a, b) Représentent un répliqua biologique.

la CMI représentant la concentration clinique osseuse. En l'absence de courbe biphasique, les survivants ne peuvent pas être qualifiés de persistants. En l'absence de croissance, ils ne peuvent pas non plus être qualifiés de résistants. Ici, l'ensemble de la population de *S. aureus* en phase stationnaire de croissance est insensible au traitement de rifampicine. Les survivants pourraient être qualifiés de tolérants au regard des cultures en phase exponentielle de croissance. En effet, l'absence d'élimination sur la période d'observation démontre la capacité de *S. aureus* à survivre à un traitement antibiotique bactéricide au moins plus longtemps en phase stationnaire par rapport à la phase exponentielle de croissance. Ainsi l'action de la rifampicine contre *S. aureus* est dépendante de la phase de croissance. Tandis qu'elle est bactéricide en phase exponentielle, elle est sans impact en phase stationnaire.

2.6. Conclusions et perspectives

2.6.1. Rifampicine

Le traitement de rifampicine à concentration clinique osseuse dans le milieu d'infection modifie la cinétique d'infection passant d'un aspect biphasique à triphasique possédant une phase de plateau. Les ostéoblastes infectés possèdent des survivants au traitement de la rifampicine exclusivement non réplicatifs dans $96,75\% \pm 0,99$ des cas. Nous pouvons noter de manière anecdotique des ostéoblastes comportant des *S. aureus* lentement réplicatifs dans $3,25\% \pm 0,99$ des cas. Les phases réplcatives rapides observées à 0 hpi ainsi que celles apparaissant au cours de la cinétique sont éliminées dès le temps suivant, probablement par l'action bactéricide de la rifampicine sur les *S. aureus* réplicatifs. Les survivants non ou lentement réplicatifs ont la capacité de sortir de leur état de quiescence sur gélose d'agar pour former des colonies après l'extraction de leur niche intraostéoblastique et de l'arrêt concomitant du traitement antibiotique. Les colonies résultantes sont plus petites que dans le contrôle et présentent un pourcentage de SCV significativement accru. Ainsi, les survivants non ou lentement réplicatifs d'un traitement à la rifampicine intraostéoblastique sont viables et cultivables. Parallèlement, le retrait du traitement de rifampicine intraostéoblastique du milieu d'infection à 6 hpi induit une sortie de la quiescence d'un nombre discret mais significatif de *S. aureus*. Au retrait du traitement, une augmentation d'environ 7,39% des ostéoblastes infectés contenant des *S. aureus* sortant de l'état quiescent pour conduire à une phase réplcative lente (II) a été observé. Ainsi, l'environnement intraostéoblastique combiné à un effet post-traitement antibiotique contiendrait le phénotype non réplcatif. Enfin, le nombre de pixel de GFP par ostéoblaste, se rapportant à la charge bactérienne, décroît de manière biphasique. Il correspond à la combinaison de l'action bactéricide de la cellule hôte, de la rifampicine sur les *S. aureus* réplicatifs, de la perte de fluorescence ou d'expression de la GFP, ainsi que de la mort des ostéoblastes relarguant les *S. aureus* non ou lentement réplicatifs.

Le traitement à la rifampicine a réduit le nombre de CFU totaux entre les temps 1 hpi et 24 hpi de $0,44 \log \pm 0,03$.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats, suggère que les survivants intraostéoblastiques de *S. aureus*, non ou lentement répliatifs, à un traitement de rifampicine à concentration clinique osseuse dans le milieu d'infection, sont des persisters.

Corroborant ces résultats, une phase stationnaire utilisée pour l'infection est insensible à l'action de la rifampicine et présente une population *S. aureus* tolérants. Le caractère non répliatif en phase stationnaire pourrait donc être nécessaire et suffisant pour définir l'insensibilité et la tolérance de la population.

La rifampicine en empêchant les phases répliatives rapides classiques (IIIa) et ainsi l'éclatement de la cellule hôte, permet aux persisters de *S. aureus* non et lentement répliatifs s'y logeant de se maintenir dans un ostéoblaste viable. La rifampicine augmente ainsi la proportion d'ostéoblastes viables possédant un ou des persisters de *S. aureus* exclusivement non répliatifs (I) ou au moins un persister lentement répliatif (II).

2.6.2. Ciprofloxacine

Le traitement de ciprofloxacine a concentration clinique osseuse dans le milieu d'infection n'a pas impacté la répartition des ostéoblastes infectés en fonction de la dynamique de réplication de *S. aureus*. Toutefois, l'augmentation à concentration clinique plasmatique a significativement réduit les phases répliatives rapides (III) et parallèlement augmenté les ostéoblastes comportant des phases répliatives lentes (II) et des *S. aureus* exclusivement non répliatifs (I). La ciprofloxacine a induit l'apparition de phases répliatives rapides non-conventionnelles (IIIb) dans $30,75\% \pm 2,7$ des phases répliatives rapides totales (III) à concentration clinique osseuse. Ces phases répliatives rapides non-conventionnelles (IIIb) se caractérisent par l'absence d'éclatement de l'ostéoblaste et par extension du relargage des bactéries dans le milieu. Les *S. aureus* se réplient rapidement jusqu'à atteindre une phase de plateau contrainte dans une structure circulaire. L'augmentation de la concentration jusqu'à la concentration clinique plasmatique n'a pas éradiqué ces phases répliatives rapides non-conventionnelles (IIIb) mais les a, au contraire, augmenté. Alors que la concentration intraostéoblastique de ciprofloxacine est supérieure à la CMI uniquement à 1 heure post-traitement avec une dose clinique osseuse, elle l'est tout au long de la cinétique avec une dose clinique plasmatique.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats démontrent que la ciprofloxacine à concentrations cliniques dans le milieu d'infection induit un réservoir intraostéoblastique de *S. aureus* s'étant rapidement répliqués et se logeant dans une structure circulaire. L'augmentation de la concentration à la concentration clinique plasmatique n'a pas permis de rejoindre le profil induit par la rifampicine à concentration clinique osseuse.

2.6.3. Combinaison rifampicine / ciprofloxacine

L'addition de la ciprofloxacine à concentration clinique osseuse n'a pas impacté les résultats obtenus avec le traitement de rifampicine seule.

2.6.4. Perspectives

Les résultats observés ont été obtenus avec la souche de laboratoire SH1000. Ainsi le prochain objectif de ces travaux de recherche est d'élucider la potentielle implication de la souche sur la dynamique de réplication et sur l'impact de la rifampicine.

Seule la rifampicine permet d'identifier les persisters intraostéoblastiques à concentration clinique. Ainsi, la ciprofloxacine ne sera pas investiguée dans les axes suivants malgré un impact sur la dynamique de réplication.

AXE 3. Dynamique de réplication, persisters et impact de la souche

3.1. Introduction

La dynamique de réplication de la souche SH1000 a démontré une hétérogénéité intraostéoblastique. Les ostéoblastes ont pu contenir soit un ou des *S. aureus* exclusivement non répliatifs (I) soit au moins un *S. aureus* sortant de son état quiescent et engendrant une phase répliatique soit lente (II) soit rapide dite classique (IIIa). Les phases répliatiques rapides classiques (IIIa) ont conduit inévitablement à l'explosion de l'ostéoblaste hôte et au relargage de tout ou partie du contenu bactérien. Toutefois, la majorité des ostéoblastes ont été la niche de *S. aureus* non répliatifs. L'addition d'un traitement de rifampicine a empêché l'apparition des phases répliatiques rapides classiques (IIIa) et mis en lumière les persisters non et lentement répliatifs.

Toutefois, ces résultats ont été observés à l'aide d'une unique souche de *S. aureus*. L'objectif de cet axe de recherche est ainsi de déterminer si ces observations sont souche dépendante. Pour ce faire, des souches cliniques, dont le phénotype a été caractérisé dans une étude antérieure, ont été implémentées dans le modèle d'étude³⁸⁹. De plus, une seconde souche de laboratoire a également été ajoutée au modèle. Enfin, l'impact du système agr dans la dynamique de réplication intraostéoblastique et la présence de persisters a été étudié à l'aide d'un mutant de la souche SH1000 délétée pour ce système.

3.2. Méthodes

3.2.1. Cultures et marquages bactériens et cellulaires

Les cultures et marquages de *S. aureus* et des ostéoblastes MG63 ont été effectués tels que décrit précédemment (Axe 1 – 1.2.). En complément de la souche SH1000-GFP une gamme de souches cliniques, de laboratoire et mutante a été employée et décrite ci-dessous.

Les isolats cliniques employés dans cette étude sont tous susceptibles à la métiline et ont été sélectionnés au sein d'une collection obtenue auprès de patients ayant souffert d'un premier épisode d'IOA aux Hospices Civil de Lyon, France, de 2001 à 2011²⁴². Les souches sélectionnées ont été caractérisés phénotypiquement dans une étude antérieure, elles sont représentatives de trois groupes ayant des profils de réplication et de cytotoxicité distincts tels que détaillé dans le tableau III-1³⁸⁹.

Le mutant SH1000 Δagr a été donné par l'équipe « Physiopathologie et biothérapies des infections muqueuses (GIMAP) » du Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), Saint-Etienne, France.

La souche HG001 est réparée pour le système RsbU d'après l'ancêtre NCTC8325³⁸⁴.

L'ensemble des souches ont été transformées avec le plasmide pCN47::GFP, décrit dans l'axe 1, par électroporation (Biorad, Gene Pulser Xcell). L'expression de la GFP des transformants a été vérifiée par microscopie à fluorescence à l'aide d'un microscope Eclipse Ti2-E (Nikon) équipé d'un objectif à huile 100x (Plan Apo, 100x/1,45) et d'une caméra (Hamamatsu, Flash 4 V3).

Toutes les souches ont été stockées à -80°C en cryotubes. Toutes les souches utilisées dans cet axe exprimant la GFP, il n'est pas fait mention dans leurs noms de cette capacité à l'instar des axes précédents.

Souches	Groupes phénotypiques ³⁸⁹	Complexe clonal	CMI en LB / Milieu d'infection ($\mu\text{g/mL}$)
BJI076	Groupe V (Réplication forte, cytotoxicité décalée)	CC5	0.006 / 0.094
BJI019	Groupe III (Réplication faible, survie forte, cytotoxicité faible)	CC22	0.003 / 0.094
BJI031		CC25	0.006 / 0.094
BJI035		CC5	> 6 / > 6 (résistante)
BJI001	Groupe Iva (Réplication faible à intermédiaire, survie faible, cytotoxicité forte)	CC25	0.006 / 0.094
BJI053		CC30	0.003 / 0.094
SH1000			0.006 / 0.094
SH1000 Δagr			0.006 / 0.094
HG001			0.003 / 0.094

Tableau III-1 : Liste des souches de *S. aureus* employées dans l'axe 3 des travaux de recherche.

3.2.2. Infections, CFU et microscopie photonique en temps réel

Les infections ont été effectuées tel que décrit précédemment (Axe 1 – 1.2.) dans des plaques 96 puits (Falcon, 351172 pour les CFU ou Greiner bio-one, 655090 pour la microscopie). Toutefois, après 2 heures de co-incubation, à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO₂, les bactéries extracellulaires restantes ont été éliminées par le remplacement du milieu avec un milieu d'infection frais contenant 10 $\mu\text{g/mL}$ de lysostaphine (Sigma, L7386) avec ou sans rifampicine à concentration clinique osseuse de 6 $\mu\text{g/mL}$ (Sigma, R3501). Les infections ont été conduites avec l'ensemble des souches GFP présentées dans le tableau III-1 à une multiplicité d'infection de 8.

Une nouvelle catégorie d'ostéoblastes infectés a été mis en lumière. Il s'agit d'ostéoblastes comportant une phase répllicative rapide avortée (IIIc). Elles sont définies par l'augmentation du nombre de pixels de GFP d'au moins 100 durant au moins deux temps successifs suivi une chute drastique du nombre de pixels de GFP d'un facteur 1,33 au moins. Le devenir des ostéoblastes infectés à la fin de la phase répllicative a été manuellement observé. La phase répllicative rapide avortée conduit

à la disparition du biomarqueur GFP et le maintien du phénotype intact de l'ostéoblaste pendant au moins trois temps successifs.

Les expériences de dénombrement de CFU sur gélose, de microscopie photonique confocale en temps réel, l'acquisition des images ainsi que leur analyse ont été effectuées tel que décrit précédemment (Axe 1 – 1.2.).

3.2.3. Concentration minimale inhibitrice

La CMI de la rifampicine a été déterminée pour l'ensemble des souches employées tel que décrit précédemment (Axe 1 – 1.2.). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau III-1.

3.2.4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées tel que décrit précédemment (Axe 1 – 1.2.).

3.3. Souches employées

Afin de mesurer l'impact de la souche employée sur la charge bactérienne, la dynamique de réplication, et l'impact de la rifampicine, diverses souches ont été implémentées dans le modèle d'étude *in cellulo*.

Une collection de souches cliniques, caractérisée phénotypiquement par une étude antérieure du laboratoire, a été sélectionnée³⁸⁹. Ainsi, la souche BJI076 appartient au groupe V possédant une réplication forte et une cytotoxicité décalée associée à une sous-expression de staphopaine A. Les souches BJI019, BJI031, et BJI035 appartiennent au groupe III possédant une réplication faible, une survie forte, et une cytotoxicité faible. Les souches BJI001 et BJI053 appartiennent au groupe IVa possédant une réplication faible à intermédiaire, une survie faible, et une cytotoxicité forte.

Il est important de noter que la souche BJI035 est résistante à la rifampicine et sert aussi de témoin négatif.

La souche HG001, a été implémentée dans le modèle. Telle que SH1000, elle provient de l'ancêtre NCTC8325. HG001 a été réparée pour le système RsbU mais n'est pas curée pour les prophages.

Enfin, le mutant SH1000 Δagr a été ajouté à l'étude afin de mesurer l'impact du système agr sur les précédentes observations.

3.4. Croissance sur gélose et action de la rifampicine

3.4.1. Croissance sur gélose

Afin de mesurer la capacité des différentes souches à être internalisées par les ostéoblastes et de s'y maintenir, ces derniers ont été infectés tel que décrit précédemment (Axe 1). Les *S. aureus* intraostéoblastiques ont été récupérés à 1 hpi et 24 hpi, ceux ayant la capacité de croître sur gélose d'agar et de former des colonies ont été monitorés par dénombrement des CFU (Fig. III-1).

A 1 hpi, l'ensemble des souches ont eu la capacité d'être internalisées par les ostéoblastes (Fig. III-1a). Toutefois, le nombre de *S. aureus* ayant la capacité de former des colonies sur gélose a été souche dépendante. En effet, les souches BJI076, BJI019, BJI031, BJI001, et BJI053 ont formé significativement plus de colonies sur gélose d'agar que la souche SH1000.

Il est important de noter que les souches SH1000 Δagr , HG001, et BJI035 qui est résistante à la rifampicine ont présenté un nombre de CFU similaire, sans différences significatives, à la souche SH1000 à 1 hpi (Fig. III-1a).

L'ensemble des souches ont présenté un nombre de CFU significativement réduit entre les temps 1 hpi et 24 hpi, à l'exception de la souche BJI019 présentant un nombre significativement accru de CFU à 24 hpi (Fig. III-1b).

Ainsi, la capacité de *S. aureus* intraostéoblastique à croître sur gélose d'agar à 1 hpi a été souches dépendantes. L'ensemble des souches ont présenté un nombre de CFU variable entre les temps 1 hpi et 24 hpi. Seule la souche BJI019 a eu plus de CFU à 24 hpi qu'à 1 hpi.

3.4.2. Impact de la rifampicine à concentration clinique osseuse

L'application d'un traitement de rifampicine à concentration clinique osseuse dans le milieu d'infection n'a pas significativement impacté le nombre de CFU des souches SH1000, SH1000 Δagr , et BJI035 récupérées des ostéoblastes hôtes à 1 hpi (Fig. III-2a). Parallèlement, un nombre significativement réduit de CFU a été retrouvé dès 1 hpi sous traitement de rifampicine pour les souches HG001, BJI076, BJI019, BJI031, BJI001, et BJI053.

Les souches SH1000 et BJI035 ont maintenu un nombre de CFU similaire sous traitement de rifampicine à 24 hpi par rapport à la condition contrôle non traitée (Fig. III-2b). Les souches HG001, BJI076, BJI019, BJI031, et BJI053 ont maintenu un nombre significativement réduit de CFU sous traitement de rifampicine à 24 hpi. Parallèlement, la souche SH1000 Δagr a présenté un nombre significativement réduit de CFU à 24 hpi sous traitement de rifampicine alors qu'il a été similaire à 1 hpi.

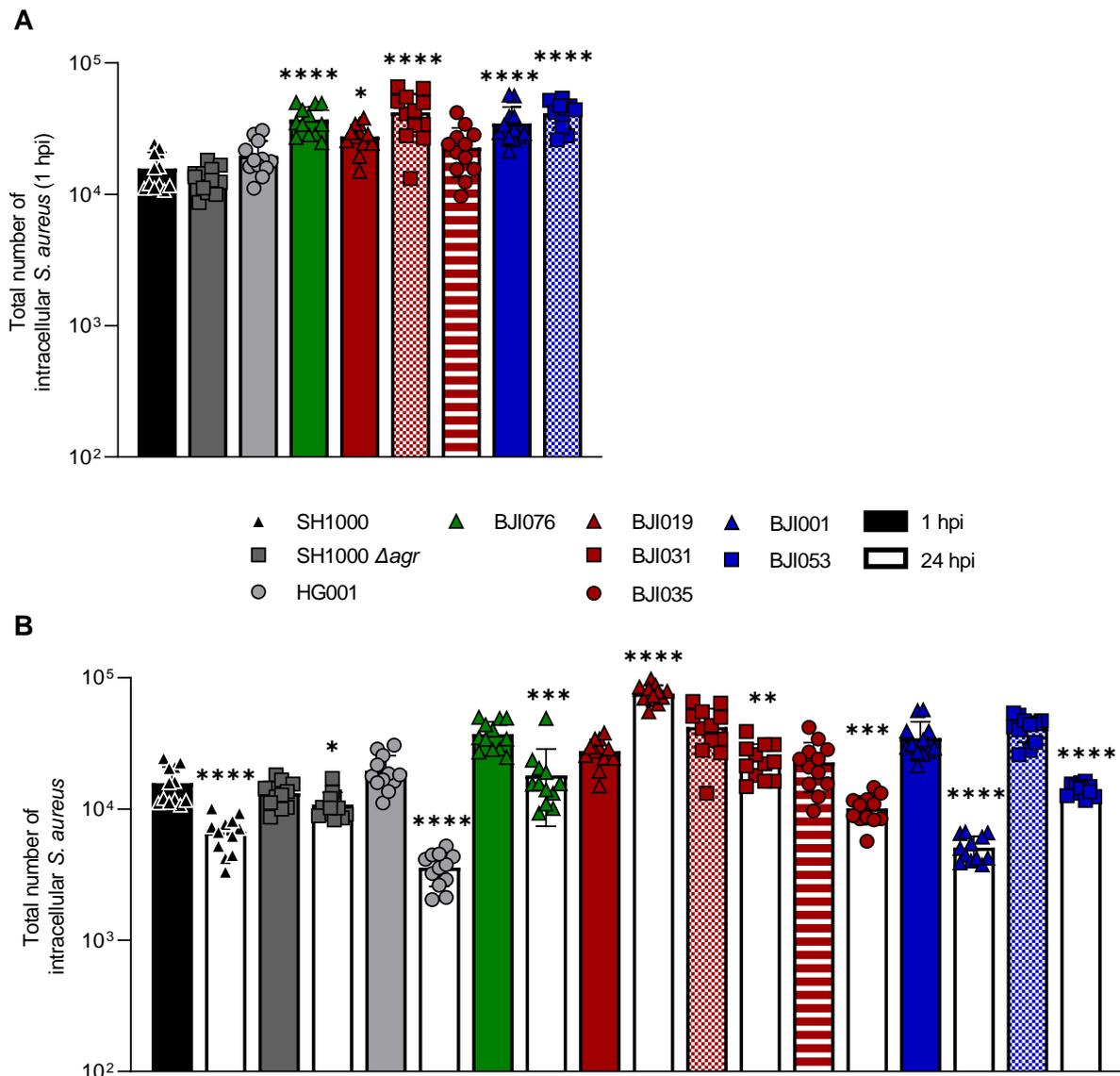


Figure III-1 : Impact de la souche sur la charge bactérienne intraostéoblastique formant des colonies sur gélose d'agar. Des ostéoblastes ont été infectés, à MOI 8, avec différentes souches de *S. aureus* exprimant la GFP. A 1 hpi et 24 hpi, les cellules ont été lysées, les bactéries intracellulaires récupérées et déposées sur géloses d'agar. Les colonies résultantes ont été monitorées après 16h30 d'incubation. Quantification du nombre de CFU totaux à (a) 1 hpi et (b) à 1 hpi et 24 hpi. (a, b) Représentent la moyenne \pm SD de quatre répliquas biologiques indépendants dans trois puits par condition et par répliqua. La significativité statistique a été déterminée par (a) le test « one-way ANOVA » suivi par le test de comparaisons multiples de Dunnett ou (b) par le test de student non-apparié (* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$).

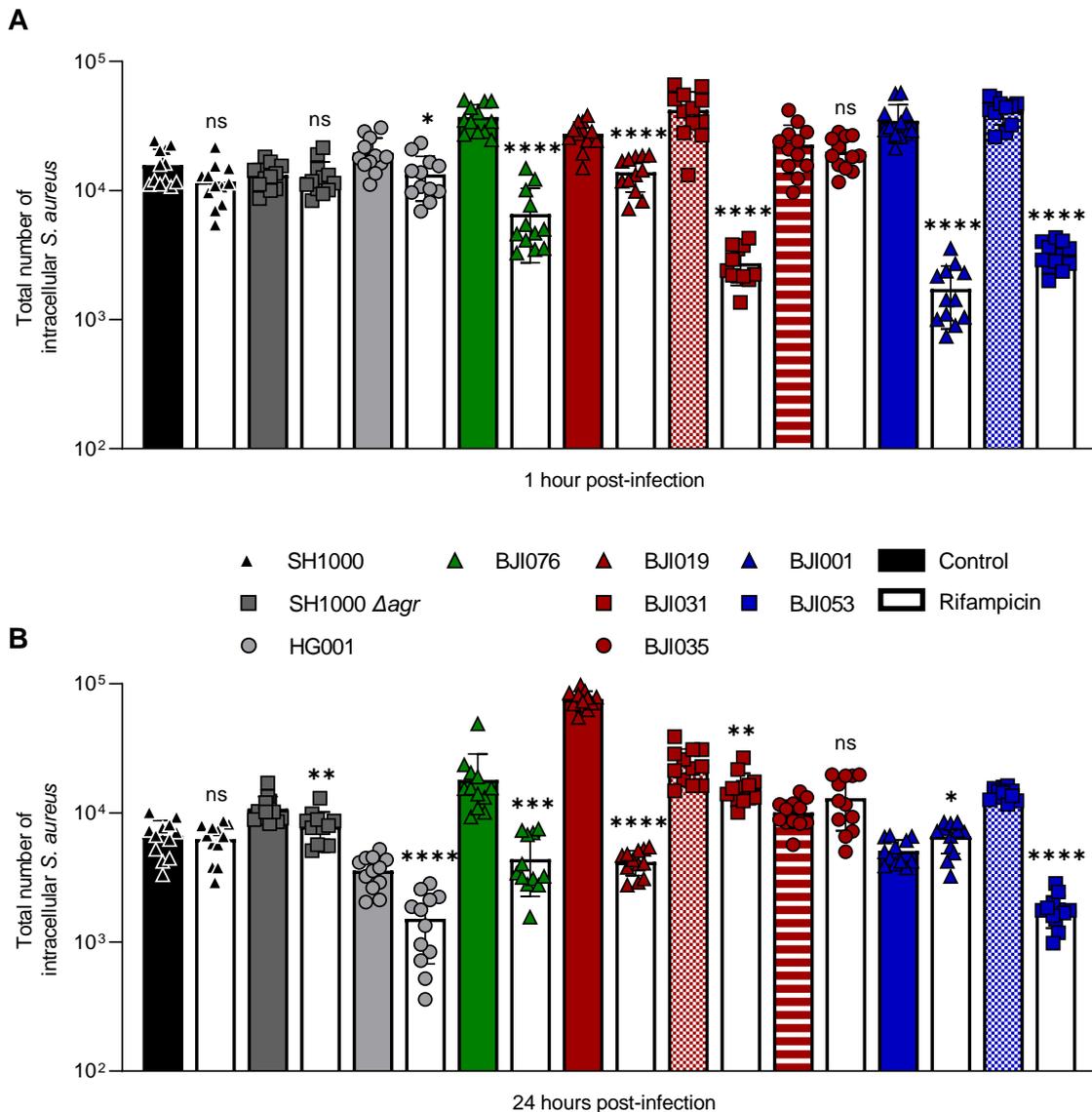


Figure III-2 : Impact de la souche sur l'action de la rifampicine envers les *S. aureus* formant des colonies sur gélose d'agar. Des ostéoblastes ont été infectés, à MOI 8, avec différentes souches de *S. aureus* exprimant la GFP. Les cellules infectées ont été traitées ou non à la rifampicine à concentration clinique osseuse. A 1 hpi et 24 hpi, les cellules ont été lysées, les bactéries intracellulaires récupérées et déposées sur géloses d'agar. Les colonies résultantes ont été monitorés après 16h30 d'incubation. Quantification du nombre de CFU totaux à (a) 1 hpi et (b) 24 hpi. (a, b) Représentent la moyenne \pm SD de quatre répliquas biologiques indépendants dans trois puits par condition et par répliqua. La significativité statistique a été déterminée par le test de student non-apparié (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0005$, **** $P < 0.0001$).

De manière étonnante, la souche BJI001 a présenté un nombre de CFU significativement accru à 24 hpi sous un traitement de rifampicine alors qu'il a été significativement réduit à 1 hpi.

Ainsi, l'impact de la rifampicine à concentration clinique osseuse a été souches dépendantes. Les souches SH1000 ainsi que BJI035 résistante à la rifampicine, ont démontré des profils similaires sans impact de la rifampicine sur le nombre de *S. aureus* intraostéoblastique capable de former des colonies sur gélose d'agar. La souche BJI001 a démontré une augmentation du taux de CFU sous traitement de rifampicine à 24 hpi alors qu'il a été plus faible à 1 hpi. Tandis que l'ensemble des autres souches ont présenté un taux réduit de CFU sous traitement de rifampicine à 24 hpi.

3.5. Dynamique de répllication et phases répllicatives rapides

Le second objectif de cet axe a été d'étudier la dynamique de répllication de *S. aureus* intraostéoblastique en fonction de la souche employée.

3.5.1. Dynamique de répllication

Tel que précédemment, en fonction de la dynamique de répllication des *S. aureus* qu'ils comportaient, différents profils des ostéoblastes infectés ont pu être mis en évidence. Ces derniers peuvent être sous-catégorisés selon qu'ils comportaient sur la période d'acquisition soit un ou des *S. aureus* exclusivement non répllicatifs (I) soit au moins un *S. aureus* sortant de son état de quiescence et conduisant à une phase répllicative lente (II) ou rapide(III), (Fig. III-3).

Il est important de noter que les ostéoblastes infectés par la souche HG001 ont été sous-catégorisés en fonction de la dynamique de répllication de manière similaire, sans différence significative, avec la souche de référence SH1000. Notons également que les ostéoblastes infectés par les souches BJI019 et BJI053 ont démontré des taux des sous-catégories (I) et (III) similaires, sans différence significative, par rapport à la souche SH1000. De plus, les phases répllicatives lentes (II) n'ont pas présenté de différences significatives pour les souches SH1000 Δagr , BJI031, BJI035, BJI076, et BJI001 par rapport à la souche SH1000.

Toutefois, des différences significatives ont été observées dans la sous-catégorisation des ostéoblastes infectés en fonction des souches utilisées. En effet, les ostéoblastes qui ont été infectés par les souches BJI019 et BJI053 ont présenté des taux de phases répllicatives lentes (II) significativement augmenté par rapport à la souche SH1000.

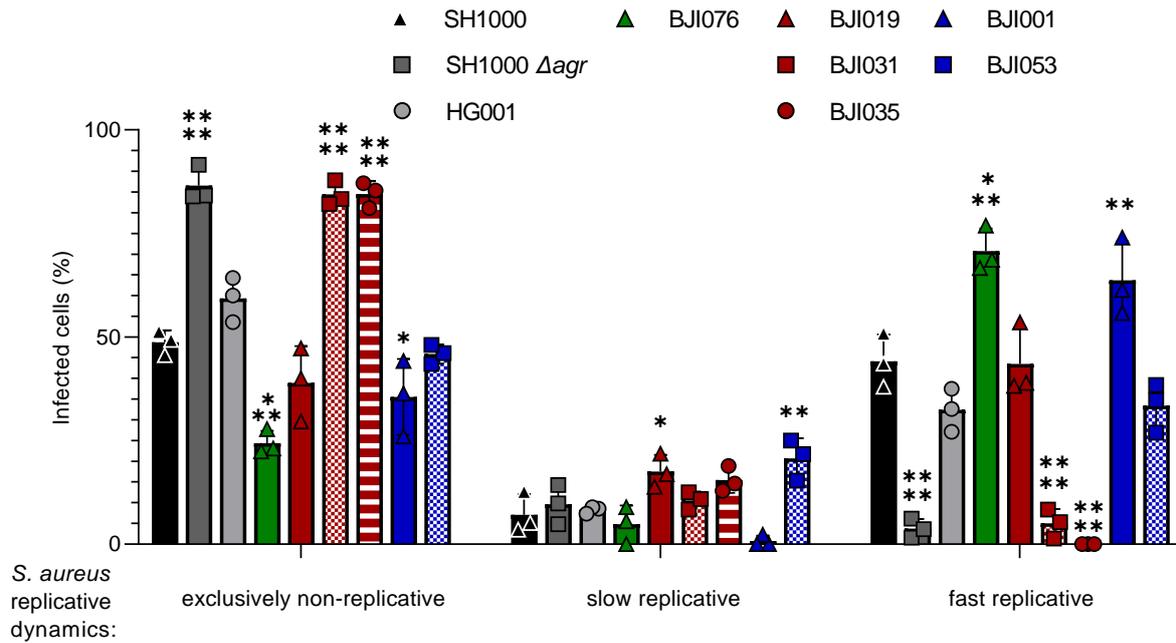


Figure III-3 : Dynamique de réplication de diverses souches de *S. aureus* intraostéoblastique. Des ostéoblastes ont été marqués et infectés, à MOI 8, avec différentes souches de *S. aureus* exprimant la GFP et marquées à l'eFluor 450 comme indiqué précédemment dans la figure I-3. Les cellules infectées ont été suivies par microscopie comme indiqué précédemment dans la figure II-1. Quantification du pourcentage de cellules infectées en fonction de la dynamique de réplication de *S. aureus* intracellulaire. Représentent la moyenne \pm SD de trois répliquas biologiques indépendants dans trois puits par condition et par répliqua. La significativité statistique a été déterminée par le test « one-way ANOVA » suivi par le test de comparaisons multiples de Dunnett (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$).

De plus, les ostéoblastes infectés par les souches SH1000 Δagr , BJI031, et BJI035, ont majoritairement comporté des *S. aureus* exclusivement non répliatifs (I) représentant $86,55\% \pm 4,34$; $84,43\% \pm 3$; et $84,53\% \pm 3,07$ des cas respectivement. Ces taux ont été significativement accru par rapport aux ostéoblastes infectés par la souche SH1000 dont la sous-catégorie (I) a représenté $48,73\% \pm 2,87$. Parallèlement, les phases répliatives rapides (III) ont été significativement réduites ou inexistantes passant de $44,16\% \pm 6,44$ pour la souche SH1000 à $3,79\% \pm 2,29$ ou $5,01\% \pm 3,50$ ou 0%, pour les souches SH1000 Δagr , BJI031, et BJI035, respectivement.

Dans le même temps, les ostéoblastes infectés par les souches BJI076 et BJI001 ont majoritairement comporté des phases répliatives rapides (III) représentant $70,75\% \pm 5,43$ et $63,71\% \pm 9,33$ des cas respectivement. Ces taux ont été significativement accrus par rapport aux ostéoblastes infectés par la souche SH1000. Parallèlement, les ostéoblastes comportant des *S. aureus* exclusivement non répliatifs (I) ont été significativement réduits et ont représenté $24,41\% \pm 2,93$ et $35,53\% \pm 9,14$ des cas, respectivement.

Il est important de noter que les phases répliquatives rapides non-conventionnelles (IIIb) ont représenté $2\% \pm 0,7$ et $1,38\% \pm 2,41$ des ostéoblastes infectés avec les souches BJI019 et BJI031, respectivement.

Ainsi, la répartition des ostéoblastes infectés en fonction de la dynamique de *S. aureus* a été souche dépendante. En effet, tandis que la souche HG001 n'a pas présenté de différence avec SH1000, les souches SH1000 Δagr , BJI031, et BJI035 ont significativement augmenté la proportion d'ostéoblastes infectés de sous-catégorie (I). A l'inverse les souches BJI076 et BJI001 ont significativement augmenté la sous-catégorie (III) représentant les phases répliquatives rapides.

3.5.2. Intensité des phases répliquatives rapides classiques

L'intensité des phases répliquatives rapides (III) se rapportent aux nombres de générations bactériennes ayant été effectuées au cours de la période de réplication. Pour les phases répliquatives rapides classiques (IIIa), celle-ci s'étend du début de la réplication jusqu'au temps précédent l'éclatement de l'ostéoblaste hôte. Puisque la surface bactérienne est fonction du nombre d'individu de la population, sa mesure permet de quantifier l'intensité des phases répliquatives rapides (III). Ici, la surface bactérienne a été quantifiée par l'analyse du nombre de pixel de GFP tel que précédemment décrit (Axe 1). L'intensité des phases répliquatives rapides classiques (IIIa) a été mesurée en effectuant le ratio du nombre de pixel de GFP bornant la phase répliquative. C'est-à-dire entre sa fin, le temps précédent l'éclatement de l'ostéoblaste hôte, et son début, l'initiation de la réplication.

Les phases répliquatives rapides classiques (IIIa) obtenues avec les souches SH1000 Δagr , BJI019, BJI031, BJI001, et BJI053 ont eu des intensités moyennes similaires à celle obtenue avec la souche de référence SH1000 sans différences significatives (Fig. III-4a).

A l'inverse, les souches HG001 et BJI076 ont présenté des intensités moyennes des phases répliquatives rapides classiques (IIIa) significativement supérieures à celle obtenue avec la souche de référence SH1000. Ceci est notamment visible par les images de microscopie. Tandis que la charge bactérienne occupe la totalité de la surface intraostéoblastique à la fin de la phase répliquative rapide classique (IIIa) pour la souche HG001, celle-ci ne représente qu'un quart de la surface avec la souche SH1000 (Fig. I-3c et III-4b).

Ainsi, les phases répliquatives rapides classiques (IIIa) ont eu des intensités variables et souche dépendante. Notamment, les souches HG001 et BJI076 ont effectué en moyenne significativement plus de générations avant de conduire à l'éclatement des ostéoblastes hôtes par rapport à la souche de référence SH1000.

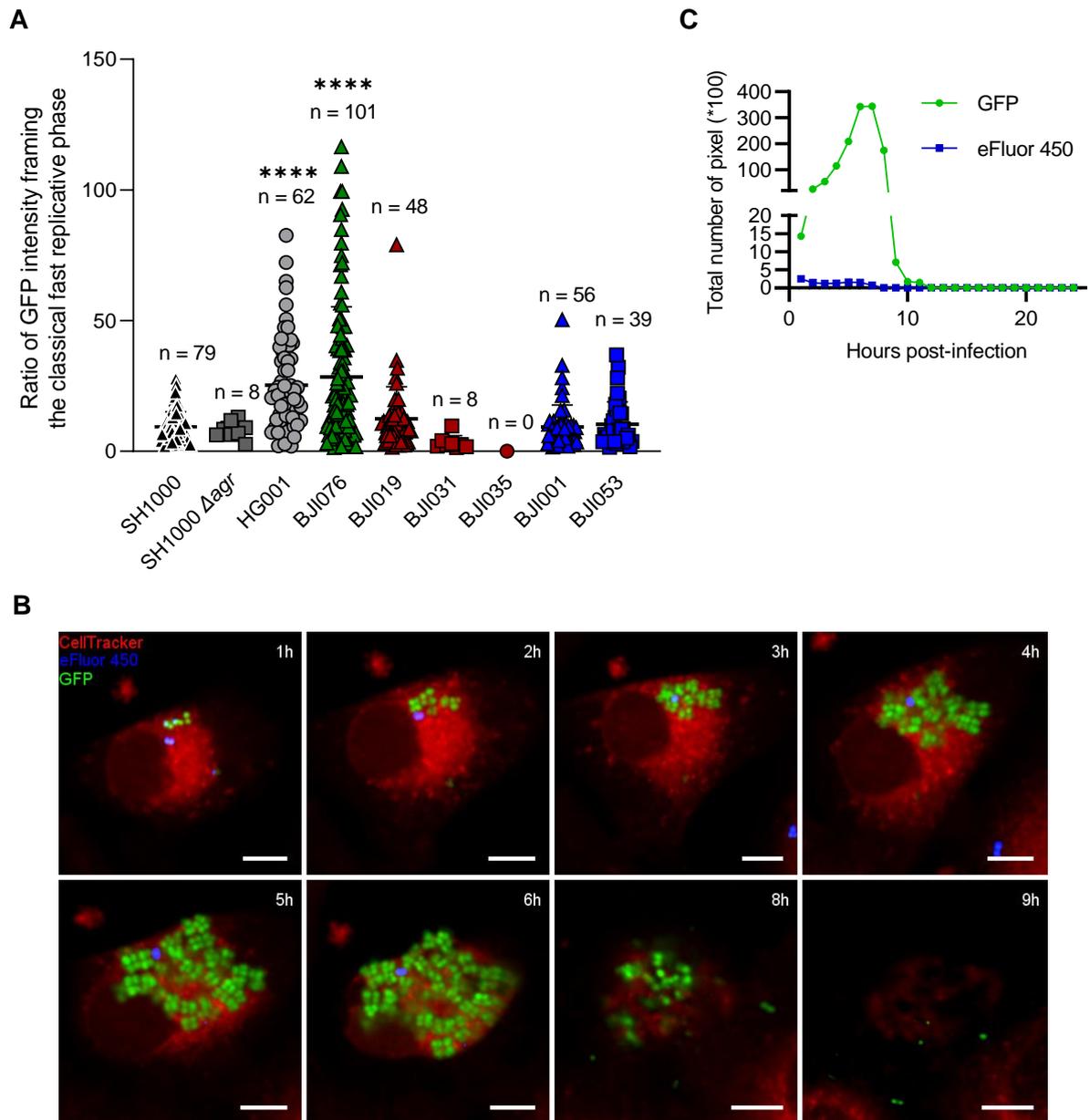


Figure III-4 : Intensité des phases réplcatives rapides en fonction des souches de *S. aureus* intraostéoblastique. Des ostéoblastes ont été marqués et infectés, à MOI 8, avec différentes souches de *S. aureus* exprimant la GFP et marquées à l'eFluor 450 comme indiqué précédemment dans la figure I-3. Les cellules infectées ont été suivies par microscopie comme indiqué précédemment dans la figure II-1. (a) Quantification du ratio du nombre de pixels de GFP bornant les phases réplcatives rapides de *S. aureus* intracellulaire. (b) Images de microscopie en temps réel montrant une phase réplcative rapide de la souche HG0001. Les barres d'échelles représentent 10 μm. (c) Quantification du nombre total de pixels de GFP et d'eFluor 450 relatif aux images de microscopie présentés en (b). (a) Représente la moyenne ± SD de trois répliquas biologiques indépendants dans trois puits par condition et par répliqua. La significativité statistique a été déterminée par le test « one-way ANOVA » suivi par le test de comparaisons multiples de Dunnett (****P<0.0001).

3.5.3. Phases réplcatives rapides avortées

L'implémentation de nouvelles souches de *S. aureus* dans le modèle d'étude a mis en lumière une nouvelle classe de phases réplcatives rapides, celle dite avortée (IIIc). En effet, malgré une phase de réplication similaire aux phases réplcatives rapides classiques (IIIa), ces dernières ne conduisent pas à l'éclatement de l'ostéoblaste hôte (Fig. III-5a). Toutefois, à la différence des phases réplcatives rapides non-conventionnelles (IIIb), les phases réplcatives rapides avortées (IIIc) se sont caractérisées par la réduction drastique et rapide du nombre de pixels de GFP (Fig. III-5a,b). Ainsi, les phases réplcatives rapides avortées (IIIc) se caractérisent par la disparition du signal de GFP à la suite d'une réplication rapide sans toutefois conduire à l'éclatement de l'ostéoblaste hôte. Ce dernier peut rester phénotypiquement viable jusqu'à la fin de l'acquisition ou au moins durant trois temps successifs.

La souche SH1000 a présenté de manière anecdotique 1 phase réplcative rapide avortée (IIIc) représentant $1,19\% \pm 2,06$ des phases réplcatives rapides (III) terminées. Il est important de noter qu'aucune phase réplcative rapide avortée (IIIc) n'a été identifiée avec la souche SH1000 dans les jeux de données correspondants aux axes précédents et ce malgré le nombre important de phases réplcatives suivies. Ceci diminue donc d'autant le taux d'apparition des phases réplcatives rapides avortées (IIIc) pour la souche SH1000.

Les souches HG001, BJI076, BJI019, et BJI001 ont présenté des phases réplcatives rapides avortées (IIIc). Le pourcentage de représentation de ces phases réplcatives (IIIc) a été significativement accru pour les souches BJI076 et BJI001 par rapport à la souche de référence SH1000 atteignant $18,68\% \pm 9,64$ et $41,68\% \pm 13,48$ des phases réplcatives rapides (III) terminées respectivement.

Les souches SH1000 Δagr , BJI031, BJI035, et BJI053, n'ont pas donné lieu à des phases réplcatives rapides avortées (IIIc).

Ainsi, une troisième classe, dites avortée, de la sous-catégorie (III) correspondant aux phases réplcatives rapides a été identifiée. L'apparition et le taux des phases réplcatives rapides avortées (IIIc) est souches dépendantes avec un maximum observé pour les souches BJI076 et BJI001.

3.6. Impact de la souche sur la dynamique de réplication en présence de rifampicine

Le troisième objectif de cet axe a été d'étudier l'impact de la rifampicine sur la dynamique de réplication des persisters de *S. aureus* intraostéoblastiques en fonction de la souche employée.

L'application d'un traitement de rifampicine à concentration clinique osseuse dans le milieu d'infection a significativement impacté la dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique pour

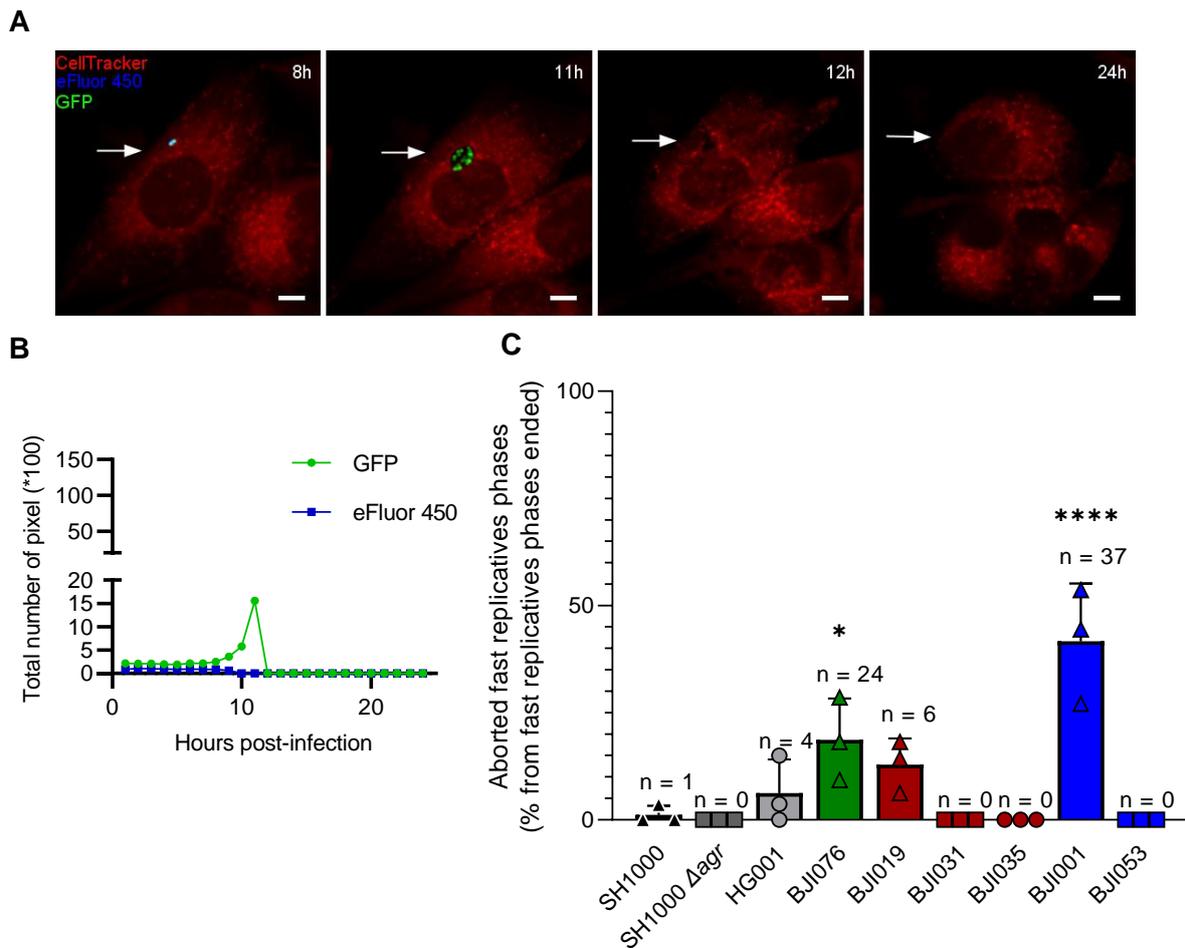


Figure III-5 : Phases répliatives rapides avortées de *S. aureus* intraostéoblastique. Des ostéoblastes ont été marqués et infectés, à MOI 8, avec différentes souches de *S. aureus* exprimant la GFP et marquées à l'eFluor 450 comme indiqué précédemment dans la figure I-3. Les cellules infectées ont été suivies par microscopie comme indiqué précédemment dans la figure II-1. (a) Images de microscopie en temps réel montrant une phase répliative rapide avortée, souche BJI001. Les barres d'échelles représentent 10 μ m. (b) Quantification du nombre total de pixels de GFP et d'eFluor 450 relatif aux images de microscopie présentés en (a). (c) Quantification du pourcentage de phases répliatives rapides avortées de *S. aureus* intracellulaire. (c) Représente la moyenne \pm SD de trois répliquas biologiques indépendants dans trois puits par condition et par répliqua. La significativité statistique a été déterminée par le test « one-way ANOVA » suivi par le test de comparaisons multiples de Dunnett (* $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$).

l'ensemble des souches employées, exceptée la souche BJI035 résistante à la rifampicine (Fig. III-6). En effet, pour l'ensemble des souches sensibles à la rifampicine, les ostéoblastes comportant des phases répliatives rapides (III) n'ont pas été observés sous le traitement de rifampicine. De manière concomitante, le taux d'ostéoblastes possédant des *S. aureus* lentement répliatifs (II) a diminué. Le pourcentage d'ostéoblastes, niches de *S. aureus* exclusivement non répliatifs (I), a significativement été augmenté pour l'ensemble des souches, sous traitement de rifampicine, de 46,96% \pm 1,58 ; 11,23% \pm 3,71 ; 35,34% \pm 3,89 ; 74,75% \pm 4,36 ; 60,53% \pm 8,03 ; 14,75% \pm 3,59 ; 64,03% \pm 9,78 ; et 54,09% \pm 2,3 pour les souches SH1000, SH1000 Δ agr, HG001, BJI076, BJI019, BJI031, BJI001, BJI053 respectivement.

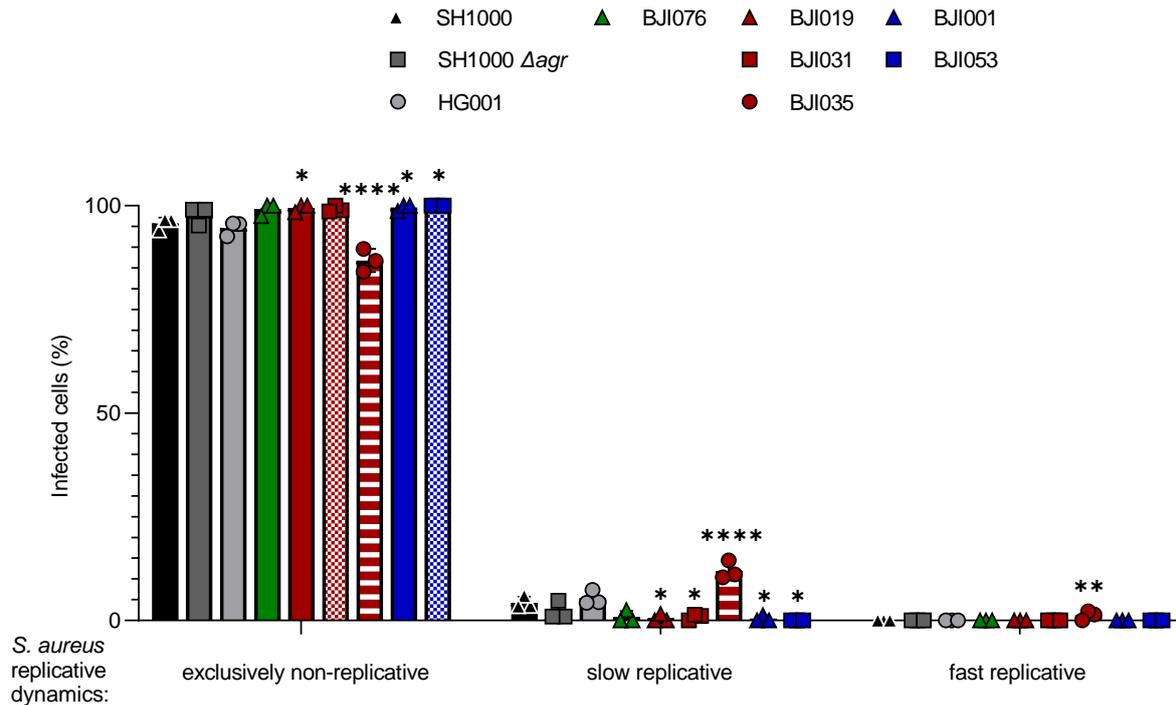


Figure III-6 : Dynamique de réplication de diverses souches de *S. aureus* intraostéoblastique sous un traitement de rifampicine à concentration clinique osseuse. Des ostéoblastes ont été marqués et infectés, à MOI 8, avec différentes souches de *S. aureus* exprimant la GFP et marquées à l'eFluor 450 comme indiqué précédemment dans la figure I-3. Les cellules infectées ont été traitées à la rifampicine à concentration clinique osseuse et suivies par microscopie comme indiqué précédemment dans la figure II-1. Quantification du pourcentage de cellules infectées en fonction de la dynamique de réplication de *S. aureus* intracellulaire sous un traitement de rifampicine. Représentent la moyenne \pm SD de trois répliquas biologiques indépendants dans trois puits par condition et par répliqua. La significativité statistique a été déterminée par le test « one-way ANOVA » suivi par le test de comparaisons multiples de Dunnett (* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, **** P <0.0001).

Ainsi, lors d'un traitement de rifampicine, la sous-catégorie (I) a représenté $95,69\% \pm 1,44$; $97,78\% \pm 2,2$; $94,63\% \pm 1,76$; $99,16\% \pm 1,44$; $99,47\% \pm 0,91$; $99,19\% \pm 0,71$; $99,56\% \pm 0,76$; et 100%, respectivement, des ostéoblastes infectés.

Ainsi, l'application d'un traitement de rifampicine a modifié significativement et pour l'ensemble des souches employées la dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique en réduisant ou inhibant les phases répliquatives lentes (II) et rapides (III). Les *S. aureus* intraostéoblastiques survivants pour l'ensemble des souches ont de ce fait présenté majoritairement ou totalement un phénotype non répliquatif.

3.7. Conclusions et perspectives

Ainsi, l'ensemble de ces résultats ont démontré le caractère souche-dépendant de la dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique. Une nouvelle classe de phases réplcatives rapides dites avortées (IIIc) a émergé dont le taux est également souche-dépendant. Ces résultats ont mis en lumière la différence d'informations apportées parallèlement par la méthode de dénombrement des CFU et d'analyse de la dynamique de réplication intracellulaire. En effet, tandis que les souches SH1000 et BJI035 ont présenté des taux similaires de CFU, celles-ci ont possédé des dynamiques de réplcations intraostéoblastiques significativement différentes. Notamment, les ostéoblastes infectés par la souche SH1000 ont comporté $44,16\% \pm 6,44$ de phases réplcatives rapides (III) alors que ceux infectés par la souche BJI035 n'en n'ont pas contenu. Ainsi, des dynamiques de réplcations intraostéoblastiques variées peuvent conduire à un taux similaire de CFU et questionne donc la puissance de cette méthode sur la compréhension de la vie intracellulaire de *S. aureus*.

De plus, la souche SH1000 mutante pour le système agr a présenté des taux de CFU similaires, excepté sous un traitement de rifampicine à 24 hpi, par rapport à la souche sauvage SH1000. Cependant, la dynamique de réplication a été différente et le taux d'ostéoblastes infectés de sous-catégorie (I) a été significativement augmenté avec le mutant. Ainsi, le système agr semblerait impliqué dans la sortie de la quiescence conduisant à des phases réplcatives rapides (III). L'intensité de ces phases n'est toutefois pas impactée par la délétion du système agr.

Parallèlement, l'ensemble de ces résultats, ont démontré que les *S. aureus* intraostéoblastiques survivants à un traitement de rifampicine à concentration clinique osseuse dans le milieu d'infection sont exclusivement non réplcatifs dans $94,63\% \pm 1,76$ à 100% des ostéoblastes infectés en fonction de la souche employée. Suivant le raisonnement décrit précédemment (Axe 2), l'ensemble de ces résultats, suggèrent que les survivants intraostéoblastique au traitement de rifampicine sont des persisters majoritairement ou totalement non réplcatifs selon la souche employée. L'impact de la rifampicine sur la dynamique de réplication est ainsi souche-indépendant. Par extension, le phénotype des persisters intraostéoblastique de *S. aureus* à la rifampicine est souche-indépendant.

Afin d'ajouter un niveau de compréhension à la vie intracellulaire de *S. aureus*, l'objectif suivant a été de relier la localisation intraostéoblastique en fonction de la dynamique de réplication de *S. aureus*. Pour ce faire, différentes méthodes de microscopie ont été employées dans l'axe suivant.

AXE 4. Dynamique de réplication et localisation intraostéoblastique

4.1. Introduction

Tel que décrit dans l'introduction de ce manuscrit de thèse de doctorat, la corrélation entre la localisation vacuolaire ou cytosolique dans les CPNP avec la dynamique de réplication de *S. aureus* n'est à ce jour pas élucidé dû à des résultats contradictoires.

Afin d'élucider la localisation intracellulaire en fonction de la dynamique de réplication dans le modèle *in cellulo* développé, différentes méthodes de microscopie ont été employées. Les résultats exploratoires des expériences de microscopies photoniques en temps réel et d'immunofluorescence ainsi que de microscopie électronique à transmission et corrélative sont présentés dans cet axe.

4.2. Méthodes

4.2.1. Cultures et marquages bactériens et cellulaires

Les cultures et marquages de *S. aureus* et des ostéoblastes MG63 ont été effectuées tel que décrit précédemment (Axe 1 – 1.2.).

4.2.2. Infections et microscopie photonique en temps réel

Les expériences de microscopie photonique confocale en temps réel, l'acquisition des images ainsi que leur analyse ont été effectuées tel que décrit précédemment (Axe 1 – 1.2.).

4.2.3. Microscopie électronique à transmission

Des ostéoblastes ont été cultivés à confluence en plaques 6 puits (Falcon, 353046) 24 heures avant l'infection. Les infections ont été conduites avec SH1000-GFP marquée à l'eFluor 450 à une multiplicité d'infection de 8 tel que décrit précédemment (Axe 1 – 1.2.). Les cellules infectées ont été traitées ou non à la rifampicine à concentration clinique osseuse de 6 µg/mL. A 24 hpi, les cellules infectées ont été lavées une fois avec du DPBS -/- à 37°C puis fixées avec du formaldéhyde à 4% (Invitrogen, FB002) pendant 20 minutes à température ambiante. Les cellules ainsi fixées ont été lavées une fois avec du DPBS -/- à température ambiante puis fixées avec 2% de glutaraldéhyde (EMS) dans 0,1 M de tampon de cacodylate de sodium à pH 7,4 à température ambiante. Après une série de trois lavages avec du tampon de cacodylate de sodium à 0,2 M, les cellules ont été fixées avec du tétroxyde d'osmium

aqueux à 1% (EMS) à température ambiante pendant 1 heure. Puis, les cellules ont été déshydratées graduellement avec de l'éthanol à température ambiante. Enfin, les cellules ainsi fixées et déshydratées ont été intégrées dans de l'Epon. Après polymérisation, des sections ultrafines de 100 nm ont été coupées à l'aide d'un ultramicrotome UC7 (Leica) puis collectées sur des grilles de 200 mailles. Les sections résultantes ont été marquées avec de l'acétate d'uranyle et du citrate de plomb avant observations à l'aide d'un microscope électronique à transmission 1400JEM (JEOL) équipé d'une caméra Orius 600 et d'un micrographe digital.

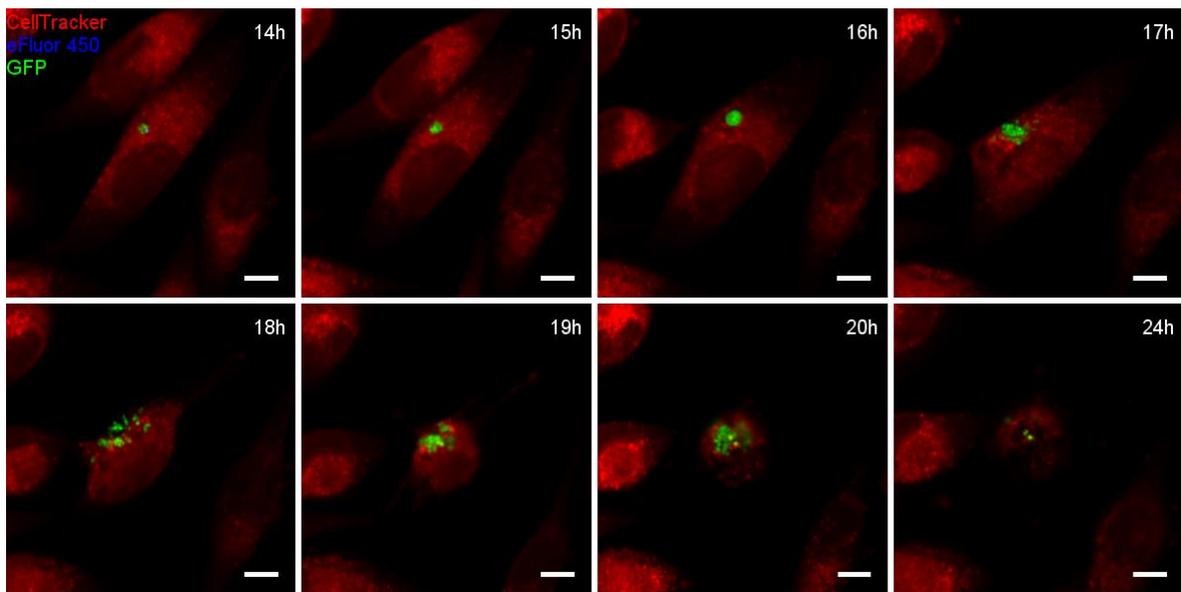
4.2.4. Microscopie corrélative

Des ostéoblastes ont été cultivés à densité éparsée en plaques 6 puits (Falcon, 353046) 24 heures avant l'infection sur des lamelles quadrillées (EMS, CM35). Préalablement aux infections, les ostéoblastes ont été marqués au CellTracker™ Red CMTPX (Thermo Fisher Scientific, C34552) tel que décrit précédemment (Axe 1 – 1.2.). Les infections ont été conduites avec SH1000-GFP marquée à l'eFluor 450 à une multiplicité d'infection de 8 tel que décrit précédemment (Axe 1 – 1.2.). A 11 hpi, les cellules infectées ont été lavées une fois avec du DPBS -/- à 37°C puis fixé avec du formaldéhyde à 4% (Invitrogen, FB002) pendant 20 minutes à température ambiante. A la suite d'un lavage unique avec du DPBS -/- à température ambiante, les images de fluorescence ont été acquises avec un microscope photonique (Zeiss, LSM 880) confocal équipé de détecteurs PMT 1, 2 et GaASP et d'une lentille d'objectif 40x (40x/1.4, WD 0.13 mm, Zeiss). Les sondes fluorescentes CellTracker™ Red CMTPX, GFP et eFluor 450, ont été respectivement excitées avec des lasers de 561 nm, 488 nm et 405 nm. Les filtres d'émission utilisés pour leur détection sont dans l'ordre : 574-712 nm, 493-574 nm, et 410-483 nm. A la suite de l'observation en microscopie photonique, les cellules infectées ont été fixées, déshydratées, intégrées, et marquées selon le protocole décrit précédemment (Axe 4 – 4.2.2.). Les sections résultantes ont été observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission 1400JEM (JEOL) équipé d'une caméra Orius 600 et d'un micrographe digital.

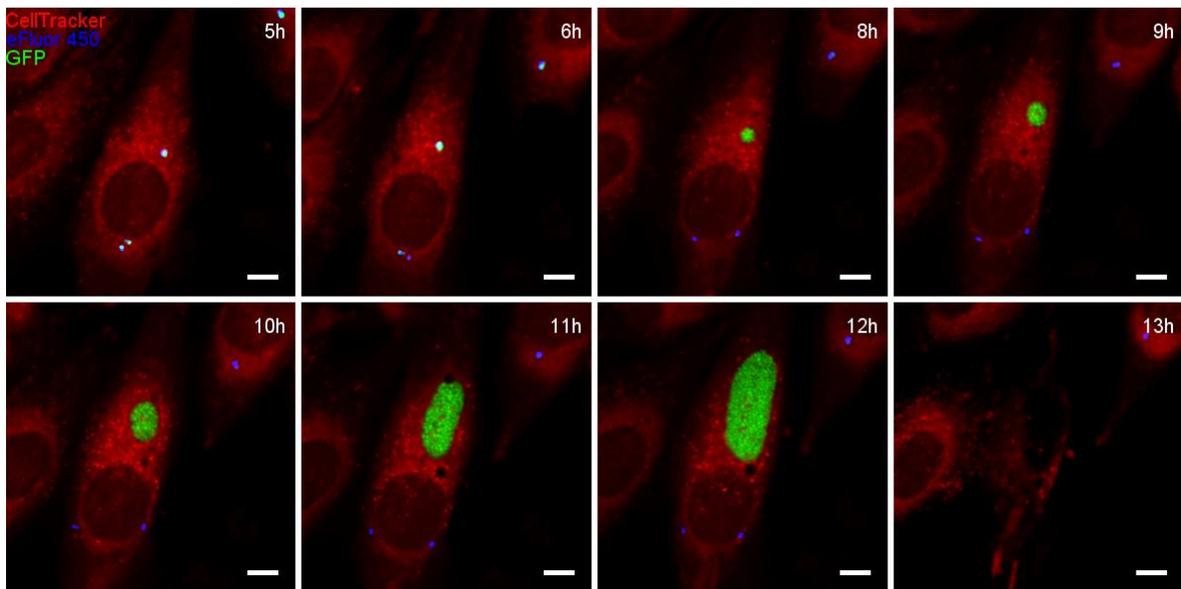
4.3. Microscopie photonique en temps réel

La structure spatiale des phases réplcatives rapides classiques (IIIa) de *S. aureus* intraostéoblastiques a été étudiée de manière exploratoire à l'aide du modèle *in cellulo* développé. Les phases réplcatives rapides classiques (IIIa) des souches SH1000 et HG001 ont été suivies au cours du temps en microscopie photonique automatisée tel que décrit dans les axes précédents. Ici, les phases réplcatives (IIIa) ont été distinguées selon que la population a présenté une structure soit ovale à circulaire soit de contour indéfini.

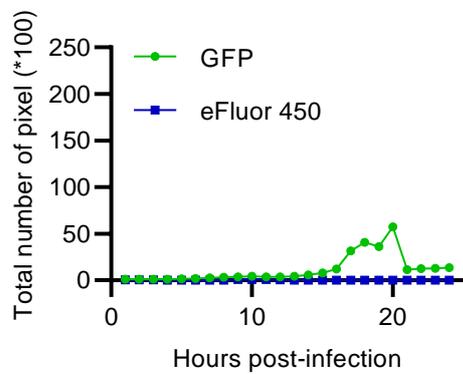
A



B



C



D

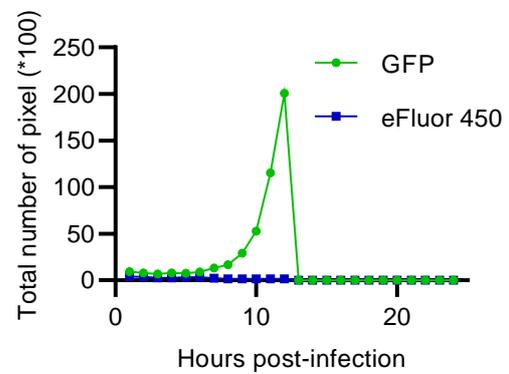


Figure IV-1 : Légende page suivante

Figure IV-1 : Phases réplcatives rapides intraostéoblastique de structure contrainte investiguées par microscopie photonique en temps réel. Des ostéoblastes ont été marqués et infectés, à MOI 8, avec différentes souches de *S. aureus* exprimant la GFP et marquées à l'eFluor 450 comme indiqué précédemment dans la figure I-3. Les cellules infectées ont été suivies par microscopie comme indiqué précédemment dans la figure II-1. Images de microscopie en temps réel montrant une phase réplcative rapide de la souche (a) SH1000 et (b) HG0001 contrainte dans une structure ovale à circulaire. Les barres d'échelles représentent 10 μm . (c, d) Quantification du nombre total de pixels de GFP et d'eFluor 450 relatif aux images de microscopie présentés en (a) et (b) respectivement.

Les phases réplcatives (IIIa) des souches SH1000 et HG001 ont été contenues dans un environnement ovale à circulaire dans $8,48\% \pm 5,27$ et $11,83\% \pm 3,53$, des cas, respectivement (Fig. IV-a,b).

4.4. Microscopie photonique et immunofluorescence

Afin de quantifier la localisation vacuolaire en fonction de son type et de la dynamique de *S. aureus* intraostéoblastique des expériences de marquages immunofluorescents ont été envisagées.

Les anticorps primaires Rab5, Rab7, Rab4, Rab11, marqueurs des endosomes précoces, tardifs, et recyclés respectivement ; Lamp1, Lamp2, marqueurs des lysosomes ; LC3, marqueur de l'autophagie et des endosomes et p62 de l'autophagie ont été envisagés. Toutefois, l'ensemble de ces marqueurs ont été aspécifiques de *S. aureus* SH1000 et l'ont marqué en culture planctonique malgré une saturation à l'albumine sérique de bovin. Ceci pourrait être due à l'expression de la protéine A par *S. aureus*. En effet, celle-ci a une forte activité de liaison aux fragment Fc des immunoglobulines notamment à celles des hôtes employés pour la production des anticorps²⁷⁸.

Ainsi, des méthodes de microscopies électroniques ont été investiguées par la suite.

4.5. Microscopie électronique à transmission

Dans l'objectif d'élucider la localisation de *S. aureus* intraostéoblastique en fonction de sa dynamique de réplication, des ostéoblastes infectés en présence ou non d'un traitement de rifampicine à concentration clinique osseuse dans le milieu d'infection ont été fixés à 24 hpi et imagés en microscopie électronique à transmission.

Les *S. aureus* intraostéoblastiques sans traitement de rifampicine ont pu être retrouvés dans des vacuoles (Fig. IV-2a-g) ou de manière cytosolique (Fig. IV-2h) à 24 hpi. Ces vacuoles semblent être composés d'un système multi-membranaires (Fig. IV-2a,b) ou à simple membrane (Fig. IV-2c-g). Les systèmes multi-membranaires ont exclusivement été associés à une vacuole lâche dont le contenu est partiellement ou totalement clair aux électrons. Notons ici que *S. aureus* retrouvé au sein de ces structures a pu être phénotypiquement intact, dense aux électrons (Fig. IV-2a), ou altéré donc clair aux

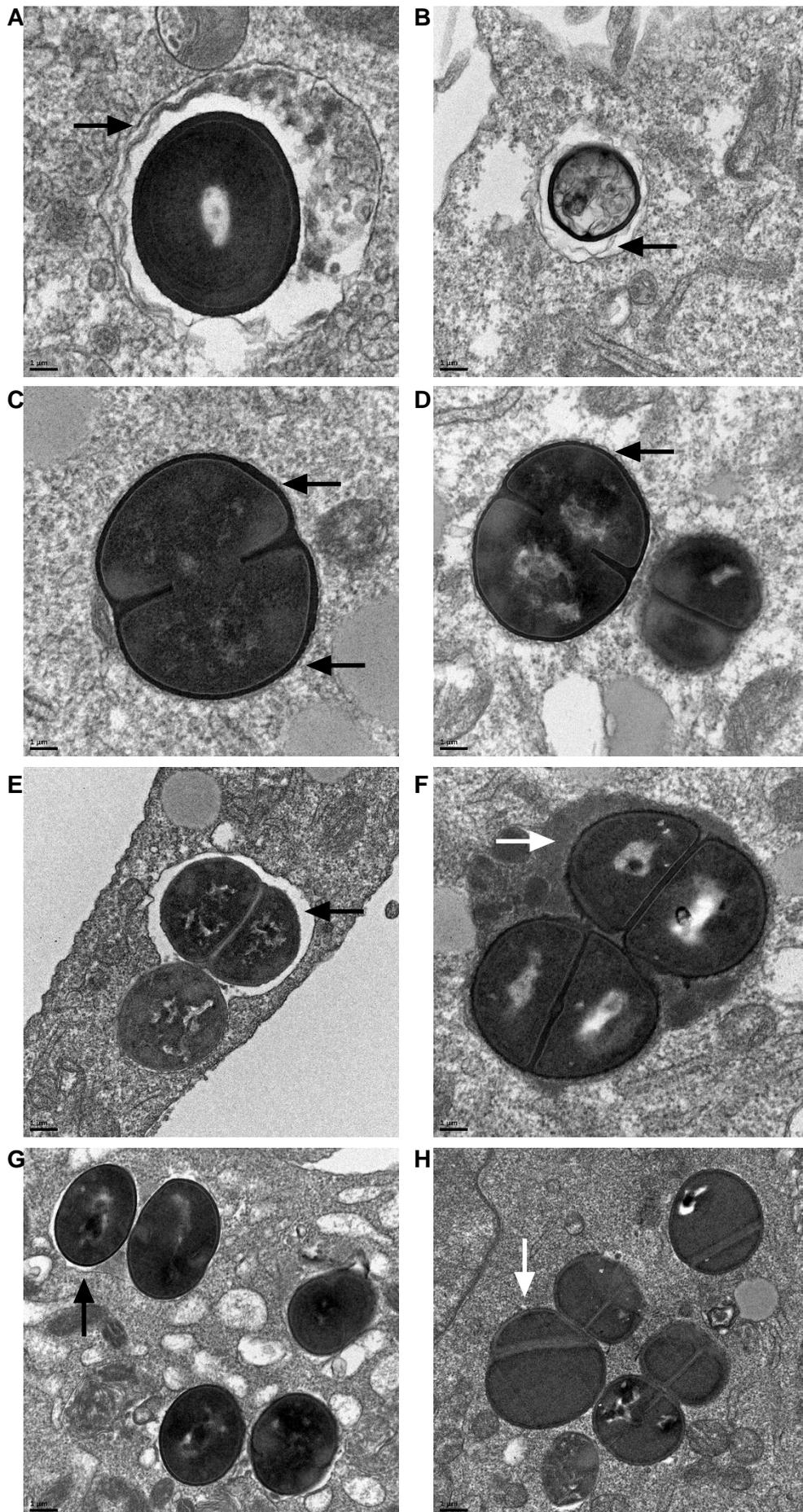


Figure IV-2 : Légende page suivante

Figure IV-2 : Localisation intraostéoblastique investiguée par microscopie électronique à transmission. Des ostéoblastes ont été infectés, à MOI 8, avec *S. aureus* SH1000-GFP marquée à l'eFluor 450 comme indiqué précédemment dans la figure I-3. Les cellules infectées ont été fixées à 24 hpi puis imagées en microscopie photonique. Images de microscopie électronique à transmission montrant des vacuoles (a, b) multi-membranaires ou (c, d, e, f, g) à simple membrane, des vacuoles (c, d) serrés à la bactérie ou (e, f) lâches, ainsi que (h) des bactéries cytoplasmiques. Les barres d'échelles correspondent à 1 μm . (a - h) Représentent des images provenant de trois répliquas biologiques indépendants dans trois puits par condition et par répliqua.

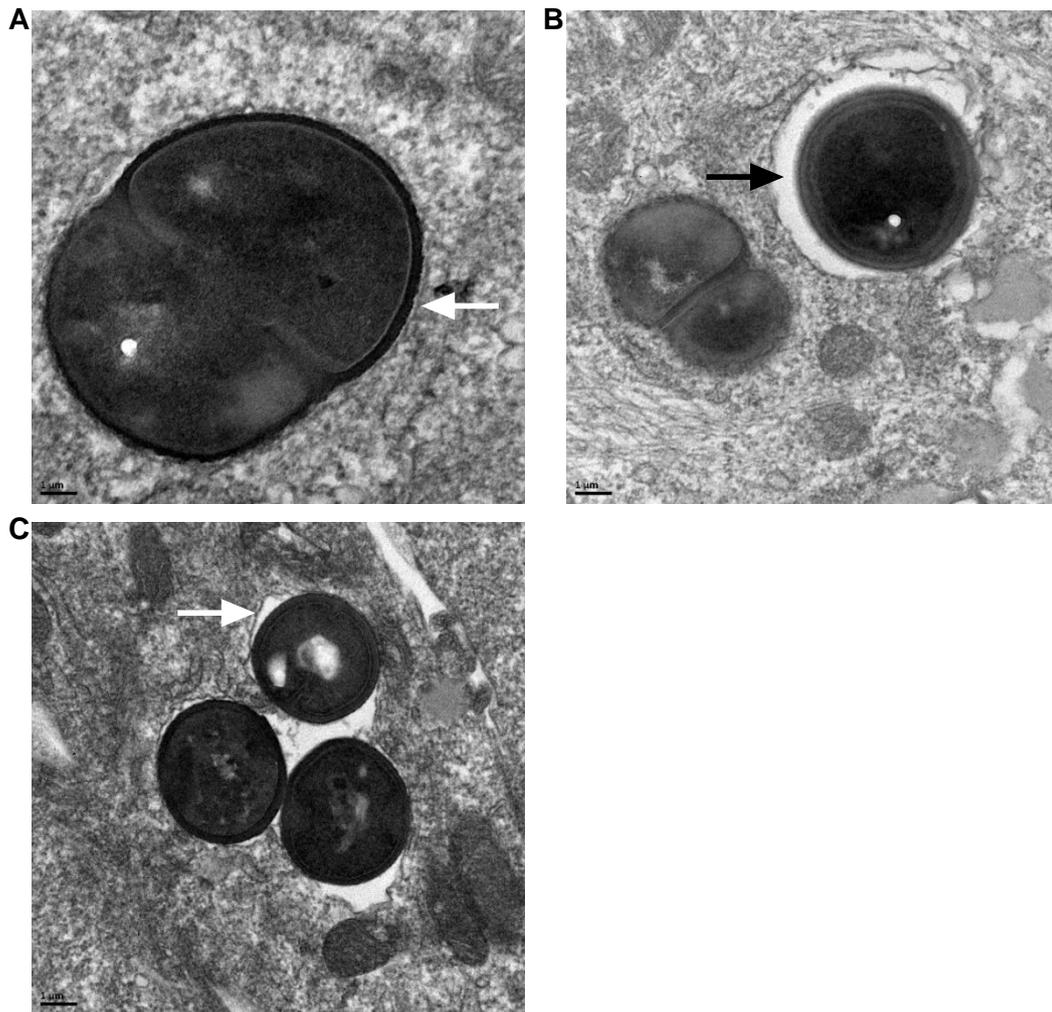


Figure IV-3 : Localisation intraostéoblastique sous traitement de rifampicine investiguée par microscopie électronique à transmission. Des ostéoblastes ont été infectés, à MOI 8, avec *S. aureus* SH1000-GFP marqués à l'eFluor 450 comme indiqué précédemment dans la figure I-3. Les cellules infectées ont été traitées à la rifampicine à concentration clinique osseuse puis fixé à 24 hpi et imagées en microscopie photonique. Images de microscopie électronique à transmission montrant des vacuoles (a) serrées à la bactérie ou (b, c) lâches. Les barres d'échelles correspondent à 1 μm . (a - c) Représentent des images provenant de trois répliquas biologiques indépendants.

électrons (Fig. IV-2b). Les vacuoles à simple membrane semblent pouvoir être resserrées autour de *S. aureus* (Fig. IV-2c,d) ou lâches (Fig. IV-2e- g). Le contenu intra-vacuolaire des structures à simple membrane lâche a pu être clair (Fig. IV-2e) ou dense (Fig. IV-2f) aux électrons.

Il est important de noter ici que les *S. aureus* ont majoritairement comportés des septums. Toutefois la majorité des événements observés se sont composés de *S. aureus* individuels ou par deux suggérant un état non ou lentement répliatif ainsi que potentiellement l'initiation de phases répliatives rapides.

Les *S. aureus* intraostéoblastique sous traitement de rifampicine ont pu être retrouvés dans des vacuoles serrées (Fig. IV-3a) ou lâches avec un contenu clair (Fig. IV-3b,c) ou dense aux électrons.

Les images de microscopie électronique à transmission ont été analysés quantitativement en double aveugle dans l'objectif de définir le pourcentage de *S. aureus* intra-vacuolaires. Afin d'étudier une population homogène de *S. aureus*, non ou lentement répliatifs et potentiellement en initiation de phases répliatives rapides, les groupes spatialement proches et supérieurs à 3 individus ont été exclus de l'analyse. Ici, $122,5 \pm 3,10$ événements représentant des *S. aureus* isolés ou en groupes de 2 ou 3 ont été analysés par condition.

$76,06\% \pm 10,23$ et $74,47\% \pm 12,73$ des événements ont été observés à l'intérieur de vacuoles sans ou sous le traitement de rifampicine à concentration clinique osseuse, respectivement. Les événements intra-vacuolaires de la condition contrôle ont été observés dans des membranes serrées autour des *S. aureus* dans $67,42\% \pm 5,14$ des cas. Sous un traitement de rifampicine, ces événements ont été augmentés à $87,46\% \pm 4,92$ des cas.

Ainsi, *S. aureus* intraostéoblastique non ou lentement répliatif et potentiellement en initiation de phase répliative rapide a pu être retrouvé soit dans le cytosol soit majoritairement au sein de vacuoles à l'aide de microscopie électronique à transmission. Ces vacuoles ont pu être multi-membranaires ou à simple membrane dont le contenu a pu être clair ou dense aux électrons. Ces vacuoles ont majoritairement été serrées autour de *S. aureus*.

4.6. Microscopie corrélative

Afin de corrélérer les observations obtenues à l'aide de la microscopie électronique à transmission avec l'analyse de la dynamique de réplication par microscopie photonique, la microscopie corrélative a été employée.

Ici, les images de microscopie présentées en figure IV-3a,b sont représentatives d'une expérience exploratoire unique.

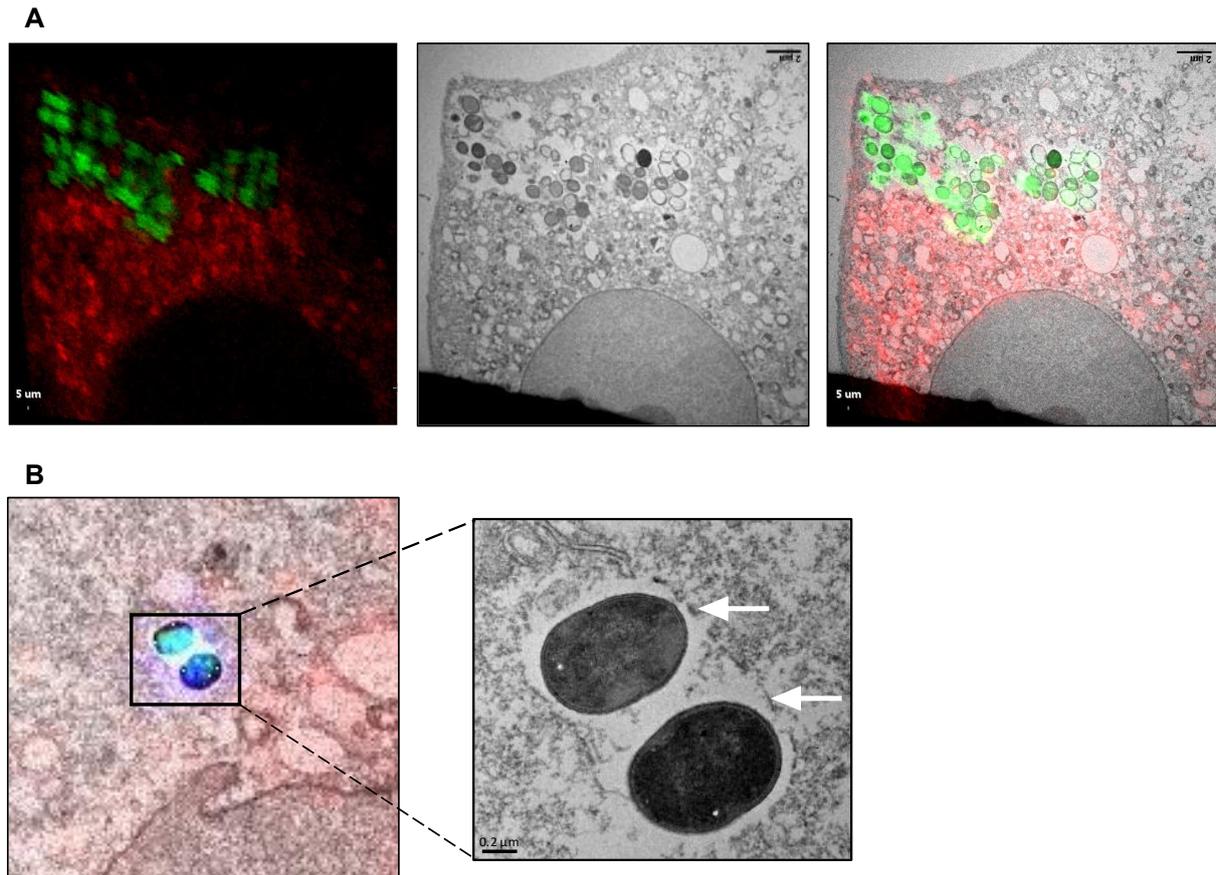


Figure IV-4 : Etat réplcatif et localisation intraostéoblastique investigué par microscopie corrélative. Des ostéoblastes ont été marqués et infectés, à MOI 8, avec *S. aureus* SH1000-GFP marquée à l'eFluor 450 comme indiqué précédemment dans la figure I-3. Les cellules infectées ont été fixées à 11 hpi puis imagées en microscopie photonique. Après inclusion, les cellules d'intérêts imagées précédemment l'ont de nouveau été en microscopie électronique à transmission. Images de microscopie corrélative montrant des ostéoblastes infectés par *S. aureus* (a) effectuant ou (b) initiant une phase réplcative.

Un ostéoblaste infecté par des *S. aureus* regroupés en amas et non marqué à l'eFluor, signe d'une phase réplcative rapide en cours, est représenté en figure IV-3a. Ici, les *S. aureus* n'ont pas été détournés par une membrane. Ces derniers présentent des phénotypes variés allant d'altéré avec un contenu clair aux électrons à viable avec un contenu dense aux électrons.

Parallèlement, un ostéoblaste infecté par une paire de *S. aureus* présentant des septums et marqué à l'eFluor 450, signe d'une réplcation lente ou dans les étapes précoces d'une réplcation rapide, est représenté en figure IV-3a. Ici, les *S. aureus* ont été détournés par une vacuole à simple membrane dont la présence est morcelée autour des bactéries.

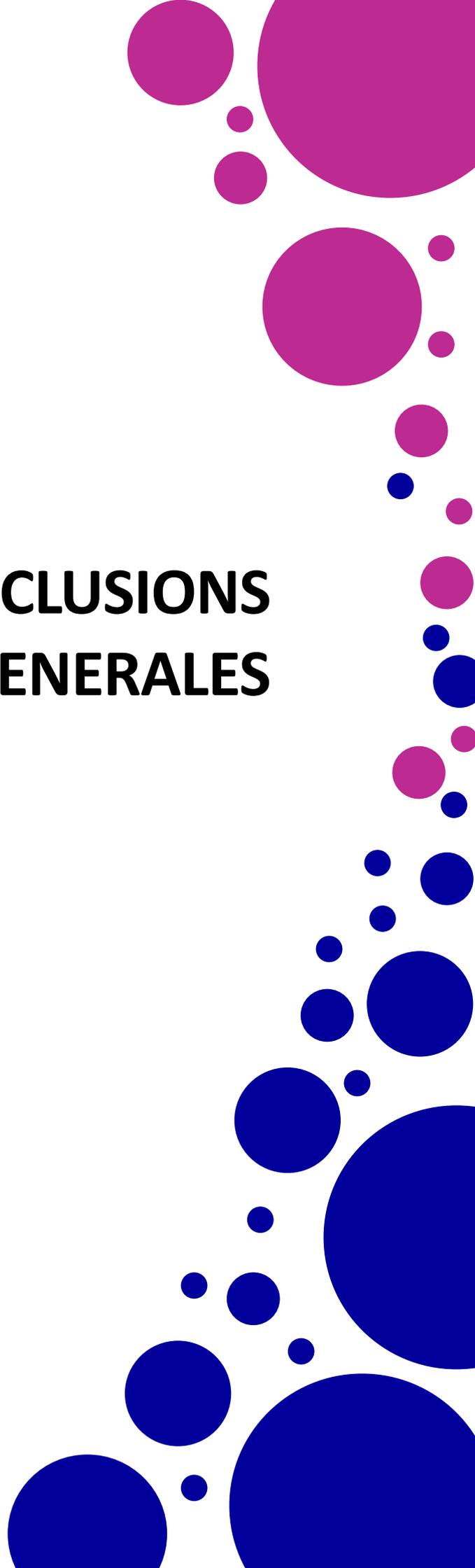
Ainsi, la microscopie corrélative permet de relier en point final la localisation intraostéoblastique avec la dynamique de réplcation.

4.7. Conclusions et perspectives

Ainsi, l'ensemble de ces résultats, suggèrent que les *S. aureus* non ou lentement répliatifs et potentiellement en initiation de phases répliatives rapides, se trouvent majoritairement au sein de vacuoles à simples membrane et serrées autour de la bactérie. Le faible taux d'observations obtenues pour les phases répliatives rapides en cours ne permet pas à cet instant de caractériser leurs localisations. Toutefois, nous pouvons noter qu'un faible pourcentage de $8,48\% \pm 5,27$ à $11,83\% \pm 3,53$ des cas selon la souche employées, SH1000 ou HG001 respectivement, sont contenues dans des structures ovales à circulaires. Rappelons également que sous un traitement de ciprofloxacine à concentration clinique osseuse, $30,75\% \pm 2,7$ des phases répliatives rapides (III) de SH1000 sont non-conventionnelles (IIIb) et maintenues sous forme circulaire.

Ainsi, la microscopie électronique à transmission et la microscopie corrélative ont permis d'apporter des éléments de réponses sur la localisation intraostéoblastique de *S. aureus* en fonction de son état répliatif. Toutefois, la méthodologie de ces techniques, notamment concernant la microscopie corrélative ne permet pas d'en obtenir une analyse à haut rendement et en temps réel. L'utilisation d'ostéoblastes exprimant des marqueurs vacuolaires fluorescents permettrait par l'utilisation de la microscopie photonique d'obtenir une analyse quantitative et au cours du temps.

CONCLUSIONS GENERALES



1.1. Etude de la dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique

Staphylococcus aureus est une bactérie commensale de l'humain et également un pathogène opportuniste majeur pouvant causer un large spectre d'infections, bénignes à mortelles, dans un contexte nosocomial ou communautaire. Les IOA à *S. aureus* ont un taux élevé de morbidité et de mortalité et présentent également un fort taux de rechute et de chronicisation. La chronicisation des IOA à *S. aureus* pourrait être due à sa physiopathologie particulière. En effet, *S. aureus* peut former des structures tridimensionnelles telles que les biofilms, les abcès et les séquestres osseux. Il peut également envahir les ostéoplastes et les cellules osseuses telles que les ostéoblastes. Ces mécanismes dits d'échappement pourraient contribuer au développement d'IOA chroniques en protégeant mécaniquement *S. aureus* du système immunitaire, des antibiotiques, et du débridement lors d'interventions chirurgicales. Afin d'apporter des éléments de réponses sur l'implication de la vie intraostéoblastique de *S. aureus* dans la physiopathologie et la chronicité des IOA, un modèle d'étude *in cellulo* a été développé dans le cadre de cette thèse de doctorat. Celui-ci combine les avantages des méthodes d'analyses de dilution de fluorescence et de surface bactérienne pour déchiffrer en temps réel et à l'échelle de la cellule eucaryote unique la dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique.

Ce modèle d'étude a permis de mettre en lumière l'hétérogénéité de la dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique sur une période de 24 heures. Une vue d'ensemble de ces résultats est présentée en figure C1. Les ostéoblastes infectés par une phase stationnaire de croissance ont été distingués selon la dynamique de réplication des *S. aureus* qu'ils contenaient. Ainsi, les ostéoblastes infectés ont pu comporter un ou des *S. aureus* exclusivement non répliatifs (I), ou au moins un *S. aureus* sortant de son état quiescent et engendrant une phase répliative lente (II), ou rapide (III) dite classique (IIIa), non-conventionnelle (IIIb), ou avortée (IIIc). Les phases répliatives rapides (III) se répartissent sur l'ensemble de la cinétique due à une sortie de la quiescence de *S. aureus* séquentielle. Les phases répliatives rapides classiques (IIIa) conduisent inévitablement à l'éclatement de la cellule hôte et au relargage des bactéries dans le milieu extracellulaire. L'analyse de la souche SH1000 a démontré qu'elles durent entre 3 heures et 5 heures. Les phases répliatives non-conventionnelles (IIIb) se caractérisent par le maintien de *S. aureus* s'étant répliqués dans une structure circulaire sans éclatement de la cellule hôte. Les phases répliatives avortées (IIIc) correspondent à la disparition du signal fluorescent bactérien lors d'une phase de réplication active sans altérer le phénotype de la cellule hôte.

Les taux de représentation de ces sous-catégories de la population ostéoblastique infectée ont été souche dépendante. Ainsi les souches employées ont pu être classées en trois types selon leurs dynamiques de répliations intraostéoblastiques. Les souches de type (A), (B), et (C) ont présenté

respectivement un profil intermédiaire entre quiescence exclusive et réplication rapide, un profil majoritairement non répliatif exclusif, ou un profil majoritairement à réplication rapide. Les taux correspondants sont répertoriés dans le schéma récapitulatif présenté en fin de cette section (Fig. C1). Les souches SH1000, HG001, BJI019, et BJI053 du type (A) ont présenté des taux similaires de phases répliatives rapides (III) et d'ostéoblastes comportant des *S. aureus* exclusivement non répliatifs (I) de 33 à 44% et de 39 à 59% respectivement. Toutefois, l'analyse effectuée pour la souche SH1000 a démontré la domination du phénotype non répliatif au sein de la population globale d'ostéoblastes infectés. En effet, environ 74% des ostéoblastes infectés ont été la niche soit exclusive (I) soit partagée (IIIa) de *S. aureus* SH1000 non répliatifs. Une analyse détaillée temps par temps a démontré que les ostéoblastes infectés par un ou des *S. aureus* SH1000 exclusivement non répliatifs (I) ont représenté au minimum environ 73% des ostéoblastes infectés au cours la cinétique. Les souches SH1000 Δagr , BJI031, et BJI035 du type (B) ont conduit à la réduction significative et drastique des phases répliatives rapides (III). Les ostéoblastes infectés ont ainsi contenu majoritairement des *S. aureus* exclusivement non répliatifs (I) entre 84% et 87%. Enfin, les souches BJI076 et BJI001 du type (C) ont quant à elles accru significativement l'apparition de phases répliatives rapides (III) comptant pour environ 70% et 64% des ostéoblastes infectés respectivement. Le taux des phases répliatives rapides avortées (IIIc) a été maximum pour ces souches. Dans le même temps, les ostéoblastes infectés par des *S. aureus* exclusivement non répliatifs (I) ont été évidemment significativement réduits.

Notons également que le système *agr* semblerait impliqué dans la sortie de la quiescence conduisant à des phases répliatives rapides (III). L'intensité de ces phases n'est toutefois pas impactée par la délétion du système *agr*.

Il est important de noter que les phases répliatives rapides classiques (IIIa) ont eu des intensités variables et souche dépendante. En effet, les souches HG001 et BJI076 ont effectué en moyenne significativement plus de générations avant de conduire à l'éclatement des ostéoblastes hôtes notamment par rapport à la souche de référence SH1000. Ainsi, plus d'individus ont été relargués dans le milieu extracellulaire et seraient notamment capables d'infecter d'autres cellules, tel que montré dans une autre étude³⁰², ou tissus voisins.

1.2. Etude de la dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique sous traitement antibiotique

Dans le cadre des infections ostéo-articulaires sur matériel prothétique, le traitement thérapeutique antibiotique de choix est une combinaison de rifamycines et de fluoroquinolones. Ainsi, la rifampicine et la ciprofloxacine, ont été ajoutées au modèle d'étude à concentrations cliniques¹⁶¹.

1.2.1. Etude de l'impact de la ciprofloxacine

L'application d'un traitement de ciprofloxacine à concentration clinique osseuse dans le milieu d'infection n'a pas impacté la répartition des ostéoblastes infectés en fonction de la dynamique de réplication de *S. aureus* SH1000. Toutefois, l'augmentation à concentration clinique plasmatique a significativement réduit les phases réplcatives rapides (III) et parallèlement augmenté les ostéoblastes comportant des phases réplcatives lentes (II) et des *S. aureus* exclusivement non réplcatifs (I). La ciprofloxacine a induit l'apparition de phases réplcatives rapides non-conventionnelles (IIIb) dans environ 31% des phases réplcatives rapides totales (III) soit 12% des ostéoblastes infectés à concentration clinique osseuse. L'augmentation jusqu'à concentration plasmatique n'a pas éradiqué ces phases réplcatives rapides non-conventionnelles (IIIb) mais les a au contraire augmenté. Ces phases réplcatives (IIIb) sont de structure circulaire et pourraient loger dans une vacuole.

1.2.2. Etude de l'impact de la rifampicine

L'application d'un traitement de rifampicine à concentration clinique osseuse dans le milieu d'infection a drastiquement impacté la dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique d'une manière souche indépendante. En effet, le traitement de rifampicine a réduit ou inhibé les phases réplcatives lentes (II) et rapides (III) de l'ensemble des souches. De ce fait 95 à 100% des ostéoblastes infectés ont présenté des survivants, viables puisque formant des colonies sur gélose d'agar, ayant un phénotype exclusivement non réplcatif (I).

Notons que l'initiation de phases réplcatives rapides à 0 hpi ainsi qu'apparaissant au cours de la cinétique ont été observées. Elles ont été éliminées dès le temps suivant probablement par l'action bactéricide de la rifampicine sur les *S. aureus* réplcatifs.

Une analyse de la souche de référence SH1000 a démontré un taux de *small colony variant* significativement accru et une réduction globale de l'aire des colonies sur gélose d'agar à la suite d'un traitement de rifampicine intraostéoblastique.

Lorsque le traitement de rifampicine a été retiré du milieu d'infection à 6 hpi, un nombre discret mais néanmoins significatif de *S. aureus* ont été capables de sortir de leur état quiescent pour engendrer une phase réplcative lente sur les 18 heures d'acquisition. Ainsi, l'environnement intraostéoblastique post-traitement antibiotique contiendrait le phénotype non réplcatif.

De plus, le nombre de pixel de GFP par ostéoblaste, se rapportant à la charge bactérienne, a diminué de manière biphasique. Cette diminution du nombre de *S. aureus* par ostéoblaste correspondrait à la combinaison de l'action bactéricide de la rifampicine et de la cellule hôte, de la mort des ostéoblastes

relarguant les *S. aureus* ainsi que dans une moindre mesure à la perte de fluorescence ou d'expression de la GFP.

Le traitement à la rifampicine a réduit le nombre de CFU totaux entre les temps 1 hpi et 24 hpi de $0,44 \log \pm 0,03$.

L'addition de la ciprofloxacine à concentration clinique osseuse n'a pas impacté les résultats obtenus avec le traitement de rifampicine seule.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats, démontrent que les survivants intraostéoblastiques de *S. aureus*, uniquement non et lentement répliatifs, a un traitement de rifampicine à concentration clinique osseuse dans le milieu d'infection, sont des persisters.

Notons également qu'une phase stationnaire de croissance planctonique de *S. aureus* SH1000, utilisée pour l'infection, est insensible à l'action de la rifampicine et présente donc une population tolérante. Le caractère non répliatif en phase stationnaire induirait l'insensibilité et la tolérance de la population qui se retrouve au sein des ostéoblastes tandis que la sortie de quiescence conduit à l'élimination de *S. aureus* intraostéoblastique.

La rifampicine en empêchant les phases répliatives rapides classiques (IIIa) et ainsi l'éclatement de la cellule hôte, permet aux persisters de *S. aureus* non et lentement répliatifs s'y logeant de se maintenir dans un ostéoblaste viable. La rifampicine augmente ainsi la proportion d'ostéoblastes viables possédant des persisters de *S. aureus* exclusivement non répliatifs (I) ou lentement répliatifs (II).

1.3. Etude de la localisation intraostéoblastique en fonction de la dynamique de répliation de *S. aureus*

L'étude de la corrélation entre la localisation et la dynamique de répliation intracellulaire de *S. aureus* permettrait d'apporter des éléments de lumière sur les mécanismes induisant la répliation ou promouvant la quiescence. Au cours de cette thèse de doctorat diverses méthodes de microscopie ont été employées. Celles-ci se composent de la microscopie photonique à fluorescence en temps réel ou à immunofluorescence en point final ainsi que la microscopie électronique à transmission et la microscopie corrélatrice. Notons que la méthode d'immunofluorescence en point final n'a pas pu être utilisée puisqu'une ou plusieurs protéines de surface de *S. aureus*, probablement la protéine A, sont aspécifiques des anticorps utilisés. L'ensemble des résultats exploratoires présentés suggèrent que les *S. aureus* non ou lentement répliatifs et potentiellement en initiation de phases répliatives rapides, se trouvent majoritairement au sein de vacuoles à simples membranes et resserrées autour de la bactérie. Notons toutefois que ces membranes ont pu être difficilement identifiables puisque

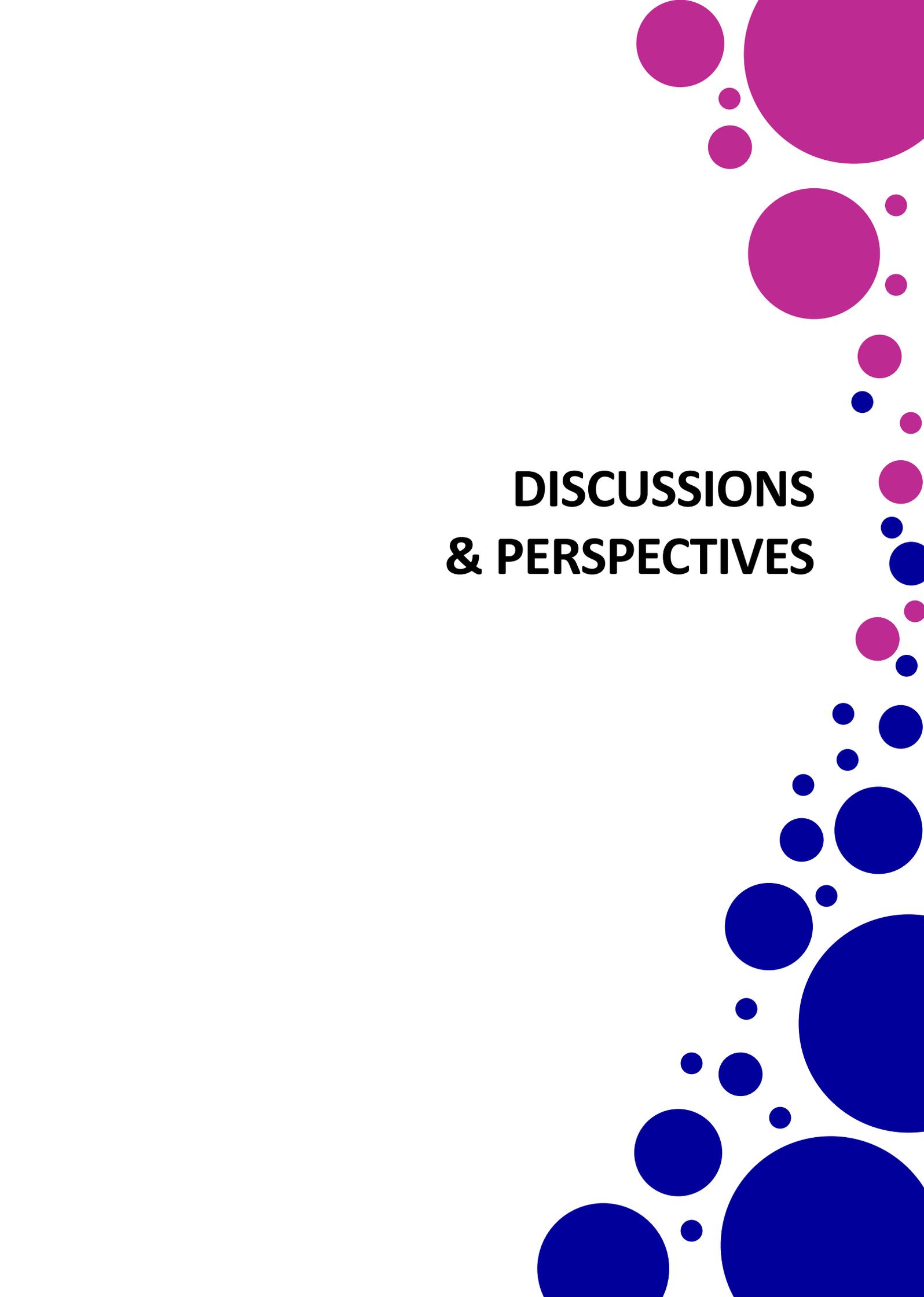
Conclusions générales

segmentées et proches de la paroi bactérienne. Le faible taux d'observations obtenues pour les phases répliquatives rapides en cours ne permet pas à cet instant de caractériser leurs localisations. Toutefois, plusieurs éléments de microscopie photonique laissent à supposer qu'au moins une faible proportion des phases répliquatives rapides se déroule au sein de vacuoles.

Ainsi, les méthodes de microscopie employées ont permis d'apporter des éléments de réponses sur la localisation intraostéoblastique de *S. aureus* en fonction de son état répliquatif.

Ainsi, ce manuscrit de thèse de doctorat présente la première étude quantitative de la dynamique de répliquaison intraostéoblastique de *S. aureus* sous traitement ou non d'antibiotiques à concentrations cliniques, en temps réel et à l'échelle de la cellule eucaryote.

L'implémentation d'autres classes et combinaisons d'antibiotiques dans le modèle d'étude ainsi que l'utilisation de cellules primaires et d'autres cellules osseuses telles que les ostéocytes permettrait d'approfondir notre compréhension de la dynamique de répliquaison de *S. aureus* et de ses persisters intracellulaire dans le cadre des IOA.



**DISCUSSIONS
& PERSPECTIVES**

1.1. Modèle *in cellulo*, dynamique de réplication hétérogène et IOA

L'ensemble des résultats présentés dans ce manuscrit de thèse mettent en lumière pour la première fois l'hétérogénéité des paramètres d'infection et de la dynamique de réplication de *S. aureus* intraostéoblastique, notamment souche dépendante, de manière quantitative et au niveau de la cellule eucaryote unique. Ces résultats s'inscrivent dans les observations qualitatives de la littérature faite en cellules épithéliales et endothéliales^{302,303}. L'apport technologique apporté par le développement dans le cadre de ma thèse du modèle *in cellulo* suivi en microscopie a été pérennisé au sein du laboratoire par la formation de mes collègues.

La méthode de dénombrement des CFU complète l'apport de la microscopie. Toutefois, dans le modèle d'infection intraostéoblastique à *S. aureus* j'ai pu mettre en évidence un biais significatif apporté *via* le retrait des ostéoblastes infectées par des phases répliquatives rapides classiques lors de l'étape de lavage précédent la récupération des *S. aureus*. Notons que le changement d'échelle des puits d'infections passant de plaques 24 puits à 96 puits a réduit cet écart. Probablement par la réduction des forces de cisaillement des fluides appliquées. L'inhibition de la lysostaphine par l'addition de protéinase K permet de s'affranchir de l'étape de lavage³⁹⁰. Toutefois, cette méthode ne fonctionne pas pour les conditions ayant un traitement antibiotique dans le milieu d'infection. La méthode de dénombrement des CFU utilisée pour étudier la viabilité des *S. aureus* intraostéoblastiques pourrait être substituée par l'utilisation d'un marqueur de viabilité fluorescent. Notons également que les résultats obtenus questionnent sur la pertinence de cette méthode pour étudier la vie intracellulaire, notamment répliquative, de *S. aureus*. En effet, des dynamiques de répliquations intraostéoblastiques significativement différentes entre souches ont pu conduire à des taux similaires de CFU.

La dynamique de réplication hétérogène de *S. aureus* intraostéoblastique est souche dépendante. Le taux d'individu de la population sortant de la quiescence et conduisant à des phases répliquatives rapides classiques (IIIa) ainsi que leurs intensités sont variables en fonction de la souches employées. Les phases répliquatives rapides classiques (IIIa) conduisent à l'éclatement de l'ostéoblaste et au relargage total ou partiel des *S. aureus* dans le milieu extracellulaire. Leur phénotype s'inscrit dans les précédentes observations qualitatives de la littérature^{245,289,302,303}. Les staphylocoques ainsi relargués pourraient coloniser les cellules et tissus voisins³⁰². Il aurait été intéressant de poursuivre le suivi par microscopie sur des temps longs, au-delà de 24 hpi, afin de déterminer, s'il y a lieu, l'état répliquatif des survivants à long terme et si ce dernier s'inscrit dans la littérature^{302,303}. En admettant que les survivants à long terme soient non répliquatifs tels que retrouvé dans la littérature, l'analyse en temps réel permettrait de déterminer le seuil temporel à partir duquel plus aucun *S. aureus* ne réverte à un

phénotype répliatif ainsi qu'à partir duquel, s'il y a lieu, plus aucun *S. aureus* intraostéoblastique n'est retrouvé. Si des survivants avaient été retrouvés sur des temps longs et afin d'étudier leur implication dans la physiopathologie des IOA il aurait été intéressant de déterminer leur capacité à infecter de nouvelles cellules eucaryotes.

En supposant que ces résultats soient transposables en clinique, la dynamique de réplication de *S. aureus* intracellulaire pourrait impacter la physiopathologie des IOA. Les phases répliatives rapides augmenteraient la sévérité des IOA aigus ainsi que leur dissémination. Les *S. aureus* non et lentement répliatifs pourraient être impliqués dans la rechute et la chronicisation des IOA. Dans ce cas, la connaissance de la dynamique de réplication intracellulaire de la souche infectieuse pourrait apporter une indication au clinicien sur la sévérité et la probabilité de chronicisation et de rechute de l'infection et permettrait donc d'en adapter la prise en charge thérapeutique. Dans la littérature, l'incorporation d'isotope stable lourd $^2\text{H}_2\text{O}$ par *S. aureus*, directement après la collecte d'expectorât de patient atteint de mucoviscidose, a été monitorée par microscopie ionique et utilisée pour mesurer l'activité anabolique³⁹¹. Ceci a permis de calculer *via* des équations empiriques le taux de croissance et le temps de doublement massique à l'échelle de la bactérie unique. L'absence d'incorporation a permis de mettre en évidence les *S. aureus* dormants ou morts. La combinaison de cette méthode avec un marqueur de viabilité permettrait d'identifier les *S. aureus* non répliatifs viables et dormants. Dans le cas où des taux seuils de croissance et de dormance de *S. aureus* serait corrélés avec une probabilité seuil d'échec thérapeutique, l'identification de ces taux pourrait aider le clinicien dans l'élaboration du schéma thérapeutique. Toutefois, la méthode d'incorporation d'isotope stable lourd ne semble pas adaptable en routine de diagnostic clinique à l'heure actuelle. Il s'agit d'une preuve de concept reflétant l'intense recherche académique et privée d'un biomarqueur de la persistance. Notons également qu'à l'instar des échantillons obtenus par expectoration dans le cadre de la mucoviscidose, l'obtention des échantillons lors IOA est une barrière à la mise en place de ce diagnostic en routine puisque nécessitant une intervention chirurgicale.

Les ostéocytes ont une durée de demi-vie de l'ordre de 25 ans qui est supérieure à celle des ostéoblastes dont la durée de vie s'étend de quelques jours à une centaine^{157,158}. Les ostéocytes pourraient ainsi être le site de nidification à long terme privilégié de *S. aureus* et impliqué dans la rechute et la chronicisation des IOA. Notons également que les ostéoblastes ayant été utilisés dans ce manuscrit proviennent d'une lignée cellulaire immortalisée nommée MG63 et dont la physiologie est modifiée par rapport aux cellules primaires. Dans ce contexte, il aurait été intéressant d'étudier le devenir de *S. aureus* au sein des ostéocytes et d'ostéoblastes primaires dans le modèle *in cellulo*. Toutefois, l'étude *in vitro* de l'infection des ostéocytes en routine est rendue difficile par leur production^{159,160}.

La méthodologie des techniques utilisées pour corrélérer la localisation intraostéoblastique avec la dynamique de réplication de *S. aureus* ne permettent pas d'obtenir une analyse à haut rendement et en temps réel. L'utilisation d'ostéoblastes exprimant des marqueurs vacuolaires fluorescents permettrait par l'utilisation de la microscopie photonique d'obtenir une analyse quantitative et au cours du temps. Celle-ci pourrait également être corrélée à la cinétique d'expression de toxines via des constructions de promoteurs fluorescents.

1.2. Impact d'antibiotiques, persisters et IOA

L'implémentation dans le modèle d'étude *in cellulo* de rifampicine et/ou de ciprofloxacine à concentrations cliniques a mis en lumière pour la première fois la dynamique de réplication des *S. aureus* intraostéoblastique survivants en temps réel. La ciprofloxacine a créé un réservoir de *S. aureus* répliatifs au sein de structures circulaires probablement par une efficacité réduite, tandis que les survivants à la rifampicine sont des persisters non ou lentement répliatifs.

La définition des persisters est une source de débat au sein de la communauté scientifique notamment parce qu'elle est laboratoire dépendant en incluant le plus souvent la ou les caractéristiques phénotypiques de la sous-population étudiée³⁴²⁻³⁵¹. Ainsi, afin d'éviter tout biais dans l'interprétation de mes résultats j'ai pris pour acte que la définition des persisters est celle qui en a été faite par Bigger en 1944 à savoir que les persisters représentent une sous-population de bactéries, initialement présentent dans une population clonale sensible, qui lorsque exposées à un antibiotique bactéricide sont dans une phase, probablement de dormance et non répliative, les rendant insensibles à son action³⁴⁰. Les persisters, mis en lumière par une courbe biphasique *in vitro* ne seraient donc pas à confondre avec les hétérorésistants, mis en lumière par une courbe en rebond *in vitro*. Ils sont une sous-population de bactéries initialement présentes dans une population clonale sensible et qui survivent à un traitement antibiotique bactéricide par l'apparition transitoire de facteur de résistance. Le débat sur la définition de persisters serait donc en partie alimenté par cette mauvaise interprétation^{346,392}.

Dans le cadre de mes travaux de recherche, le traitement de ciprofloxacine à concentrations cliniques dans le milieu d'infection a induit la formation de phases répliatives rapides non-conventionnelles de *S. aureus* intraostéoblastiques. Elles se caractérisent par un maintien de *S. aureus* répliatifs ou s'étant répliatés au sein de structures circulaires. Il s'agit à ma connaissance de la première description de ce mécanisme post-traitement antibiotique. Ceci pourrait être dû à une efficacité de l'antibiotique réduite ou à une concentration insuffisante dite sous-inhibitrice dans ce micro-environnement. En effet, bien que la concentration de ciprofloxacine retrouvée au sein des ostéoblastes ait été supérieure

à la CMI, nous pouvons supposer que celle-ci a été hétérogène au sein de la cellule hôte. Une méthode d'analyse combinant la microscopie ionique, photonique et électronique développer pour *M. tuberculosis* permettrait de corrélérer la localisation intraostéoblastique et la dynamique de réplication de *S. aureus* avec la concentration de ciprofloxacine dans son micro-environnement³⁹³⁻³⁹⁵. Dans l'éventualité où les structures circulaires soient des vacuoles, il serait intéressant d'étudier en parallèle l'impact de la ciprofloxacine sur l'expression et la sécrétion de toxines, telles que les PSMs, qui sont impliquées dans la sortie de cette dernière.

Dans le cadre de mes travaux de recherche, les *S. aureus* intraostéoblastiques survivant à un traitement de rifampicine à concentration clinique osseuse dans le milieu d'infection sont non ou lentement répliatifs tandis que ceux en réplication sont éliminés. Ces survivants peuvent ainsi être qualifié de persisters d'après la définition faite par Bigger en 1944. Dans la littérature, des persisters aux antibiotiques ont été retrouvés chez d'autres espèces bactériennes telles que *S. typhimurium* et *E. coli* au sein de macrophages^{351,396}. Le traitement à la rifampicine a induit la réduction globale du nombre de pixel de GFP de *S. aureus* par ostéoblaste d'environ 28% ainsi qu'une réduction d'environ 0,45 log du nombre de CFU sur gélose entre les temps 1 hpi et 24 hpi. Il est important de noter que dans la littérature les taux de persisters de *S. aureus* survivants à un traitement d'oxacilline, de clarithromycine ou de moxifloxacine au sein de macrophages sont plus faible avec une réduction de la charge bactérienne initiale allant de 3 à 5 log³⁶⁶. Ces variations pourraient être le fait des différences méthodologiques entre les études concernant notamment les antibiotiques et les cellules eucaryotes employés.

Les *S. aureus* en phase stationnaire de croissance planctonique, ayant servie à l'infection des ostéoblastes, ont été insensible à l'action de la rifampicine pour une gamme de concentration dont celle utilisée lors des infections. Ainsi, une réplication ralentit à nulle serait suffisante pour établir un biomarqueur de la persistance dans ces conditions. Toutefois, l'extrapolation à l'environnement intracellulaire semble compromise. En effet, la disparition du signal fluorescent et/ou la mort de *S. aureus* intracellulaire ne peut pas être attribué à une cause unique. Il s'agit d'un phénomène multifactoriel dépendant notamment de l'action de l'antibiotique, de la cellule hôte mais également du potentiel échappement dans le milieu extracellulaire bactéricide. Ainsi les propriétés intrinsèques du modèle intracellulaire ne permettent pas à cet instant de déterminer si une réplication ralentit à nulle est suffisante pour caractériser les persisters de *S. aureus* intraostéoblastique à la rifampicine. Il est important de noter que les persisters à la rifampicine pourraient être présent indépendamment de son action ou induit par celle-ci. La rifampicine pourrait contraindre une partie des *S. aureus* non répliatifs à rester dans leur état de quiescence tel qu'observé *in vitro* dans la littérature³⁵⁵. En l'état actuel des données, cette hypothèse ne peut pas être vérifier et nécessite des expériences

complémentaires. Des analyses, en cours d'étude dans le cadre de ma thèse, de séquençage d'ARN démontreraient tel qu'attendu la réduction drastique de la quantité d'ARN de *S. aureus* sous traitement de rifampicine. Ainsi, les persisters observés dans notre modèle pourrait être initialement persistant puisque provenant d'une phase stationnaire insensible et en partie maintenu dans cet état par la rifampicine. La réduction de la quantité d'ARN de *S. aureus* intraostéoblastique pourrait expliquer le phénotype des colonies observées sur gélose. En effet, le délai de reformation de la collection d'ARN pourrait induire un retard à la première multiplication ou une croissance ralentit au moins dans les premiers temps. En supposant que les résultats obtenus *in cellulo* soient transposables en clinique, la rifampicine en empêchant les phases répliquatives rapides intraostéoblastiques pourrait être bénéfique pour le traitement de la phase aiguë de l'infection. Toutefois, elle n'aurait pas d'impact sur les *S. aureus* non ou lentement répliquatifs tout en les protégeant de la lyse de la cellule hôte induite par les phases répliquatives rapides concomitantes. Ces persisters cachés du système immunitaire pourraient être impliqué dans la rechute de l'infection et la chronicisation des IOA. Dans la littérature, des études ont permis de caractériser, en routine de diagnostic clinique sur gélose, le taux de persisters de *S. aureus* à partir d'isolats cliniques³⁷¹. La corrélation de ce taux avec les échecs thérapeutiques permettrait également au clinicien d'adapter la thérapie en conséquence.

1.3. Poursuite des travaux de recherche

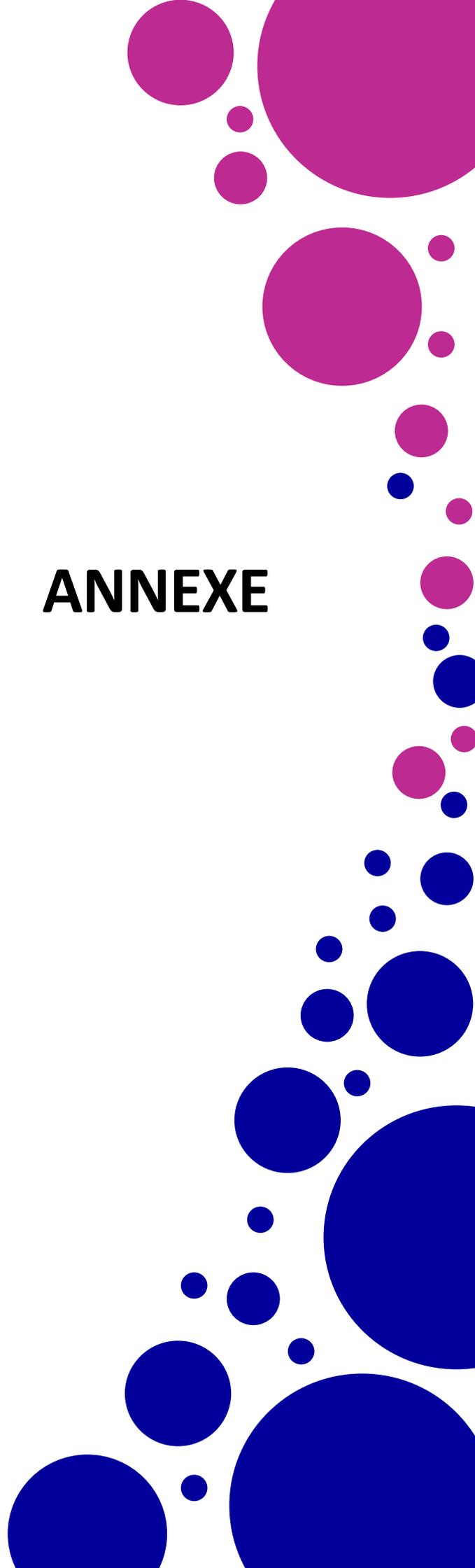
A la suite des travaux de recherche présenté dans ce manuscrit, s'il m'en était donné l'opportunité, je m'attacherai à étudier la corrélation entre la dynamique de répllication, les persisters et la niche intracellulaire avec la rechute et la chronicisation des IOA. Bien que la corrélation soit positive *in vitro*, la capacité des antibiotiques à cibler le réservoir intracellulaire et/ou non répliquatif n'est pas pris en compte dans le choix thérapeutique alors qu'elle peut représenter une clef du succès. Ainsi, il me semble opportun d'envisager des bithérapies combinant la rifampicine, ciblant les *S. aureus* répliquatifs, avec une seconde molécule active en milieu intracellulaire éradiquant les persisters non et lentement répliquatifs. La recherche de telles molécules actives contre *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* et extensivement *M. tuberculosis* non répliquatifs sont à l'étude d'après la littérature³⁹⁷⁻⁴⁰². Notons également l'emploi compassionnelle de la phagothérapie pour traiter des patients atteints d'infection à *S. aureus* en échec thérapeutique. Toutefois, les persisters qui seraient dormants pourraient persister à l'action des bactériophages. Malgré la capacité des bactériophages à atteindre l'environnement intracellulaire, leur capacité lytique est variable selon les études⁴⁰³⁻⁴⁰⁵.

En parallèle, je m'attacherai à comprendre les mécanismes sous-jacents à la sortie de la quiescence de *S. aureus* intracellulaire. En effet, à l'image du statisticien Abraham Wald, n'étudier que les persisters

introduirait le biais des survivants⁴⁰⁶. La compréhension des mécanismes de sortie de quiescence permettrait d'envisager des stratégies thérapeutiques combinant la réversion du phénotype persisters avec l'éradication concomitante des révertants. Par exemple, dans la littérature, l'activation de la respiration bactérienne par la supplémentation du milieu en oxygène, en carbone et en accepteur d'électron est suffisante pour réverter les persisters de *S. aureus*, *E. coli* et *M. smegmatis* d'une phase stationnaire de croissance les rendant ainsi de nouveau sensibles à l'action des quinolones⁴⁰⁷. Une limitation majeure de ce traitement est intrinsèque à son mécanisme. Si les antibiotiques utilisés ne parviennent pas à éliminer les révertants alors leurs réversions pourrait conduire à l'aggravation de la phase aigüe de l'infection ou à une rechute.

Ainsi, ma thèse de doctorat s'insère dans la compréhension globale de la physiopathologie des IOA *via* l'étude conjointe de la dynamique de réplication et de la persistance de *S. aureus* intracellulaire aux antibiotiques couramment utilisés en clinique.

ANNEXE



Intracellular *Staphylococcus aureus* replicative dynamics monitoring under antibiotics challenges: highlighting persisters.

¹Evotec ID Lyon, *In Vitro* Biology, Antibacterials Unit, 40 Avenue Tony Garnier, F-69007 Lyon, France.

²CIRI – Centre International de Recherche en Infectiologie, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Univ Lyon, F-69007, Lyon, France

³Platim, SFR Bioscience, Univ Lyon, ENS de Lyon, Inserm, CNRS, US8 UAR3444, UCBL, 50 Avenue Tony Garnier, F-69007 Lyon, France.

⁴Centre de Référence pour la prise en charge des Infections ostéo-articulaires complexes (CRIOAC Lyon ; www.crioac-lyon.fr), Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

Contact: florian.marro@evotec.com

Gordon Research Conference & Seminar « New Antibacterial Discovery and Development » 2022

Introduction and objectives

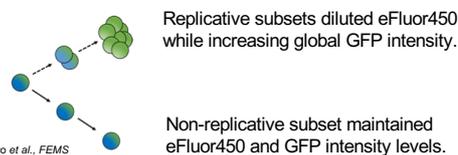
Staphylococcus aureus, a major aetiological agent of bone and joint infection, is associated with a high risk of relapse and chronicity, potentially in part due to its ability to invade and persist in non-professional phagocytic bone cells such as osteoblasts. Despite the potential role of intracellular *S. aureus* in the development of difficult-to-treat chronic infection, their replicative dynamics are still incompletely understood, as is the apparition of persisters defined as a subset of the bacterial population which survive bactericidal antibiotic pressure.

The aim of this study is to determine the intra-osteoblastic replicative dynamics of *S. aureus* and its persisters, in the presence or absence of clinically-relevant antibiotics at their active concentration in bone via live microscopy.

Material & Methods

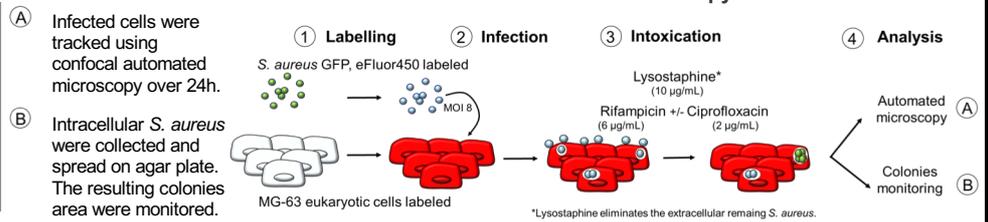
Fluorescence dilution

The initial eFluor450 labelling of the bacteria allows monitoring the replicative rates by fluorescence dilution.



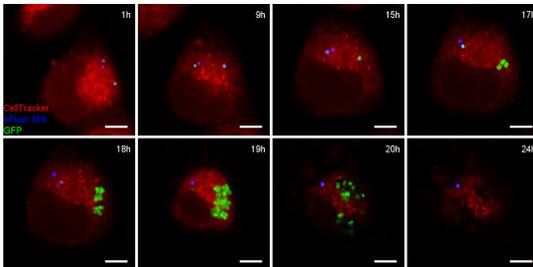
Marro et al., FEMS Microbiol rev, 2022

Infection and automated microscopy



Results

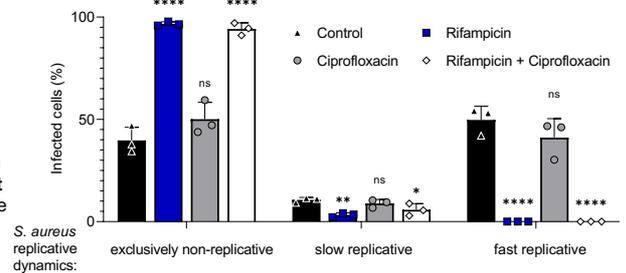
Control



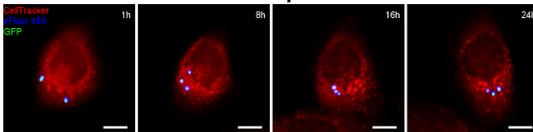
S. aureus intracellular replicative dynamics

In absence of antibiotic pressure, cells could be distinguished into 3 subsets depending on their *S. aureus* content replicative dynamics:
 (i) Cells bearing **exclusively non-replicative** *S. aureus* accounting for **40%**. At least one *S. aureus* entering
 (ii) **slow replication**, **10%** or (iii) **fast replication** leading to the burst of the cells, **50%** (60% concomitantly carries non-replicative *S. aureus*).

Eukaryotic cell subsets depending on the replicative dynamics of their *S. aureus* content

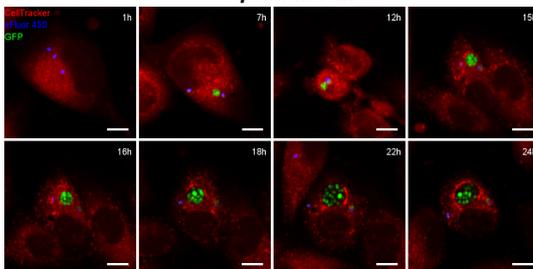


Rifampicin



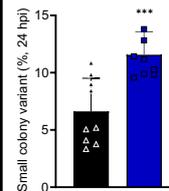
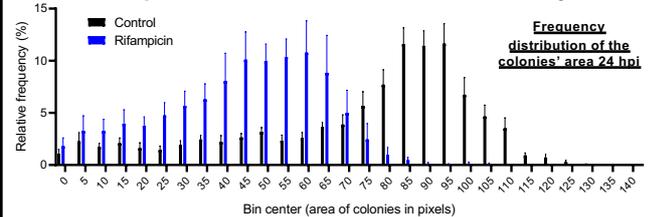
Under rifampicin challenges, cells having fast replicative phase were not anymore observed while subset having **exclusively non-replicative *S. aureus* increased to almost 100%**.

Ciprofloxacin



Under ciprofloxacin challenges, **30% of cells having fast replicative phase followed an unclassical pathway**: Replicative *S. aureus* are maintained in circular structure without eukaryotic cells burst.

S. aureus persisters: resuscitation and small colony variant

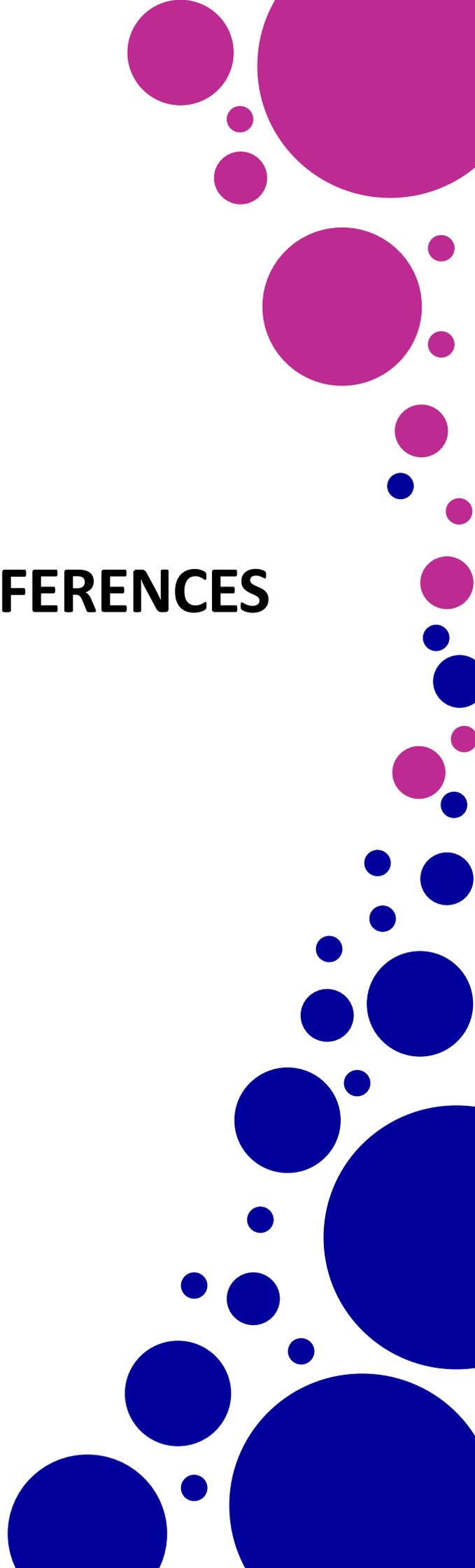


The resulting colonies of *S. aureus* persisters under rifampicin challenges 24 hpi, besides demonstrating their viability, **were significantly smaller** than the colonies of the untreated control condition. Moreover, there was a significantly **higher percentage of small colony variants** within the rifampicin treated population.

Conclusion

Overall, these data suggest that rifampicin enriches an intracellular reservoir of non-replicating drug persistent *S. aureus* by killing the replicating subpopulation and thus avoiding osteoblast burst. This allows the non-replicating *S. aureus* sharing the same osteoblast to persist within a viable cell. Further, ciprofloxacin applied at clinical bone concentration could not reach its minimum inhibitory concentration and maximal activity within osteoblast cells creating intracellular reservoirs of vacuolar replicating *S. aureus*. Replicative dynamics knowledge of *S. aureus* under antibiotics challenges should allow a better understanding of the intra-osteoblastic persisters.

REFERENCES



1. Pasteur, L. De l'extension de la théorie des germes à l'étiologie de quelques maladies communes. *Comptes Rendus Académie Sci.* **t. 90**, 1033–1044 (1880).
2. Ogston, A. Report upon Micro-Organisms in Surgical Diseases. *Br. Med. J.* **1**, 369.b2-375 (1881).
3. Ogston, A. Micrococcus Poisoning. *J. Anat. Physiol.* **17**, 24–58 (1882).
4. Wertheim, H. F. L. *et al.* The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections. *Lancet Infect. Dis.* **5**, 751–762 (2005).
5. Mehraj, J. *et al.* Epidemiology of Staphylococcus aureus Nasal Carriage Patterns in the Community. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **398**, 55–87 (2016).
6. Urish, K. L. & Cassat, J. E. Staphylococcus aureus Osteomyelitis: Bone, Bugs, and Surgery. *Infect. Immun.* **88**, e00932-19 (2020).
7. Alder, K. D. *et al.* Intracellular Staphylococcus aureus in bone and joint infections: A mechanism of disease recurrence, inflammation, and bone and cartilage destruction. *Bone* **141**, 115568 (2020).
8. Ellington, J. K. *et al.* Intracellular Staphylococcus aureus and antibiotic resistance: implications for treatment of staphylococcal osteomyelitis. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **24**, 87–93 (2006).
9. Pichichero, M. E. & Friesen, H. A. Polymicrobial osteomyelitis: report of three cases and review of the literature. *Rev. Infect. Dis.* **4**, 86–96 (1982).
10. 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).
11. Masters, E. A. *et al.* Evolving concepts in bone infection: redefining “biofilm”, “acute vs. chronic osteomyelitis”, “the immune proteome” and “local antibiotic therapy”. *Bone Res.* **7**, 20 (2019).
12. Calhoun, J. H., Manring, M. M. & Shirliff, M. Osteomyelitis of the long bones. *Semin. Plast. Surg.* **23**, 59–72 (2009).
13. Conterno, L. O. & Turchi, M. D. Antibiotics for treating chronic osteomyelitis in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD004439 (2013).
14. Azzam, K., McHale, K., Austin, M., Purtill, J. J. & Parvizi, J. Outcome of a Second Two-stage Reimplantation for Periprosthetic Knee Infection. *Clin. Orthop.* **467**, 1706–1714 (2009).
15. Masters, E. A. *et al.* Skeletal infections: microbial pathogenesis, immunity and clinical management. *Nat. Rev. Microbiol.* **20**, 385–400 (2022).
16. Muthukrishnan, G., Masters, E. A., Daiss, J. L. & Schwarz, E. M. Mechanisms of Immune Evasion and Bone Tissue Colonization That Make Staphylococcus aureus the Primary Pathogen in Osteomyelitis. *Curr. Osteoporos. Rep.* **17**, 395–404 (2019).
17. Billroth, T. *Untersuchungen über die vegetationsformen von coccobacteria septica und den antheil, welchen sie an der entstehung und verbreitung der accidentellen wundkrankheiten haben.* (Georg Reimer, 1874).
18. Billroth, T. *Lectures on surgical pathology and therapeutics.* (1877).
19. Gilden, D. Etymologia: Staphylococcus. *Emerg Infect Dis* **19**, 1153 (2013).
20. Rosenbach, F. J. *Mikro-organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen.* (J.F. Bergmann, 1884).
21. Pain, M. *et al.* Staphylococcus borealis sp. nov., isolated from human skin and blood. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **70**, 6067–6078 (2020).
22. Lin, Y.-T. *et al.* Staphylococcus taiwanensis sp. nov., isolated from human blood. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **72**, (2022).
23. Kovařovic, V. *et al.* Staphylococcus ratti sp. nov. Isolated from a Lab Rat. *Pathog. Basel Switz.* **11**, 51 (2022).
24. Parte, A. C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J. P., Reimer, L. C. & Göker, M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **70**, 5607–5612 (2020).

25. Strasheim, W., Kock, M. M., Dreyer, A. W. & Ehlers, M. M. Molecular markers of resistance in coagulase-negative staphylococci implicated in catheter-related bloodstream infections.
26. Javid, F. *et al.* Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on coagulase gene. *Vet. World* **11**, 423–430 (2018).
27. Dos Santos, D. C. *et al.* *Staphylococcus chromogenes*, a Coagulase-Negative *Staphylococcus* Species That Can Clot Plasma. *J. Clin. Microbiol.* **54**, 1372–1375 (2016).
28. Adkins, P. R. F., Middleton, J. R., Calcutt, M. J., Stewart, G. C. & Fox, L. K. Species Identification and Strain Typing of *Staphylococcus agnetis* and *Staphylococcus hyicus* Isolates from Bovine Milk by Use of a Novel Multiplex PCR Assay and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **55**, 1778–1788 (2017).
29. Lamers, R. P. *et al.* Phylogenetic relationships among *Staphylococcus* species and refinement of cluster groups based on multilocus data. *BMC Evol. Biol.* **12**, 171 (2012).
30. Saraiva, B. M. *et al.* Reassessment of the distinctive geometry of *Staphylococcus aureus* cell division. *Nat. Commun.* **11**, 4097 (2020).
31. Greenwood, D. & O’Grady, F. Scanning electron microscopy of *Staphylococcus aureus* exposed to some common anti-staphylococcal agents. *J. Gen. Microbiol.* **70**, 263–270 (1972).
32. Touhami, A., Jericho, M. H. & Beveridge, T. J. Atomic Force Microscopy of Cell Growth and Division in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **186**, 3286–3295 (2004).
33. Tenea, G. N., Angamarca, E. & Olmedo, D. Combinations of Peptide-Protein Extracts from Native Probiotics Suppress the Growth of Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Citrobacter freundii* via Membrane Perturbation and Ultrastructural Changes. *Antibiotics* **11**, 154 (2022).
34. Lima, D. B. *et al.* Antimicrobial effect of *Dinoponera quadriceps* (Hymenoptera: Formicidae) venom against *Staphylococcus aureus* strains. *J. Appl. Microbiol.* **117**, 390–396 (2014).
35. Foster, T. *Staphylococcus*. in *Medical Microbiology* (ed. Baron, S.) (University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996).
36. Rasheed, N. A. & Hussein, N. R. *Staphylococcus aureus*: An Overview of Discovery, Characteristics, Epidemiology, Virulence Factors and Antimicrobial Sensitivity. *Clin. Med.* **08**, (2021).
37. 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).
38. S, J. *et al.* Exfoliatin-producing strains define a fourth agr specificity group in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **182**, (2000).
39. Clarke, B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **3**, S131–S139 (2008).
40. Alford, A. I., Kozloff, K. M. & Hankenson, K. D. Extracellular matrix networks in bone remodeling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **65**, 20–31 (2015).
41. Compston, J. E. Bone marrow and bone: a functional unit. *J. Endocrinol.* **173**, 387–394 (2002).
42. Parfitt, A. M. Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone* **30**, 5–7 (2002).
43. Burr, D. B. Targeted and nontargeted remodeling. *Bone* **30**, 2–4 (2002).
44. Kohli, N. *et al.* Bone remodelling in vitro: Where are we headed? *Bone* **110**, 38–46 (2018).
45. Boyle, W. J., Simonet, W. S. & Lacey, D. L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* **423**, 337–342 (2003).
46. Simonet, W. S. *et al.* Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89**, 309–319 (1997).
47. Ross, F. P. & Teitelbaum, S. L. $\alpha\beta 3$ and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology. *Immunol. Rev.* **208**, 88–105 (2005).
48. Teitelbaum, S. L., Abu-Amer, Y. & Ross, F. P. Molecular mechanisms of bone resorption. *J. Cell. Biochem.* **59**, 1–10 (1995).

49. Silver, I. A., Murrills, R. J. & Etherington, D. J. Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp. Cell Res.* **175**, 266–276 (1988).
50. Rucci, N. Molecular biology of bone remodelling. *Clin. Cases Miner. Bone Metab. Off. J. Ital. Soc. Osteoporos. Miner. Metab. Skelet. Dis.* **5**, 49–56 (2008).
51. Logan, C. Y. & Nusse, R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 781–810 (2004).
52. Long, F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 27–38 (2011).
53. Komori, T. Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. *Adv. Exp. Med. Biol.* **658**, 43–49 (2010).
54. Komori, T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J. Cell. Biochem.* **99**, 1233–1239 (2006).
55. Landis, W. J. The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix. *Bone* **16**, 533–544 (1995).
56. Orimo, H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J. Nippon Med. Sch. Nippon Ika Daigaku Zasshi* **77**, 4–12 (2010).
57. Hock, J. M. *et al.* Osteoblast apoptosis and bone turnover. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **16**, 975–984 (2001).
58. Jilka, R. L., Weinstein, R. S., Bellido, T., Parfitt, A. M. & Manolagas, S. C. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **13**, 793–802 (1998).
59. Rubin, C. T. & Lanyon, L. E. Osteoregulatory nature of mechanical stimuli: Function as a determinant for adaptive remodeling in bone. *J. Orthop. Res.* **5**, 300–310 (1987).
60. Baron, R. & Kneissel, M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat. Med.* **19**, 179–192 (2013).
61. Wijenayaka, A. R. *et al.* Sclerostin stimulates osteocyte support of osteoclast activity by a RANKL-dependent pathway. *PLoS One* **6**, e25900 (2011).
62. Nakashima, T. *et al.* Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat. Med.* **17**, 1231–1234 (2011).
63. Eriksen, E. F. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **11**, 219–227 (2010).
64. Moodie, R. *Paleopathology : an introduction to the study of ancient evidences of disease / by Roy L. Moodie. Ill. Univ. Ill. Press* **243–82**, (1923).
65. Klenerman, L. A history of osteomyelitis from the Journal of Bone and Joint Surgery: 1948 TO 2006. *J. Bone Joint Surg. Br.* **89**, 667–670 (2007).
66. Bromfield, W. *Chirurgical observations and cases.* vol. II (London, T. Cadell, 1773).
67. Smith, N. *Medical and surgical memoirs.* (Baltimore, William A. Francis, 1831).
68. Nelaton, A. *Eléments de pathologie chirurgicale.* (Paris, Germer Bailliere, 1844).
69. Mader, J. T., Shirliff, M. & Calhoun, J. H. Staging and staging application in osteomyelitis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **25**, 1303–1309 (1997).
70. Romanò, C. L., Romanò, D., Logoluso, N. & Drago, L. Bone and joint infections in adults: a comprehensive classification proposal. *Eur. Orthop. Traumatol.* **1**, 207–217 (2011).
71. 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).
72. Lew, D. P. & Waldvogel, F. A. Osteomyelitis. *Lancet Lond. Engl.* **364**, 369–379 (2004).
73. FLOW, I. *et al.* A Trial of Wound Irrigation in the Initial Management of Open Fracture Wounds. *N. Engl. J. Med.* **373**, 2629–2641 (2015).
74. Urish, K. L. *et al.* A Multicenter Study of Irrigation and Debridement in Total Knee Arthroplasty Periprosthetic Joint Infection: Treatment Failure Is High. *J. Arthroplasty* **33**, 1154–1159 (2018).

75. Urish, K. L. *et al.* Predictors and Cost of Readmission in Total Knee Arthroplasty. *J. Arthroplasty* **33**, 2759–2763 (2018).
76. Kavanagh, N. *et al.* Staphylococcal Osteomyelitis: Disease Progression, Treatment Challenges, and Future Directions. *Clin. Microbiol. Rev.* **31**, e00084-17 (2018).
77. Josse, J., Velard, F. & Gangloff, S. C. Staphylococcus aureus vs. Osteoblast: Relationship and Consequences in Osteomyelitis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **5**, 85 (2015).
78. Kavanagh, N., O'Brien, F. J. & Kerrigan, S. W. Staphylococcus aureus protein A causes osteoblasts to hyper-mineralise in a 3D extra-cellular matrix environment. *PLoS ONE* **13**, e0198837 (2018).
79. Del Pozo, J. L. & Patel, R. Clinical practice. Infection associated with prosthetic joints. *N. Engl. J. Med.* **361**, 787–794 (2009).
80. Schwarz, E. M. *et al.* 2018 International Consensus Meeting on Musculoskeletal Infection: Research Priorities from the General Assembly Questions. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **37**, 997–1006 (2019).
81. Kurtz, S., Ong, K., Lau, E., Mowat, F. & Halpern, M. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *J. Bone Joint Surg. Am.* **89**, 780–785 (2007).
82. Tande, A. J. & Patel, R. Prosthetic joint infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **27**, 302–345 (2014).
83. Gornitzky, A. L., Kim, A. E., O'Donnell, J. M. & Swarup, I. Diagnosis and Management of Osteomyelitis in Children: A Critical Analysis Review. *JBJS Rev.* **8**, e1900202 (2020).
84. Metsemakers, W. J. *et al.* Infection after fracture fixation: Current surgical and microbiological concepts. *Injury* **49**, 511–522 (2018).
85. Metsemakers, W. J. *et al.* Fracture-related infection: A consensus on definition from an international expert group. *Injury* **49**, 505–510 (2018).
86. Gustilo, R. B., Mendoza, R. M. & Williams, D. N. Problems in the management of type III (severe) open fractures: a new classification of type III open fractures. *J. Trauma* **24**, 742–746 (1984).
87. Patzakis, M. J. & Wilkins, J. Factors influencing infection rate in open fracture wounds. *Clin. Orthop.* 36–40 (1989).
88. Zalavras, C. G. Prevention of Infection in Open Fractures. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **31**, 339–352 (2017).
89. Ostermann, P. A., Seligson, D. & Henry, S. L. Local antibiotic therapy for severe open fractures. A review of 1085 consecutive cases. *J. Bone Joint Surg. Br.* **77**, 93–97 (1995).
90. Merritt, K. Factors increasing the risk of infection in patients with open fractures. *J. Trauma* **28**, 823–827 (1988).
91. Boulton, A. J. M., Vileikyte, L., Ragnarson-Tennvall, G. & Apelqvist, J. The global burden of diabetic foot disease. *Lancet Lond. Engl.* **366**, 1719–1724 (2005).
92. Neville, R. F., Kayssi, A., Buescher, T. & Stempel, M. S. The diabetic foot. *Curr. Probl. Surg.* **53**, 408–437 (2016).
93. Armstrong, D. G., Boulton, A. J. M. & Bus, S. A. Diabetic Foot Ulcers and Their Recurrence. *N. Engl. J. Med.* **376**, 2367–2375 (2017).
94. Premkumar, A. *et al.* Projected Economic Burden of Periprosthetic Joint Infection of the Hip and Knee in the United States. *J. Arthroplasty* **36**, 1484-1489.e3 (2021).
95. Kaandorp, C. J. *et al.* Incidence and sources of native and prosthetic joint infection: a community based prospective survey. *Ann. Rheum. Dis.* **56**, 470–475 (1997).
96. Weston, V., Jones, A., Bradbury, N., Fawthrop, F. & Doherty, M. Clinical features and outcome of septic arthritis in a single UK Health District 1982-1991. *Ann. Rheum. Dis.* **58**, 214–219 (1999).
97. Dubost, J. J. *et al.* No changes in the distribution of organisms responsible for septic arthritis over a 20 year period. *Ann. Rheum. Dis.* **61**, 267–269 (2002).

98. Senneville, E. *et al.* Needle puncture and transcutaneous bone biopsy cultures are inconsistent in patients with diabetes and suspected osteomyelitis of the foot. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **48**, 888–893 (2009).
99. Zuluaga, A. F., Galvis, W., Jaimes, F. & Vesga, O. Lack of microbiological concordance between bone and non-bone specimens in chronic osteomyelitis: an observational study. *BMC Infect. Dis.* **2**, 8 (2002).
100. Funk, S. S. & Copley, L. A. B. Acute Hematogenous Osteomyelitis in Children: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *Orthop. Clin. North Am.* **48**, 199–208 (2017).
101. Kaplan, S. L. Recent lessons for the management of bone and joint infections. *J. Infect.* **68** Suppl 1, S51-56 (2014).
102. Yagupsky, P. *Kingella kingae*: carriage, transmission, and disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **28**, 54–79 (2015).
103. Offiah, A. C. Acute osteomyelitis, septic arthritis and discitis: differences between neonates and older children. *Eur. J. Radiol.* **60**, 221–232 (2006).
104. Chain, E. *et al.* Penicillin as a chemotherapeutic agent. *The Lancet* **236**, 226–228 (1940).
105. Orr, H. W. The treatment of acute osteomyelitis by drainage and rest. *J Bone Jt. Surg* **9**, 733–9 (1927).
106. Dennison, W. M. Haematogenous osteitis in children; preliminary report on treatment with penicillin. *J. Bone Joint Surg. Br.* **30B**, 110–123 (1948).
107. Kuiper, J. W. P. *et al.* Prosthetic joint-associated infections treated with DAIR (debridement, antibiotics, irrigation, and retention): analysis of risk factors and local antibiotic carriers in 91 patients. *Acta Orthop.* **84**, 380–386 (2013).
108. Kuiper, J. W., Willink, R. T., Moojen, D. J. F., van den Bekerom, M. P. & Colen, S. Treatment of acute periprosthetic infections with prosthesis retention: Review of current concepts. *World J. Orthop.* **5**, 667–676 (2014).
109. Baker, P. *et al.* Patient reported outcome measures after revision of the infected TKR: comparison of single versus two-stage revision. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. Off. J. ESSKA* **21**, 2713–2720 (2013).
110. Vaishya, R., Agarwal, A. K., Rawat, S. K., Singh, H. & Vijay, V. Is Single-stage Revision Safe Following Infected Total Knee Arthroplasty? A Critical Review. *Cureus* **9**, e1629 (2017).
111. Wignadasan, W., Ibrahim, M. & Haddad, F. S. One- or two-stage reimplantation for infected total knee prosthesis? *Orthop. Traumatol. Surg. Res. OTSR* **109**, 103453 (2023).
112. Liu, C. *et al.* Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children: executive summary. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **52**, 285–292 (2011).
113. Saavedra-Lozano, J. *et al.* Bone and Joint Infections. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **36**, 788–799 (2017).
114. Deng, R. *et al.* Preclinical and translational pharmacokinetics of a novel THIOMAB™ antibody-antibiotic conjugate against *Staphylococcus aureus*. *mAbs* **11**, 1162–1174 (2019).
115. Lehar, S. M. *et al.* Novel antibody-antibiotic conjugate eliminates intracellular *S. aureus*. *Nature* **527**, 323–328 (2015).
116. Mariathan, S. & Tan, M.-W. Antibody-Antibiotic Conjugates: A Novel Therapeutic Platform against Bacterial Infections. *Trends Mol. Med.* **23**, 135–149 (2017).
117. Ferry, T. *et al.* Past and Future of Phage Therapy and Phage-Derived Proteins in Patients with Bone and Joint Infection. *Viruses* **13**, 2414 (2021).
118. Phagothérapie : l'ANSM autorise un accès compassionnel pour des bactériophages dans les infections ostéo-articulaires. <https://ansm.sante.fr/actualites/phagothérapie-lansm-autorise-un-acces-compassionnel-pour-des-bacteriophages-dans-les-infections-osteo-articulaires>.
119. Ferry, T. *et al.* Phage Therapy as Adjuvant to Conservative Surgery and Antibiotics to Salvage Patients With Relapsing *S. aureus* Prosthetic Knee Infection. *Front. Med.* **7**, 570572 (2020).
120. Ferry, T. *et al.* Case Report: Arthroscopic 'Debridement Antibiotics and Implant Retention' With Local Injection of Personalized Phage Therapy to Salvage a Relapsing *Pseudomonas Aeruginosa* Prosthetic Knee Infection. *Front. Med.* **8**, 569159 (2021).

121. Rosenberger, L. H., Politano, A. D. & Sawyer, R. G. The surgical care improvement project and prevention of post-operative infection, including surgical site infection. *Surg. Infect.* **12**, 163–168 (2011).
122. Alt, V. Antimicrobial coated implants in trauma and orthopaedics-A clinical review and risk-benefit analysis. *Injury* **48**, 599–607 (2017).
123. Schmidmaier, G., Kerstan, M., Schwabe, P., Südkamp, N. & Raschke, M. Clinical experiences in the use of a gentamicin-coated titanium nail in tibia fractures. *Injury* **48**, 2235–2241 (2017).
124. Libraty, D. H., Patkar, C. & Torres, B. Staphylococcus aureus reactivation osteomyelitis after 75 years. *N. Engl. J. Med.* **366**, 481–482 (2012).
125. Gallie, W. E. First recurrence of osteomyelitis eighty years after infection. *J. Bone Joint Surg. Br.* **33-B**, 110–111 (1951).
126. Boselli, E. & Allaouchiche, B. [Diffusion in bone tissue of antibiotics]. *Presse Medicale Paris Fr.* **1983** **28**, 2265–2276 (1999).
127. Cunha, B. A., Gossling, H. R., Pasternak, H. S., Nightingale, C. H. & Quintiliani, R. The penetration characteristics of cefazolin, cephalothin, and cephradine into bone in patients undergoing total hip replacement. *J. Bone Joint Surg. Am.* **59**, 856–859 (1977).
128. Summersgill, J. T., Schupp, L. G. & Raff, M. J. Comparative penetration of metronidazole, clindamycin, chloramphenicol, ceftiofur, ticarcillin, and moxalactam into bone. *Antimicrob. Agents Chemother.* **21**, 601–603 (1982).
129. Sendi, P. *et al.* Staphylococcus aureus small colony variants in prosthetic joint infection. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **43**, 961–967 (2006).
130. 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).
131. 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).
132. Huemer, M., Mairpady Shambat, S., Brugger, S. D. & Zinkernagel, A. S. Antibiotic resistance and persistence-Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Rep.* **21**, e51034 (2020).
133. Patti, J. M., Allen, B. L., McGavin, M. J. & Höök, M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**, 585–617 (1994).
134. Novick, R. P. & Geisinger, E. Quorum Sensing in Staphylococci. *Annu. Rev. Genet.* **42**, 541–564 (2008).
135. 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).
136. Hofstee, M. I. *et al.* Three-Dimensional In Vitro Staphylococcus aureus Abscess Communities Display Antibiotic Tolerance and Protection from Neutrophil Clearance. *Infect. Immun.* **88**, e00293-20 (2020).
137. Tam, K. & Torres, V. J. Staphylococcus aureus Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. *Microbiol. Spectr.* **7**, 7.2.16 (2019).
138. Farnsworth, C. W. *et al.* Adaptive Upregulation of Clumping Factor A (ClfA) by Staphylococcus aureus in the Obese, Type 2 Diabetic Host Mediates Increased Virulence. *Infect. Immun.* **85**, e01005-16 (2017).
139. Malachowa, N. *et al.* Contribution of Staphylococcus aureus Coagulases and Clumping Factor A to Abscess Formation in a Rabbit Model of Skin and Soft Tissue Infection. *PLoS ONE* **11**, e0158293 (2016).
140. Rooijackers, S. H. M. *et al.* Early expression of SCIN and CHIPS drives instant immune evasion by Staphylococcus aureus. *Cell. Microbiol.* **8**, 1282–1293 (2006).
141. de Haas, C. J. C. *et al.* Chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus aureus, a bacterial antiinflammatory agent. *J. Exp. Med.* **199**, 687–695 (2004).
142. Postma, B. *et al.* Chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus aureus binds specifically to the C5a and formylated peptide receptor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **172**, 6994–7001 (2004).

143. Rooijackers, S. H. M. *et al.* Staphylococcal complement inhibitor: structure and active sites. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **179**, 2989–2998 (2007).
144. Kobayashi, S. D., Malachowa, N. & DeLeo, F. R. Pathogenesis of Staphylococcus aureus Abscesses. *Am. J. Pathol.* **185**, 1518–1527 (2015).
145. Kapral, F. A., Smith, S. & Lal, D. The esterification of fatty acids by Staphylococcus aureus fatty acid modifying enzyme (FAME) and its inhibition by glycerides. *J. Med. Microbiol.* **37**, 235–237 (1992).
146. Long, J. P., Hart, J., Albers, W. & Kapral, F. A. The production of fatty acid modifying enzyme (FAME) and lipase by various staphylococcal species. *J. Med. Microbiol.* **37**, 232–234 (1992).
147. Mortensen, J. E., Shryock, T. R. & Kapral, F. A. Modification of bactericidal fatty acids by an enzyme of Staphylococcus aureus. *J. Med. Microbiol.* **36**, 293–298 (1992).
148. de Mesy Bentley, K. L. *et al.* Evidence of Staphylococcus Aureus Deformation, Proliferation, and Migration in Canaliculi of Live Cortical Bone in Murine Models of Osteomyelitis. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **32**, 985–990 (2017).
149. de Mesy Bentley, K. L., MacDonald, A., Schwarz, E. M. & Oh, I. Chronic Osteomyelitis with Staphylococcus aureus Deformation in Submicron Canaliculi of Osteocytes: A Case Report. *JBJS Case Connect.* **8**, e8 (2018).
150. Masters, E. A. *et al.* Identification of Penicillin Binding Protein 4 (PBP4) as a critical factor for Staphylococcus aureus bone invasion during osteomyelitis in mice. *PLoS Pathog.* **16**, e1008988 (2020).
151. Masters, E. A. *et al.* An in vitro platform for elucidating the molecular genetics of S. aureus invasion of the osteocyte lacuno-canalicular network during chronic osteomyelitis. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **21**, 102039 (2019).
152. 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).
153. Yang, D. *et al.* Novel Insights into Staphylococcus aureus Deep Bone Infections: the Involvement of Osteocytes. *mBio* **9**, e00415-18 (2018).
154. Walter, N., Mendelsohn, D., Brochhausen, C., Rupp, M. & Alt, V. Intracellular S. aureus in Osteoblasts in a Clinical Sample from a Patient with Chronic Osteomyelitis—A Case Report. *Pathogens* **10**, 1064 (2021).
155. 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).
156. Krauss, J. L. *et al.* Staphylococcus aureus Infects Osteoclasts and Replicates Intracellularly. *mBio* **10**, e02447-19 (2019).
157. Rosenberg, N., Rosenberg, O. & Soudry, M. Osteoblasts in bone physiology-mini review. *Rambam Maimonides Med. J.* **3**, e0013 (2012).
158. Knothe Tate, M. L., Adamson, J. R., Tami, A. E. & Bauer, T. W. The osteocyte. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 1–8 (2004).
159. Kalajzic, I. A New Osteocytic Cell Line, Raising New Questions and Opportunities. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **34**, 977–978 (2019).
160. Kalajzic, I. *et al.* In vitro and in vivo approaches to study osteocyte biology. *Bone* **54**, 296–306 (2013).
161. Marro, F. C. *et al.* In vitro antibiotic activity against intraosteoblastic Staphylococcus aureus : a narrative review of the literature. *J. Antimicrob. Chemother.* **76**, 3091–3102 (2021).
162. Franz, B., Davies, M. E. & Horner, A. Localization of viable bacteria and bacterial antigens in arthritic joints of Erysipelothrix rhusiopathiae-infected pigs. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **12**, 137–142 (1995).
163. Pischon, N. *et al.* Effects of Porphyromonas gingivalis on cell cycle progression and apoptosis of primary human chondrocytes. *Ann. Rheum. Dis.* **68**, 1902–1907 (2009).
164. Garzoni, C. & Kelley, W. L. Return of the Trojan horse: intracellular phenotype switching and immune evasion by Staphylococcus aureus. *EMBO Mol. Med.* **3**, 115–117 (2011).

165. 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).
166. Edwards, A. M., Potts, J. R., Josefsson, E. & Massey, R. C. *Staphylococcus aureus* host cell invasion and virulence in sepsis is facilitated by the multiple repeats within FnBPA. *PLoS Pathog.* **6**, e1000964 (2010).
167. Dziewanowska, K. *et al.* Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect. Immun.* **67**, 4673–4678 (1999).
168. Roper, P. M., Shao, C. & Veis, D. J. Multitasking by the OC Lineage during Bone Infection: Bone Resorption, Immune Modulation, and Microbial Niche. *Cells* **9**, 2157 (2020).
169. 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).
170. Foster, T. J. Surface Proteins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Spectr.* **7**, 7.4.2 (2019).
171. Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K. & Höök, M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 49–62 (2014).
172. 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).
173. Zong, Y. *et al.* A ‘Collagen Hug’ model for *Staphylococcus aureus* CNA binding to collagen. *EMBO J.* **24**, 4224–4236 (2005).
174. Hair, P. S., Ward, M. D., Semmes, O. J., Foster, T. J. & Cunnion, K. M. *Staphylococcus aureus* clumping factor A binds to complement regulator factor I and increases factor I cleavage of C3b. *J. Infect. Dis.* **198**, 125–133 (2008).
175. Hair, P. S. *et al.* Clumping factor A interaction with complement factor I increases C3b cleavage on the bacterial surface of *Staphylococcus aureus* and decreases complement-mediated phagocytosis. *Infect. Immun.* **78**, 1717–1727 (2010).
176. Elasri, M. O. *et al.* *Staphylococcus aureus* collagen adhesin contributes to the pathogenesis of osteomyelitis. *Bone* **30**, 275–280 (2002).
177. Tung, H. s *et al.* A bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal Sdr family. *Biochem. J.* **345 Pt 3**, 611–619 (2000).
178. Smeltzer, M. S. & Gillaspay, A. F. Molecular pathogenesis of staphylococcal osteomyelitis. *Poult. Sci.* **79**, 1042–1049 (2000).
179. Patti, J. M. *et al.* Molecular characterization and expression of a gene encoding a *Staphylococcus aureus* collagen adhesin. *J. Biol. Chem.* **267**, 4766–4772 (1992).
180. Rydén, C. *et al.* Selective binding of bone matrix sialoprotein to *Staphylococcus aureus* in osteomyelitis. *Lancet Lond. Engl.* **2**, 515 (1987).
181. Rydén, C. *et al.* Specific binding of bone sialoprotein to *Staphylococcus aureus* isolated from patients with osteomyelitis. *Eur. J. Biochem.* **184**, 331–336 (1989).
182. Ryding, U., Flock, J. I., Flock, M., Söderquist, B. & Christensson, B. Expression of collagen-binding protein and types 5 and 8 capsular polysaccharide in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* **176**, 1096–1099 (1997).
183. Thomas, M. G., Peacock, S., Daenke, S. & Berendt, A. R. Adhesion of *Staphylococcus aureus* to Collagen Is Not a Major Virulence Determinant for Septic Arthritis, Osteomyelitis, or Endocarditis. *J. Infect. Dis.* **179**, 291–293 (1999).
184. Burke, F. M., Di Poto, A., Speziale, P. & Foster, T. J. The A domain of fibronectin-binding protein B of *Staphylococcus aureus* contains a novel fibronectin binding site. *FEBS J.* **278**, 2359–2371 (2011).
185. Deivanayagam, C. C. S. *et al.* A novel variant of the immunoglobulin fold in surface adhesins of *Staphylococcus aureus*: crystal structure of the fibrinogen-binding MSCRAMM, clumping factor A. *EMBO J.* **21**, 6660–6672 (2002).

186. Ganesh, V. K. *et al.* A Structural Model of the Staphylococcus aureus ClfA–Fibrinogen Interaction Opens New Avenues for the Design of Anti-Staphylococcal Therapeutics. *PLOS Pathog.* **4**, e1000226 (2008).
187. Vazquez, V. *et al.* Fibrinogen is a ligand for the Staphylococcus aureus microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM) bone sialoprotein-binding protein (Bbp). *J. Biol. Chem.* **286**, 29797–29805 (2011).
188. Geoghegan, J. A., Monk, I. R., O’Gara, J. P. & Foster, T. J. Subdomains N2N3 of Fibronectin Binding Protein A Mediate Staphylococcus aureus Biofilm Formation and Adherence to Fibrinogen Using Distinct Mechanisms. *J. Bacteriol.* **195**, 2675–2683 (2013).
189. Josse, J., Laurent, F. & Diot, A. Staphylococcal Adhesion and Host Cell Invasion: Fibronectin-Binding and Other Mechanisms. *Front. Microbiol.* **8**, 2433 (2017).
190. O’Neill, E. *et al.* A novel Staphylococcus aureus biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. *J. Bacteriol.* **190**, 3835–3850 (2008).
191. Shinji, H. *et al.* Role of Fibronectin-Binding Proteins A and B in In Vitro Cellular Infections and In Vivo Septic Infections by Staphylococcus aureus. *Infect. Immun.* **79**, 2215–2223 (2011).
192. Kerro Dego, O., van Dijk, J. E. & Nederbragt, H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine Staphylococcus aureus mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. *Vet. Q.* **24**, 181–198 (2002).
193. Ellington, J. K. *et al.* Mechanisms of Staphylococcus aureus invasion of cultured osteoblasts. *Microb. Pathog.* **26**, 317–323 (1999).
194. Aly, R., Shinefield, H. R., Litz, C. & Maibach, H. I. Role of teichoic acid in the binding of Staphylococcus aureus to nasal epithelial cells. *J. Infect. Dis.* **141**, 463–465 (1980).
195. Tran Van Nhieu, G. & Isberg, R. R. Bacterial internalization mediated by beta 1 chain integrins is determined by ligand affinity and receptor density. *EMBO J.* **12**, 1887–1895 (1993).
196. Sinha, B. *et al.* Fibronectin-binding protein acts as Staphylococcus aureus invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1. *Cell. Microbiol.* **1**, 101–117 (1999).
197. Fowler, T. *et al.* Cellular invasion by Staphylococcus aureus involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *Eur. J. Cell Biol.* **79**, 672–679 (2000).
198. Grundmeier, M. *et al.* Truncation of fibronectin-binding proteins in Staphylococcus aureus strain Newman leads to deficient adherence and host cell invasion due to loss of the cell wall anchor function. *Infect. Immun.* **72**, 7155–7163 (2004).
199. Roche, F. M. *et al.* The N-terminal A domain of fibronectin-binding proteins A and B promotes adhesion of Staphylococcus aureus to elastin. *J. Biol. Chem.* **279**, 38433–38440 (2004).
200. Wann, E. R., Gurusiddappa, S. & Hook, M. The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of Staphylococcus aureus is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen. *J. Biol. Chem.* **275**, 13863–13871 (2000).
201. Burke, F. M., McCormack, N., Rindi, S., Speziale, P. & Foster, T. J. Fibronectin-binding protein B variation in Staphylococcus aureus. *BMC Microbiol.* **10**, 160 (2010).
202. Schwarz-Linek, U. *et al.* Pathogenic bacteria attach to human fibronectin through a tandem beta-zipper. *Nature* **423**, 177–181 (2003).
203. Fowler, T., Johansson, S., Wary, K. K. & Höök, M. Src kinase has a central role in in vitro cellular internalization of Staphylococcus aureus. *Cell. Microbiol.* **5**, 417–426 (2003).
204. Edwards, A. M., Potter, U., Meenan, N. A. G., Potts, J. R. & Massey, R. C. Staphylococcus aureus Keratinocyte Invasion Is Dependent upon Multiple High-Affinity Fibronectin-Binding Repeats within FnBPA. *PLOS ONE* **6**, e18899 (2011).
205. Bingham, R. J. *et al.* Crystal structures of fibronectin-binding sites from *Staphylococcus aureus* FnBPA in complex with fibronectin domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 12254–12258 (2008).
206. Testoni, F. *et al.* Internalization by osteoblasts of two Staphylococcus aureus clinical isolates differing in their adhesin gene pattern. *Int. J. Artif. Organs* **34**, 789–798 (2011).

207. Agerer, F. *et al.* Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* reveals a functional link between focal adhesion kinase and cortactin in integrin-mediated internalisation. *J. Cell Sci.* **118**, 2189–2200 (2005).
208. Selbach, M. & Backert, S. Cortactin: an Achilles' heel of the actin cytoskeleton targeted by pathogens. *Trends Microbiol.* **13**, 181–189 (2005).
209. Oviedo-Boyso, J. *et al.* The phosphoinositide-3-kinase-Akt signaling pathway is important for *Staphylococcus aureus* internalization by endothelial cells. *Infect. Immun.* **79**, 4569–4577 (2011).
210. Wang, J.-H. *et al.* Involvement of phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt signaling pathway in $\beta 1$ integrin-mediated internalization of *Staphylococcus aureus* by alveolar epithelial cells. *J. Microbiol. Seoul Korea* **51**, 644–650 (2013).
211. Abel, J. *et al.* *Staphylococcus aureus* evades the extracellular antimicrobial activity of mast cells by promoting its own uptake. *J. Innate Immun.* **3**, 495–507 (2011).
212. Goldmann, O., Tuchscher, L., Rohde, M. & Medina, E. α -Hemolysin enhances *Staphylococcus aureus* internalization and survival within mast cells by modulating the expression of $\beta 1$ integrin. *Cell. Microbiol.* **18**, 807–819 (2016).
213. Corrigan, R. M., Miajlovic, H. & Foster, T. J. Surface proteins that promote adherence of *Staphylococcus aureus* to human desquamated nasal epithelial cells. *BMC Microbiol.* **9**, 22 (2009).
214. Askarian, F. *et al.* The interaction between *Staphylococcus aureus* SdrD and desmoglein 1 is important for adhesion to host cells. *Sci. Rep.* **6**, 22134 (2016).
215. Hirschhausen, N. *et al.* A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin Atl and heat shock cognate protein Hsc70 as host cell receptor. *Cell. Microbiol.* **12**, 1746–1764 (2010).
216. Yang, Y.-H. *et al.* Structural Insights into SraP-Mediated *Staphylococcus aureus* Adhesion to Host Cells. *PLoS Pathog.* **10**, e1004169 (2014).
217. Ashraf, S., Cheng, J. & Zhao, X. Clumping factor A of *Staphylococcus aureus* interacts with AnnexinA2 on mammary epithelial cells. *Sci. Rep.* **7**, 40608 (2017).
218. McDonnell, C. J. *et al.* Inhibition of major integrin $\alpha V \beta 3$ reduces *Staphylococcus aureus* attachment to sheared human endothelial cells. *J. Thromb. Haemost. JTH* **14**, 2536–2547 (2016).
219. Claes, J. *et al.* Clumping factor A, von Willebrand factor-binding protein and von Willebrand factor anchor *Staphylococcus aureus* to the vessel wall. *J. Thromb. Haemost. JTH* **15**, 1009–1019 (2017).
220. Sitkiewicz, I., Babiak, I. & Hryniewicz, W. Characterization of transcription within sdr region of *Staphylococcus aureus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **99**, 409–416 (2011).
221. Hussain, M. *et al.* Insertional Inactivation of eap in *Staphylococcus aureus* Strain Newman Confers Reduced Staphylococcal Binding to Fibroblasts. *Infect. Immun.* **70**, 2933–2940 (2002).
222. Kerro-Dego, O., Prysliak, T., Perez-Casal, J. & Potter, A. A. Role of GapC in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. *Vet. Microbiol.* **156**, 443–447 (2012).
223. Truong-Bolduc, Q. C., Khan, N. S., Vyas, J. M. & Hooper, D. C. Tet38 Efflux Pump Affects *Staphylococcus aureus* Internalization by Epithelial Cells through Interaction with CD36 and Contributes to Bacterial Escape from Acidic and Nonacidic Phagolysosomes. *Infect. Immun.* **85**, e00862-16 (2017).
224. Dziewanowska, K. *et al.* Staphylococcal fibronectin binding protein interacts with heat shock protein 60 and integrins: role in internalization by epithelial cells. *Infect. Immun.* **68**, 6321–6328 (2000).
225. Kusch, H. & Engelmann, S. Secrets of the secretome in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* **304**, 133–141 (2014).
226. Cooper, L. Z., Madoff, M. A. & Weinstein, L. Heat stability and species range of purified staphylococcal alpha-toxin. *J. Bacteriol.* **91**, 1686–1692 (1966).
227. Grimminger, F. *et al.* Human endothelial cell activation and mediator release in response to the bacterial exotoxins *Escherichia coli* hemolysin and staphylococcal alpha-toxin. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **159**, 1909–1916 (1997).

228. Inoshima, I. *et al.* A Staphylococcus aureus pore-forming toxin subverts the activity of ADAM10 to cause lethal infection in mice. *Nat. Med.* **17**, 1310–1314 (2011).
229. Nygaard, T. K. *et al.* Alpha-Toxin Induces Programmed Cell Death of Human T cells, B cells, and Monocytes during USA300 Infection. *PLoS ONE* **7**, e36532 (2012).
230. Gouaux, J. E. *et al.* Subunit stoichiometry of staphylococcal alpha-hemolysin in crystals and on membranes: a heptameric transmembrane pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 12828–12831 (1994).
231. Wilke, G. A. & Bubeck Wardenburg, J. Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in Staphylococcus aureus alpha-hemolysin-mediated cellular injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 13473–13478 (2010).
232. Alonzo, F. & Torres, V. J. The bicomponent pore-forming leucocidins of Staphylococcus aureus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **78**, 199–230 (2014).
233. Seilie, E. S. & Bubeck Wardenburg, J. Staphylococcus aureus pore-forming toxins: The interface of pathogen and host complexity. *Semin. Cell Dev. Biol.* **72**, 101–116 (2017).
234. 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).
235. Koop, G. *et al.* Identification of LukPQ, a novel, equid-adapted leukocidin of Staphylococcus aureus. *Sci. Rep.* **7**, 40660 (2017).
236. Vrieling, M. *et al.* LukMF' is the major secreted leukocidin of bovine Staphylococcus aureus and is produced in vivo during bovine mastitis. *Sci. Rep.* **6**, 37759 (2016).
237. Yamada, T. *et al.* Leukotoxin family genes in Staphylococcus aureus isolated from domestic animals and prevalence of lukM-lukF-PV genes by bacteriophages in bovine isolates. *Vet. Microbiol.* **110**, 97–103 (2005).
238. Chatterjee, S. S. *et al.* Essential Staphylococcus aureus toxin export system. *Nat. Med.* **19**, 364–367 (2013).
239. Surewaard, B. G. J. *et al.* Inactivation of Staphylococcal Phenol Soluble Modulins by Serum Lipoprotein Particles. *PLOS Pathog.* **8**, e1002606 (2012).
240. Surewaard, B. G. J. *et al.* Staphylococcal alpha-phenol soluble modulins contribute to neutrophil lysis after phagocytosis. *Cell. Microbiol.* **15**, 1427–1437 (2013).
241. Rasigade, J.-P. *et al.* PSMs of hypervirulent Staphylococcus aureus act as intracellular toxins that kill infected osteoblasts. *PLoS One* **8**, e63176 (2013).
242. 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.e1-568.e11 (2015).
243. Abad, L. *et al.* Antibiofilm and intraosteoblastic activities of rifamycins against Staphylococcus aureus: promising in vitro profile of rifabutin. *J. Antimicrob. Chemother.* **75**, 1466–1473 (2020).
244. Burlak, C. *et al.* Global analysis of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus exoproteins reveals molecules produced in vitro and during infection. *Cell. Microbiol.* **9**, 1172–1190 (2007).
245. Stelzner, K. *et al.* Intracellular Staphylococcus aureus employs the cysteine protease staphopain A to induce host cell death in epithelial cells. *PLoS Pathog.* **17**, e1009874 (2021).
246. Cassat, J. E. *et al.* A secreted bacterial protease tailors the Staphylococcus aureus virulence repertoire to modulate bone remodeling during osteomyelitis. *Cell Host Microbe* **13**, 759–772 (2013).
247. Doery, H. M., Magnusson, B. J., Cheyne, I. M. & Sulasekharam, J. A phospholipase in staphylococcal toxin which hydrolyses sphingomyelin. *Nature* **198**, 1091–1092 (1963).
248. White, M. J., Boyd, J. M., Horswill, A. R. & Nauseef, W. M. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C contributes to survival of Staphylococcus aureus USA300 in human blood and neutrophils. *Infect. Immun.* **82**, 1559–1571 (2014).
249. Jenul, C. & Horswill, A. R. Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. *Microbiol. Spectr.* **7**, 7.2.29 (2019).

250. Recsei, P. *et al.* Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by agar. *Mol. Gen. Genet. MGG* **202**, 58–61 (1986).
251. Thoendel, M., Kavanaugh, J. S., Flack, C. E. & Horswill, A. R. Peptide signaling in the *Staphylococci*. *Chem. Rev.* **111**, 117–151 (2011).
252. Dunman, P. M. *et al.* Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the *agr* and/or *sarA* loci. *J. Bacteriol.* **183**, 7341–7353 (2001).
253. Peng, H. L., Novick, R. P., Kreiswirth, B., Kornblum, J. & Schlievert, P. Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **170**, 4365–4372 (1988).
254. 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).
255. Thoendel, M. & Horswill, A. R. Biosynthesis of peptide signals in gram-positive bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.* **71**, 91–112 (2010).
256. Kavanaugh, J. S., Thoendel, M. & Horswill, A. R. A role for type I signal peptidase in *Staphylococcus aureus* quorum sensing. *Mol. Microbiol.* **65**, 780–798 (2007).
257. Novick, R. P. *et al.* The *agr* P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen. Genet. MGG* **248**, 446–458 (1995).
258. Lina, G. *et al.* Transmembrane topology and histidine protein kinase activity of AgrC, the *agr* signal receptor in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **28**, 655–662 (1998).
259. Koenig, R. L., Ray, J. L., Maleki, S. J., Smeltzer, M. S. & Hurlburt, B. K. *Staphylococcus aureus* AgrA binding to the RNAIII-*agr* regulatory region. *J. Bacteriol.* **186**, 7549–7555 (2004).
260. 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).
261. Morfeldt, E., Taylor, D., von Gabain, A. & Arvidson, S. Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII. *EMBO J.* **14**, 4569–4577 (1995).
262. Bronner, S., Stoessel, P., Gravet, A., Monteil, H. & Prévost, G. Variable Expressions of *Staphylococcus aureus* Bicomponent Leucotoxins Semiquantified by Competitive Reverse Transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3931–3938 (2000).
263. Vandenesch, F., Kornblum, J. & Novick, R. P. A temporal signal, independent of *agr*, is required for *hla* but not *spa* transcription in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **173**, 6313–6320 (1991).
264. Wolz, C. *et al.* Agr-independent regulation of fibronectin-binding protein(s) by the regulatory locus *sar* in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **36**, 230–243 (2000).
265. Novick, R. P. *et al.* Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J.* **12**, 3967–3975 (1993).
266. Schwan, W. R., Langhorne, M. H., Ritchie, H. D. & Stover, C. K. Loss of hemolysin expression in *Staphylococcus aureus agr* mutants correlates with selective survival during mixed infections in murine abscesses and wounds. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **38**, 23–28 (2003).
267. Quave, C. L. *et al.* *Castanea sativa* (European Chestnut) Leaf Extracts Rich in Ursene and Oleanene Derivatives Block *Staphylococcus aureus* Virulence and Pathogenesis without Detectable Resistance. *PLOS ONE* **10**, e0136486 (2015).
268. 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).
269. Paharik, A. E. *et al.* Coagulase-Negative Staphylococcal Strain Prevents *Staphylococcus aureus* Colonization and Skin Infection by Blocking Quorum Sensing. *Cell Host Microbe* **22**, 746-756.e5 (2017).
270. Mayville, P. *et al.* Structure-activity analysis of synthetic autoinducing thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus* responsible for virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 1218–1223 (1999).

271. 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).
272. Bubeck Wardenburg, J., Bae, T., Otto, M., Deleo, F. R. & Schneewind, O. Poring over pores: alpha-hemolysin and Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Nat. Med.* **13**, 1405–1406 (2007).
273. Heyer, G. *et al.* *Staphylococcus aureus* agr and sarA functions are required for invasive infection but not inflammatory responses in the lung. *Infect. Immun.* **70**, 127–133 (2002).
274. Bubeck Wardenburg, J., Patel, R. J. & Schneewind, O. Surface proteins and exotoxins are required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Infect. Immun.* **75**, 1040–1044 (2007).
275. Wright, J. S., Jin, R. & Novick, R. P. Transient interference with staphylococcal quorum sensing blocks abscess formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 1691–1696 (2005).
276. Todd, D. A. *et al.* Signal Biosynthesis Inhibition with Ambuic Acid as a Strategy To Target Antibiotic-Resistant Infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, e00263-17 (2017).
277. Gillaspay, A. F. *et al.* Role of the accessory gene regulator (agr) in pathogenesis of staphylococcal osteomyelitis. *Infect. Immun.* **63**, 3373–3380 (1995).
278. Sinha, B. & Fraunholz, M. *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 170–175 (2010).
279. Gresham, H. D. *et al.* Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **164**, 3713–3722 (2000).
280. Siegmund, A. *et al.* Intracellular persistence of *Staphylococcus aureus* in endothelial cells is promoted by the absence of phenol-soluble modulins. *Virulence* **12**, 1186–1198 (2021).
281. Deretic, V. Autophagy in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* **26**, 523–528 (2005).
282. Knodler, L. A. & Celli, J. Eating the strangers within: host control of intracellular bacteria via xenophagy. *Cell. Microbiol.* **13**, 1319–1327 (2011).
283. Vural, A. & Kehrl, J. H. Autophagy in macrophages: impacting inflammation and bacterial infection. *Scientifica* **2014**, 825463 (2014).
284. Schnaith, A. *et al.* *Staphylococcus aureus* subvert autophagy for induction of caspase-independent host cell death. *J. Biol. Chem.* **282**, 2695–2706 (2007).
285. Mestre, M. B., Fader, C. M., Sola, C. & Colombo, M. I. Alpha-hemolysin is required for the activation of the autophagic pathway in *Staphylococcus aureus*-infected cells. *Autophagy* **6**, 110–125 (2010).
286. Gauron, M. C., Newton, A. C. & Colombo, M. I. PKC α Is Recruited to *Staphylococcus aureus*-Containing Phagosomes and Impairs Bacterial Replication by Inhibition of Autophagy. *Front. Immunol.* **12**, 662987 (2021).
287. Neumann, Y. *et al.* Intracellular *Staphylococcus aureus* eludes selective autophagy by activating a host cell kinase. *Autophagy* **12**, 2069–2084 (2016).
288. Bravo-Santano, N. *et al.* Intracellular *Staphylococcus aureus* Modulates Host Central Carbon Metabolism To Activate Autophagy. *mSphere* **3**, e00374-18 (2018).
289. Kahl, B. C. *et al.* *Staphylococcus aureus* RN6390 Replicates and Induces Apoptosis in a Pulmonary Epithelial Cell Line. *Infect. Immun.* **68**, 5385–5392 (2000).
290. Moldovan, A. & Fraunholz, M. J. In or out: Phagosomal escape of *Staphylococcus aureus*. *Cell. Microbiol.* **21**, e12997 (2019).
291. Bayles, K. W. *et al.* Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect. Immun.* **66**, 336–342 (1998).
292. Strobel, M. *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. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **22**, 799–809 (2016).
293. Grosz, M. *et al.* Cytoplasmic replication of *Staphylococcus aureus* upon phagosomal escape triggered by phenol-soluble modulins. *Cell. Microbiol.* **16**, 451–465 (2014).
294. Blättner, S. *et al.* *Staphylococcus aureus* Exploits a Non-ribosomal Cyclic Dipeptide to Modulate Survival within Epithelial Cells and Phagocytes. *PLoS Pathog.* **12**, e1005857 (2016).

295. Qazi, S. N. A. *et al.* agr Expression Precedes Escape of Internalized Staphylococcus aureus from the Host Endosome. *Infect. Immun.* **69**, 7074–7082 (2001).
296. Giese, B. *et al.* Expression of δ -toxin by Staphylococcus aureus mediates escape from phago-endosomes of human epithelial and endothelial cells in the presence of β -toxin. *Cell. Microbiol.* **13**, 316–329 (2011).
297. Diep, B. A. *et al.* Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Lancet Lond. Engl.* **367**, 731–739 (2006).
298. Jarry, T. M., Memmi, G. & Cheung, A. L. The expression of alpha-haemolysin is required for Staphylococcus aureus phagosomal escape after internalization in CFT-1 cells. *Cell. Microbiol.* **10**, 1801–1814 (2008).
299. Jarry, T. M. & Cheung, A. L. Staphylococcus aureus escapes more efficiently from the phagosome of a cystic fibrosis bronchial epithelial cell line than from its normal counterpart. *Infect. Immun.* **74**, 2568–2577 (2006).
300. Giese, B. *et al.* Staphylococcal Alpha-Toxin Is Not Sufficient To Mediate Escape from Phagolysosomes in Upper-Airway Epithelial Cells. *Infect. Immun.* **77**, 3611–3625 (2009).
301. Chi, C.-Y. *et al.* Panton-Valentine Leukocidin Facilitates the Escape of Staphylococcus aureus From Human Keratinocyte Endosomes and Induces Apoptosis. *J. Infect. Dis.* **209**, 224–235 (2014).
302. Rollin, G. *et al.* Intracellular Survival of Staphylococcus aureus in Endothelial Cells: A Matter of Growth or Persistence. *Front. Microbiol.* **8**, 1354 (2017).
303. Palma Medina, L. M. *et al.* Metabolic Cross-talk Between Human Bronchial Epithelial Cells and Internalized Staphylococcus aureus as a Driver for Infection*. *Mol. Cell. Proteomics* **18**, 892–908 (2019).
304. Krut, O., Utermöhlen, O., Schlossherr, X. & Krönke, M. Strain-Specific Association of Cytotoxic Activity and Virulence of Clinical Staphylococcus aureus Isolates. *Infect. Immun.* **71**, 2716–2723 (2003).
305. Haslinger-Löffler, B. *et al.* Staphylococcus aureus induces caspase-independent cell death in human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int.* **70**, 1089–1098 (2006).
306. Haslinger-Löffler, B. *et al.* Multiple virulence factors are required for Staphylococcus aureus-induced apoptosis in endothelial cells. *Cell. Microbiol.* **7**, 1087–1097 (2005).
307. 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).
308. Haslinger, B., Strangfeld, K., Peters, G., Schulze-Osthoff, K. & Sinha, B. Staphylococcus aureus alpha-toxin induces apoptosis in peripheral blood mononuclear cells: role of endogenous tumour necrosis factor-alpha and the mitochondrial death pathway. *Cell. Microbiol.* **5**, 729–741 (2003).
309. Bantel, H. *et al.* alpha-Toxin is a mediator of Staphylococcus aureus-induced cell death and activates caspases via the intrinsic death pathway independently of death receptor signaling. *J. Cell Biol.* **155**, 637–648 (2001).
310. Walev, I. *et al.* Staphylococcal alpha-toxin kills human keratinocytes by permeabilizing the plasma membrane for monovalent ions. *Infect. Immun.* **61**, 4972–4979 (1993).
311. Soe, Y. M., Bedoui, S., Stinear, T. P. & Hachani, A. Intracellular Staphylococcus aureus and host cell death pathways. *Cell. Microbiol.* **23**, e13317 (2021).
312. Muñoz-Planillo, R., Franchi, L., Miller, L. S. & Núñez, G. A critical role for hemolysins and bacterial lipoproteins in Staphylococcus aureus-induced activation of the Nlrp3 inflammasome. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 3942–3948 (2009).
313. Tucker, K. A., Reilly, S. S., Leslie, C. S. & Hudson, M. C. Intracellular Staphylococcus aureus induces apoptosis in mouse osteoblasts. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**, 151–156 (2000).
314. Mohamed, W. *et al.* Intracellular proliferation of S. aureus in osteoblasts and effects of rifampicin and gentamicin on S. aureus intracellular proliferation and survival. *Eur. Cell. Mater.* **28**, 258–268 (2014).
315. Imre, G. & Rajalingam, K. Role for caspase-2 during pore-forming toxin-mediated apoptosis. *Cell Cycle* **11**, 3709 (2012).

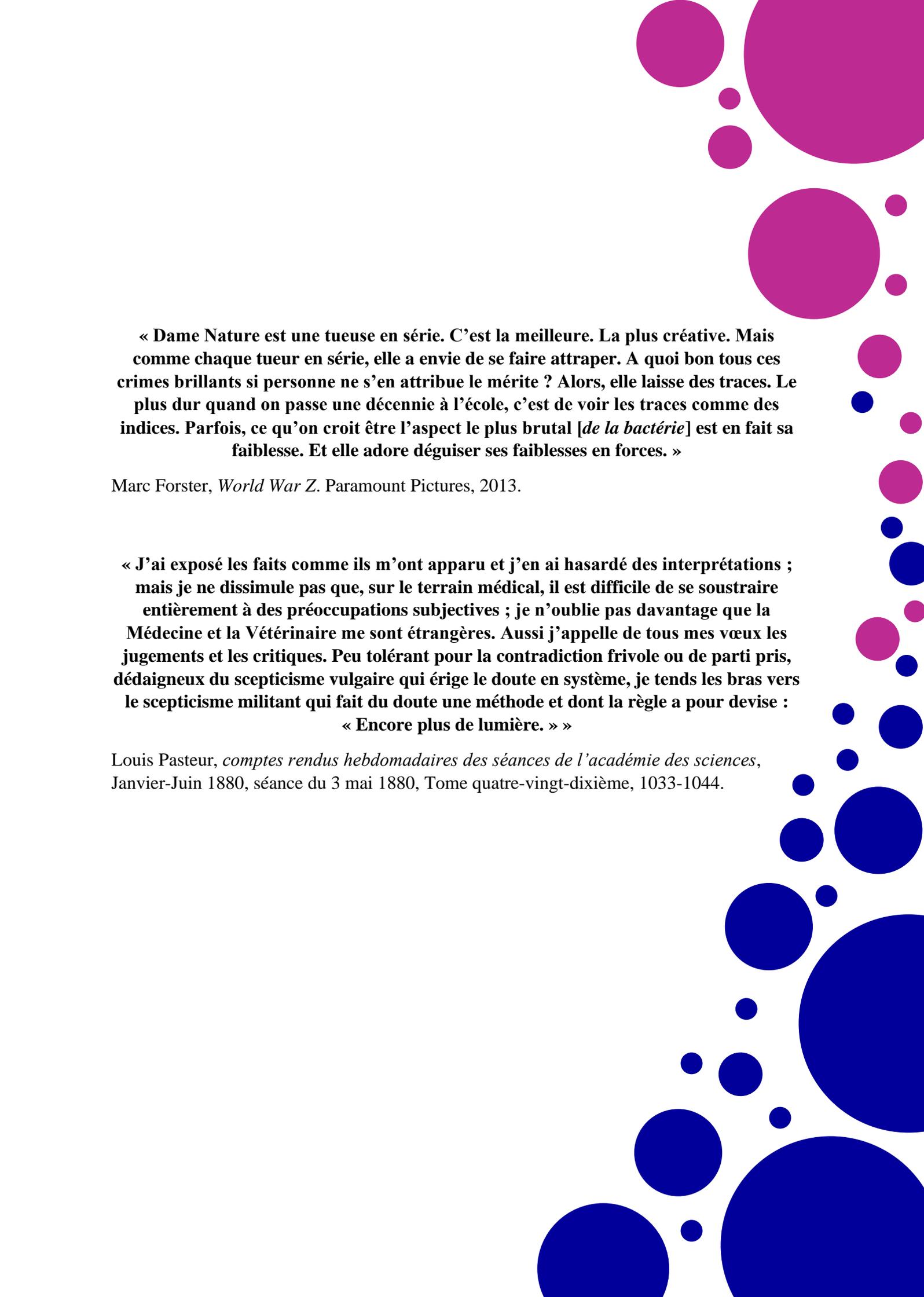
316. Alexander, E. H. *et al.* Staphylococcus aureus and Salmonella enterica serovar Dublin induce tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand expression by normal mouse and human osteoblasts. *Infect. Immun.* **69**, 1581–1586 (2001).
317. Kapral, F. A. & Shayegani, M. G. Intracellular survival of staphylococci. *J. Exp. Med.* **110**, 123–138 (1959).
318. Melly, M. A., Thomison, J. B. & Rogers, D. E. Fate of staphylococci within human leukocytes. *J. Exp. Med.* **112**, 1121–1130 (1960).
319. Rogers, D. E. & Tompsett, R. The survival of staphylococci within human leukocytes. *J. Exp. Med.* **95**, 209–230 (1952).
320. Tuchscher, L. *et al.* Sigma Factor SigB Is Crucial to Mediate Staphylococcus aureus Adaptation during Chronic Infections. *PLoS Pathog.* **11**, e1004870 (2015).
321. Tuchscher, L. *et al.* Staphylococcus aureus phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Mol. Med.* **3**, 129–141 (2011).
322. Valour, F. *et al.* Antimicrobial Activity against Intraosteoblastic Staphylococcus aureus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 2029–2036 (2015).
323. Schröder, A., Kland, R., Peschel, A., von Eiff, C. & Aepfelbacher, M. Live cell imaging of phagosome maturation in Staphylococcus aureus infected human endothelial cells: small colony variants are able to survive in lysosomes. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* **195**, 185–194 (2006).
324. Gunaratnam, G. *et al.* ClpC affects the intracellular survival capacity of Staphylococcus aureus in non-professional phagocytic cells. *Sci. Rep.* **9**, 16267 (2019).
325. Schwartz, J., Leidal, K. G., Femling, J. K., Weiss, J. P. & Nauseef, W. M. Neutrophil bleaching of GFP-expressing staphylococci: probing the intraphagosomal fate of individual bacteria. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 2632–2641 (2009).
326. Koziel, J. *et al.* Phagocytosis of Staphylococcus aureus by macrophages exerts cytoprotective effects manifested by the upregulation of antiapoptotic factors. *PLoS One* **4**, e5210 (2009).
327. Youssouf, N. *et al.* Staphylococcus aureus Decreases SUMOylation Host Response to Promote Intramacrophage Survival. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 8108 (2021).
328. Marro, F. C., Laurent, F., Josse, J. & Blocker, A. J. Methods to monitor bacterial growth and replicative rates at the single-cell level. *FEMS Microbiol. Rev.* **30** (2022).
329. Ueckert, J. E., Nebe von-Caron, G., Bos, A. P. & Ter Steeg, P. F. Flow cytometric analysis of *Lactobacillus plantarum* to monitor lag times, cell division and injury. *Lett. Appl. Microbiol.* **25**, 295–299 (1997).
330. Flannagan, R. S. & Heinrichs, D. E. A Fluorescence Based-Proliferation Assay for the Identification of Replicating Bacteria Within Host Cells. *Front. Microbiol.* **9**, 3084 (2018).
331. Sturm, A. *et al.* The Cost of Virulence: Retarded Growth of Salmonella Typhimurium Cells Expressing Type III Secretion System 1. *PLoS Pathog.* **7**, e1002143 (2011).
332. Kerr, M. C. *et al.* Inhibition of the PtdIns(5) kinase PIKfyve disrupts intracellular replication of Salmonella. *EMBO J.* **29**, 1331–1347 (2010).
333. Malik-Kale, P., Winfree, S. & Steele-Mortimer, O. The Bimodal Lifestyle of Intracellular Salmonella in Epithelial Cells: Replication in the Cytosol Obscures Defects in Vacuolar Replication. *PLoS ONE* **7**, e38732 (2012).
334. Rubio, T. *et al.* Incidence of an Intracellular Multiplication Niche among Acinetobacter baumannii Clinical Isolates. *mSystems* **7**, e0048821 (2022).
335. Hommes, J. W. & Surewaard, B. G. J. Intracellular Habitation of Staphylococcus aureus: Molecular Mechanisms and Prospects for Antimicrobial Therapy. *Biomedicines* **10**, 1804 (2022).
336. Flannagan, R. S., Heit, B. & Heinrichs, D. E. Intracellular replication of *Staphylococcus aureus* in mature phagolysosomes in macrophages precedes host cell death, and bacterial escape and dissemination: *S. aureus* replicates in mature phagolysosomes in macrophages. *Cell. Microbiol.* **18**, 514–535 (2016).

337. 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).
338. Olivier, A. C., Lemaire, S., Van Bambeke, F., Tulkens, P. M. & Oldfield, E. Role of rsbU and staphyloxanthin in phagocytosis and intracellular growth of *Staphylococcus aureus* in human macrophages and endothelial cells. *J. Infect. Dis.* **200**, 1367–1370 (2009).
339. Raineri, E. J. M., Yedavally, H., Salvati, A. & van Dijk, J. M. Time-resolved analysis of *Staphylococcus aureus* invading the endothelial barrier. *Virulence* **11**, 1623–1639 (2020).
340. Bigger, J. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *The Lancet* **244**, 497–500 (1944).
341. Hobby, G. L., Meyer, K. & Chaffee, E. Observations on the Mechanism of Action of Penicillin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **50**, 281–285 (1942).
342. Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L. & Leibler, S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* **305**, 1622–1625 (2004).
343. Wood, T. K., Song, S. & Yamasaki, R. Ribosome dependence of persister cell formation and resuscitation. *J. Microbiol.* **57**, 213–219 (2019).
344. Balaban, N. Q. *et al.* Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 441–448 (2019).
345. Gollan, B., Grabe, G., Michaux, C. & Helaine, S. Bacterial Persisters and Infection: Past, Present, and Progressing. *Annu. Rev. Microbiol.* **73**, 359–385 (2019).
346. Urbaniec, J., Xu, Y., Hu, Y., Hingley-Wilson, S. & McFadden, J. Phenotypic heterogeneity in persisters: a novel ‘hunker’ theory of persistence. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**, fuab042 (2022).
347. Personnic, N. *et al.* Quorum sensing modulates the formation of virulent *Legionella* persisters within infected cells. *Nat. Commun.* **10**, 5216 (2019).
348. Claudi, B. *et al.* Phenotypic Variation of *Salmonella* in Host Tissues Delays Eradication by Antimicrobial Chemotherapy. *Cell* **158**, 722–733 (2014).
349. Adams, K. N. *et al.* Drug tolerance in replicating mycobacteria mediated by a macrophage-induced efflux mechanism. *Cell* **145**, 39–53 (2011).
350. Wakamoto, Y. *et al.* Dynamic persistence of antibiotic-stressed mycobacteria. *Science* **339**, 91–95 (2013).
351. Helaine, S. *et al.* Internalization of *Salmonella* by macrophages induces formation of nonreplicating persisters. *Science* **343**, 204–208 (2014).
352. Keren, I., Kaldalu, N., Spoering, A., Wang, Y. & Lewis, K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol. Lett.* **230**, 13–18 (2004).
353. Lechner, S., Lewis, K. & Bertram, R. *Staphylococcus aureus* persisters tolerant to bactericidal antibiotics. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 235–244 (2012).
354. Johnson, P. J. T. & Levin, B. R. Pharmacodynamics, population dynamics, and the evolution of persistence in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Genet.* **9**, e1003123 (2013).
355. Vulin, C., Leimer, N., Huemer, M., Ackermann, M. & Zinkernagel, A. S. Prolonged bacterial lag time results in small colony variants that represent a sub-population of persisters. *Nat. Commun.* **9**, 4074 (2018).
356. Kamble, E. & Pardesi, K. Antibiotic Tolerance in Biofilm and Stationary-Phase Planktonic Cells of *Staphylococcus aureus*. *Microb. Drug Resist. Larchmt. N* **27**, 3–12 (2021).
357. Wang, Y. *et al.* Inactivation of TCA cycle enhances *Staphylococcus aureus* persister cell formation in stationary phase. *Sci. Rep.* **8**, 10849 (2018).
358. Conlon, B. P. *et al.* Persister formation in *Staphylococcus aureus* is associated with ATP depletion. *Nat. Microbiol.* **1**, 16051 (2016).
359. Kubistova, L., Dvoracek, L., Tkadlec, J., Melter, O. & Licha, I. Environmental Stress Affects the Formation of *Staphylococcus aureus* Persisters Tolerant to Antibiotics. *Microb. Drug Resist. Larchmt. N* **24**, 547–555 (2018).
360. Lázár, V., Snitser, O., Barkan, D. & Kishony, R. Antibiotic combinations reduce *Staphylococcus aureus* clearance. *Nature* **610**, 540–546 (2022).

361. Lechner, S., Patra, P., Klumpp, S. & Bertram, R. Interplay between population dynamics and drug tolerance of *Staphylococcus aureus* persister cells. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 381–391 (2012).
362. Singh, R., Ray, P., Das, A. & Sharma, M. Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: an in vitro study. *J. Med. Microbiol.* **58**, 1067–1073 (2009).
363. Karimaei, S., Kazem Aghamir, S. M., Foroushani, A. R. & Pourmand, M. R. Antibiotic tolerance in biofilm persister cells of *Staphylococcus aureus* and expression of toxin-antitoxin system genes. *Microb. Pathog.* **159**, 105126 (2021).
364. Bär, J. *et al.* Quantification of within-patient *Staphylococcus aureus* phenotypic heterogeneity as a proxy for the presence of persisters across clinical presentations. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **28**, 1022.e1-1022.e7 (2022).
365. Peyrusson, F., Nguyen, T. K., Najdovski, T. & Van Bambeke, F. Host Cell Oxidative Stress Induces Dormant *Staphylococcus aureus* Persisters. *Microbiol. Spectr.* **10**, e0231321 (2022).
366. Peyrusson, F. *et al.* Intracellular *Staphylococcus aureus* persisters upon antibiotic exposure. *Nat. Commun.* **11**, 2200 (2020).
367. Huemer, M. *et al.* Molecular reprogramming and phenotype switching in *Staphylococcus aureus* lead to high antibiotic persistence and affect therapy success. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **118**, e2014920118 (2021).
368. Nguyen, T. K. *et al.* The Persister Character of Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* Contributes to Faster Evolution to Resistance and Higher Survival in THP-1 Monocytes: A Study With Moxifloxacin. *Front. Microbiol.* **11**, 587364 (2020).
369. Gefen, O., Chekol, B., Strahilevitz, J. & Balaban, N. Q. TDtest: easy detection of bacterial tolerance and persistence in clinical isolates by a modified disk-diffusion assay. *Sci. Rep.* **7**, 41284 (2017).
370. Matsuo, M. *et al.* Genetic and Transcriptomic Analyses of Ciprofloxacin-Tolerant *Staphylococcus aureus* Isolated by the Replica Plating Tolerance Isolation System (REPTIS). *Antimicrob. Agents Chemother.* **63**, e02019-18 (2019).
371. Herren, S. C. *et al.* Assessing Antibiotic Tolerance of *Staphylococcus aureus* Derived Directly from Patients by the Replica Plating Tolerance Isolation System (REPTIS). *Antimicrob. Agents Chemother.* **66**, e0096721 (2022).
372. Wang, W. *et al.* Transposon Mutagenesis Identifies Novel Genes Associated with *Staphylococcus aureus* Persister Formation. *Front. Microbiol.* **6**, 1437 (2015).
373. Yee, R., Cui, P., Shi, W., Feng, J. & Zhang, Y. Genetic Screen Reveals the Role of Purine Metabolism in *Staphylococcus aureus* Persistence to Rifampicin. *Antibiot. Basel Switz.* **4**, 627–642 (2015).
374. Han, J. *et al.* Glycerol Uptake Is Important for L-Form Formation and Persistence in *Staphylococcus aureus*. *PLOS ONE* **9**, e108325 (2014).
375. Wang, X. *et al.* Involvement of Small Colony Variant-Related Heme Biosynthesis Genes in *Staphylococcus aureus* Persister Formation in vitro. *Front. Microbiol.* **12**, 756809 (2021).
376. Zalis, E. A. *et al.* Stochastic Variation in Expression of the Tricarboxylic Acid Cycle Produces Persister Cells. *mBio* **10**, e01930-19 (2019).
377. Santana, M. *et al.* *Bacillus subtilis* FOF1 ATPase: DNA sequence of the atp operon and characterization of atp mutants. *J. Bacteriol.* **176**, 6802–6811 (1994).
378. Pinel-Marie, M.-L. *et al.* RNA antitoxin SprF1 binds ribosomes to attenuate translation and promote persister cell formation in *Staphylococcus aureus*. *Nat. Microbiol.* **6**, 209–220 (2021).
379. Shang, Y. *et al.* *Staphylococcus aureus* PhoU Homologs Regulate Persister Formation and Virulence. *Front. Microbiol.* **11**, 865 (2020).
380. Bukowski, M. *et al.* *Staphylococcal* saoABC Operon Codes for a DNA-Binding Protein SaoC Implicated in the Response to Nutrient Deficit. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 6443 (2022).
381. Peng, Q. *et al.* PurN Is Involved in Antibiotic Tolerance and Virulence in *Staphylococcus aureus*. *Antibiot. Basel Switz.* **11**, 1702 (2022).

382. Bojer, M. S., Lindemose, S., Vestergaard, M. & Ingmer, H. Quorum Sensing-Regulated Phenol-Soluble Modulins Limit Persister Cell Populations in *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.* **9**, 255 (2018).
383. Baldry, M. *et al.* Phenol-Soluble Modulins Modulate Persister Cell Formation in *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.* **11**, 573253 (2020).
384. Bæk, K. T. *et al.* Genetic Variation in the *Staphylococcus aureus* 8325 Strain Lineage Revealed by Whole-Genome Sequencing. *PLoS ONE* **8**, e77122 (2013).
385. Helaine, S. *et al.* Dynamics of intracellular bacterial replication at the single cell level. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 3746–3751 (2010).
386. Tinevez, J.-Y. *et al.* TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods* **115**, 80–90 (2017).
387. CLSI. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. (11th ed. CLSI standard M07. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.).
388. CLSI. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. (29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019).
389. Rodrigues Lopes, I. *et al.* Microscopy-based phenotypic profiling of infection by *Staphylococcus aureus* clinical isolates reveals intracellular lifestyle as a prevalent feature. *Nat. Commun.* **13**, 7174 (2022).
390. Rigaille, J. *et al.* Improved Enzyme Protection Assay to Study *Staphylococcus aureus* Internalization and Intracellular Efficacy of Antimicrobial Compounds. *J. Vis. Exp. JoVE* (2021).
391. Kopf, S. H. *et al.* Trace incorporation of heavy water reveals slow and heterogeneous pathogen growth rates in cystic fibrosis sputum. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, (2016).
392. Kaldalu, N. *et al.* *In Vitro* Studies of Persister Cells. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **84**, e00070-20 (2020).
393. Greenwood, D. J. *et al.* Subcellular antibiotic visualization reveals a dynamic drug reservoir in infected macrophages. *Science* **364**, 1279–1282 (2019).
394. Fearn, A., Greenwood, D. J., Rodgers, A., Jiang, H. & Gutierrez, M. G. Correlative light electron ion microscopy reveals *in vivo* localisation of bedaquiline in *Mycobacterium tuberculosis*-infected lungs. *PLOS Biol.* **18**, e3000879 (2020).
395. Santucci, P. *et al.* Intracellular localisation of *Mycobacterium tuberculosis* affects efficacy of the antibiotic pyrazinamide. *Nat. Commun.* **12**, 3816 (2021).
396. Demarre, G. *et al.* The Crohn's disease-associated *Escherichia coli* strain LF82 relies on SOS and stringent responses to survive, multiply and tolerate antibiotics within macrophages. *PLOS Pathog.* **15**, e1008123 (2019).
397. 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.* **17**, e3000337 (2019).
398. Gold, B. *et al.* Novel Cephalosporins Selectively Active on Nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Chem.* **59**, 6027–6044 (2016).
399. Bryk, R. *et al.* Selective Killing of Nonreplicating *Mycobacteria*. *Cell Host Microbe* **3**, 137–145 (2008).
400. Grant, S. S. *et al.* Identification of novel inhibitors of non-replicating *Mycobacterium tuberculosis* using a carbon starvation model. *ACS Chem. Biol.* **8**, 10.1021/cb4004817 (2013).
401. Yamada, W. *et al.* Combination Therapy to Kill *Mycobacterium tuberculosis* in Its Nonreplicating Persister Phenotype. *Antimicrob. Agents Chemother.* **66**, e00695-22 (2022).
402. McCall, I. C., Shah, N., Govindan, A., Baquero, F. & Levin, B. R. Antibiotic Killing of Diversely Generated Populations of Nonreplicating Bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **63**, e02360-18 (2019).
403. Śliwka, P., Ochocka, M. & Skaradzińska, A. Applications of bacteriophages against intracellular bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **48**, 222–239 (2022).

404. Kolenda, C. *et al.* Evaluation of the Activity of a Combination of Three Bacteriophages Alone or in Association with Antibiotics on *Staphylococcus aureus* Embedded in Biofilm or Internalized in Osteoblasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* **64**, e02231-19 (2020).
405. Kaur, S., Harjai, K. & Chhibber, S. Bacteriophage-aided intracellular killing of engulfed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by murine macrophages. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 4653–4661 (2014).
406. Mangel, M. & Samaniego, F. J. Abraham Wald's Work on Aircraft Survivability. *J. Am. Stat. Assoc.* **79**, 259–267 (1984).
407. Gutierrez, A. *et al.* Understanding and Sensitizing Density-Dependent Persistence to Quinolone Antibiotics. *Mol. Cell* **68**, 1147-1154.e3 (2017).



« Dame Nature est une tueuse en série. C'est la meilleure. La plus créative. Mais comme chaque tueur en série, elle a envie de se faire attraper. A quoi bon tous ces crimes brillants si personne ne s'en attribue le mérite ? Alors, elle laisse des traces. Le plus dur quand on passe une décennie à l'école, c'est de voir les traces comme des indices. Parfois, ce qu'on croit être l'aspect le plus brutal [de la bactérie] est en fait sa faiblesse. Et elle adore déguiser ses faiblesses en forces. »

Marc Forster, *World War Z*. Paramount Pictures, 2013.

**« J'ai exposé les faits comme ils m'ont apparu et j'en ai hasardé des interprétations ; mais je ne dissimule pas que, sur le terrain médical, il est difficile de se soustraire entièrement à des préoccupations subjectives ; je n'oublie pas davantage que la Médecine et la Vétérinaire me sont étrangères. Aussi j'appelle de tous mes vœux les jugements et les critiques. Peu tolérant pour la contradiction frivole ou de parti pris, dédaigneux du scepticisme vulgaire qui érige le doute en système, je tends les bras vers le scepticisme militant qui fait du doute une méthode et dont la règle a pour devise :
« Encore plus de lumière. » »**

Louis Pasteur, *comptes rendus hebdomadaires des séances de l'académie des sciences*, Janvier-Juin 1880, séance du 3 mai 1880, Tome quatre-vingt-dixième, 1033-1044.